



” Locked Nucleic Acid ” nanovectorisés pour la répression de l’activité de microARN impliqués dans la radiorésistance des cellules de glioblastome

Audrey Griveau

► To cite this version:

Audrey Griveau. ” Locked Nucleic Acid ” nanovectorisés pour la répression de l’activité de microARN impliqués dans la radiorésistance des cellules de glioblastome. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d’Angers, 2013. Français. NNT : . tel-01065649

HAL Id: tel-01065649

<https://theses.hal.science/tel-01065649>

Submitted on 18 Sep 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.

Thèse de Doctorat

Audrey GRIVEAU

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : Recherche clinique, innovation technologique, santé publique

Spécialité : Neurosciences

Unité de recherche : INSERM U1066, MINT, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 3

Soutenue le : 16 Décembre 2013

Thèse N° : 1371

« Locked Nucleic Acid » nanovectorisés pour la répression de l'activité de microARN impliqués dans la radiorésistance des cellules de glioblastome

JURY

Rapporteurs :

Dr Virginie ESCRIOU, Directeur de Recherche DR2 CNRS, CNRS UMR8151-INSERM U1022, Paris
Dr Jean-Paul ISSARTEL, Directeur de Recherche DR2 CNRS, INSERM U836 Equipe 7, Grenoble

Examineurs :

Dr Patrick BARIL, Maître de conférences, Centre de Biophysique Moléculaire-CNRS UPR4301, Orléans
Pr Didier BETBEDER, Professeur des Universités, EA 4483, Lille

Directeur de Thèse :

Dr Emmanuel GARCION, Chargé de recherche CR1 INSERM, INSERM U1066, Angers

2013-2014

Thèse de Doctorat

Spécialité : Neurosciences

Ecole doctorale Biologie Santé

« Locked Nucleic Acid » nanovectorisés pour la répression de l'activité de microARN impliqués dans la radiorésistance des cellules de glioblastome

GRIVEAU Audrey |

Sous la direction du Docteur |
GARCION Emmanuel

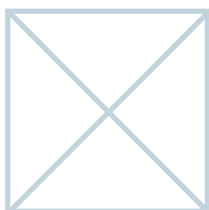
Membres du jury

ESCRIOU Virginie | Rapporteur

ISSARTEL Jean-Paul | Rapporteur

BARIL Patrick | Examineur

BETBEDER Didier | Examineur



Soutenu publiquement le :
16 Décembre 2013



L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier le Pr Jean-Pierre Benoit, directeur de l'INSERM U1066, de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie également le Dr Emmanuel Garcion, mon directeur de thèse, pour m'avoir dans un premier temps permis de réaliser mon stage de master 2, puis d'avoir su me donner l'envie de poursuivre en thèse. Sans ce stage avec toi, je ne sais pas si j'aurais poursuivie dans la recherche. Et ne t'inquiètes pas, après presque 4 ans passés au sein du laboratoire, je ne regrette rien. Merci pour le temps que tu m'as accordé, les conseils que tu m'as donnés mais également pour nos discussions scientifiques et celles qui l'étaient un peu moins. Grâce à toi, j'ai pu être compris comment on jouait aux échecs. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta carrière en espérant que l'année prochaine tu passes Directeur de Recherche.

Je remercie le Dr Virginie Escriou (Université de Paris) d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse.

Je remercie le Dr Jean-Paul Issartel (Université de Grenoble) d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail, mais également d'avoir fait parti de mon comité de suivi de thèse. Merci pour vos remarques et conseils qui m'ont permis d'avancer.

Je remercie le Pr Didier Betbeder (Université de Lille) et le Dr Patrick Baril (Université d'Orléans) d'avoir acceptés d'être examinateurs de ma thèse.

Je remercie également le Conseil général de Maine-et-Loire, la Ligue Nationale contre le Cancer et le Cancéropôle Grand-Ouest pour les aides financières dont j'ai bénéficiées pour réaliser ma thèse.

Je remercie également tous les membres de l'INSERM U1066 et toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier :

Le Dr François Hindré pour m'avoir initié à la radioactivité, même si je pense que l'on aura toujours un souci à se comprendre quand tu parles de Curie et moi de Becquerel. Merci à Camille Belloche et Annabelle Cikankowitz pour les différentes synthèses de formulations réalisées. Merci également au Dr Nicolas Lepareur de Rennes pour les éluions de rhénium.

Laurent Lemaire et Florence Franconi pour votre savoir-faire en IRM ; en effet après une petite formation avec vous je sais maintenant un petit peu me servir du logiciel, du moins faire quelques Scan. Merci Laurent pour toutes nos discussions sur le métabolisme cellulaire et la spectrométrie.

Le Pr François-Régis Bataille et les radiophysiciens de l'Institut de Cancérologie de l'Ouest d'Angers pour m'avoir permis de réaliser des irradiations externes sur des cellules. Merci à Damien Autret, Magali Edouard, Christophe Legrand, Christelle Di-Bartolo et Jérôme Mesgouez.

Albert Lisbona, Sophie Chiavassa et Caroline Noblet de l'ICO-René Gauducheau de Nantes pour les irradiations réalisées sur l'animal.

Pierre Legras et Jérôme Roux pour leurs conseils en expérimentation animale mais également Dom et Laurent qui ont su s'occuper très bien de mes petites souris pendant mon absence.

Jérôme Cayon et Catherine Guillet pour leurs aides respectifs au niveau de la qPCR et de la cytométrie en flux. Merci également à Sébastien Boni pour les expérimentations concernant la transfection.

REMERCIEMENTS

Merci également à toutes les personnes avec qui j'ai collaborées pendant ses trois ans :

Le Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans et plus particulièrement le Pr Patrick Midoux de m'avoir accueillie au sein de son unité pour la réalisation d'expérimentations. Merci également au Pr Chantal Pichon, pour ses encouragements et conseils au travers nos réunions pour mon comité de suivi de thèse et également pour avoir permis la mise en place d'échanges entre nos laboratoires. Un merci particulier à Cristine Goncalves pour sa bonne humeur, sa gentillesse et son savoir faire qu'elle a su me transmettre au cours de cette semaine à Orléans. Merci également au Dr Patrick Baril et à Safia Ezzine pour la synthèse de plasmides. Bon courage à toi, Safia pour cette dernière année de thèse.

Au Pr Lucie Karayan-Tapon et à Anaïs Balbous de l'INSERM U935 de Poitiers pour le travail collaboratif sur l'établissement du miRnome en réponse à la radiothérapie. On a réussi Anaïs à faire nos 120 extractions... J'espère que tu garderas un bon souvenir de ton passage à Angers. Bonne continuation à toi et bon courage.

Au Pr Jean Mosser et à Amandine Etcheverry de l'UMR CNRS 6061 de Rennes pour le traitement et l'analyse de données miARN pour l'établissement du miRnome.

Au Pr Didier Betbeder et au Dr Rodolphe Carpentier de l'EA4483 de Lille, pour les synthèses, les envois et les informations concernant les nanoparticules polysaccharidiques.

Mention spéciale pour l'« équipe Garcion » :

- Erika, tu es partie du labo il y a bientôt deux ans mais c'est grâce à la formation que tu m'as donnée pendant mon stage de master que j'ai pu mener à bien ma thèse. Merci pour ta bonne humeur et tes conseils. Bon courage à toi et à William.

- Sylvie, tu es arrivée au cours de ma thèse et tu as été d'une très grande aide pour moi. Merci pour tout ce temps que tu as passé, enfermée en L2, à t'occuper de mes cellules. Ne t'inquiètes pas et aie confiance en toi, tu travailles bien. Merci pour tout, et maintenant il va falloir que tu me trouves une remplaçante pour te donner plein de travail...

- Jérôme, je ne suis pas chimiste et je pense que je ne le saurais jamais. Merci pour le temps que tu as passé à m'initier au greffage. Merci aussi d'avoir su répondre présent quand j'avais des questions ou quand j'avais besoin d'aide. Je ne sais pas si tu as pris ta décision finale concernant le fait de faire une thèse, mais je pense que tu en es tout à fait capable, alors fonce. Même si il y a des jours sans, la vie est belle, Jérôme.

- Delphine, sacré fifine, et oui on en a passé des heures ensemble que ce soit à l'animalerie ou en radioactivité (là s'était plutôt du nocturne). Merci pour l'aide que tu m'as apportée et pour ta bonne humeur (je pense que ton rire restera mémorable à jamais). Bon courage pour la dernière ligne droite (je reviendrais pour ta thèse, je ne louperais en rien la fifine soutenance).

- Shubaash, merci pour les manip complémentaires que tu as réalisées mais également pour la correction de mon anglais dans l'article. Bonne continuation à Nottingham.

- Claire, tu viens d'arriver au sein de l'équipe et je suis sûre que tu vas très bien d'intégrer. Je vais te faire une donation puisque c'est toi qui reprend mon bureau et par la même occasion mes collègues de bureau (tu vas voir ils sont géniaux). Bon courage pour ton post-doc mais également pour ta nouvelle vie dans ta nouvelle maison.

REMERCIEMENTS

Mention particulière pour mon bureau de l'IRIS :

- Je ne vais pas être galante et je vais commencer par toi, Khaled. Je pense que d'être dans un bureau entièrement de filles a du être dur pour toi. Tu as eu le droit à toutes les discussions de filles possibles, mais je pense qu'à la fin, tu aimais plutôt bien cela. Et oui mon khalidou, c'est la fin de ma thèse et je vais partir. Bon courage à toi pour ta dernière année, mais ne t'inquiètes pas je serais de retour pour ta soutenance. Bon courage à 'maman' aussi pour son nouveau poste. Dès que Marie-Féta est là, n'oublis pas de m'appeler, je suis la marraine.

- Anne-Claire, on a commencé ensemble et on va partir ensemble, on a rendu nos manuscrits quasi ensemble et nos soutenances seront quasi en même temps. Et oui, la thèse c'est des manips qui ne marchent pas, des manips qui marchent une seule fois, des réunions, des papiers à écrire ; mais à la fin on y ait arrivé. Merci pour les moments passés pendant ces trois années de thèse. Comme tu as pu le voir, on part du bureau mais nos urnes sont toujours là pour nous représenter. Bon courage pour cette dernière ligne droite et pour la suite, en espérant que tu trouves ce que tu veux et de préférence à l'endroit que tu veux (proche de Rémy surtout).

- Angélique ou plutôt Suppo, la dernière arrivée dans notre bureau. Avec toi, les journées passent mais ne se ressemblent pas. Tu es une vraie joie de vivre et tu as apporté une folie supplémentaire à notre bureau. Tes discussions de très haut niveau, de people ou de bébés vont me manquer. Et oui, Suppo, il y a un moment où il faut partir, mais ne t'inquiètes pas, je te confie à Khalidou. Le jour où tu nous fais un petit avec Wiwi, ne l'emmène pas tout de suite chez le dentiste... Bon courage pour la suite, je suis certaine que ta thèse Eydo va envoyer du lourd à la fin.

- Pauline, je te confie les deux enfants de notre bureau (bon courage, car je pense que les premiers mois d'adaptation vont être durs). Tu vas rentrer dans la dernière ligne droite, mais je suis sûre que tu vas très bien t'en sortir. Je pense que toi comme moi, on se souviendra du GTRV... A l'année prochaine pour fêter ton diplôme de docteur.

Merci à vous tous pour la bonne humeur et l'entente que nous avons eu au sein de notre bureau. Bon courage à tous pour la suite.

Merci également à tous les autres doctorants et post-doctorants (de l'IBT et de l'IRIS) :

- Anne-Laure, tu es la prochaine à te lancer, je te souhaite bon courage pour la suite en espérant que tu trouves un post-doc en Angleterre.

- Nicolas, on a commencé notre stage à l'IBT et on fini notre thèse à IRIS, bonne continuation à toi.

- Leila, ma Fatou, c'est bon tu es docteur et maintenant 'T'ES TROP VIP'. Ce fut un réel plaisir de partager cette thèse avec toi, l'équipe de nuit va me manquer. Pleins de belles choses pour la suite que ce soit au niveau professionnel ou personnel (je n'oublie pas Medhi bien sur).

- Fabien, je pense que tu es unique en ton genre. Bon courage pour ta dernière année avec ton Prilling. Pleins de bonheurs avec ton petit Jules (et oui j'avais deviné le prénom) et Noémie.

- Gaël, ne t'inquiètes pas tu vas réussir à faire une aussi belle thèse que ta thèse d'exercice. Bon courage Jean-No.

- Emma, tu as été à mi-temps au labo mais à chaque fois que tu étais là, on trouvait toujours du temps pour papoter. Toi aussi, tu es sur la fin, alors bon courage pour la rédaction. Je t'ai préparé une invitation spécialement pour toi pour ma soutenance.

- Amin, tu représentes l'équipe CO₂ maintenant, l'avenir de la recherche est entre tes mains.

- JP, et non je ne t'ai pas oublié, tu es le seul doctorant qui est parti mais qui est toujours là. Merci pour tout mon petit JP. Il va falloir que tu trouves quelqu'un d'autre maintenant pour les fleurs et les poissons. Bon courage pour tes études de médecine, dans quelques années tu seras un vrai Docteur K.

REMERCIEMENTS

Merci également à Thomas B., Hélène, Chantal, Elise, Aurélien, Elodie, Sandy, Stéphanie, Marie M., Marie W., Samuli, Carl, Giovanna, Thomas C., Anita, pour ces moments partagés avec vous.

Merci également à mes collègues de pause : Jérôme, Guillaume, Anne-Claire et Florian.

Guillaume, reste comme tu es et garde ta bonne humeur. Je crois que c'est fini, je n'aurais plus ma 'surprise' du vendredi soir. Merci pour toutes ces pauses où on a eu de bons fous rires : ah bon, les grues prennent l'autoroute... Bon courage à toi et à Maud pour la suite, sans oublier la petite Margot.

Florian, je pense que tu es the best des jeux de mots (pas toujours réussis) mais qui m'ont toujours fait rire. En partant, je crois que 'Dédé' va donner son timer à 'Foufouch'. Bon courage pour la suite (dans la recherche ou pas).

Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire : Clément, Anne (pour tout ce que tu m'as appris sur les primo-cultures), Brice, Edith (une secrétaire hyper dynamique), Stéphanie, Patrick, Emilie, Claudia, Marie-Claire, Olivier, Catherine, Frédéric, Nathalie, Jean-Luc, Nolwenn (bon courage dans ton rôle de maman), Laurence, Frank, Jean-Christophe, Céline et Patricia (les secrétaires que j'ai le plus sollicitées durant ces trois ans).

Merci également aux stagiaires que j'ai encadrés : Fanny, Héloïse, Lousineh et Nada.

Ces trois années n'ont pas été que synonyme de labo, merci donc à l'équipe Bouchemaine (les Pierre, Bastien, Nico, Andréa, Rémy, David et les autres), Anne-Claire, Suppo, Fifine, Foufouch, Kaka, Fabien, JP, Jérôme, Clément (et oui Legeay, il paraît que tu es important), Sonia et Gabi (de superbes moments passés en votre compagnie), pour nos soirées JJ, Bolech ou Carré inoubliables...

Merci également à Sophie et Olivier, Carole et Jean-René, Vanessa et Willy, Valérie et Laurent, Céline et Franck ainsi que tous les enfants pour vos encouragements.

Merci à Aurore, Anastasia et Elodie d'être mes amies depuis tant d'années.

Enfin, un grand merci à mes parents et à mon frère Quentin, d'avoir toujours crus en moi et de m'avoir fait confiance dans mes choix. Votre soutien a été très important pour la réalisation de cette thèse. Merci pour tout.

Liste des abréviations

^{188}Re -NCLs	Nanocapsules lipidiques de Rhénium 188
2'-O-Me	2'-O-méthyle
ABC	Adenosine triphosphate binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago	Argonaute
AMO	Anti-miRNA oligonucleotides
Akt	Serin/threonin protein kinase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCNU	Bis-chloroethylnitrosourea
bFGF	basic Fibroblastic Growth Factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CCTS	Cellules cancéreuses de type souche
CED	Convention Enhanced Delivery
Chk	Checkpoint
CoCl_2	Chlorure de cobalt (II)
COX10	Cytochrome c oxidase assembly protein
CT-scanner	Computed Tomography-scanner
DAXX	Death-associated protein 6
DFO	Desferrioxamine
DGCR8	Di George Critical Region 8
DMT1	Divalent Metal Transporter 1
DOTAP	Dioleoyl trimethylammonium propane
DSPE-PEG-maléimide	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000]
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR	Enhanced retention permeability
FDA	Food and Drug Administration
FeNTA	Acide nitrilotriacétique ferrique
FeSO_4	Sulfate de fer (II)
GBM	Glioblastome multiforme

GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
Gy	Gray
HIF	Hypoxia Inductible Factor
HNRNPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
HPS	Hématoxyline, phloxine, safran
HRE	Hypoxia Responsive Element
HRMS	Hypoxia-Regulated MicroRNAs
IDH-1	Isocitrate Déshydrogénase-1
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISCU	Iron-sulfur cluster scaffold homolg
JAM	Junctional Adhesion Molecule
JMY	Junction mediating and regulatory protein
kDa	kilodalton
let-7	lethal-7
L1-NCLs	Nanocapsules lipidiques fonctionnalisées avec le peptide L1
LNA	Locked Nucleic Acid
LOH10q	Loss of heterozygosity on chromosome 10q
LPD	Lipid-polycation-DNA complexes
m7G	7-méthyl-guanosine
MAPK	Mitogen-activated Protein kinase
MDM2	Mouse Double Minute 2
MDR	Multidrug resistance
MGMT	O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase
miARN ou miR	micro-ARN
miRISC	miRNA-induced silencing complex
NCLs	Nanocapsules lipidiques
NPS	Nanoparticules polysaccharidiques
O ₂	Oxygène
OMS	Organisation mondiale de la santé
P-bodies	Processing-bodies
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PDGFR	Plateted-Derived Growth Factor Receptor
PDPH	3-(2-Pyridyldithio)propionyl hydrazide
pH	Potentiel hydrogène
PHL	Prolyl hydroxylases
PI3K	Phosphatidyl-Inositol triphosphate kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PLC-γ	Phospholipase C-γ
pO ₂	Pression partielle en oxygène
pri-miARN	primaire-miARN
pré-miARN	précurseur de miARN
PS	Phosphorothioates
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
Rb	Rétinoblastome
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich
RGD	Arginine-glycine-acide aspartique
RIN	RNA Integrity Number
RISC	RNA-induced silencing complex
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SNC	Système nerveux central
siARN	small interfering ARN
stRNA	small temporal RNA
TGF-béta	Transforming Growth Factor beta
TGFBR	Transforming growth factor beta receptor
TGFR	Transforming Growth Factor Receptor
TOPORS	Topoisomerase I Binding, Arginine/Serine-Rich, E3 Ubiquitin Protein Ligase
TP53	Tumor protein P53
TP53BP2	Tumor Protein P53 Binding Protein
UTR	UnTranslated Region
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL	Von Hippel-Lindau

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses, d'après (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011).....	2
Figure 2 : Caractéristiques émergentes et facteurs favorisant le développement de cellules cancéreuses, d'après (Hanahan and Weinberg 2011)	3
Figure 3 : Diagnostic des tumeurs cérébrales par deux types d'imagerie : CT-scanner après injection d'iode(A) ou IRM après injection de gadolinium (B), d'après l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales	5
Figure 4 : Coupes histologiques de tumeurs astrocytaires, A : astrocytomes de grade I (coloration HPS-hématoxyline, phloxine, safran-), B : astrocytomes de grade II (coloration HPS), C : astrocytomes anaplasiques (coloration HPS) et D : GBM (coloration HPS), d'après (Figarella-Branger <i>et al.</i> 2008)	8
Figure 5 : Coupes histologiques de tumeurs oligodendrogiales, A : oligodendrogliome de grade I (coloration HPS) et B : oligodendrogliome de grade II (coloration HPS), d'après (Figarella-Branger <i>et al.</i> 2008)	8
Figure 6 : Voie de signalisation PI3K/Akt, d'après (Mellinghoff <i>et al.</i> 2005)	11
Figure 7 : Altérations physiopathologiques et moléculaires initiant des GBM primaires et secondaires, d'après (Kanu <i>et al.</i> 2009; Ohgaki and Kleihues 2007)	12
Figure 8 : Représentation schématisée de l'effet photoélectrique.....	13
Figure 9 : Représentation schématisée de l'effet Compton.....	14
Figure 10 : Courbe de survie de patients atteints d'un GBM traités selon deux stratégies, la radiothérapie seule ou la radiothérapie combinée à la chimiothérapie (Témodal®), d'après (Stupp <i>et al.</i> 2005)	15
Figure 11 : Représentation d'implants au sein d'une cavité de résection tumorale, d'après (http://www.gliadel.com/about-gliadel/how-gliadel-used/)	16
Figure 12 : Hypothèse des cellules cancéreuses de type souche (CCTS)	20
Figure 13 : Structure de la protéine CD133, d'après (Bidlemaier <i>et al.</i> 2008)	21
Figure 14 : Schéma représentant les effets de la radiothérapie sur l'ADN, ainsi que les facteurs s'y opposant ou s'y associant, d'après (Zhou and Elledge 2000)	22
Figure 15 : Représentation schématisée de la régulation de la voie de HIF-1, sous deux conditions : normoxie (A) et hypoxie (B), d'après (Meijer <i>et al.</i> 2012)	24
Figure 16 : Mécanisme de biogénèse des miARN.....	29
Figure 17 : Effets des miARN sur l'ARN messager	29
Figure 18 : Représentation des sites principaux pouvant être la cible de miARN, d'après (Bartel 2009) ...	30
Figure 19 : Schéma représentant la répartition 'idéale' entre ces deux types de miARN	35
Figure 20 : Représentation schématisée de leurs oligonucléotides des miARN, d'après (Moulton <i>et al.</i> 2004; Ruberti <i>et al.</i> 2012)	38
Figure 21 : Schéma de différents types de nanovecteurs	41
Figure 22 : Principe de formulation des nanocapsules lipidiques (NCLs)	42

Figure 23 : Stratégies thérapeutiques envisagées pour éliminer, dans un premier temps, les cellules les plus résistantes (Stratégie 1), puis dans un second temps, les cellules de la masse tumorale (Stratégie 2)	57
Figure 24 : Représentation des différentes voies d'endocytose, d'après (Conner and Schmid 2003)	59
Figure 25 : Effets de modulateurs du fer sur l'expression de CD133 dans une primo-culture de GBM cultivée à 3% d'O ₂ , Test de Dunnett : * p<0.001, comparaison avec le contrôle	73
Figure 26 : Mise en culture et caractérisation des CCTS de GBM	75
Figure 27 : Schéma représentant le travail sur la mise en évidence de miARN impliqués dans la radiorésistance	78
Figure 28 : Exemple d'une souris Nude placée sur un cadre de stéréotaxie	120
Figure 29 : Principe de la 'Convention Enhanced Delivery'	120
Figure 30 : Imagerie d'un cerveau de souris par l'XRAD	121
Figure 31 : Chronogramme représentant le protocole 1	121
Figure 32 : Courbes de Kaplan Meier comparant les différents traitements administrés aux souris	123-124
Figure 33 : Chronogramme représentant le protocole 2	125
Figure 34 : Schéma représentant les liens entre la protéine CD133, le métabolisme du fer et l'internalisation de la transferrine	129
Figure 35 : Gels Retards visualisant la formation de complexes entre les LNA et des lipopolyplexes (A) ou des NPS (B)	134
Figure 36 : Représentation schématique du travail de thèse	135
Tableau 1 : Classification des tumeurs gliales selon l'OMS	6
Tableau 2 : Classification des gliomes selon leurs caractéristiques histologiques, d'après (Kleihues and Sobin 2000)	7
Tableau 3 : Récapitulatif des différents échantillons	77

Table des matières

Introduction générale

I. Le glioblastome, les cellules cancéreuses de type souche et le marqueur associé AC133/1 2-26

1.	Le glioblastome.....	2
1.1.	Généralités sur le cancer	2
1.2.	Les tumeurs cérébrales : épidémiologie, symptômes, diagnostic et classification	3
1.2.1.	Épidémiologie	3
1.2.2.	Symptômes.....	4
1.2.3.	Diagnostic.....	4
1.2.4.	Classification	5
1.3.	Caractéristiques physiopathologiques et moléculaires du glioblastome	9
1.3.1.	Aberrations chromosomiques	9
1.3.2.	Dérégulations des voies de signalisation.....	10
a)	Dérégulations liées aux facteurs de croissance	10
b)	Dérégulations liées aux gènes suppresseurs	11
1.4.	Les traitements du glioblastome	12
1.4.1.	La chirurgie	12
1.4.2.	La radiothérapie.....	13
1.4.3.	La chimiothérapie	14
1.4.4.	Les implants polymériques.....	15
1.4.5.	Les essais cliniques	16
2.	Origine cellulaire du glioblastome et cellules cancéreuses de type souche	17
2.1.	Concept des cellules cancéreuses de type souche.....	17
2.1.1.	Les cellules souches	17
2.1.2.	Identification de cellules cancéreuses de type souche dans les glioblastomes	18
a)	Capacité d'auto-renouvellement	18
b)	Capacité de différenciation	19
c)	Capacité à initier la formation de tumeurs	19
2.2.	La protéine CD133	20
3.	Caractéristiques des cellules AC133/1-positives et AC133/1-négatives	21
4.	Radiorésistance et microenvironnement tumoral : l'axe hypoxie-CCTS	23
4.1.	Hypoxie tumorale et radiorésistance.....	23
4.2.	Hypoxie tumorale et CCTS AC133/1-positives	24
5.	Fonction de la protéine CD133.....	25

II. Les microARN..... 27-37

1.	Découverte des microARN	27
2.	Biogenèse des miARN	28
3.	Mode d'action des miARN	29
4.	Implication des miARN dans les maladies dont les cancers	31
5.	Les différents types de miARN.....	32
5.1.	Les miARN considérés comme des oncogènes.....	32
5.2.	Les miARN considérés comme des suppresseurs de tumeurs	33
6.	Les miARN impliqués dans le développement du glioblastome	33
7.	Stratégies moléculaires pour réguler l'expression de ces différents miARN	35
7.1.	Les oligonucléotides anti-miARN	35
7.2.	Les antagomiRs	36
7.3.	Les Locked Nucleic Acid	36
7.4.	Les miARN 'sponges'.....	37
7.5.	Autres molécules	37

III. Vectorisation de principes actifs ou de petits acides nucléiques par les nanomédecines.....	39-42
1. Les nanovecteurs	39
1.1. Interaction du nanovecteur avec le milieu vivant	39
1.2. Nanovecteurs et cancer	40
2. Les nanocapsules lipidiques	41
IV. Objectifs de la thèse.....	43
Chapitre I : Marqueurs de radiorésistance et glioblastome.....	45-80
1. L'épitope AC133/1	45
1.1. Expression d'AC133/1 et phénotypes tumoraux	45
1.2. Rôle pour AC133/1	58
2. Un nouveau marqueur de radiorésistance : les microARN ?.....	74
2.1. Établissement d'une collection de CCTS de glioblastome	74
2.2. Exposition des cellules à deux types de radiations	76
2.2.1. Radiothérapie externe : Rayons X.....	76
2.2.2. Radiothérapie interne : Nanocapsules lipidiques de Rhénium 188 (¹⁸⁸ Re-NCLs)	76
2.3. Extractions des miARN	76
2.4. Analyse des données	77
Chapitre II : Développement de nanomédecine permettant le ciblage d'AC133/1 et de miARN.....	81-118
1. Immunonanociblage de l'épitope AC133/1	81
2. Complexation d'acides nucléiques aux NCLs	92
2.1. Complexation de l'ADN plasmidique ou de siARN aux NCLs	92
2.2. Complexation avec des Locked Nucleic Acid.....	103
Chapitre III : Expérimentations <i>in vivo</i> testant la combinaison du nano-objet complexé aux LNA et aux irradiations externes.....	119-126
1. Implantation des cellules de glioblastome par stéréotaxie	119
2. Injection des NCLs complexés à des Locked Nucleic Acid (LNA) par la méthode de CED... ..	120
3. Irradiations externes des animaux.....	121
4. Protocole 1 : Étude de l'efficacité du traitement combiné à une irradiation	121
5. Protocole 2 : Étude de l'efficacité du traitement combiné à une irradiation fractionnée	124
Discussion Générale et Perspectives.....	127-134
1. Études de deux marqueurs de radiorésistance au sein des glioblastomes.....	127
1.1. L'épitope AC133/1 de la protéine CD133	127
1.2. Les microARN.....	131
2. Développement de nanomédecines permettant le ciblage de marqueurs de radiorésistance	132
2.1. Nanovecteur permettant le ciblage des cellules AC133/1 positives.....	132
2.2. Nanovecteur se combinant à des acides nucléiques.....	133
Conclusion.....	135
Références Bibliographiques.....	137-164

INTRODUCTION

GÉNÉRALE

I. Le glioblastome, les cellules cancéreuses de type souche et le marqueur associé AC133/1

1. Le glioblastome

1.1. Généralités sur le cancer

Le cancer se manifeste par une production anormale de cellules indifférenciées, qui échappent au contrôle de l'organisme, se multiplient indéfiniment et peuvent atteindre différents organes. Ce dysfonctionnement du contrôle du cycle cellulaire résulte d'altérations génétiques et/ou épigénétiques au sein des cellules dont l'étiologie demeure incertaine et peut inclure : les radiations, des virus ou des agents chimiques. Si l'on ne connaît pas d'entité causale aux cancers, alors certaines caractéristiques du comportement cellulaire peuvent être décrites comme constituant la signature d'une cellule cancéreuse ; il s'agit de l'immortalité répliquative, de l'induction de l'angiogénèse, de la résistance à la mort cellulaire, de l'autosuffisance en signaux de croissance, de l'insensibilité aux inhibiteurs de prolifération, de l'invasion tissulaire ou du potentiel métastatique (**Figure 1**) (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011).

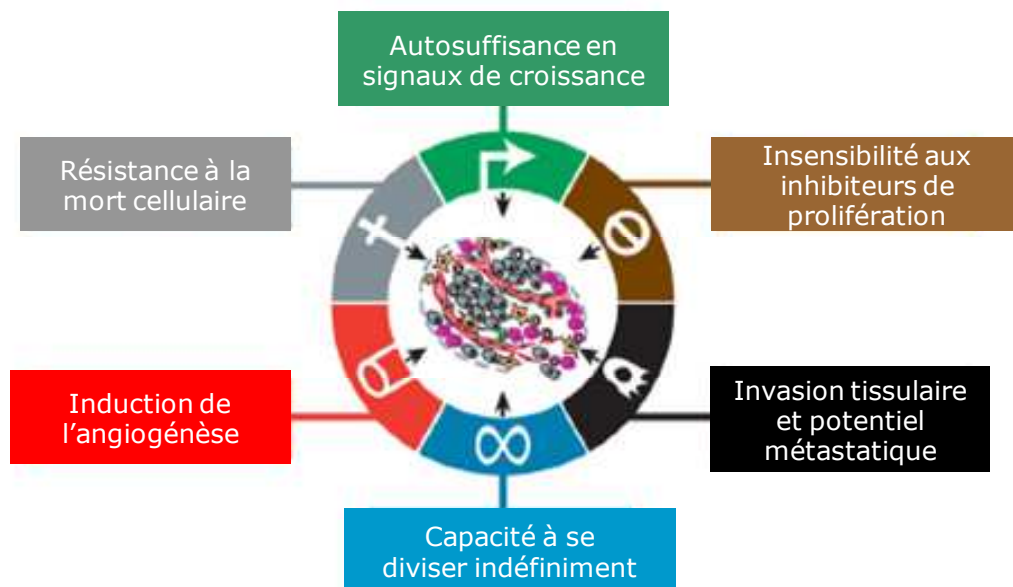


Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses, d'après (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011)

Ces éléments symptomatiques peuvent être complétés de caractéristiques émergentes des cellules cancéreuses que sont : la dérégulation du métabolisme énergétique et l'échappement des cellules à la surveillance du système immunitaire. Au plan causal, un facteur intrinsèque que constitue l'instabilité du génome et un facteur extrinsèque qu'est l'inflammation, peuvent s'avérer comme des éléments, sinon permissifs, favorables à l'émergence d'un phénotype cancéreux (**Figure 2**) (Hanahan and Weinberg 2011).

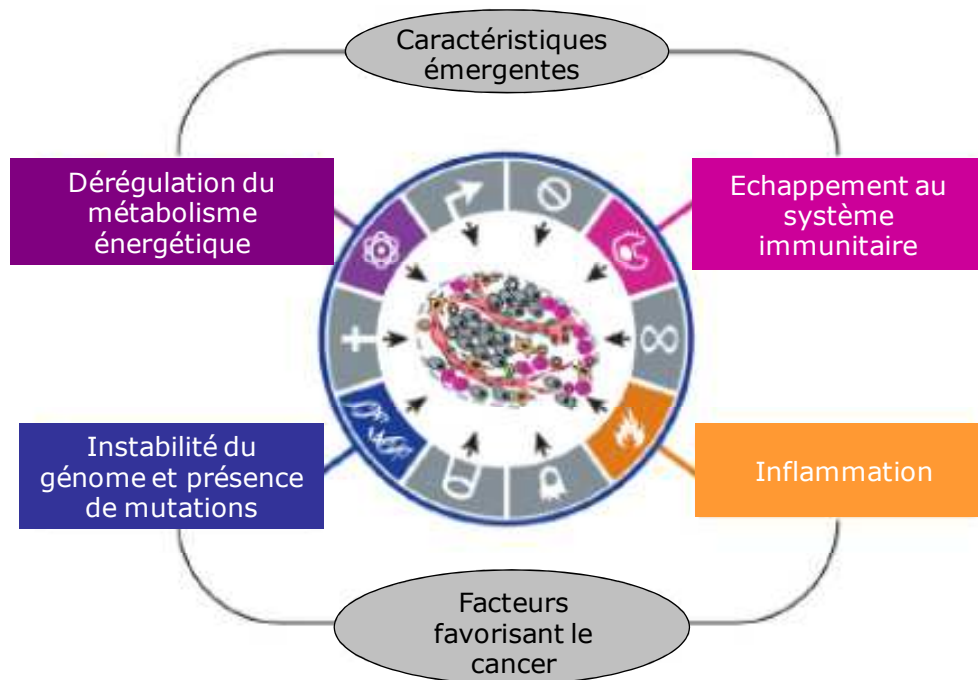


Figure 2 : Caractéristiques émergentes et facteurs favorisant le développement de cellules cancéreuses, d'après (Hanahan and Weinberg 2011)

1.2. Les tumeurs cérébrales : épidémiologie, symptômes, diagnostic et classification

1.2.1. Épidémiologie

Les tumeurs cérébrales sont les cancers affectant le système nerveux central (SNC) dont le cerveau, siège de notre conscience et par là-même particulier. Avec une incidence annuelle de 4 pour 100000 habitants chez l'adulte, ces tumeurs sont fréquentes et représentent environ 2400 nouveaux cas chaque année en France. Parmi les tumeurs du SNC, les tumeurs gliales malignes ou gliomes représentent 2% de l'ensemble des cancers (Chatel *et al.* 2005) et sont la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'enfant et la

troisième chez l'adulte de moins de 40 ans (Ohgaki and Kleihues 2005). Les gliomes affectent les cellules gliales et plus particulièrement les cellules macrogliales comme les astrocytes et les oligodendrocytes.

1.2.2. Symptômes

Certains symptômes sont communs à de nombreux cancers comme les crises d'épilepsie, les nausées et les vomissements, les maux de tête, et l'hémi-parésie. D'autres signes cliniques, plus spécifiques aux patients atteints de tumeurs cérébrales, sont une perte progressive de la mémoire, une dégradation de la personnalité voire un déficit de celle-ci dû à un endommagement des lobes frontal et temporal (Chatel *et al.* 2005).

1.2.3. Diagnostic

Dès lors que les patients présentent ces différents signes cliniques, les médecins utilisent plusieurs techniques ou interventions pour déterminer si une personne est atteinte ou non d'une tumeur au cerveau. Le médecin établira un bilan complet de santé, puis effectuera un examen physique. Par la suite, les médecins auront recours aux techniques d'imageries que sont la tomodensitométrie également appelée scanographie de type CT-scanner (Computed Tomography) ainsi que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Martin-Duverneuil *et al.* 2008). Le CT-scanner, une technique d'imagerie médicale basée sur l'absorption des rayons X par les tissus, permet de mettre en évidence la localisation de la tumeur ainsi que d'estimer la masse de celle-ci. L'IRM est une technique d'imagerie médicale reposant sur le principe de résonance magnétique nucléaire. L'IRM sollicite l'utilisation d'un champ magnétique qui est produit par un aimant créant une magnétisation des tissus par alignement des moments magnétiques de spin. L'IRM est essentiellement utilisée pour le SNC, les muscles, le cœur et les tumeurs, et permet la visualisation des tissus mous avec une sensibilité de contraste importante ; en revanche l'IRM ne permet pas la visualisation des tissus « durs ». Ces deux techniques ont besoin d'utiliser des agents de contraste comme des produits à base d'iode ou des produits paramagnétiques de type gadolinium (**Figure 3**).

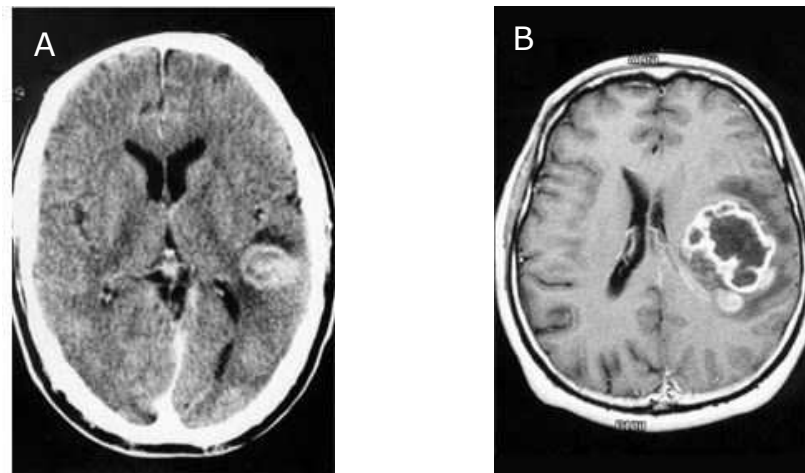


Figure 3 : Diagnostic des tumeurs cérébrales par deux types d'imagerie : CT-scanner après injection d'iode (A) ou IRM après injection de gadolinium (B), d'après l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales

Le diagnostic est par la suite enrichi par des examens anatomopathologiques permettant de mettre en évidence les caractéristiques histologiques de la tumeur, ces examens sont réalisés suite à une biopsie ou à une résection tumorale.

1.2.4. Classification

Différentes classifications des gliomes ont été développées et ont conduit à la classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) qui est basée sur des méthodes d'immunohistochimies (Louis *et al.* 2007). En effet, la classification de l'OMS repose sur un diagnostic histologique comparant les analogies des cellules tumorales à celles des astrocytes ou des oligodendrocytes normaux.

Au sein de cette classification, quatre grades sont définis selon le degré de malignité :

- le grade I fait référence à des tumeurs plutôt bien définies avec une croissance lente et dont l'exérèse permet dans la majorité des cas la guérison,
- le grade II correspond également à des tumeurs à croissance lente mais dont les limites sont moins bien définies,
- le grade III correspond à des tumeurs anaplasiques avec une évolution rapide,
- le grade IV correspond à des tumeurs malignes mal définies, infiltrantes et se multipliant rapidement (Kleihues and Sobin 2000).

Les gliomes, des tumeurs issues du tissu de soutien ou de la glie, regroupent trois types : les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes également appelés gliomes mixtes, chacun étant subdivisé en différents grades. Les astrocytomes sont divisés en 4 grades : les astrocytomes pilocytiques (grade I), les astrocytomes diffus ou de bas grade (grade II), les astrocytomes anaplasiques (grade III) et les glioblastomes multiformes (GBM) (grade IV). Quant aux oligodendrogliomes et aux oligoastrocytomes, ils sont classés selon deux grades, grade II et grade III (Kleihues and Sobin 2000) (**Tableau 1**).

Types	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV
Astrocytome	Astrocytome pilocytique	Astrocytome de bas grade	Astrocytome anaplasique	Glioblastome (GBM)
Oligodendrogliome		Oligodendrogliome de bas grade	Oligodendrogliome anaplasique	
Oligoastrocytome ou gliome mixte		Oligoastrocytome de bas grade	Oligoastrocytome anaplasique	

Tableau 1 : Classification des tumeurs gliales selon l'OMS

Les caractéristiques histologiques se définissent au niveau de l'état de différenciation, la densité cellulaire, la présence ou l'absence d'atypies cytonucléaires, la présence ou non d'activité mitotique, la présence ou non de nécrose ainsi que la présence ou l'absence de prolifération capillaire (**Tableau 2**) (Kleihues and Sobin 2000).

Types	Grades	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies cytonucléaires	Activité mitotique	Nécrose	Prolifération cellulaire
Astrocytomes	Grade II	Élevée	Modérée	Occasionnelles	≤ 1 mitose	Absente	Absente
	Grade III	Anaplasie focale ou dispersée	Importante	Présentes	Présente	Absente	Absente
	Grade IV	Faible	Élevée	Marquées	Marquée	Présente	Présente
Oligodendrogliomes	Grade II	Élevée	Modérée	Possibles	Occasionnelle	Absente	Absente
	Grade III	Anaplasie focale ou dispersée	Importante	Possibles	Forte	Possible	Possible
Oligoastrocytomes ou gliomes mixtes	Grade II	Élevée	Faible ou modérée		Absente ou faible	Absente	Absente
	Grade III		Importante	Possibles	Marquée	Possible	Possible

Tableau 2 : Classification des gliomes selon leurs caractéristiques histologiques, d'après (Kleihues and Sobin 2000)

En effet, les astrocytomes de grade I présentent une forme biphasique comprenant des cellules bipolaires, des fibres de Rosenthal et des cellules rondes pseudo-oligodendrogiales formant des microkystes. Les astrocytomes de grade II présentent des cellules avec des noyaux excentrés et des cytoplasmes éosinophiles. Les astrocytomes anaplasiques (grade III) possèdent une densité cellulaire beaucoup plus importante. Les GBM sont quant à eux caractérisés par une prolifération microvasculaire (**Figure 4**) (Figarella-Branger *et al.* 2008).

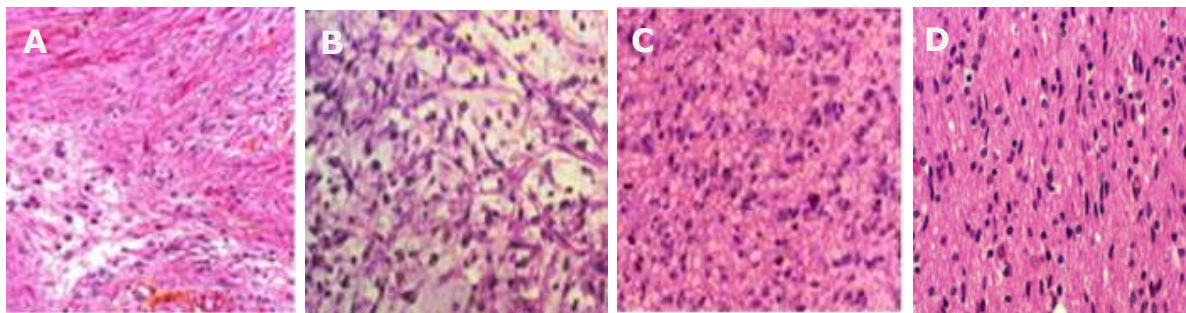


Figure 4 : Coupes histologiques de tumeurs astrocytaires, A : astrocytomes de grade I (coloration HPS-hématoxyline, phloxine, safran-), B : astrocytomes de grade II (coloration HPS), C : astrocytomes anaplasiques (coloration HPS) et D : GBM (coloration HPS), d'après (Figarella-Branger *et al.* 2008)

Les deux grades d'oligodendrogliomes comportent des cellules tumorales arrondies à noyaux irréguliers et des zones de microkystiques (**Figure 5**) (Figarella-Branger *et al.* 2008)

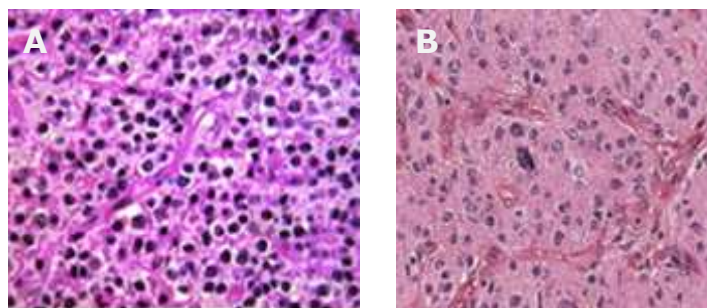


Figure 5 : Coupes histologiques de tumeurs oligodendrogiales, A : oligodendrogliome de grade I (coloration HPS) et B : oligodendrogliome de grade II (coloration HPS), d'après (Figarella-Branger *et al.* 2008)

Pour les gliomes mixtes ou oligoastrocytomes, le diagnostic histologique est plus difficile, car ils se confondent avec les oligodendrogliomes et les astrocytomes en possédant des caractéristiques histologiques de chacune de ces pathologies (Figarella-Branger *et al.* 2008).

En ce qui concerne la pathologie « gliome » appréhendée au cours de ce travail, le GBM en est la forme la plus indifférenciée, la plus fréquente et la plus agressive chez l'homme (Bao *et al.* 2006). Les cellules de GBM s'infiltrant au sein du cerveau, provoquent une inflammation du tissu cérébral suivie de la formation d'un œdème, le tout associé à une hyperpression intracrânienne entraînant le décès des patients (Stupp and Hegi 2007). Avec une survie moyenne comprise entre 12 et 15 mois, le pronostic du GBM est dramatique (Bao *et al.* 2006; Stupp and Hegi 2007). Moins de 5% des patients survivent au delà de 5 ans (Grossman and Batara 2004). Le GBM a une incidence plus importante chez les sujets âgés entre 45 et 70 ans (Chatel *et al.* 2005). Dans la plupart des cas, les GBM primaires sont sporadiques, c'est à dire sans prédisposition familiale, avec la présence d'anomalies chromosomiques (cf. paragraphe 1.3. Caractéristiques physiopathologiques et moléculaires du glioblastome).

1.3. Caractéristiques physiopathologiques et moléculaires du glioblastome

Les altérations moléculaires observées dans les GBM ont permis de mettre en évidence deux formes de progression des GBM : les GBM primaires (ou de novo) représentant 90% des GBM et les GBM secondaires (Kanu *et al.* 2009). Ces altérations comprennent des incohérences génétiques, des dérégulations des voies de signalisation du cycle cellulaire liées aux facteurs de croissance et aux gènes suppresseurs (Figarella-Branger *et al.* 2008).

1.3.1. Aberrations chromosomiques

Les altérations chromosomiques les plus fréquentes sont une délétion au niveau du chromosome 10, un gain au niveau du chromosome 7, des pertes du 22q, 1p et 19q. En ce qui concerne, la perte du chromosome 10, celle-ci peut toucher la totalité du chromosome, ou seulement le 10p ou le 10q (Ohgaki and Kleihues 2007).

1.3.2. Dérégulations des voies de signalisation

a) Dérégulations liées aux facteurs de croissance

Ces dérégulations sont en générale liées à des récepteurs des facteurs de croissance de type tyrosine kinase tels que l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), le VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), le PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) et le TGF α (Transforming Growth Factor Receptor) (Kanu *et al.* 2009). Parmi ces quatre récepteurs le plus fréquemment modifié est l'EGFR, et plus particulièrement son variant III accru dans les GBM primaires (Kanu *et al.* 2009).

L'activation de l'EGFR variant III entraîne celle de différentes voies comme :

- la voie de la PLC- γ (Phospholipase C- γ) par l'activation de la protéine kinase C, qui régule la transcription des gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose et l'angiogénèse,
- la voie des MAPK (Mitogen-activated Protein kinase) qui induit l'activation de facteurs de transcription et qui est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire,
- la voie de la PI3K (Phosphatidyl-Inositol triphosphate Kinase) qui est impliquée dans la survie cellulaire par stimulation de la protéine kinase Akt.

Par exemple, dans le cas de l'activation de la voie de signalisation PI3K-Akt. L'EGFR, activé lorsqu'il se lie au facteur de croissance, recrute PI3K à la membrane cellulaire. Ensuite, PI3K va phosphoryler le PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3. Par la suite, PIP3 va activer des molécules telles que la protéine Akt ou la cible de la rapamycine (mTOR). Cette voie étant inhibée par PTEN (Phosphatase and TENSin homolog). La protéine Akt inhibe l'apoptose et active la prolifération cellulaire. Dans le cas de l'EGFR variant III, la signalisation est identique et aboutit aux mêmes effets que sont le maintien de la prolifération cellulaire et la survie des cellules tumorales (**Figure 6**) (Mellinghoff *et al.* 2005).

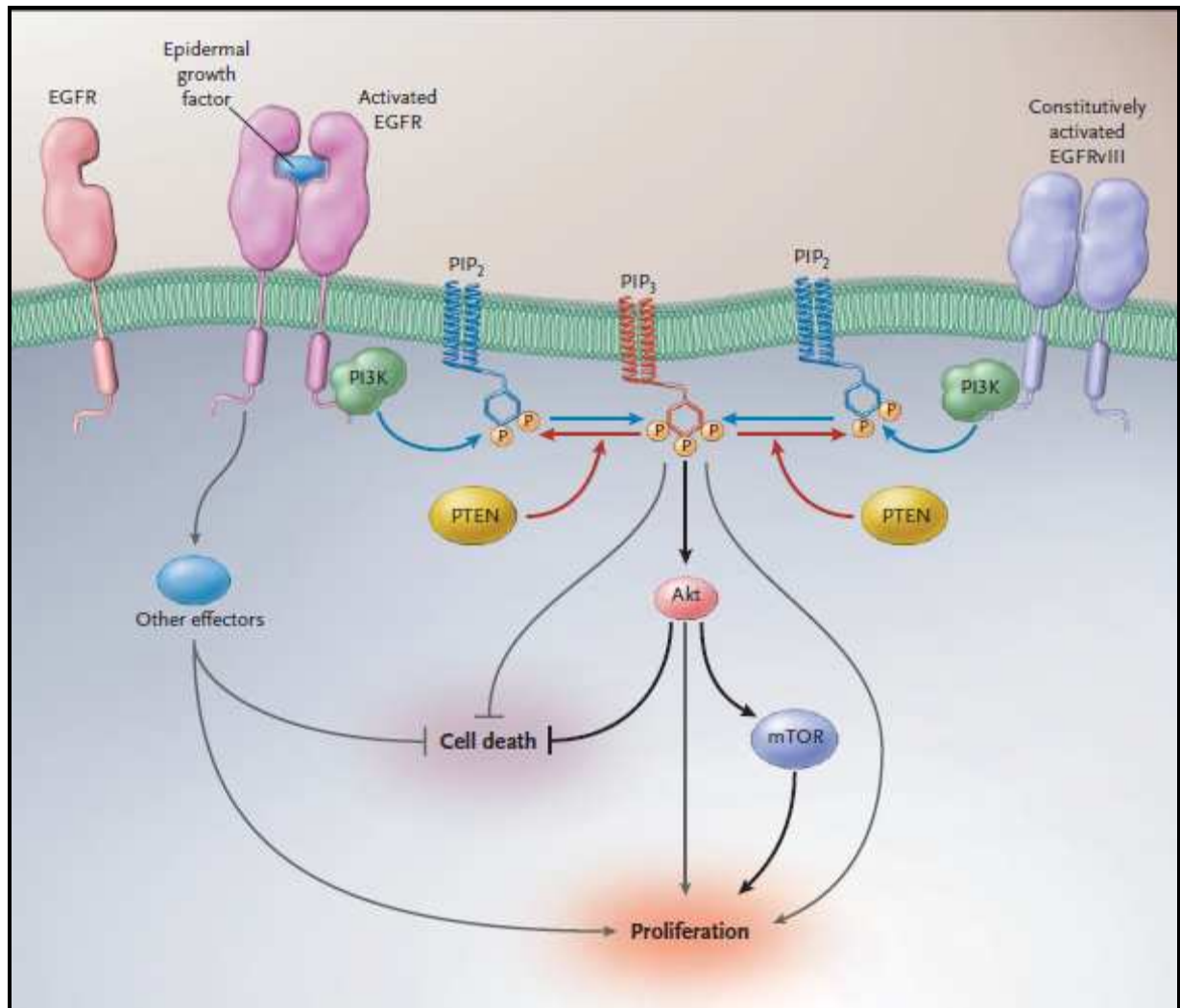


Figure 6 : Voie de signalisation PI3K/Akt, d'après (Mellinghoff *et al.* 2005)

b) Dérégulations liées aux gènes suppresseurs

Une des dérégulations la plus fréquemment observée dans les GBM secondaires est la mutation du gène TP53. La protéine p53 joue un rôle important dans le contrôle des cycles cellulaires, son inactivation engendre des aberrations chromosomiques (Ohgaki and Kleihues 2007). Son inactivation est possible par une amplification ou une surexpression de MDM2 (Mouse Double Minute 2) qui dégrade p53 (Furnari *et al.* 2007).

Une autre voie de signalisation également impliquée dans la tumorigénèse des GBM, est la voie Rb (Rétinoblastome). Ces altérations peuvent être une délétion homozygote du gène suppresseur p16 (plus fréquent dans les GBM primaires) ou une forte méthylation de son promoteur (plus fréquent dans les GBM secondaires) (Nakamura *et al.* 2001).

L'inactivation d'autres gènes est possible par le biais de l'hyperméthylation de leurs promoteurs, en effet c'est le cas du gène O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT) codant pour la protéine de réparation MGMT. La fonction de cette protéine est de surveiller l'ADN en éliminant les groupements alkyls trouvés en position O6 sur les guanines (Combs *et al.* 2011). La présence de la MGMT dans les cellules normales permet une protection de celles-ci contre des carcinogènes exogènes. Dans les cas des cellules tumorales, une corrélation existe entre l'expression de la MGMT et la résistance aux agents alkylants fréquemment utilisés pour le traitement des GBM. Les patients présentant une méthylation de MGMT sont plus sensibles aux agents alkylants (Esteller *et al.* 2000).

Une autre mutation est également présente dans les GBM, c'est la mutation du gène IDH-1 (Isocitrate Déshydrogénase-1). La présence de cette mutation définit l'évolution du GBM, en effet cela facilite la distinction entre les GBM primaires et les GBM secondaires (Combs *et al.* 2011). Cette mutation est peu présente dans les GBM primaires (environ 6% des cas), par contre, elle est constatée dans environ 50% des GBM secondaires (Balss *et al.* 2008; Ichimura *et al.* 2009)

La **figure 7** résume les altérations physiopathologiques et moléculaires initiant des GBM primaires et secondaires.

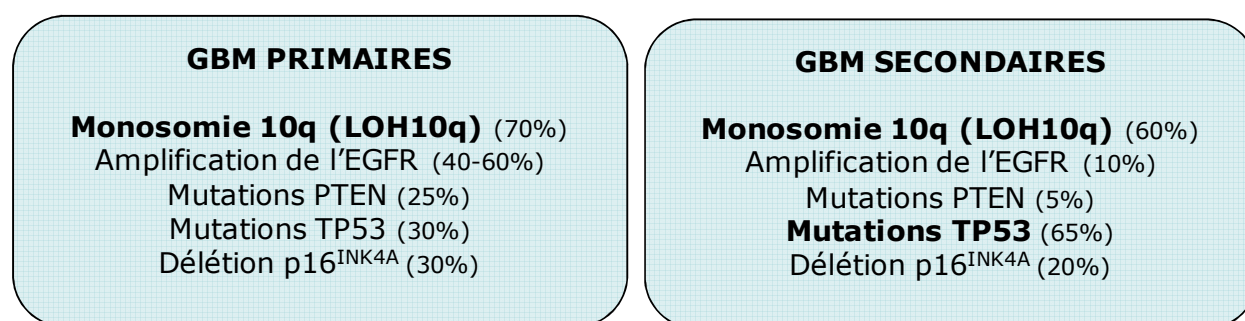


Figure 7 : Altérations physiopathologiques et moléculaires initiant des GBM primaires et secondaires, d'après (Kanu *et al.* 2009; Ohgaki and Kleihues 2007)

1.4. Les traitements du glioblastome

1.4.1. La chirurgie

Le premier traitement est la chirurgie qui consiste en une résection tumorale réalisée par les neurochirurgiens. Celle-ci n'est réalisable que si la localisation de la tumeur le permet. La résection tumorale permet de réduire les symptômes dus à l'hypertension

intracrânienne. Les GBM étant des tumeurs qui diffusent dans le parenchyme cérébral, l'exérèse totale est difficile. C'est pourquoi, dans la majorité des cas, des thérapies sont associées à la chirurgie comme la radio/chimiothérapie.

1.4.2. La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional irradiant les cellules tumorales par le biais de rayonnements ionisants (rayons X). Différents types de radiothérapie existent :

- la radiothérapie conformationnelle qui représente une avancée importante dans l'oncologie, en effet elle permet de délivrer une dose souhaitée dans un volume défini grâce à l'adaptation de la forme du faisceau,
- la radiothérapie guidée par l'image qui permet le contrôle de la position exacte de la zone à traiter,
- la contactthérapie qui utilise des tubes à rayons X pour délivrer des rayons de faibles énergies,
- la radiothérapie stéréotaxique, une technique de haute précision qui utilise des microfaisceaux convergents permettant d'irradier à haute dose de petites zones,
- la tomothérapie qui couple l'utilisation d'un scanner et d'un accélérateur de particules,
- le Cyberknife, un nouveau système de radiochirurgie (petit accélérateur linéaire) qui utilise la robotique pour traiter tout type de tumeurs,
- et l'hadronthérapie qui utilise un faisceau de protons ou d'ions carbonés, ce qui permet de concentrer la dose sur la tumeur sans irradier les organes et tissus proches de la tumeur.

L'unité de dose de la radiothérapie est le Gray (Gy) qui représente l'énergie d'un Joule absorbé dans 1 kilogramme de matière ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$).

Différentes actions des rayonnements ionisants sur les tissus se produisent. Le premier mécanisme est l'effet photoélectrique, un phénomène d'absorption totale de l'énergie correspondant à l'interaction d'un photon incident avec un électron (**Figure 8**) (Cornelissen and Vallis 2010).

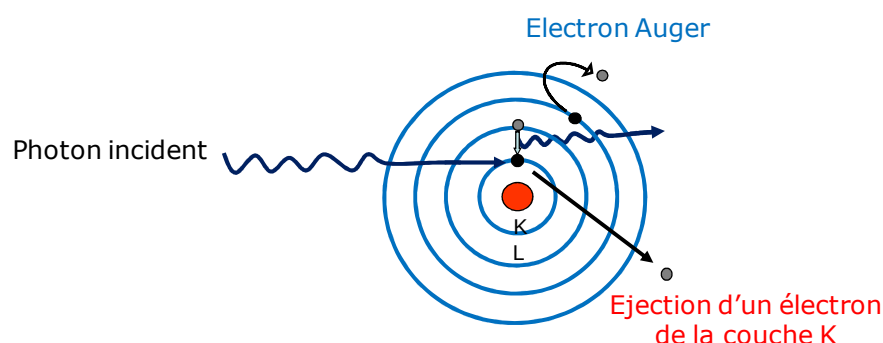


Figure 8 : Représentation schématique de l'effet photoélectrique

Le deuxième mécanisme est l'effet Compton, le photon incident va perdre une partie de son énergie au profit de la mise en mouvement d'un électron (**Figure 9**) (Chamberlain 1953).

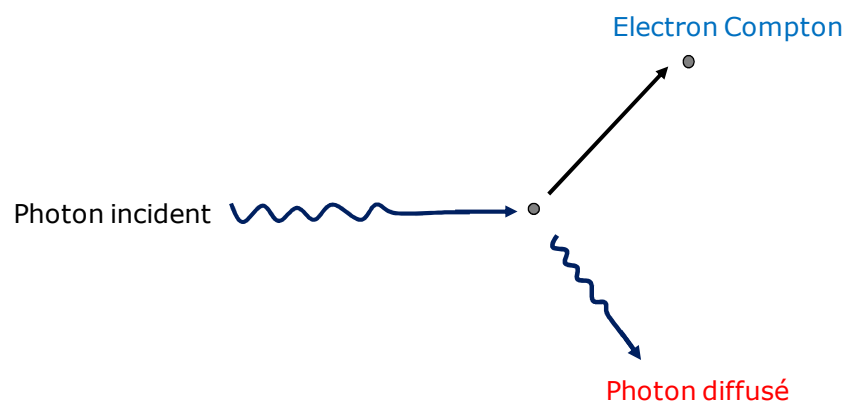


Figure 9 : Représentation schématisée de l'effet Compton

Deux types d'effets des radiations peuvent se produire : d'une part, un effet direct sur la structure de l'ADN. En effet, des espèces radicalaires hautement réactives (radicaux libres) sont produites principalement par la radiolyse de l'eau. Ces radicaux se fixent sur l'ADN et sont capables de créer directement des lésions dans les molécules d'ADN qui entraînent la mort des cellules. C'est principalement pour ces propriétés que les rayonnements ionisants sont utilisés dans les stratégies curatives des tumeurs par radiothérapie. D'autre part, des effets indirects non désirés peuvent se produire, il s'agit de la formation d'ARN anormaux qui entraîne la présence de protéines modifiées. Ces anomalies peuvent être réparées par l'action de trois enzymes présentes en permanence dans notre génome, que sont l'endonucléase, la polymérase 1 et la ligase.

Malheureusement, la simple radiothérapie n'est pas suffisante dans le traitement du GBM, il faut donc l'associer à une chimiothérapie.

1.4.3. La chimiothérapie

Les traitements couramment et actuellement utilisés dans les GBM sont la chirurgie combinée à de la radiothérapie externe et dans la majorité des cas à de la chimiothérapie (Corsten *et al.* 2007). En effet, l'équipe de Stupp a montré que la survie des patients était augmentée lorsque, suite à une intervention chirurgicale, la radiothérapie et la chimiothérapie étaient combinées (avec comme agent pharmacologique : le Témzolomide) (**Figure 10**) (Stupp *et al.* 2005). Le protocole Stupp se déroule de la manière suivante, dans un premier temps, une radiothérapie fractionnée associée à de la chimiothérapie est

réalisée. Les patients reçoivent une dose d'irradiation de 2 Grays par jour, cinq jours par semaine, pendant six semaines, soit au total une dose de 60 Grays. En parallèle, un traitement avec du Temodal® (nom commercial du Témzolomide) à raison de 75 mg/m², sept jours par semaine, est administré aux patients. Après quatre semaines d'arrêt, un traitement au Temodal® est de nouveau prescrit aux patients à raison d'une dose comprise entre 150 et 200 mg/m² par cycle de cinq jours tous les 28 jours, cinq à six cycles sont réalisés. Le Témzolomide est un agent dont le rôle est de bloquer la réplication de l'ADN et d'empêcher les cellules à division rapide de se diviser ; le Témzolomide alkyle la guanine, ce qui entraîne l'apparition de lésions cytotoxiques (Friedman *et al.* 2000).

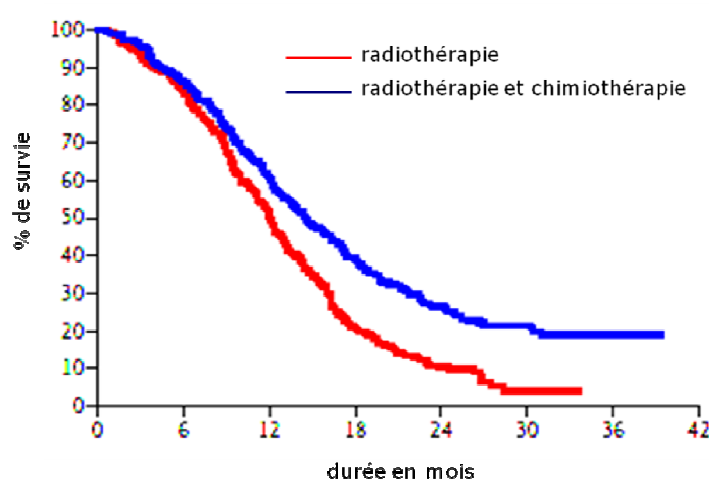


Figure 10 : Courbe de survie de patients atteints d'un GBM traités selon deux stratégies, la radiothérapie seule ou la radiothérapie combinée à de la chimiothérapie (Témodal®), d'après (Stupp *et al.* 2005)

1.4.4. Les implants polymériques

Une autre possibilité thérapeutique est l'utilisation d'implants polymériques qui sont déposés après la résection, totale ou partielle, de la tumeur (**Figure 11**). Dans le cas du GBM, il s'agit d'un polymère, le Gliadel® chargé en agents chimio-thérapeutiques (carmustine ou BCNU) qui est biodégradable dans le cerveau (Westphal *et al.* 2006). La carmustine est un antinéoplasique cytostatique dont son action principale est l'alkylation de l'ADN et de l'ARN. La carmustine possède un intérêt majeur dans les traitements des GBM, puisque sa solubilité dans les graisses favorise le passage de la barrière hémato-encéphalique. Une combinaison de cet implant avec de la chimiothérapie (Témzolomide) a été testé par des équipes françaises et s'est révélée intéressante, puisqu'une augmentation de la survie des patients a été observée (environ 17 mois) (Menei *et al.* 2010).

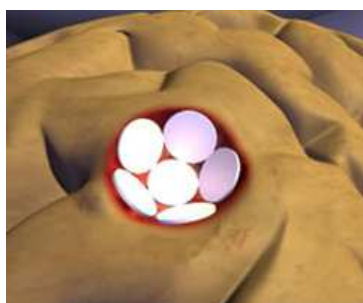


Figure 11 : Représentation d'implants au sein d'une cavité de résection tumorale, d'après (<http://www.gliadel.com/about-gliadel/how-gliadel-used/>)

1.4.5. Les essais cliniques

Différents essais cliniques sont actuellement en cours d'essai pour traiter le GBM, mais aucun pour l'instant n'a donné de résultats concluants. Au sein des divers essais cliniques, différentes molécules thérapeutiques ont été testées, quelques exemples vont être présentés :

- les anticorps monoclonaux : Cétuximab dirigé contre le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Hasselbalch *et al.* 2010) ou le TRC 105 ciblant CD105 qui réagit avec TGF-béta (phase II aux États-Unis, sur des GBM récurrents)
- le Losartan, un inhibiteur des récepteurs de l'angiotensine I combiné à un traitement standard (phase III au CHU de Bobigny, sur des GBM nouvellement diagnostiqués),
- le Dovitinib, un inhibiteur de cibles multiples, par exemple du VEGFR (phase II aux États-Unis, sur des GBM récurrents),
- le SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), un inhibiteur de l'histone désacétylase combiné à l'Avastin (phase II aux États-Unis, sur des GBM récurrents),
- l'Axitinib, un inhibiteur des récepteurs VEGFR 1, 2 et 3 (phase II en Belgique, sur des GBM récurrents).

Mais malgré ces différents protocoles thérapeutiques mis en place, les patients décèdent, en grande partie dû à l'apparition de récives locales (Bao *et al.* 2006; Bidlingmaier *et al.* 2008). Ces échecs thérapeutiques sont également dus au développement de résistances face aux traitements (Bao *et al.* 2006; Medina *et al.* 2008). Ces résistances peuvent s'expliquer par l'efflux des principes actifs (Liu *et al.* 2006), la réparation cellulaire (Bao *et al.* 2006) et la non sensibilité des cellules à la mort cellulaire (Liu *et al.* 2006). Dans le cas du Témzolomide, les dommages causés à l'ADN et son efficacité semblent inversement corrélés à l'expression d'une enzyme, la MGMT (Stupp and Hegi 2007). Dans

les autres pistes envisagées, comme la combinaison d'une action sur les topo-isomérases (Irinotecan) et sur le blocage du VEGF impliqué dans la néoangiogénèse tumorale (Bevacizumab), des bénéfices relatifs sont constatés (Vredenburgh *et al.* 2007), mais les espoirs portés semblent encore loin de celui d'une guérison (e.g. normalisation de l'endothélium vasculaire avec les inhibiteurs de VEGF).

Aussi, pour pallier les récives, l'identification au sein des GBM de nouvelles cibles pertinentes, non seulement impliquées dans l'évolution initiale de la maladie mais également et surtout dans la radiorésistance, l'échappement à la mort chimio-induite, ou dans la réparation cellulaire, apparaît essentielle. Le développement d'outils permettant d'atteindre ces nouvelles cibles est également crucial en vue de faire évoluer le traitement conventionnel encore dans l'impasse vers la guérison.

2. Origine cellulaire du glioblastome et cellules cancéreuses de type souche

2.1. Concept des cellules cancéreuses de type souche

2.1.1. Les cellules souches

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées, essentielles pendant le développement et la formation des tissus au potentiel de prolifération lent et illimité. Ces cellules ont deux caractéristiques : l'auto-renouvellement ainsi que la différenciation. Ces cellules sont soit maintenues dans le compartiment souche par division symétrique où elles se renouvellent à l'identique, soit elles sont capables de se diviser par division asymétrique conduisant à l'obtention de deux cellules filles différentes : une cellule souche et un progéniteur précoce. Ce progéniteur, a par la suite, la capacité de se diviser rapidement mais de façon limitée pour donner des cellules matures et fonctionnelles. Ces cellules sont donc importantes dans les mécanismes de morphogénèse, de renouvellement, de réparation et de régénération des tissus (Potten and Loeffler 1990). Classiquement, une cellule souche, par exemple neurale, a la capacité de s'auto-renouveler indéfiniment et de donner par la suite des précurseurs donnant à leur tour des cellules matures fonctionnelles comme les neurones, les astrocytes ou les oligodendrocytes (Baumann *et al.* 2009; Bidlingmaier *et al.* 2008).

2.1.2. Identification de cellules cancéreuses de type souche dans les glioblastomes

A l'heure actuelle, aucun marqueur spécifique des cellules cancéreuses de type souche (CCTS) n'a été identifié, sinon des marqueurs associés. Deux techniques sont utilisées pour l'isolement de ces CCTS.

D'une part, la création de *side population* qui se fait grâce à l'exclusion de Hoechst. L'utilisation du colorant fluorescent permet l'identification des CCTS par cytométrie en flux. En effet, la majorité des cellules tumorales accumulent le colorant Hoechst tandis que les CCTS le rejettent, composant ainsi les cellules de la *side population* (Goodell *et al.* 1996).

D'autre part, les CCTS peuvent être identifiées et isolées grâce à la présence de marqueurs à leur surface, comme par exemple :

- l'épitope glycosylé, AC133/1, de la protéine CD133, qui est un marqueur de cellules souches et de CCTS (Yin *et al.* 1997),
- CD15, un antigène glucidique fortement exprimé à la surface de cellules souches pluripotentes (Capela and Temple 2002),
- CD171, régule la croissance neuronale cellulaire, la survie, la migration et la croissance axonale et est surexprimé dans les gliomes et autres cancers solides (Bao *et al.* 2008),
- CXCR4, un récepteur pour les cellules stromales dérivées, fortement surexprimé dans les GBM (Schulte *et al.* 2011),
- l'intégrine α -6, fortement exprimée dans les cellules souches embryonnaires, hématopoïétique et neurales mais également dans les CCTS des GBM (Lathia *et al.* 2010),
- les molécules d'adhésion comme la famille des molécules d'adhésion de jonction JAM (Junctional Adhesion Molecule). JAM-1 est exprimée dans les cellules endothéliales et épithéliales et est connue pour augmenter la résistance cellulaire (Wolburg and Lippoldt 2002). JAM-1 a été montré comme étant surexprimée dans les GBM, cette surexpression est en lien avec le pronostic des patients (Lathia *et al.* 2012).

Ces CCTS possèdent également les mêmes propriétés que les cellules souches, à savoir la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation.

a) Capacité d'auto-renouvellement

Des études, chez le rat et chez l'humain, ont montré que les CCTS ont la capacité de former des sphères dans un milieu de culture favorisant le maintien des propriétés souches (Galli *et al.* 2004; Hemmati *et al.* 2003; Yuan *et al.* 2004). Ce milieu est dépourvu de facteurs de différenciation, donc de sérum. Il est complétement avec de l'EGF et du bFGF

(basic Fibroblastic Growth Factor) (Montet *et al.* 2006), facteurs de croissance favorisant la prolifération de cellules souches.

b) Capacité de différenciation

Il a été mis en évidence que des sphéroïdes exprimaient à leur surface des marqueurs associés aux cellules souches neurales, tels que Nestine, AC133/1, Musashi-1, Sox2, Melk, PSP, Bmi-1, CXCR4 et Oct4 (Hemmati *et al.* 2003; Schulte *et al.* 2011; Singh *et al.* 2003; Wu *et al.* 2013). Ces cellules présentent également la capacité à exprimer des marqueurs de différenciations neurales après déplétion en facteur de croissance, tels que la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) classiquement exprimée par les astrocytes, la bêta-3-tubuline exprimée par les neurones et les galactocérébroside-C, un marqueur d'oligodendrocytes.

c) Capacité à initier la formation de tumeurs

Après avoir été isolées et caractérisées, les CCTS sont implantées chez l'animal et la croissance tumorale a été comparée aux cellules tumorales dites non souches (Bao *et al.* 2006; Galli *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2004). Ces études démontrent que les CCTS possèdent des propriétés uniques de tumorigénicité.

Ces différentes études mettent en évidence le fait de l'existence d'une petite population de CCTS dans les GBM.

L'hypothèse concernant la formation des CCTS pourrait être que ces cellules subiraient, suite à diverses mutations, une pseudo-différenciation et deviendraient des précurseurs par division symétrique ou par division asymétrique (Baumann *et al.* 2009). Ces CCTS se différencieraient et donneraient naissance à une masse tumorale non fonctionnelle composée des différents types cellulaires (**Figure 12**).

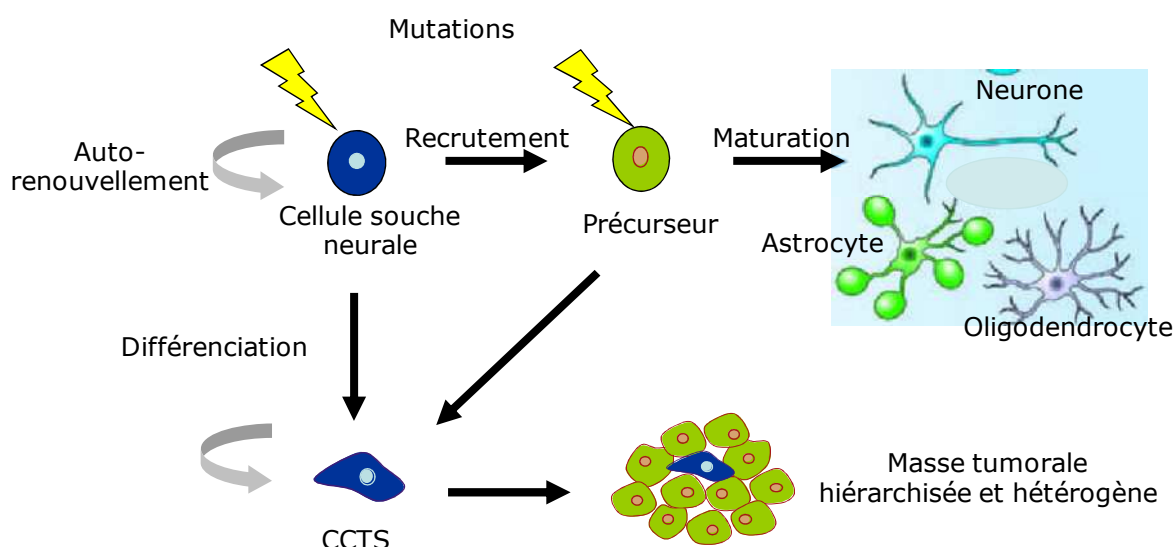


Figure 12 : Hypothèse des cellules cancéreuses de type souche (CCTS)

2.2. La protéine CD133

Dans les GBM, bien que sa fonction soit peu connue, le marqueur de surface le plus documenté et le plus utilisé pour isoler des CCTS demeure la protéine CD133, également appelée prominine-1 humaine (Liu *et al.* 2006). Son identification initiale a été réalisée à la surface du neuroépithélium de souris à l'aide d'immunoglobulines (Weigmann *et al.* 1997), puis par clonage dans des cellules souches hématopoïétiques humaines (Yin *et al.* 1997). La protéine CD133 est une glycoprotéine de 115 kDa contenant cinq domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires glycosylées de 250 acides aminés chacune, ainsi qu'un domaine cytoplasmique C-terminal (**Figure 13**) (Miraglia *et al.* 1997). Cette protéine est localisée dans les microvillosités et les protrusions de la membrane plasmique (Huttner *et al.* 2008). Elle interagit avec les compartiments membranaires riches en cholestérol de la cellule et les zones de rafts lipidiques (Birlingmaier *et al.* 2008; Huttner *et al.* 2008). CD133 présente huit sites potentiels de N-glycosylations (Miraglia *et al.* 1997) et possède des épitopes associés à des glycosylations dont AC133/1 qui est reconnu par l'anticorps AC133/1 spécifique (Fargeas *et al.* 2003). CD133 est la première protéine membranaire identifiée de la famille Prominine et est conservée chez différentes espèces comme par exemple chez le poisson zèbre (Huttner *et al.* 2008) et le ver plat *Caenorhabditis elegans* (Eiring *et al.* 2010). Par contre, cette protéine est absente chez les organismes unicellulaires comme *Saccharomyces cerevisiae* (Yang *et al.* 2007). L'épitope AC133/1 est exprimé dans différents types de cellules souches non transformées, comme les cellules souches hématopoïétiques (Miraglia *et al.* 1997), les cellules souches embryonnaires (Fargeas *et al.* 2003) ou les cellules souches neurales (Huttner *et al.* 2008). Il est également présent au sein des CCTS de GBM (Liu *et al.* 2006) et des CCTS d'autres

cancers affectant divers organes dont : colon, rein, poumon et prostate (Bidlingmaier *et al.* 2008). AC133/1 est donc un marqueur associé aux cellules souches et au cancer en général.

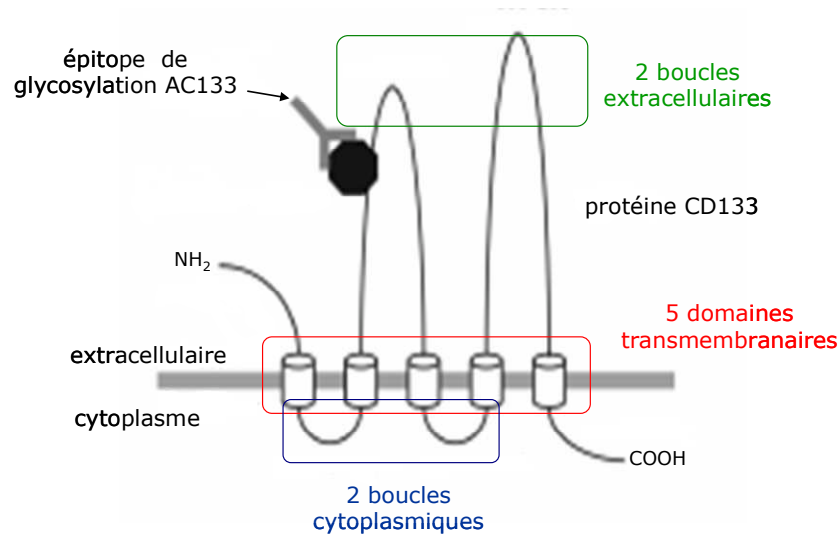


Figure 13 : Structure de la protéine CD133, d'après (Bidlingmaier *et al.* 2008)

Le gène de CD133, situé sur le chromosome 4 chez l'humain, est composé de 37 exons (Huttner *et al.* 2008; Shmelkov *et al.* 2005).

3. Caractéristiques des cellules AC133/1-positives et AC133/1-négatives

Au sein des tumeurs cérébrales, les CCTS des GBM expriment deux types de sous-populations : d'une part les cellules AC133/1-positives et d'autre part les cellules AC133/1-négatives (Bidlingmaier *et al.* 2008). Ces deux types se distinguent par de nombreuses différences qui ont été établies grâce à diverses études *in vitro* et *in vivo*. D'une part, du point de vue de la tumorigénicité, les cellules AC133/1-positives ont été définies comme des cellules hautement tumorigènes (Bao *et al.* 2006). Les cellules AC133/1-positives sont également celles qui représentent la population cellulaire qui confère la résistance aux gliomes contre les traitements actuels (Bao *et al.* 2006; Chang *et al.* 2009), ceci peut s'expliquer par le fait qu'elles présentent un faible taux d'apoptose dû à la diminution d'activité de l'enzyme caspase 3 (Bao *et al.* 2006). Les cellules AC133/1-positives possèdent une activation importante des protéines de checkpoints (Chk 1 et 2) (Bao *et al.* 2006) qui jouent un rôle dans la réparation des dommages causés à l'ADN (**Figure 14**) (Zhou and

Elledge 2000). Les cellules AC133/1-positives ont un taux d'ARNm de la famille des transporteurs ABC (Adenosine TriPhosphate binding cassette) plus élevé (Bidlingmaier *et al.* 2008). L'irradiation des cellules AC133/1-positives entraîne une augmentation de la formation de clones, donc l'apparition de récives (McCord *et al.* 2009). Il a également été montré que la molécule AC133/1 était plus fortement exprimée après une radiothérapie (Bao *et al.* 2006). La sécrétion de VEGF est également différente entre ces deux types de sous-populations. En effet, *in vivo* chez des modèles de souris, le VEGF induit une plus forte vascularité de la tumeur qui est associée à une hémorragie ainsi qu'un taux de mortalité plus élevé (Oka *et al.* 2007). Des études ont montré que la quantification de l'expression d'AC133/1 au sein de la tumeur était liée à l'agressivité tumorale et donc au pronostic des patients (Bao *et al.* 2006). Les cellules cancéreuses de type souche possèdent naturellement un taux élevé de protéines *multidrug resistance* (MDR) comme la protéine P-glycoprotéine codant pour le gène *mdr1* et le gène Bcl-2 qui est un anti-apoptotique des lymphomes à cellules B (Liu *et al.* 2006). L'expression de ces deux gènes a été étudiée sur des échantillons de cerveaux humains normal et atteints de GBM, ces recherches ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la présence de cellules cancéreuses de type souche, l'expression d'AC133/1 et celle des gènes *mdr1* et Bcl-2 (Shervington and Lu 2008). Toutes ces informations font des cellules AC133/1-positives des cellules tumorigènes, résistantes aux traitements et donc des cellules importantes à considérer pour pouvoir les traiter et les détruire.

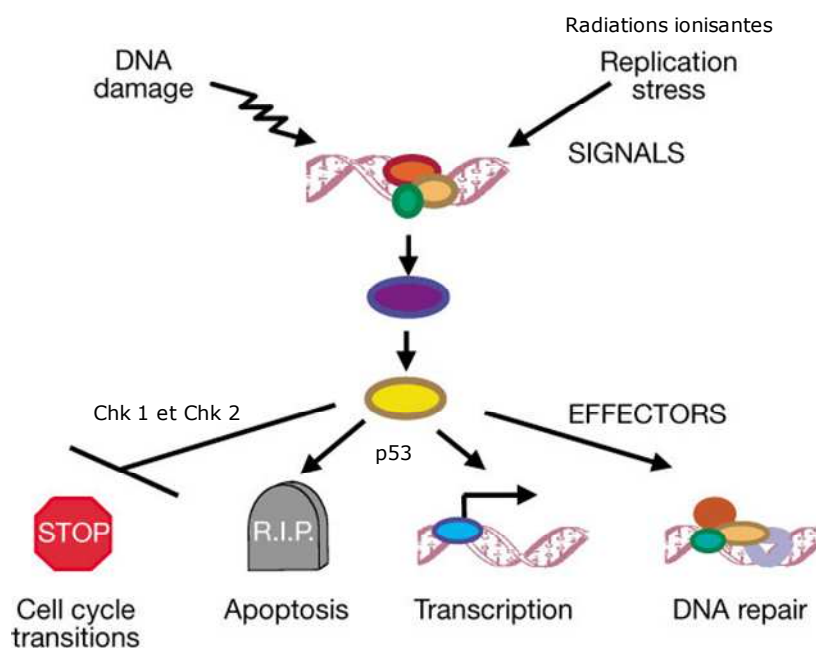


Figure 14 : Schéma représentant les effets de la radiothérapie sur l'ADN, ainsi que les facteurs s'y opposant ou s'y associant, d'après (Zhou and Elledge 2000)

4. Radiorésistance et microenvironnement tumoral : l'axe hypoxie-CCTS

La radiothérapie est un des traitements incontournables du GBM ; mais son efficacité est malheureusement limitée par des mécanismes de radiorésistance non complètement élucidés combinant l'action de facteurs biologiques intrinsèques des cellules tumorales, à l'influence du microenvironnement dans lequel elles se développent. Dans ce contexte, deux entités biologiques cohabitent pour favoriser les événements moléculaires et cellulaires constitutifs de la radiorésistance que sont l'échappement, la prévention et la réparation : il s'agit de l'hypoxie tumorale et des CCTS.

4.1. Hypoxie tumorale et radiorésistance

L'hypoxie tumorale représente un problème majeur pour la radiothérapie, du fait d'une diminution progressive de la radiosensibilité lorsque la pression partielle en oxygène (O_2) dans une tumeur atteint des niveaux inférieurs à 10 mmHg (Harrison *et al.* 2002; Hockel and Vaupel 2001). La présence d'oxygène moléculaire augmente les lésions de l'ADN par la formation de radicaux libres d'oxygène, qui sont produit principalement après l'interaction des rayonnements avec de l'eau intracellulaire (Azzam *et al.* 2012). De ce fait, la dose d'irradiation nécessaire pour obtenir l'effet biologique est nettement plus élevée en conditions hypoxiques comparativement aux conditions normoxiques (Dendy and Wardman 2006; Palcic *et al.* 1982). Différents « capteurs » d' O_2 , dont les radicaux libres d'oxygènes, les molécules thiolées ou certains canaux ioniques (Lopez-Barneo *et al.* 2001), ainsi que différents effecteurs de l'hypoxie, vont pouvoir influencer la résistance à l'irradiation (Cohen-Jonathan Moyal 2012; Yokosawa *et al.* 2010). Parmi les voies identifiées, la plus étudiée demeure celle des protéines de la famille HIF (Hypoxia Inducible Factor). Les protéines HIF sont des hétérodimères constitués d'une sous unité α cytosolique régulée par l' O_2 intracellulaire et d'une sous unité β nucléaire. En condition de normoxie, les sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α sont rapidement hydroxylées par les prolyl hydroxylases (PHL) dont l'activité est largement dépendante de la présence du fer (Schofield and Ratcliffe 2004). La sous-unité α hydroxylée est ensuite prise en charge par la protéine VHL (Von Hippel-Lindau) conduisant à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome (Huang *et al.* 1998; Ivan *et al.* 2001). Les cellules soumises à une diminution de la pression en oxygène, permettent aux hétérodimères de HIF de reconnaître des séquences consensus spécifiques appelées HRE (Hypoxia Responsive Element) présentes dans les gènes répondant à l'hypoxie (Wenger *et al.* 2005), l'angiogénèse, la survie cellulaire, la prolifération ou le métabolisme du glucose (**Figure 15**) (Carroll and Ashcroft 2005). Le grade de la tumeur

(Zhong *et al.* 1999) et l'impact de la radiothérapie sur les cellules de gliome (Hsieh *et al.* 2010; Kessler *et al.* 2010) sont ainsi directement liés à l'expression de HIF.

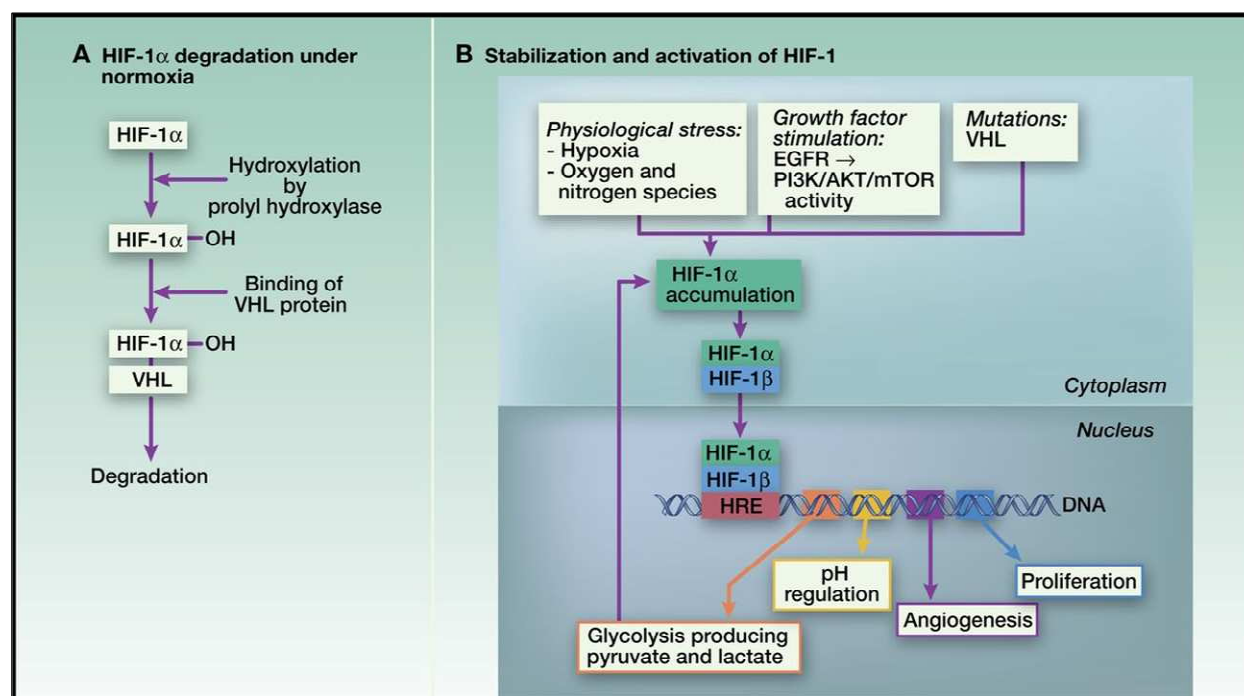


Figure 15 : Représentation schématique de la régulation de la voie de HIF-1, sous deux conditions : normoxie (A) et hypoxie (B), d'après (Meijer *et al.* 2012)

(A) : HIF-1 α est rapidement dégradée à cause de l'hydroxylation de HIF-1 α par la prolyl hydroxylase d'une part, et de sa liaison à la protéine VHL d'autre part. (B) : Différents stress physiologiques, stimulations de facteurs de croissance ou mutations de la protéine VHL contribuent à la stabilisation et à l'accumulation de HIF-1 α . Lorsque HIF-1 α est stabilisée, un complexe se forme entre HIF-1 α et HIF-1 β . Ce complexe HIF-1 se lie à l'élément sensible à l'hypoxie (HRE) de l'ADN, en initiant ainsi la transcription des gènes cibles.

4.2. Hypoxie tumorale et CCTS AC133/1-positives

L'angiogénèse est un phénomène important au sein des GBM, diverses études se sont intéressées à la relation qu'il pouvait exister entre l'angiogénèse et les CCTS. Précédemment, il a été évoqué la différence de sécrétion de VEGF entre les deux types de cellules que sont les cellules AC133/1-positives et les cellules AC133/1-négatives. On peut donc dire que les cellules AC133/1-positives produisent des facteurs pro-angiogéniques capables de recruter des cellules endothéliales qui vont permettre par la suite la néoangiogénèse *in vitro* mais également *in vivo* (Bao *et al.* 2006; Oka *et al.* 2007).

L'hypoxie, autre facteur du microenvironnement tumoral, affecte également la régulation des CCTS dans les GBM. En effet, des études ont montré que l'expression du marqueur AC133/1 à la surface des cellules de GBM humains est dépendante de la pression en oxygène *in vitro*, une faible pression en oxygène (3% d'O₂) maintien une expression plus importante des cellules AC133/1-positives (Platet *et al.* 2007). L'hypoxie dans les GBM permettrait donc le maintien des CCTS.

Des études se sont par la suite intéressées aux mécanismes répondant à l'hypoxie, des protéines de la famille de HIF (HIF-1 et HIF-2) ont été mises en évidence comme favorisant la prolifération et la survie des CCTS dans un environnement hypoxique (Li *et al.* 2009; Pallini *et al.* 2008; Soeda *et al.* 2009). A noter également, qu'une surexpression de HIF-1 α entraîne une surexpression de la protéine CD133, ceci mettant en évidence un rôle de HIF-1 α dans la régulation de CD133 (Pallini *et al.* 2008). Par ailleurs, l'effet des protéines BMP (Bone Morphogenetic Protein), qui ont un rôle dans l'inhibition des CCTS dans les GBM (Piccirillo *et al.* 2006), est inhibé par l'hypoxie et notamment par HIF-1 α (Pistollato *et al.* 2009).

L'épitope AC133/1 apparaît à ce jour comme un marqueur associé des CCTS dont son expression est en lien avec le microenvironnement tumoral et qui joue un rôle important dans les phénomènes de radiorésistance. De ce fait, des études plus approfondies de cet épitope semblent intéressantes.

5. Fonction de la protéine CD133

Une des fonctions de la protéine CD133 est son implication dans les dégénérescences rétiniennes. En effet, CD133 est exprimée dans des lignées cellulaires de rétinoblastome. L'analyse génétique de patients atteints de dégénérescence rétinienne a permis de mettre en évidence une mutation dans le gène de CD133 avec une délétion du nucléotide 1878, conduisant à l'apparition d'un codon stop plus précoce (en position 614). Cette mutation aboutit à la synthèse d'une forme tronquée, au niveau de la seconde boucle extracellulaire (le cinquième domaine transmembranaire ainsi que le segment C-terminal) de CD133 (Maw *et al.* 2000), cette forme n'est plus capable d'être présente à la surface des cellules. Une autre étude démontre que CD133 interagit avec la protéine protocadhérine qui est une protéine d'adhésion cellulaire spécifique des photorécepteurs, ainsi qu'avec les filaments d'actines, ces deux molécules jouant un rôle dans la morphogénèse de la membrane des disques (Yang *et al.* 2008).

Une autre étude s'est intéressée aux fonctions intrinsèques de CD133 dans l'autophagie, l'apoptose, la tumorigenèse et la survie cellulaire dans un modèle d'hépatome. Cette étude a démontré d'une part, que l'expression de CD133 augmentait l'activité d'autophagie et que d'autre part, CD133 était impliquée dans la survie des cellules à travers la régulation de l'autophagie et du glucose (Chen *et al.* 2013).

Enfin, une expression plus importante de CD133 est observée lorsque le taux de glucose est élevé dans des cellules musculaires squelettiques de rat, ce qui induit une augmentation de l'internalisation du glucose (Yang *et al.* 2007).

La fonction et le rôle des CCTS et de ses marqueurs associés doit être approfondis pour permettre un meilleur ciblage des entités responsables de la résistance aux traitements. Et pour, par la suite, pouvoir développer une stratégie thérapeutique plus adaptée pour le traitement du GBM.

Les CCTS ne sont peut être pas les seules responsables de la résistance des cellules de GBM aux différents traitements, d'autres entités cellulaires ou moléculaires peuvent contribuer aux échecs thérapeutiques du GBM.

II. Les microARN

Dans la mesure où le transport extracellulaire de microARN a pu être associé à la production de microvésicules (Huttner *et al.* 2008), et du fait de la présence du marqueur CD133 associé aux CCTS à la surface de particules membranaires sécrétées dans le cerveau (Skog *et al.* 2008), et malgré qu'aucune relation entre CD133 et le transport extracellulaire de microARN n'est à ce jour été démontrée dans le GBM, il nous est apparu pertinent de mieux comprendre le fonctionnement des microARN au sein du GBM.

1. Découverte des microARN

Récemment, une nouvelle classe d'ARN a été mise en évidence, les microARN également appelés miARN ou miR. Ce sont des ARN endogènes, non codants, simples brins, de petites tailles (entre 18 et 25 nucléotides) qui ne présentent ni queue poly A ni coiffe (Lee *et al.* 2004). Le premier miARN, lin-4, a été mis en évidence en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* par Victor Ambros, Rosalind Lee et Rhonda Feinbaum (Lee *et al.* 1993). Le deuxième, let-7 (lethal-7), a également été découvert chez *C. elegans* en 2000 par le groupe de Gary Ruvkun (Reinhart *et al.* 2000). Ces deux gènes ont un rôle dans le contrôle larvaire de *C. elegans* (Reinhart *et al.* 2000). Initialement appelés « small temporal RNAs » (stRNAs) (Pasquinelli *et al.* 2000), en 2001 ils furent plus étudiés et renommés : microARN (Lagos-Quintana *et al.* 2001). Par la suite, d'autres miARN ont été découverts chez différentes espèces, comme chez la mouche *Drosophila melanogaster* (Nolo *et al.* 2006), le poisson zèbre (Wienholds *et al.* 2003), la grenouille (Giraldez *et al.* 2005) et chez l'homme (Lagos-Quintana *et al.* 2001; Lee and Ambros 2001). Les miARN sont présents dans toutes les régions du génome (Carthew and Sontheimer 2009), régulent entre 10 et 30% des gènes codants (Paranjape *et al.* 2009) et constituent la composante majeure de la régulation des gènes (Bartel 2004). En Juin 2013, miRBase version 20 répertoriait l'existence de 24521 miARN répartis dans 206 espèces. Environ 50% des miARN forment des groupes composés de plusieurs miARN (Hertel *et al.* 2006; Lee and Dutta 2009).

2. Biogenèse des miARN

Le mécanisme de biogenèse des miARN se déroule en plusieurs étapes. La synthèse débute tout d'abord dans le noyau cellulaire, le gène codant pour le miARN est transcrit par l'ARN polymérase II ou III en miARN primaire (couramment appelé le pri-miARN) long de plusieurs centaines à plusieurs milliers de nucléotides. Le pri-miARN est structuré de la manière suivante : une tige d'environ 33 nucléotides, une boucle terminale et des séquences 'flanquantes', ces séquences possèdent en 5' une coiffe 7-méthyl-guanosine (m7G) et une queue poly-A en 3' (Cai *et al.* 2004; Lee *et al.* 2004). Ce pri-miARN est par la suite clivé par le complexe nommé microprocesseur et devient un miARN précurseur (pré-miARN) (Cai *et al.* 2004; Lee *et al.* 2004). Ce complexe microprocesseur est formé, chez l'homme, de l'enzyme Drosha, une ribonucléase III, associée à son cofacteur DGCR8 (Di George Critical Region 8). Chez les autres organismes, DGCR8 est remplacé par l'enzyme Pasha (Gregory *et al.* 2004; Lee *et al.* 2003). La présence du cofacteur est nécessaire pour permettre l'ancrage du complexe au pri-miARN entre les séquences 'flanquantes' et la tige. Le pré-miARN, composé de 70 à 90 nucléotides dont deux nucléotides non appariés en 3' et un phosphate en 5' (Han *et al.* 2006), en forme d'épingle à cheveux, est par la suite exporté vers le cytoplasme grâce à l'exportine-5 (Lund *et al.* 2004). Le pré-miARN est par la suite clivé par une ribonucléase de type III, Dicer, qui aboutit à la formation d'un duplexe double brin miARN/miARN*. Le complexe miRISC (miRNA-induced silencing complex), composé de protéines de la famille Argonaute, agit ensuite sur le duplexe miARN/miARN* (Adams *et al.* 2009). Un seul des deux brins du duplexe est conservé et devient un miARN mature, l'autre brin est quant à lui dégradé (Bartel 2004). Le brin conservé est celui dont la séquence est spécifique et complémentaire de l'ARNm cible (**Figure 16**) (Bartel 2004). Le miARN mature est composé de deux parties : la coiffe située en 5', constituée de 2 à 7 nucléotides, qui s'associe à la cible et la partie en 3' qui reconnaît la cible.

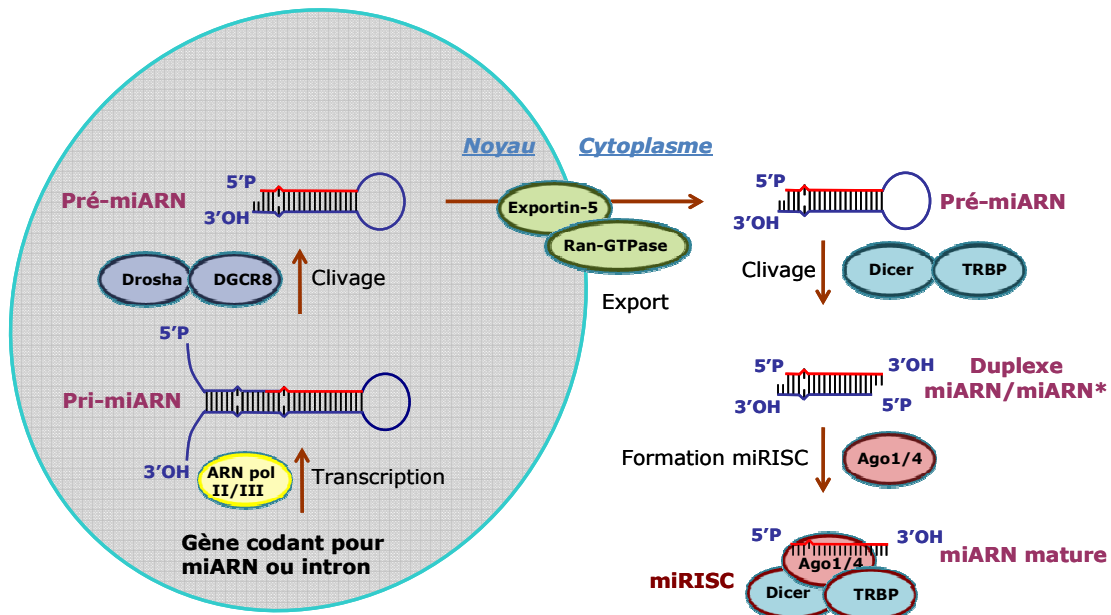


Figure 16 : Mécanisme de biogénèse des miARN

3. Mode d'action des miARN

Un miARN peut avoir plusieurs cibles et plusieurs miARN peuvent avoir la même cible (Sethupathy *et al.* 2006). Les sites des miARN sont complémentaires au niveau de la région 3' UTR (UnTranslated Region) non traduite de l'ARNm (Bartel 2004). Un appariement entre le miARN mature et l'ARNm cible peut avoir deux conséquences principales : i) une répression de la traduction de l'ARNm ou ii) une dégradation de l'ARNm (**Figure 17**) (Bartel 2004).

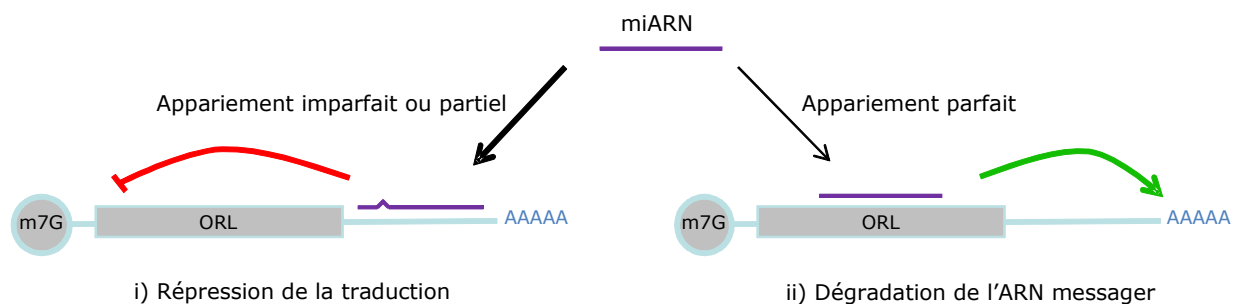


Figure 17 : Effets des miARN sur l'ARN messager

Les miARN jouent un rôle dans divers processus biologiques et cellulaires comme par exemple le développement, la prolifération, l'apoptose mais également dans différentes maladies dont les cancers (Bartel 2004; Chen *et al.* 2005; Zimmerman and Wu 2010).

4. Implication des miARN dans les maladies dont les cancers

Différentes équipes ont pu mettre en évidence un lien entre des processus biologiques ou des pathologies et la régulation de miARN spécifiques. Par exemple, l'équipe de Srivastava a montré l'importance de deux miARN (miR1-1 et miR1-2), spécifiquement exprimés dans des cellules du muscle et du cœur, une surexpression de ces deux miARN entraîne une diminution du développement des cardiomyocytes ventriculaires (Zhao *et al.* 2005). Les miARN sont impliqués dans plusieurs maladies, la première mise en évidence fut une maladie génétique, le syndrome de l'X fragile également appelé le syndrome d'Escalante (Eulalio *et al.* 2008). Des corrélations entre d'autres pathologies et la sur- ou sous-expression de certains miARN ont par la suite été mises en évidence. Comme par exemple dans le syndrome de Tourette, le miR-132 réprime l'expression d'une protéine, dont le gène est impliqué dans des altérations sur l'ADN (Abelson *et al.* 2005). Dans le cas de la schizophrénie, il s'agit du miR-181b qui est surexprimé (Ardekani and Naeini 2010; Perkins *et al.* 2007).

Les miARN peuvent avoir un rôle prépondérant dans l'induction et/ou la progression des cancers chez l'homme (Calin and Croce 2006). En 2002, Calin et ses collègues ont mis en évidence la première corrélation entre les miARN et le cancer (Calin *et al.* 2002). Ces études ont mis en évidence que deux miARN (miR-15a et miR-16-1) étaient absents ou faiblement exprimés chez les patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique (Calin *et al.* 2002). Dans l'adénocarcinome colique, deux miARN ont été identifiés comme sous-exprimés (miR-143 et miR-145) (Michael *et al.* 2003). Chez l'homme, environ 50% des gènes des miARN sont situés dans des régions chromosomiques fragiles impliqués dans le développement de cancers (Calin *et al.* 2004; Zhang and Coukos 2006) et environ 25% de ces miARN sont dérégulés dans au moins un type de cancer. Certains miARN peuvent être surexprimés (miR-21, miR-155, miR-221 et miR-222) (Calin *et al.* 2004; Gillies and Lorimer 2007; Medina *et al.* 2010; Medina *et al.* 2008) et d'autres sont sous-exprimés (miR-143, miR-145 et let7/miR-98) dans différents cancers (Roush and Slack 2008; Wu *et al.* 2010). Parfois, des miARN sont surexprimés dans certains cancers et sous-exprimés dans d'autres, c'est le cas du 'cluster' miR-17-92 qui est surexprimé dans sept types de tumeurs et sous-exprimé dans trois autres (He *et al.* 2005; O'Donnell *et al.* 2005), la même chose se produit

avec miR-181b et miR-181c qui sont sous-exprimés dans le GBM et surexprimés dans d'autres tumeurs (Bandres *et al.* 2006). On peut donc dire que les miARN sont une nouvelle classe de gènes impliquée dans l'oncogenèse humaine (Bandres *et al.* 2006) et dans le processus de métastases (Nicoloso *et al.* 2009). De ce fait, deux types de miARN existent au sein des cancers, il y a tout d'abord les miARN considérés comme des oncogènes et d'autres considérés comme des suppresseurs de tumeurs.

5. Les différents types de miARN

5.1. Les miARN considérés comme des oncogènes

Les miARN considérés comme des oncogènes, sont des miARN surexprimés dans les cellules cancéreuses, également appelés 'oncomiRs' (Zhang *et al.* 2007). Plusieurs miARN ont déjà été identifiés comme étant des 'oncomiRs' : miR-155, miR-372/373, le 'cluster' miR-17-92, miR-21, miR-135... MiR-155 est l'un des premiers à avoir été décrit comme surexprimé dans plusieurs cancers tels que les lymphomes (Kluiver *et al.* 2006), le cancer du sein ou le cancer du poumon (Volinia *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2007). Dans le cas du cancer du sein, la surexpression de miR-155 augmente la survie cellulaire et la résistance aux agents thérapeutiques (Kong *et al.* 2010). En 2006, il a été montré que la surexpression de miR-372/373 conduit à une prolifération cellulaire importante dans le cancer du testicule (Voorhoeve *et al.* 2006). Le 'cluster' mir-17-92, regroupant six miARN (miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a et miR-92), a été décrit comme étant surexprimé dans le cancer du poumon et dans les lymphomes B (Zhang *et al.* 2007), avec un impact sur la prolifération cellulaire *in vitro* et sur l'évolution tumorale *in vivo* (Hayashita *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007). MiR-21 est quant à lui surexprimé dans 15 types de cancers différents (Wang and Lee 2009), comme par exemple dans le cancer du sein (Frankel *et al.* 2008) ou dans les cellules de GBM humain U87MG (Shi *et al.* 2010). La surexpression de miR-21 implique une sur-régulation de Bcl-2, une augmentation de la masse tumorale ainsi qu'une diminution de l'apoptose (Si *et al.* 2007). Et pour finir, il y a également miR-135 qui est surexprimé dans les adénomes et les carcinomes colorectal (Nagel *et al.* 2008).

5.2. Les miARN considérés comme des suppresseurs de tumeurs

Une autre fonction des miARN peut être de réduire la formation de cellules tumorales ou d'empêcher l'apparition de cancer, dans ce cas ces miARN sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs (Zhang *et al.* 2007). Quelques exemples vont être brièvement évoqués : let-7 (Calin *et al.* 2004), le 'cluster' miR-15a/miR-16-1 (Calin *et al.* 2002), la famille miR-29 (Mott *et al.* 2007), miR-128 (Godlewski *et al.* 2008) et miR-34 (Ji *et al.* 2009). Tout d'abord, le premier miARN identifié en tant que suppresseur de tumeur fut let-7 (Nana-Sinkam and Croce 2013), son étude dans les cellules d'adénocarcinome du poumon a montré qu'une augmentation de son expression inhibait la prolifération cellulaire (Dalmay 2008). Dans les tumeurs pulmonaires, une étude a montré qu'une faible expression de let-7 régule favorablement l'expression de la protéine RAS qui joue un rôle prépondérant dans l'auto-renouvellement, la réduction de la formation de mammosphères, de l'expansion clonale et la tumorigénicité (Johnson *et al.* 2005; Yu *et al.* 2007). Ensuite, le deuxième miARN, composé d'un « cluster » de deux miARN : miR-15a et miR-16-1, a été découvert dans la leucémie lymphoïde chronique comme étant délétère ou sous-régulé chez ses patients (Calin *et al.* 2002). Ce 'cluster' a un effet répressif sur le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Cimmino *et al.* 2005). Quant à la famille miR-29, subdivisée en deux groupes (miR-29b-1/miR-29a et miR-29b-2/miR-29c) (Mott *et al.* 2007), elle est sous-régulée dans la leucémie lymphoïde chronique, le cancer du poumon, le cancer du sein, la leucémie myéloïde aiguë et le cholangiocarcinome (Calin *et al.* 2005; Garzon and Croce 2008; Iorio *et al.* 2005; Mott *et al.* 2007; Yanaihara *et al.* 2006). Il y a également, l'expression de miR-128 qui est réduite dans les gliomes de haut grade et qui diminue la prolifération cellulaire des gliomes (Godlewski *et al.* 2008). Et pour finir, miR-34 est sous-régulé dans le cancer de l'estomac et dans les cellules cancéreuses pancréatiques, en rétablissant la fonction de p53 (Ji *et al.* 2009). D'autres miARN sont également considérés comme des suppresseurs de tumeurs : miR-199b-5p, miR-125b, miR-326 et miR-324-5p (DeSano and Xu 2009; Kefas *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2011).

6. Les miARN impliqués dans le développement du glioblastome

Divers miARN ont déjà été décrits comme étant impliqués dans le développement du GBM, comme par exemple miR-21, miR-210, miR-221/222, miR-181a et miR-181b, miR-7, miR-128, miR-124 ou encore miR-137 ... (Ciafre *et al.* 2005; Godlewski *et al.* 2008; Kefas *et al.* 2008; Novakova *et al.* 2009; Shi *et al.* 2008; Silber *et al.* 2008). Trois exemples vont par

la suite être brièvement décrits.

MiR-21 a été mis en évidence comme étant présent dans des cellules de GBM *in vitro* et comme étant impliqué dans la croissance tumorale *in vivo* (Ji *et al.* 2010). Un knockdown de miR-21 entraîne une augmentation de l'activité apoptotique avec une activation des caspases (Chan *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2007), une réduction de la viabilité cellulaire et des volumes tumoraux (Corsten *et al.* 2007). MiR-21 est également impliqué dans l'inhibition de la traduction de différentes molécules comme : RECK, TGFBR, DAXX, PDCD4, p63, JMY, TOPORS, HNRNPK et TP53BP2 (Novakova *et al.* 2009). En 2010, une équipe a mis en évidence un lien entre miR-21 et le Témzolomide, en effet, une surexpression de miR-21 réduit l'apoptose cellulaire induite par le Témzolomide (Shi *et al.* 2010). Cette étude a montré qu'un prétraitement des cellules U87MG avec miR-21, avant un traitement au Témzolomide, réduisait l'action de l'agent alkylant (Shi *et al.* 2010). MiR-21 est donc un oncogène dans le cas du GBM.

Un autre exemple est le miR-210, un miARN induit par l'hypoxie, qui peut être appelé HRMS (Hypoxia-Regulated MicroRNAs) et qui est impliqué dans le GBM (Kulshreshtha *et al.* 2007). Deux cibles de miR-210 ont été identifiées : ISCU (iron-sulfur cluster scaffold homolog) et COX10 (cytochrome c oxidase assembly protein) (Chen *et al.* 2010).

Dernier exemple, miR-221, souvent surexprimé dans les GBM contrôle la croissance cellulaire ainsi que la progression du cycle cellulaire (Ciafre *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2010). MiR-221 fonctionne en parallèle avec un second miARN qui est le miR-222. Ces deux miARN ont un effet similaire (Ciafre *et al.* 2005) puisqu'ils inhibent l'apoptose en réduisant l'expression de Bcl-2 et en augmentant celle de Bax (Zhang *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2010) ainsi qu'en réduisant l'expression de Kip/Cip en agissant par exemple sur p27 ou p57 (Gillies and Lorimer 2007; Medina *et al.* 2008). Le knockdown de miR-221 permet un retour 'normal' à l'apoptose (Zhang *et al.* 2010).

Au sein des cancers, de nombreux miARN sont présents en fortes ou faibles quantités et ont des effets néfastes (c'est le cas des oncogènes) ou bénéfiques (les miARN suppresseurs de tumeurs). Pour pouvoir pallier les effets des miARN, il faut réduire l'expression des oncogènes et augmenter celle des miARN suppresseurs de tumeurs. Le défi est donc de trouver une balance au sein des cellules cancéreuses entre ces deux types de miARN (**Figure 19**).

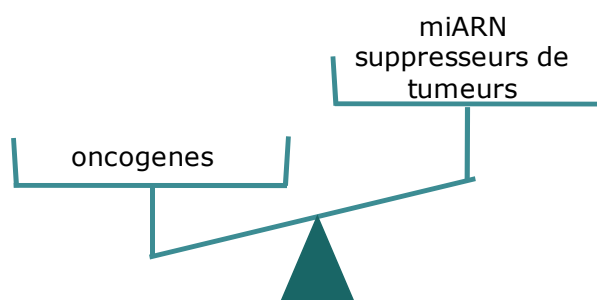


Figure 19 : Schéma représentant la répartition 'idéale' entre ces deux types de miARN au sein des cancers

7. Stratégies moléculaires pour réguler l'expression de ces différents miARN

Le ciblage des miARN peut se faire à l'aide d'oligonucléotides qui peuvent agir soit sur les miARN oncogéniques soit sur les miARN agissant comme suppresseurs de tumeurs (Dalmay 2008). Le fonctionnement de ces oligonucléotides a tout d'abord été testé avec le ciblage des siARN. Au cours de ces dernières années, différents types d'oligonucléotides pouvant cibler des miARN ont été développés : les oligonucléotides anti-miARN, les antagomiRs, les Locked Nucleic Acid (LNA), les miARN 'sponges', les miARN 'mask', les miARN mimiques (Garzon *et al.* 2010).

7.1. Les oligonucléotides anti-miARN

Tout d'abord, les oligonucléotides anti-miARN (AMOs) sont des oligonucléotides simples brins de petites tailles (entre 13 et 25 nucléotides) qui agissent comme des inhibiteurs de miARN, qui bloquent l'interaction entre le miARN et son ARNm cible (Li *et al.* 2009; Weiler *et al.* 2006). Le premier inconvénient de ces AMOs est leur faible tolérance à la dégradation par les nucléases (Stenvang and Kauppinen 2008). Différents AMOs modifiés chimiquement, permettant une meilleure affinité d'hybridation mais également une meilleure résistance à la dégradation des nucléases, existent (Esau 2008; Stenvang and Kauppinen 2008). La première génération d'oligonucléotides modifiés chimiquement donne naissance aux phosphorothioates (PS) qui sont chargés négativement (Stenvang and

Kauppinen 2008). La modification chimique consiste à remplacer un atome de soufre par un atome d'oxygène du groupe phosphate (**Figure 20**) (Stenvang and Kauppinen 2008). Une des spécificités des PS est leur capacité à stimuler le système immunitaire (Stenvang and Kauppinen 2008), mais ils ont également plusieurs inconvénients comme une faible liaison aux acides nucléiques complémentaires ainsi qu'une liaison non-spécifique à la protéine (Kurreck *et al.* 2002). Un second type de modification est la modification 2'-O-méthyle (2'-O-Me) qui permet une augmentation de l'affinité avec l'ARNm (Stenvang and Kauppinen 2008). Le principal inconvénient est également la dégradation par les nucléases (**Figure 20**) (Meister *et al.* 2004). Ensuite, il y a les morpholinos qui sont des molécules synthétiques non chargées, complémentaires à l'ARNm par appariement des bases. Les morpholinos sont composés des bases azotées classiques fixées sur des cycles morpholines (**Figure 20**) (Stenvang and Kauppinen 2008). Les morpholinos ne sont pas reconnus par les nucléases, et sont donc très résistants aux endonucléases, exonucléases et protéases, et sont très stables dans les systèmes biologiques (Hudziak *et al.* 1996).

7.2. Les antagomiRs

Ensuite, nous avons les antagomiRs dont leur rôle est de bloquer les effets des oncomiRs (Krutzfeldt *et al.* 2005). Ils furent découverts en 2005 par l'équipe de Krutzfeldt sur une étude basée sur l'expression de miR-122 chez la souris. Ce sont de courts (21-23 nucléotides de long) brins d'ARN synthétiques complémentaires à l'ARNm cible (Garzon *et al.* 2010). Ces molécules sont conjuguées à une molécule de cholestérol pour augmenter la pénétration cellulaire (Sotillo and Thomas-Tikhonenko 2011).

7.3. Les Locked Nucleic Acid

Il y a aussi les Locked Nucleic Acid (LNA) qui sont des ARN rigides bi-cycliques analogues (Stenvang and Kauppinen 2008) possédant un pont méthylène reliant le 2'O du ribose au 4'C (**Figure 20**) (Kurreck *et al.* 2002). Les LNA sont très stables, avec une forte affinité pour l'ARNm, une bonne solubilité en milieu aqueux (Stenvang and Kauppinen 2008) ainsi qu'une faible toxicité *in vivo* (Li *et al.* 2009). Ils peuvent également réduire la réponse immunitaire ainsi qu'augmenter la température de fusion de quelques degrés (2 à 10°C par monomère) (Kurreck *et al.* 2002; Stenvang and Kauppinen 2008). Ces molécules ont déjà été testées sur des modèles cellulaires, comme par exemple sur des cellules de GBM. L'étude a révélée que l'utilisation de LNA ciblant le miR-21 induit une inhibition de la

croissance cellulaire ainsi qu'une induction de l'apoptose (Chan *et al.* 2005). Une autre étude, s'intéressant au LNA ciblant miR-221/222 dans une lignée cellulaire du cancer de la prostate, a montré une augmentation de p27 ainsi qu'une réduction de la capacité des cellules à former des clones (Galardi *et al.* 2007).

7.4. Les miARN 'sponges'

Une autre catégorie est les miARN 'sponges' qui sont des ARN synthétiques complémentaires des sites 3'UTR de l'ARNm (Ebert and Sharp 2010; Li *et al.* 2009). Leur principal avantage est la capacité d'inhiber l'expression de toute une famille de miARN, ce qui pose un problème lorsque les miARN sont regroupés dans des 'clusters' (Ebert and Sharp 2010). Ces miARN sont intéressants, car une seule administration est suffisante pour l'inhibition des miARN contrairement aux antagomiRs qui nécessitent une administration répétée (Ebert and Sharp 2010).

7.5. Autres molécules

D'autres molécules existent comme : les miARN 'mask' et les miARN mimiques. Les miARN 'mask' sont des oligonucléotides antisens simples brins 2'-O-Me modifiés, complémentaires à l'ARNm (Li *et al.* 2009). Les miARN mimiques ont une fonction de suppresseur de tumeurs, qui impliquent la mort cellulaire et le blocage de la prolifération cellulaire (Garzon *et al.* 2010).

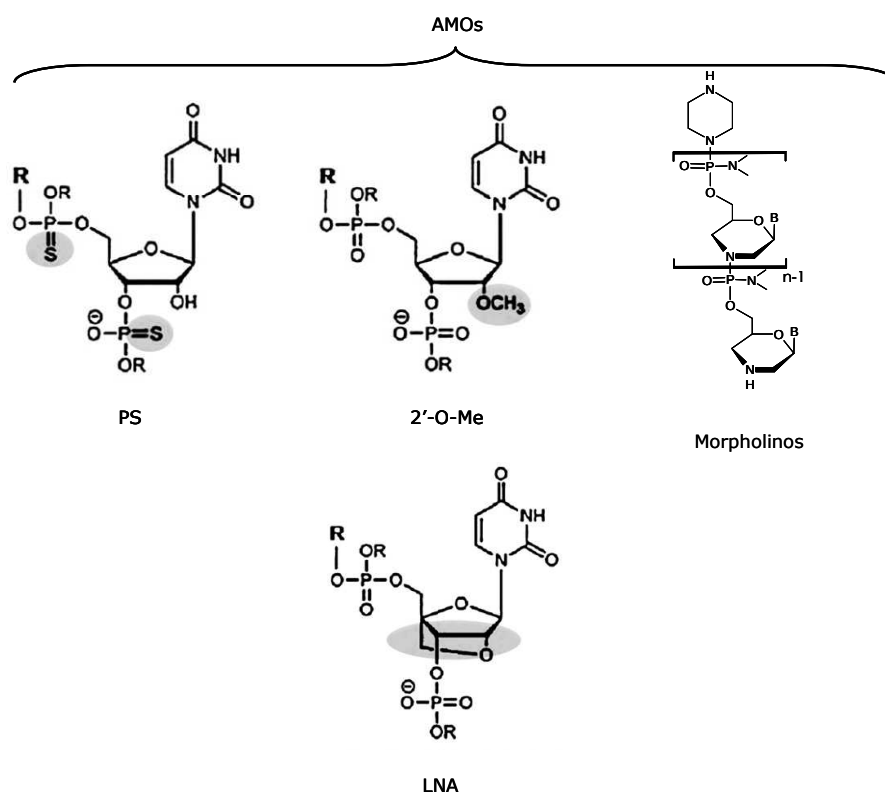


Figure 20 : Représentation schématique de leurres oligonucléotidiques des miARN, d'après (Moulton *et al.* 2004; Ruberti *et al.* 2012)

Parallèlement à l'identification de cibles pertinentes, un problème majeur imposé par ces pathologies demeure la résistance aux traitements avec une administration non optimale des traitements. L'émergence des nanotechnologies et des nanomédecines offre des perspectives intéressantes qui pourraient être combinées aux molécules qui inhibent l'action des miARN. En raison de leur taille submicronique, les nanostructures peuvent interagir de façon unique avec les systèmes biologiques avec une meilleure efficacité, spécificité et sécurité biologique des médicaments ou principes actifs (Heurtault *et al.* 2002).

III. Vectorisation de principes actifs ou de petits acides nucléiques par les nanomédecines

1. Les nanovecteurs

Des études récentes démontrent l'intérêt des nanomédecines et offrent des perspectives intéressantes pour l'administration d'agents pharmacologiques s'opposant à leur croissance. Différents paramètres sont à prendre en compte lors de la conception d'un vecteur (Shapira *et al.* 2011) :

- la complexité de synthèse ainsi que le coût de la conception,
- la stabilité,
- la furtivité du vecteur,
- la libération du médicament,
- la biodégradabilité,
- et la toxicité.

1.1. Interaction du nanovecteur avec le milieu vivant

Des interactions entre le milieu vivant et les nanoparticules sont possibles grâce à la composition des nanoparticules, et plus particulièrement grâce à leur taille nanométrique, leur charge de surface, leur porosité et leur rugosité. Autre caractéristique importante pour les interactions avec le milieu vivant est la versatilité de structure. Cette versatilité est possible en fonctionnalisant la surface des nanoparticules, par des groupements chimiques, des ligands ou des anticorps. Ces interactions sont faisables grâce aux molécules environnantes comme les molécules d'eau, les acides ou les bases, les ions, les matériaux organiques (de type glucidiques, protéiques, lipidiques), les tensioactifs ainsi que les polymères. Ces interactions peuvent avoir lieu avec les membranes ou les biomolécules (lipides, protéines, ADN) et peuvent entraîner des effets structuraux et fonctionnels, mais aussi des transferts d'énergies, des changements de conformation des biomolécules (Nel *et al.* 2009).

1.2. Nanovecteurs et cancer

Les nanomédecines doivent passer différentes barrières biologiques, quelles soient tissulaires (sang, épithélium, endothélium), cellulaires (matrice extracellulaire, membrane plasmique) et/ou sub-cellulaires (mitochondrie, noyau, endolysosome, réticulum). Les progrès récents dans le domaine des nanomédecines permettent d'orienter les nouvelles thérapies vers des thérapies ciblées. En effet, la combinaison des agents anticancéreux à des nanovecteurs permet d'améliorer la biodistribution, notamment le passage des barrières biologiques, mais également présente des avantages au niveau clinique avec des réductions de dose. En outre, cette combinaison peut grandement améliorer l'affinité de la drogue ainsi que la sélectivité (Peer *et al.* 2007). Des études ont déjà démontré l'intérêt des nanotechnologies dans les traitements des GBM. Comme par exemple, des nanoparticules superparamagnétiques de polyacrylamide qui présentent une capacité de rétention au niveau tumoral (Moffat *et al.* 2003). Des nanoparticules modifiées à leurs surfaces par des séquences RGD ont montré leur capacité à reconnaître des intégrines surexprimées à la surface des cellules de gliomes (Montet *et al.* 2006). La biodistribution des principes actifs peut être améliorée grâce à leur encapsulation au sein de systèmes colloïdaux (Petit *et al.* 2008). Des études avec différents nanovecteurs (liposomes, nanosphères polymériques, nanocapsules lipidiques) ont montré, que lorsque l'agent thérapeutique était encapsulé, son devenir était fonction du vecteur (Couvreur *et al.* 2002; Gref *et al.* 1994; Muller and Keck 2004; Storm *et al.* 1998). L'avantage de cette encapsulation est la protection de l'agent thérapeutique jusqu'à sa libération.

La **figure 21** schématise des nanovecteurs actuellement utilisés : les nanoparticules polymériques hydrophiles et hydrophobes, les micelles, les liposomes, les nanoparticules lipidiques solides ou non, les dendrimères, les nanoparticules inorganiques, les nanocristaux et les nanotubes de carbone.

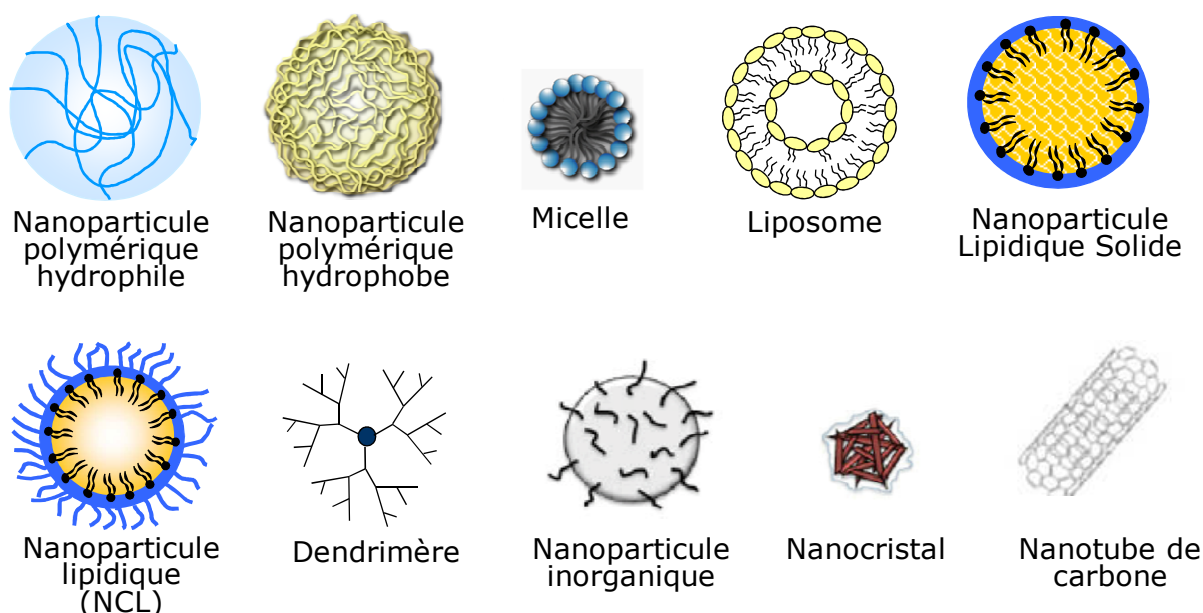


Figure 21 : Schéma de différents types de nanovecteurs

2. Les nanocapsules lipidiques

Une première génération de nanocapsules a été développée il y a une quarantaine d'années, mais ces nanocapsules étaient très rapidement éliminées par le système réticuloendothélial, ce qui ne permettait une délivrance des médicaments ou des principes actifs que jusqu'au foie et à la rate (Beduneau *et al.* 2008). Le laboratoire INSERM U1066 a par la suite mis au point et développé une nouvelle génération de nanocapsules, les nanocapsules lipidiques (NCLs), brevetées en 2000 (n°026800) (Heurtault *et al.* 2002). Ce sont des vecteurs colloïdaux d'un diamètre pouvant varier entre 20 et 100 nm (Heurtault *et al.* 2003). Les NCLs sont constituées d'un cœur huileux contenant des triglycérides (Labrafac®), d'un surfactant amphiphile (polyéthylène glycol hydroxystéarate : Solutol®) et d'un agent tensioactif lipophile (lécithines : Lipoïd®), tous ces excipients étant biocompatibles (**Figure 22**) (Heurtault *et al.* 2002). De plus, les composants des NCLs et notamment le Solutol®-HS15 peut interagir avec la P-glycoprotéine et le phénomène de multidrug resistance (Garcion *et al.* 2006). La formation des NCLs est basée sur le principe d'inversion de phase qui provoque le passage d'une microémulsion huile dans eau à une microémulsion eau dans huile par une augmentation de la température (**Figure 22**) (Heurtault *et al.* 2002). Le procédé de formulation des NCLs se déroule en deux étapes : la première correspond à l'ajout des différents composants qui subissent des cycles de chauffages-refroidissements, et la seconde à réaliser un choc thermique produit par un ajout d'eau froide qui dilue la préparation et fige les nano-objets (**Figure 22**) (Heurtault *et*

al. 2002). L'intérêt majeur de ces NCLs est leur capacité à transporter des agents anticancéreux hydrophobes radioactifs ou chimiques jusqu'aux cellules cibles, tout en protégeant le contenu des dégradations chimiques et enzymatiques (Beduneau *et al.* 2008) et en augmentant leur action (Garcion *et al.* 2006). Les NCLs peuvent également être modifiées à leur surface, ce qui les rend plus furtives et leur permet un ciblage plus spécifique, comme par exemple avec le greffage d'anticorps à leur surface (Beduneau *et al.* 2008). Des études précédentes ont montré que les NCLs participaient au routage subcellulaire et entraient au sein des cellules par les différentes voies d'endocytose suivant la taille des objets (Paillard *et al.* 2010). Les NCLs échappent donc à l'endolysosome, ce qui veut dire que les NCLs vont dans le cytoplasme et ceci est important pour véhiculer des acteurs pouvant modifier la membrane plasmique. Les NCLs présentent d'autres avantages comme par exemple : le franchissement facilité des membranes ou des barrières biologiques grâce à leurs tailles nanométriques, la réduction des interactions avec la matrice extracellulaire et l'augmentation de la biodistribution du principe actif (Allard *et al.* 2009). Les NCLs ont également montré une application intéressante concernant leur administration en locale par voie stéréotaxique dans le cerveau de rats, cette administration de NCLs chargées d'un radioélément a provoqué une réduction de la taille de la tumeur (Vanpouille-Box *et al.* 2011).

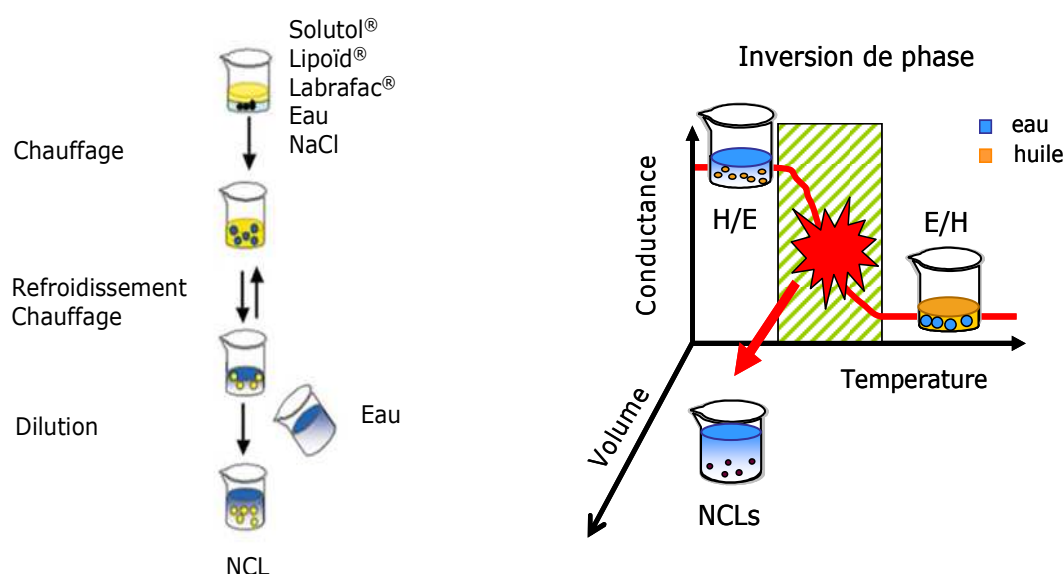


Figure 22 : Principe de formulation des nanocapsules lipidiques (NCLs)

IV. Objectifs de la thèse

L'objectif de ce travail de thèse de doctorat a été d'étudier la **pertinence du ciblage thérapeutique de deux marqueurs potentiels de radiorésistance dans le GBM**, également associés à des phénotypes de cellules cancéreuses de type souche, que sont : l'**épitope AC133/1** et certains **microARN** (miR-21, miR-210 et miR-221).

Deux questions majeures ont été posées :

- i) **Quelle est la signification de l'expression de ces marqueurs** au sein des GBM au plan de leur développement et évolution comme au niveau fonctionnel cellulaire ?
- ii) **Les nanomédecines représentent-elles des outils utiles** et pertinents pour reconnaître ces marqueurs « a priori » membranaires (AC133/1) ou intracellulaires (miARN) et quel serait alors leur impact thérapeutique ?

En ce qui concerne la première question, nous avons étudié le lien entre l'expression d'AC133, le microenvironnement tumoral (et plus particulièrement l'influence de la pression partielle en oxygène) et l'agressivité tumorale. Par la suite, en nous basant sur la localisation membranaire d'AC133/1, nous nous sommes intéressés au rôle fonctionnel cellulaire de cette molécule dans les mécanismes d'échanges avec le milieu extracellulaire (endocytose notamment). Enfin, une dernière étude a considéré l'expression de miARN au sein d'une nouvelle collection de CCTS issues de patients atteints de GBM en réponse à divers traitements de radiothérapie.

En ce qui concerne la deuxième question, un travail de synthèse de nanovecteurs a été réalisé. Des constructions originales utilisant des immunoglobulines pour reconnaître AC133/1 ou des peptides ou polymères pouvant être combinés ou complexés à des « Locked Nucleic Acid » s'opposant à l'activité de miARN ont été développées, structurellement caractérisées et testées au niveau fonctionnel *in vitro* en amont d'expérimentations *in vivo*.

CHAPITRE I

Chapitre I : Marqueurs de radiorésistance et glioblastome

1. L'épitope AC133/1

1.1. Expression d'AC133/1 et phénotypes tumoraux

La radiorésistance est un problème majeur vis-à-vis duquel des mécanismes intrinsèques (inhérents aux cellules tumorales dans leurs caractéristiques endogènes) et des mécanismes extrinsèques (dépendants du microenvironnement) coexistent et communiquent. Si la cellule tumorale est bien armée pour s'opposer aux effets des traitements (échappement, réparation, exclusion), alors les conditions environnementales qu'elle subit ou/et qu'elle corrompt sont importantes à considérer dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements.

Une faible pression partielle tissulaire en oxygène est un facteur de radiorésistance indéniable. A cet effet, des études précédentes ont montré d'une part, qu'AC133/1 est localisée dans des zones d'hypoxie des GBM (Pistollato *et al.* 2010). D'autre part, une faible pression partielle en oxygène maintient l'expression d'AC133/1 *in vitro* (Platet *et al.* 2007) et les « propriétés souches » des CCTS (Li *et al.* 2009). Enfin, les cellules AC133/1-positives sont radiorésistantes (Bao *et al.* 2006).

Il nous est donc apparu important, dans ce premier article, d'étudier la signification fonctionnelle de l'expression d'AC133/1 en réponse à la pression partielle en oxygène (pO_2), notamment dans nos modèles d'études tumoraux de GBM humains *in vitro* puis chez l'animal (chez des souris immunodéprimées). AC133/1 est-il réellement le témoin de l'hypoxie tumorale et son expression est-elle effectivement corrélée à l'agressivité des GBM ?

***In vitro* expansion of human glioblastoma cells at non-physiological oxygen tension irreversibly alters subsequent *in vivo* aggressiveness and AC133 expression**

ERIKA BOURSEAU-GUILMAIN¹, LAURENT LEMAIRE¹, AUDREY GRIVEAU¹,
ERIC HERVOUET⁴, FRANÇOIS VALLETTE⁴, FRANÇOIS BERGER², PHILIPPE MENEI^{1,3},
JEAN-PIERRE BENOIT¹, DIDIER WION² and EMMANUEL GARCION¹

¹Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, Inserm, UMR_S 646, Université d'Angers, Angers;

²Institut des Neurosciences, Inserm, UMR_S 836, Université Joseph Fourier, Grenoble; ³Département de Neurochirurgie, CHU, Angers; ⁴Centre de Recherche en Cancérologie (CRCNA), Inserm, UMR_S 892, Université de Nantes, Nantes, France

Received September 7, 2011; Accepted October 19, 2011

DOI: 10.3892/ijo.2011.1271

Abstract. Among markers of glioblastoma initiating cells, AC133 has been shown to be associated with glioblastoma resistance and malignancy. Recently, it was demonstrated that increasing oxygen tension (pO₂) down-regulated AC133 expression in glioblastoma cells *in vitro*. In order to better understand extrinsic factor regulation of AC133, this work aimed to investigate the relationship between cell culture pO₂, AC133 expression, and tumor development and phenotype. Using treatments with CoCl₂ and HIF-1 α shRNA knockdowns on non-sorted human primary glioblastoma cells cultured at low (3%) versus high (21%) oxygen tension, we established a responsibility for low pO₂ in the maintenance of high levels of AC133 expression, with a major but non-exclusive role for HIF-1 α . We also demonstrated that human glioblastoma cells previously cultured under high oxygen tension can lose part of their aggressiveness when orthotopically engrafted in SCID mice or lead to tumors with distinct phenotypes and no re-expression of AC133. These observations showed that the specific pO₂ microenvironment irreversibly impacts glioblastoma cell phenotypes, highlighting the pertinence of culture conditions when extrapolating data from xenogenic models to human cells in their source environment. They also raised AC133 as a marker of non-exposure to oxygenated areas rather than a marker of aggressiveness or low pO₂ niches.

Introduction

Central nervous system glioblastomas are among the most aggressive and treatment-resistant cancers. The recent discovery

of self-renewing and uniquely tumorigenic brain tumor stem cells (BTSCs) (1-4), also referred to as brain cancer initiating cells, points to the presumption that this cancer stem cell subpopulation intrinsically resistant to radio and chemotherapeutic treatments might be responsible for the phenotypical derivation of tumors and their recurrence.

Instead of specific markers, makers shared with cancer stem cells (5,6) and BTSCs, such as AC133 (2), CD15 (7), and CD171 (8), have been documented. Among these, AC133, an epitope of the CD133 protein, which is itself a pentaspan glycoprotein identified firstly on hematopoietic stem cells, is the best known (9-12). *In vitro*, in the presence of EGF, FGF-2, and heparin, AC133 expressing cells isolated from human glioblastoma regenerate, form neurosphere-like colonies and are capable of generating cells that express markers of differentiated neural cells (2). In xenograft models using immunodeficient mice, they lead to cancers that are phenotypically similar to the original tumors (2). AC133-positive cancer cells are also particularly resistant to radiotherapy (13) and TRAIL-mediated apoptosis (14). In addition, these cells are capable of promoting tumor neovascularization by producing VEGF (15). Finally, AC133 overexpression in human gliomas is associated with poor clinical outcome (16).

Although these findings are in line with the relevance of developing targeted strategies against BTSCs in glioblastomas through AC133 recognition, other observations argue for a more complex reality. Indeed, while less tumorigenic than their AC133-positive counterparts (3), AC133-negative cells can lead to tumors with a distinct phenotype (17). Moreover, the occurrence of BTSCs does not exclude the existence of cellular networks in which individually non-tumorigenic cell populations might cooperate to produce tumors (18). In addition, the tissue microenvironment might exert pivotal effects for tumor development (18,19), and extrinsic cell modulators may drive the expression of intrinsic markers.

In line with this, AC133 expression in glioblastoma has been associated either with anatomical while not necessarily functional perivascular niches (20) or hypoxic pseudopalisading necrotic regions (21,22). Thus, it is not yet understood whether

Correspondence to: Dr Emmanuel Garcion, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U646, IBS - CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France
E-mail: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

Key words: glioblastoma, CD133, tumor niche, cancer stem cell culture, HIF-1 α

AC133 incidence in those areas is due to improved survival of AC133-positive cells or positive regulation of AC133 expression. As oxygen is involved in the stem cell behavior (23) and tumor aggressiveness of human glioblastoma (24), it is important to consider its role on AC133 expression and AC133-positive BTSC performance. As such, it has recently been demonstrated that exposure to low oxygen tension (pO_2) allows for maintenance of the AC133 phenotype of non-sorted human glioblastoma cells *in vitro* (25). In addition, sorted AC133-positive human glioblastoma cells preserve their stem cell phenotype under low oxygen tension *in vitro* (26).

Nonetheless, these studies did not address how cell culture pO_2 might affect the AC133 phenotype and the behavior of cancer cells following implantation in animals. In our study, we demonstrate that xenogenic experimental tumors, obtained from non-sorted human glioblastoma cells cultured either at 3 or 21% O_2 , can significantly differ. In this context, we investigate whether AC133 is an indicator of low oxygen tension or of tumor aggressiveness. Finally, we discuss our data regarding the relevance of biopsy-derived models for functional investigations or for therapeutic targeting purposes.

Materials and methods

Patient tissue samples and human glioma cell cultures. Specimens from patients undergoing biopsy for *de novo* glioma were obtained from the Department of Neurosurgery of the Angers CHU (France), and from the Department of Neurosurgery of the Grenoble CHU (France), with institutional review board approvals. Pathologic diagnosis established that Glioblastoma, Glioblastoma, and Glioblastoma tumor samples were grade IV WHO glioblastomas. Straight after tissue dissociation as previously described (25), cells were plated on uncoated plastic flasks at 2×10^4 /ml of defined medium and cultured at $37^\circ C$ under an atmosphere containing 5% CO_2 and either 3 or 21% O_2 . Glioblastoma, Glioblastoma and Glioblastoma were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Biowhitaker, Verviers, Belgium) added with Glutamax, B27 and N2 supplements (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), recombinant human EGF and FGF-2 (20 ng/ml each, R&D Systems Europe, Lille, France), and heparin (5 μg /ml, Sigma-Aldrich, Lyon, France). Growth factors and supplements were added every 3 days for a period of 10-15 days, until new dissociations with Versene (Lonza, Levallois-Perret, France) and re-plating following initial culture setting. Under these permanent conditions, cells grew and were maintained as floating neurosphere-like colonies.

AC133 labeling and flow cytometry. Glioma cells exposed to different oxygen tensions were collected and dissociated using Versene (Lonza). A total of 1.5×10^5 cells were incubated with 5 μg /ml AC133 antibody (Miltenyi Biotech, Paris, France) or IgG1 isotype control (BD-Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 1 h at $4^\circ C$ in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Cells were then washed three times in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, and incubated for 30 min at $4^\circ C$ with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment polyclonal antibody (Dakocytomation, Trappes, France) at 20 μg /ml in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Following three more washes in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, cells were re-suspended in PBS containing 2%

formaldehyde and 0.02% sodium azide. A BD FACSCalibur™ fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest™ software (BD-Biosciences) were used in order to proceed to flow cytometry acquisition. Analysis was carried out using WinMDI 2.9 software (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA).

Treatment of human glioma cells with cobalt dichloride ($CoCl_2$). Glioblastoma, Glioblastoma, and Glioblastoma human glioblastoma cells were dissociated in Versene (Lonza). They were then plated at 37.5×10^3 cells per ml in the aforementioned media and incubated in the presence of vehicle alone (PBS) or 100-150 μM $CoCl_2$ for 24 h at $37^\circ C$, 5% CO_2 and 3% O_2 .

shRNA knockdown. Glioblastoma cells were stably transfected using control transduction particles (SHC001V) or shRNA transduction particles expressing siRNA against HIF-1 α (IDs: TRCN0000003810, TRCN0000003811 and TRCN0000010819), according to the manufacturer's instructions (Mission® pLKO.1-puro lentiviral particles, Sigma-Aldrich). Cells were seeded at 5×10^3 in 96-well plates in supplemented neurobasal medium, and infected with a multiplicity of infection of 2. Puromycin (1 μg /ml, Sigma-Aldrich) selected infected cells.

Q-PCR. Q-PCR analyses were carried out using a Chromo 4™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and SYBR Green detection (iQ-SYBR Supermix, Bio-Rad). Primers were designed using Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). The ΔC_t method was retained for quantification, and multiple genes were used for normalization, as previously described (27).

Orthotopic xenograft assays. Glioblastoma and Glioblastoma human glioblastoma cells, grown at 3 or 21% O_2 , were dissociated in Versene, washed, and resuspended at 50,000 cells in 5 μl Eagle's minimum essential medium (EMEM, Biowhitaker). SCID female mice (Charles River) were anesthetized using xylazine (50 μg /g) (Rompun®, Bayer, Puteaux, France) and Ketamine (10 μg /g) (Clorketam®, Vétérinaire, Lure, France). Stereotactic implantation of the 5 μl cell suspension was carried out into the right striatum using a Hamilton syringe and a 32-gauge needle at the following coordinates: 0.5 mm anterior from Bregma, 2 mm lateral from the sagittal suture, and 3 mm below dura. Cells were injected progressively over 2.5 min, followed by 5 min of waiting, and progressive needle removal from brain over 6 min. MRI was used to monitor tumor growth. The Kaplan-Meier method was used to plot animal survival. Animal care was carried out in line with relevant European Community regulations (Official Journal of European Community L358 12/18/1986).

Magnetic resonance imaging. Experiments were performed with a Bruker Avance DRX 300 (Bruker, Wiessembourg, France), equipped with a vertical super wide bore magnet and shielded gradient insert. The resonant circuit of the nuclear magnetic resonance (NMR) probe was a 38-mm diameter birdcage. Rectal temperature was maintained at $37^\circ C$ by using a feedback-regulated heating pad. Brain lesion evolution was assessed using T2-weighted images obtained using a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) (TR = 2000 ms; effective echo time = 31.7 ms; RARE factor = 8; FOV = 2.5×2.5 cm; matrix 128x128; nine contiguous slices of 1.2 mm, four averages). In order to improve tumor detection, FLAIR imaging was

Table I. Glioblastoma cells cultured at low pO₂ expressed improve levels of AC133 than those cultured at high pO₂.^a

	GMFI at 3% O ₂ (arbitrary units)	GMFI at 21% O ₂ (arbitrary units)	Mean variation of AC133 expression per cell
GlioA (passage 21)	77.42±0.15	1.03±0.25	-98.7%
GlioB (passage 14)	16.70±0.56	2.08±0.15	-87.6%
GlioC (passage 11)	52.07±1.59	0.65±0.17	-98.7%

^aGlioA, GlioB, and GlioC glioblastoma primary cells were cultured at 3 or 21% O₂ and analyzed for AC133 expression using the anti-AC133 monoclonal antibody (AC133) or an IgG1κ isotype control (IgG1κ). FITC fluorescence revealed after application of the corresponding secondary antibody was expressed in geometric mean fluorescence intensity (GMFI) arbitrary units. Mean variation of AC133 expression per cell was calculated according to GMFI obtained at 3 versus 21% O₂.

performed using a 600 ms inversion pulse prior to the RARE pattern, providing enough time to allow for the annulling of the normal parenchyma and therefore tumor detection.

Immunohistochemistry. Brains from xenotransplanted mice were surgically removed, snap-frozen in isopentane cooled at -35°C with liquid nitrogen, and stored at -80°C before 10 μm transverse sections of anterior brain were made using a Cryocut 3000 (Leica, Rueil-Malmaison, France). After at least 24 h storage at -20°C and 30 min drying at room temperature, slides were fixed in -20°C cold methanol for 10 min. Sections were then blocked with 10% normal goat serum in PBS added with 4% bovine serum albumine for 30 min at room temperature. Primary antibodies against CD133 (clone AC133 and clone 293C3 both from Miltenyi Biotec) and the corresponding negative isotype controls (mouse IgG1κ and mouse IgG2b, both from BD Biosciences) were diluted in PBS containing 4% BSA and used at 5 μg/ml. They were applied overnight at 4°C. After washes in PBS, a secondary biotinylated goat anti-mouse IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA) diluted in PBS containing 4% BSA was applied at 15 μg/ml for 45 min at room temperature. After additional washes in PBS, Alexa Fluor® 488 streptavidine conjugates (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were applied in the dark at 4 μg/ml for 45 min. Finally, labeled sections were washed three times with PBS before mounting in fluorescent mounting medium from Dakocytomation. All slides were examined under an Axioskop-2 Zeiss fluorescence microscope (Le Pecq, France). Images were acquired through a Photometrics CoolSNAP ES camera equipped with a QImaging CRI Micro Color 2 RGB Liquid Crystal filter and by using the MetaVue™ imaging system (all from Roper Scientific, Evry, France).

Statistical analysis. XLSTAT 2006 Version 2006.3 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. Statistical significance for each experiment was determined by a Dunnett's test. Alternatively, the Gehan-Wilcoxon and the Mann and Whitney non-parametric tests were used. The tests were considered as significant with p<0.05.

Results

Oxygen tension impacts the AC133 phenotype of human glioma cells in vitro. To determine the effect of oxygen pressure on AC133 expression in non-sorted primary human glioblastoma cells, GlioA, GlioB, and GlioC were cultured either at 3% O₂ or 21% O₂. High expression of AC133 was found in all cell lines when maintained at low oxygen tension (from initial suspensions to at least passage 30). As such, at matching cell passages flow cytometry analysis revealed that the percentage of AC133-positive cells was improved from 3 to 21% O₂ condition (Fig. 1). Quantification of geomean fluorescence intensity further indicated a mean reduction of AC133 expression per cell up to 99% between 21 and 3% O₂ (Table I).

A role for HIF-1α in the regulation of AC133 expression. Having established a role for oxygen tension in the regulation of AC133, we next investigated whether HIF-1α a major transcription factor regulated by oxygen tension, was involved in this effect. HIF-1α has been described to be over-expressed in various cancers including gliomas (28). It heterodimerizes with constitutively expressed subunit HIF-1β to form HIF-1, a basic helix-loop-helix structure that regulates the transcription by specifically recognizing a short consensus HRE (hypoxia responsive element) sequence in the promoter of hypoxia responsive genes. HRE sequence is characterized by the presence of a consensus core CGTG found in all known HIF-1α-responsive promoters (29). A multiple sequence alignment ClustalW2 program revealed that the consensus core was present in all CD133 promoters from P1 to P5. Interestingly, the analysis showed that a sequence of 12 nucleotides present in P5 (known to be functional in stem cells) TACGTGCTCTGG-nucleotides 5416-542 matched perfectly with that present in the [+656/+667] HRE sequence of the human IGFBP-1 gene (30). Hence, this sequence represents a potential target for the binding of HIF-1 in glioblastoma cells.

To determine the potential influence of HIF on regulating the expression of AC133, cobalt chloride (CoCl₂), which inhibits the degradation of HIF (31), and the shRNA knockdown strategy against HIF-1α were used. As HIF-1α stabilization has been shown to increase from moderate to severe hypoxia while not induced under ambient air (32), in order to try getting its level maximal, the hypoxia-mimetic CoCl₂ was used already from the 3% O₂ condition. When GlioA cells were incubated for 24 h with 100 or 150 μM of CoCl₂ in low pO₂ conditions, no significant change was observed in AC133 expression as compared to control culture (Fig. 2). In contrast, CoCl₂ treatment increased the expression of AC133 in GlioB and GlioC (+36-41% for GlioB and +41-56% for GlioC) (Fig. 2). We further address the impact of HIF-1α inhibition on CoCl₂ responding glioblastoma cell types. Transcriptional down-regulation of HIF-1α mRNA with a lentiviral shRNA-based system performed on GlioB (knockdown efficiency of ~80% and GlioC (knockdown efficiency of

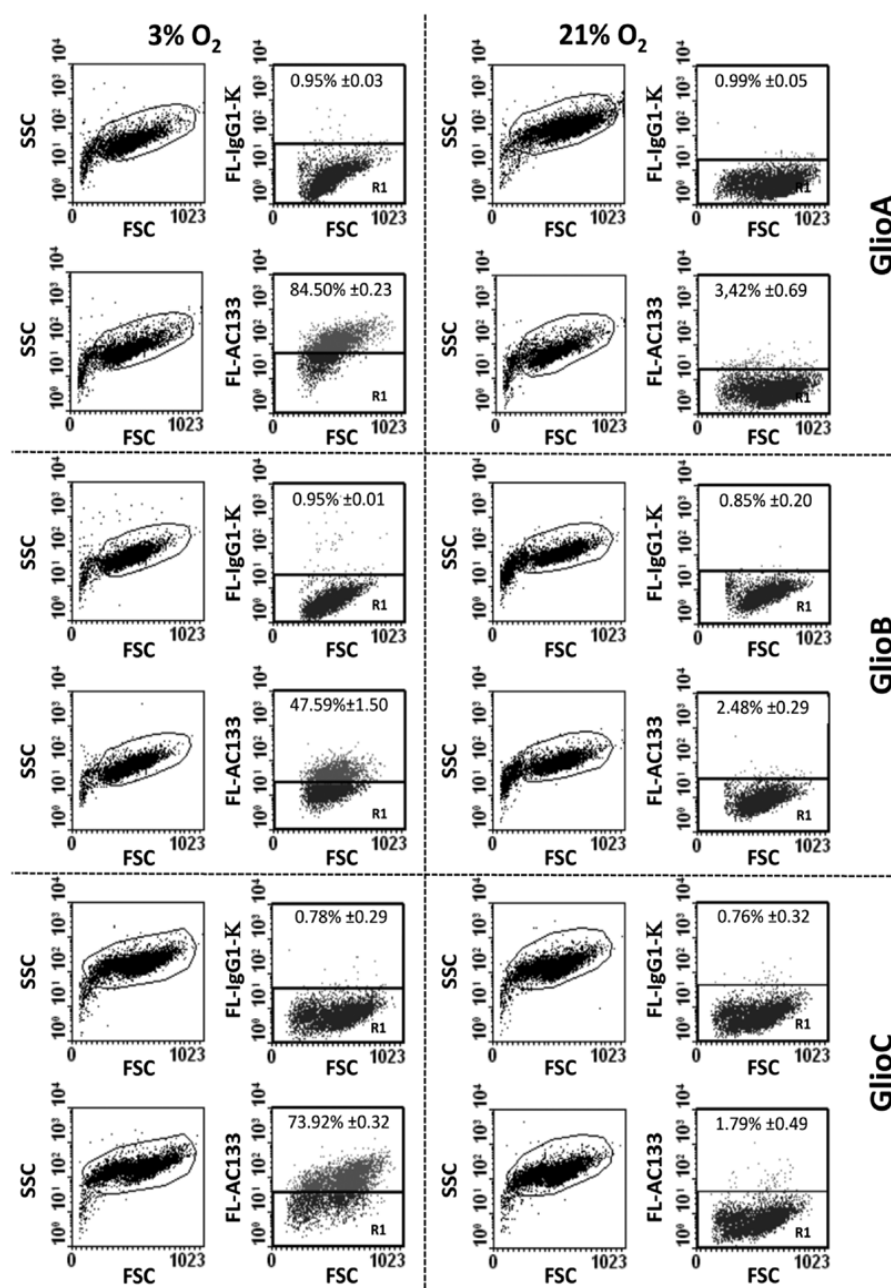


Figure 1. Greater percentage of AC133 positive cells are obtained in glioblastoma cells cultured at low pO_2 . Glioblastoma primary cells were cultured at 3 or 21% O_2 and analyzed for AC133 expression using the anti-AC133 monoclonal antibody (AC133) or an IgG1 κ isotype control (IgG1 κ). The FITC fluorescence after application of the corresponding secondary antibody is expressed in geometric mean arbitrary units. FSC represented the forward scattering. Indicated percentages represent relative cell numbers that were up to the gated isotype control cells reported on each panel (gate R1). Dot plot profiles illustrate a representative experiment of at least a triplicate, at passage 21 (Glioblastoma), passage 14 (Glioblastoma) and passage 11 (Glioblastoma) at 3 or 21% O_2 .

~65% (Fig. 3 left panels) was associated with a 80-90% reduction in AC133 expression for Glioblastoma, but had no impact on AC133 expression for Glioblastoma (Fig. 3 right panels).

Human glioma cells exposed to different oxygen tensions in vitro do not behave equally following orthotopic transplantation in immunodepleted mice. Having established a role for oxygen tension and HIF-1 α in regulating AC133 *in vitro*, we

wished to further address whether tumor development and AC133 expression were affected by the expansion of human glioblastoma cells under different oxygen tension culture conditions. For this purpose, we focused on the cell types for which tumors were detected through MRI monitoring within 3 months after stereotactic injection of glioblastoma cells in the right striatum of immunodepleted mice, namely Glioblastoma and Glioblastoma (Fig. 4). Kaplan-Meier curves shown in Fig. 4A revealed that

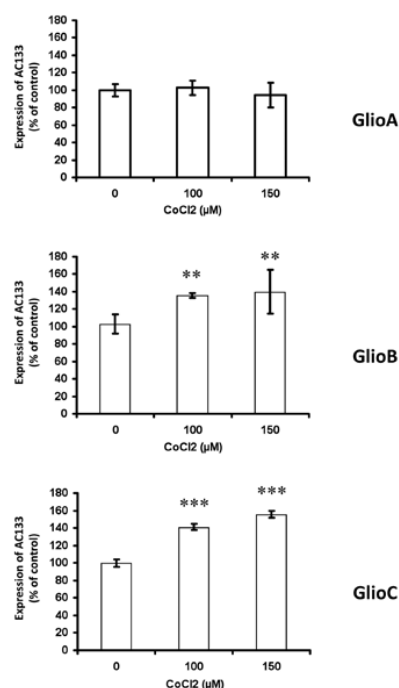


Figure 2. AC133 expression was up-regulated by CoCl₂ treatment in glioblastoma cells. GliA, GliB, and GliC primary human glioblastoma cells cultured at 3% O₂ were incubated with 0, 100 and 150 μM CoCl₂ for 24 h and then analyzed for AC133 expression by flow cytometry. Results are expressed as percentage of control, representing the geomean fluorescence intensity levels obtained after immunostaining of AC133 for cells treated with vehicle alone. Results represent mean ± SEM of three independent experiments. Dunnett's test: **p<0.01, ***p<0.001.

GlioA cell cultures at 3% O₂ were more aggressive than GlioA cells cultured at 21% O₂. In contrast, no significant differences in Kaplan-Meier curves were observed on GlioB. However, tumors caused by the implantation of GlioA cultured at 3% O₂ prior to injection were detected earlier than the tumors arising from GlioA cultured under 21% O₂ (Fig. 4B). Indeed, mice injected with the cells cultured at 3% developed a detectable tumor within 3 months post-injection (average tumor size 32±8 μl (n=8)), whereas a similar size was observed 5 months post-injection of GlioA cells initially cultured at 21% O₂.

Interestingly, although no differences were observed on Kaplan-Meier curves, GlioB cultured at 21 vs. 3% O₂ appeared to differ on MRI images. When GlioB cells were cultured *in vitro* at 21% O₂ prior injection, brain tumor occurred within 2 months [average tumor size 23±13 μl (n=8)], whereas injection of cells cultured at 3% O₂ reached such a size after 3 months [average tumor size 34 ± 21 μl (n=6)] (Fig. 4B). Examined together, the data indicate that culture conditions are likely to exhibit a real impact on tumor aggressiveness *in vivo*, underlying the fact that the choice of culture parameters can modulate cell behavior *in vivo*.

Extinction of AC133 expression of human glioma cells exposed to low oxygen tension in vitro prevents in vivo re-expression after orthotopic transplantation in immunodepleted mice. In order to address human AC133 expression in mice with tumor growth, a study was carried out on mice 24 h post-injection of AC133 positive cells to validate AC133 immunohistochemical detection using the AC133 antibody or 293C3 antibody, both recognizing two different human epitopes of the CD133 protein (Fig. 5A).

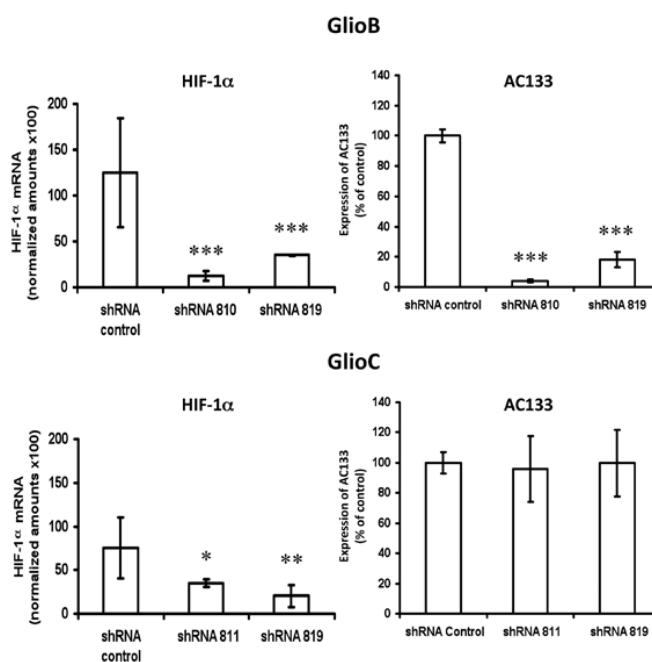


Figure 3. HIF-1α knockdown led to a reduced AC133 expression at 3% O₂ in GliB cells but not in GliC. Left panels show that transfection of GliB and GliC cells with specific shRNA against HIF-1α RNA (810, 811 or 819) in HIF-1α mRNA levels when compared with irrelevant shRNA control as determined by RT-qPCR. Results are expressed in normalized amounts as indicated in Materials and methods. Right panels indicate that while knockdown of HIF-1α resulted in dramatic inhibition of AC133 expression in GliB as assessed by flow cytometry, no effect was observed in GliC. Results are expressed as percentage of control, representing the geomean fluorescence intensity levels obtained after immunostaining of AC133 for cells treated with shRNA control. They also represent mean ± SEM of three independent experiments. Dunnett's test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

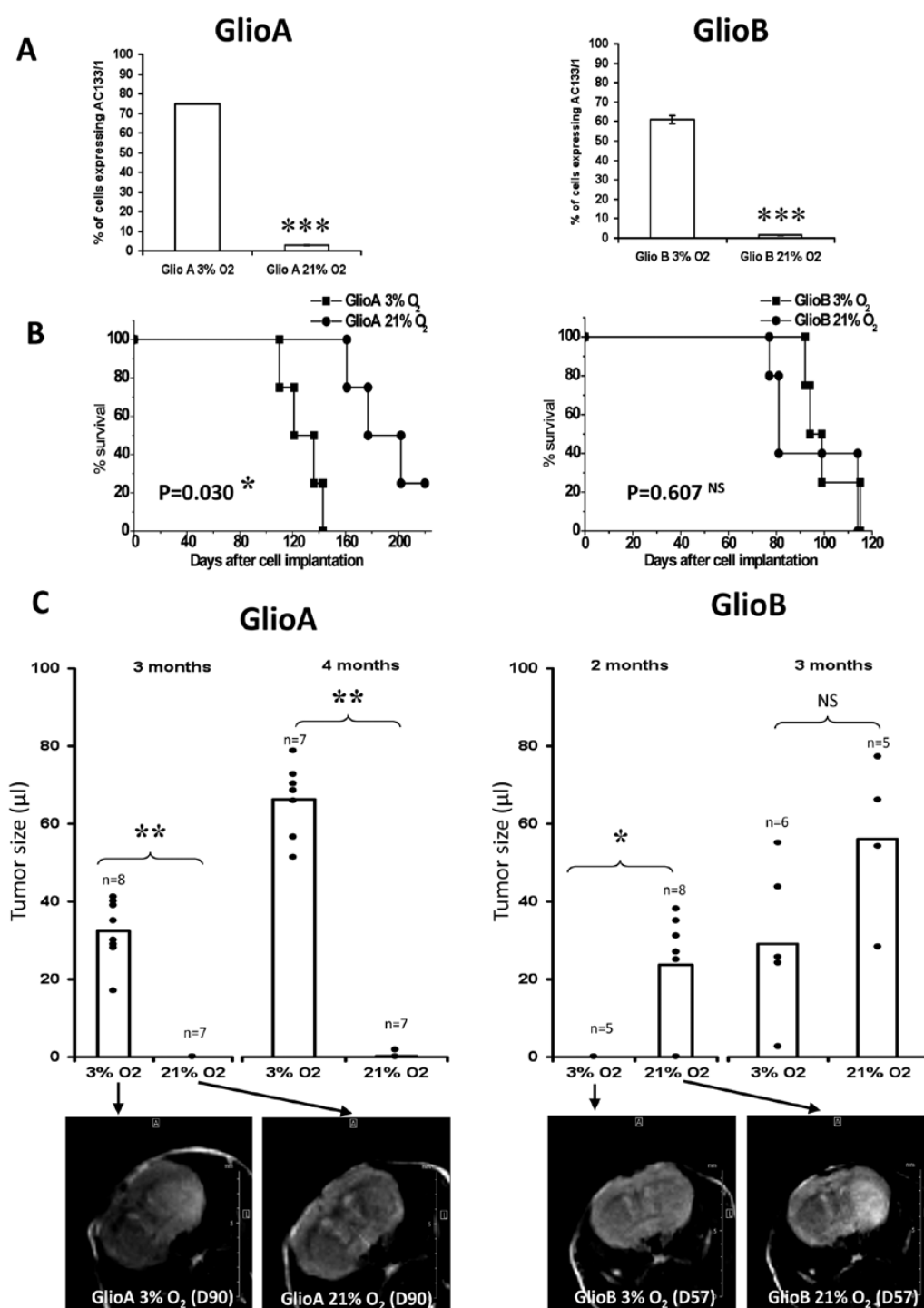


Figure 4. Culturing glioblastoma primary cells at 3 or 21% O₂ resulted in distinct cell behavior *in vivo*. (A) Flow cytometry analysis of AC133 expression before implantation confirms that GlioA and GlioB cells cultured at 3% O₂ expressed more AC133 than did cells cultured at 21% O₂. (B) Kaplan-Meier survival curves following implantation of 50,000 cells into the right striatum of female SCID mice revealed that cells cultured at 3% O₂ were more aggressive than their 21% O₂ counterparts for GlioA but not for GlioB. Gehan-Wilcoxon test: NS, not significant; *p<0.05. (C) Measurement of tumor sizes assessed by MRI analysis and corresponding representative MRI images for mice implanted with GlioA or GlioB. Note that although tumors obtained with GlioB grown at 3% O₂ were not detectable at 2 months after brain implantation, they close in on their 21% O₂ counterparts 1 month later, thus revealing distinct growth modalities and density contrast at a given point in time for cells maintained in culture at 3 versus 21% O₂. Mann-Whitney U test: NS, not significant; *p<0.05; **p<0.01.

Applying this technique to brain tumors collected at the end point of the experiment revealed that when the injected cells were initially cultured at 3% O₂, AC133 was still detected, and

this for both GlioA and GlioB cells (Fig. 5B). However, AC133 was detected in limited clusters within the tumor, suggesting that not all the tumor cells had kept the AC133 phenotype. The

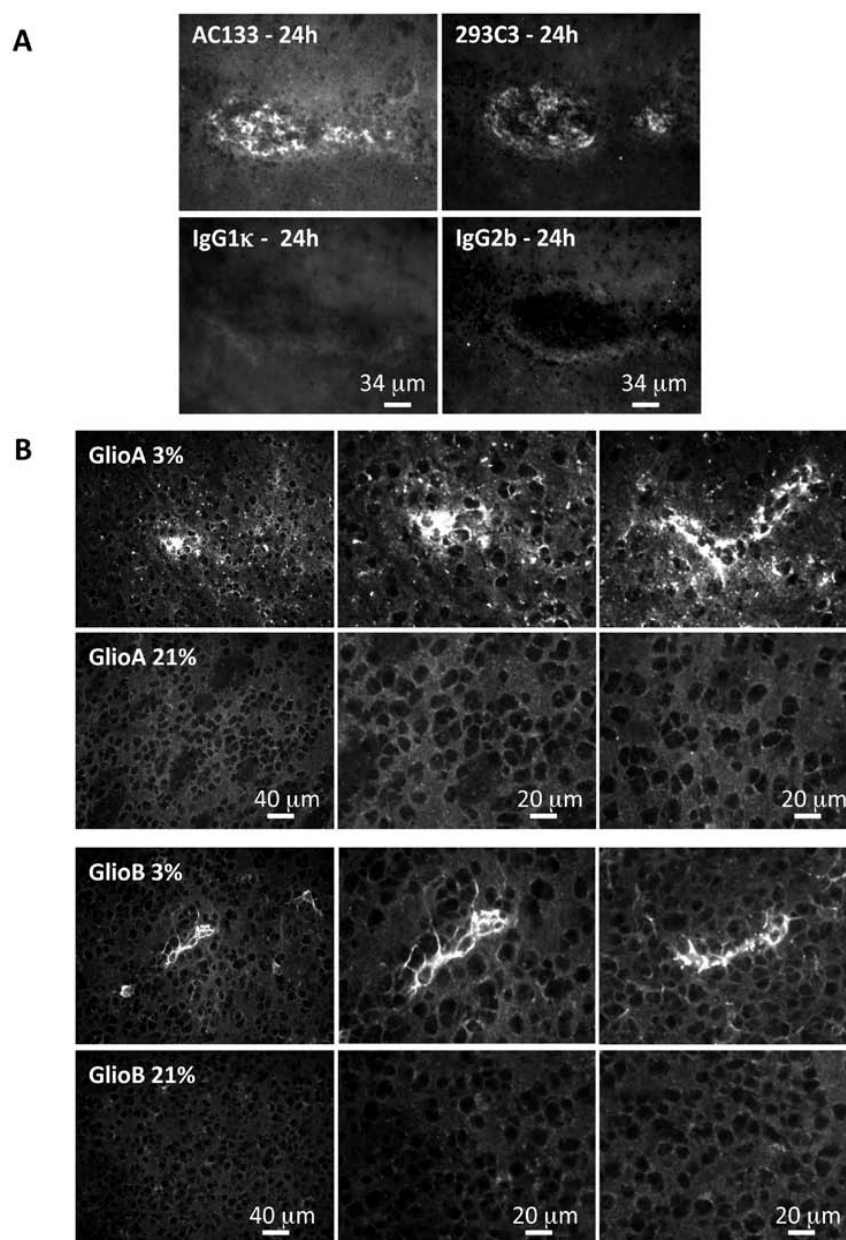


Figure 5. AC133 was not re-expressed *in vivo* in glioblastoma tumors obtained from cells cultured at 21% O₂ while maintained in tumors derived from cells grown at 3% O₂. (A) Validation of the immunohistochemical detection of AC133. Analysis was initially performed using AC133 and 293C3 antibodies as well as respective isotype controls (IgG1κ and IgG2b) on mouse brain adjacent cryosections 24 h after implantation of 50,000 Glioma glioblastoma cells grown at 3% O₂ known to express AC133 *in vitro*. Note common staining characteristics between AC133 and 293C3. Also note the absence of background when using isotype controls at the same concentrations. (B) Although AC133 was detected in discrete areas of both Glioma and GliomaB tumors derived from cells grown at 3% O₂, it was not found on brain tumors derived from cells grown at 21% O₂.

same approach on tumors arising from cells cultured at 21% O₂ did not reveal any AC133 expression (Fig. 5B), indicating that neither Glioma nor GliomaB cells grown in 21% O₂ before injection gave rise to AC133 cells *in vivo*.

Discussion

Consequences of the 21% standard pO₂ culture condition on glioblastoma phenotypes. To address cancer cell behavior

in vivo and *in vitro*, cancer cell cultures are generally performed under 5% CO₂ combined to classical atmospheric conditions of approximately 21% O₂ (160 mm Hg). However, pO₂ values do not exceed 12% O₂ (95 mm Hg) in the blood and vary from 1 to 5% (6-34 mm Hg) in normal tissues including the brain (33). Moreover, a characteristic feature of advanced solid tumors is to display hypoxic tissue areas (pO₂ ≤ 0.4% or 2.5 mm Hg) due to insufficient vascularization, oversize tumor mass, and necrosis (34). Thus, an atmosphere containing 21% O₂ should be physio-

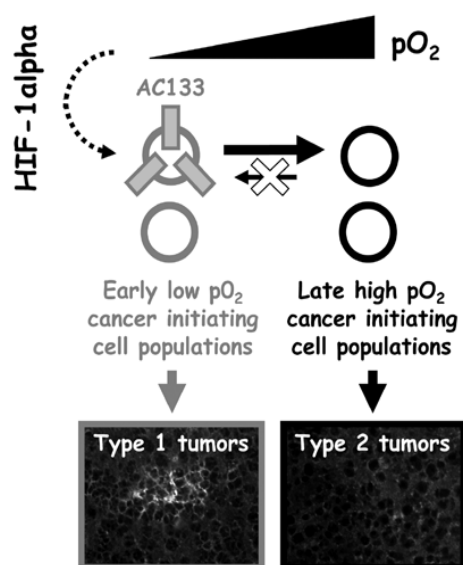


Figure 6. Model defining the relationships between the environmental pO_2 and the AC133 phenotype. During gliomagenesis, high oxygen tension may be a component of the cancer initiating cell niche that drives an early-to-late cancer initiating cell switch. In this situation, the irreversible loss of AC133 expression would be perceived as a witness of glioblastoma cell maturation. Instead of being a marker of tumorigenicity, aggressiveness, or oxygen supply, AC133 notably regulated by HIF-1 α therefore represents a hallmark of glioblastoma cell non-exposure to high oxygen tension. Thus, early cancer cell populations that contain AC133-positive cells formed type 1 tumors that continue to express AC133, while late AC133-negative cancer cell developed type 2 tumors which did not re-express AC133.

logically considered hyperoxic. In the present study, although glioblastoma cells were cultured as three-dimension neurospheres, a condition that lowers pO_2 due to the gradient of O_2 diffusion from the external to the inner part of the spheres, our data demonstrated that *in vitro* pO_2 ranges obtained at 3 versus 21% O_2 resulted in distinct cell behavior *in vivo*. Tumor aggressiveness was higher for GliobA when cultured at 3 versus 21% O_2 . MRI detection of GliobB grown at 3% was delayed when compared to GliobB grown at 21%, while ultimately giving rise to similar adverse clinical effects. Moreover, AC133, typically found on fresh human glioblastoma biopsy specimens (21) or on short-term primary glioblastoma cultures [(3,13); our study]; was maintained after expansion *in vitro* at 3% O_2 while lost at 21% O_2 and not re-expressed after cell implantation *in vivo*. These combined findings stressed that pO_2 values obtained at 3% O_2 preserve better the AC133 phenotype of glioblastoma cells than do pO_2 values obtained through the standard O_2 atmospheric tension. Our results confirmed, therefore, that a low pO_2 ($\leq 3\%$ O_2 or 24 mm Hg) should be considered a basic condition to study glioblastoma cell behavior in their current microenvironment. As such, the fact that pO_2 irreversibly changes the phenotype of glioblastoma cell populations is also reminiscent of the effects of serum and laminin on gene expression profiles, expression of stem cell makers, and glioma invasiveness (3,35,36). As variations of pH, the traditional 21% O_2 represents a new environmental stress for glioblastoma cells that inevitably triggers alterations of their differentiation, genetic and epigenetic status, and survival. Considering tumor heterogeneity, selection of glioblastoma cell clones will therefore be different at 3 and 21% O_2 . As such, low

oxygen tension is often perceived as an obstacle for chemo- and radiotherapy due to the induction of several resistance genes (13,36), DNA repair or methylation (22), miRNA expression (37), and maintenance of stemness (38). Conversely, high oxygen tension represents an oxidative stress that may be associated with the selection of cells that are well-equipped for reactive oxygen species detoxification (39).

Is AC133 a marker of BTSC non-chronic exposure to high oxygen tension? AC133 has initially been described as a marker of hematopoietic stem cells (9,11), while then associated with embryonic stem cells (40) and a variety of somatic stem cells (41). AC133 was also recognized as a putative cancer stem cell marker in blood, brain, colon, prostate, lung, breast, liver, and skin cancers (12,41). Although the BTSC hypothesis was strongly supported by recent data (4,42,43), the idea of a responsibility of cancer stem cells in glioblastoma development remains to be documented (44) and does not exclude the role of clonal selection (45). We emphasize that if the hypothesis of brain cancer initiating cells is correct, the loss of AC133 does not preclude their occurrence. We did establish that GliobA and GliobB that do not contain high AC133 expressing cells when cultured at 21% O_2 self-renew *in vitro* and do form tumors *in vivo*. The data give further significance to the originally established unique ability of immunosorted AC133-positive cells to form brain tumors (2,3,13,46) and corroborate the fact that AC133-negative cells are also capable of doing so (47,48). Thus, high AC133 expression is not a marker of every cancer initiating cells within brain tumors.

Sorted AC133-positive cells have been described as more aggressive than their AC133-negative counterparts (2,3,13). Our data proved that when considering the full cancer cell population, the major reduction in AC133 expression at high versus low pO_2 (87.6%, GliobB, Table I) as well as in AC133 positive cell numbers (from 47.59 to 2.48%, GliobB, Fig. 1) allows for the development of tumors that are similarly aggressive. Thus, AC133 does not appear to be a general marker of tumor aggressiveness.

Low oxygen tension was associated with the stem cell-like properties of AC133-positive glioblastoma cells (26). As we have confirmed here that this also resulted in high levels of AC133, one might assume that AC133 expression constitutes a witness of low oxygen tension. The presence of putative HRE in Prominin-1 promoters combined with the modulation of AC133 expression by $CoCl_2$ treatment and HIF-1 α shRNA knockdown supported this assertion. Previous data obtained with siRNA against HIF-1 α (49), or instead with an oxygen stable HIF-1 α construct (50), also corroborated this, with a significant role for HIF-1 α . Interestingly, in contrast to what happen in glioblastoma, in gastric, colorectal and lung cancer cell lines Matsumoto *et al* established an inverse correlation between HIF-1 α and CD133 expression thus indicating tissue specificities for the regulation of CD133 by HIF-1 α (51). However, $CoCl_2$ did not induce AC133 in GliobA O_2 , and HIF-1 α shRNAs were not able to reduce AC133 expression in GliobC. Although constitutive expression of AC133 might be maximal in GliobA, and HIF-2 is likely to compensate for the loss of HIF-1 α in GliobC (21,52), HIF-independent pathways may be involved in the AC133 regulation by hypoxia. A variety of these recognizable cell signals that translate to environmental

O₂ changes have already been described, including: reactive oxygen species (53), thiol-based sensors (53), the transcriptional co-activator PGC-1 α (54), or mTOR inhibition via the AMPK/TSC2/Rheb pathway (55). Regardless of the signaling pathway involved in regulating AC133 by pO₂, we have established in our study that the loss of AC133 at 21% O₂ *in vitro* (data not shown) and *in vivo* following glioma cell implantation in mouse brains was irreversible. This lack of re-expression of AC133 therefore supported the fact that AC133 is not a genuine marker of hypoxia in glioblastoma. Indeed, low pO₂ commonly involved in glioblastoma growth and aggressiveness (23,24) should be present within GliA and GliB tumors, which was supported by a reduced vascularization observed using CD31 labeling (data not shown). One-way regulation of AC133 by pO₂ might be explained by the acquisition of a new pattern of transcriptional activators or a new DNA methylation status of glioblastoma cells at 21% (56,57).

As AC133 does not attest to the glioma cell capability of forming tumors or to glioblastoma aggressiveness or low oxygen tension, we propose that it represents a witness of glioblastoma cell non-exposure to high oxygen tension. The presence of AC133 positive glioblastoma cell populations that have also been established at ambient oxygen setting could be explain in this context by creation of hypoxic gradients within the growing glioma spheres (58). This fact would be attenuated by chronic exposure of cells to high oxygen tension through sequential dissociation and re-plating. Hence, similarly to developmental cues that lead to irreversible maturation of early-to-late neural stem cell differentiation during development such as FGF (59), high oxygen tension may represent a component of the BTSC niche that drives an early-to-late BTSC switch during gliomagenesis. If EGF receptor expression represents a witness of the acquired phenotype for neural stem cell maturation, loss of AC133 would be a witness of BTSC maturation. To support this assertion, the loss of AC133 expression has been associated with cancer stem cell differentiation in glioblastoma (60) and in colon cancer (61). Moreover, use of glioma cell differentiation factors such as retinoic acid lead to down-regulation of AC133 expression (62). In addition, transdifferentiation of tumor cells into vessel formation was recently associated with stemness phenotype and hypoxia in glioblastoma (63). Thus, irreversible AC133-loss may also have an impact on this epithelial to mesenchymal transition reciprocally. Two types of tumors could therefore be obtained from non-sorted human glioblastoma cells expanded *in vitro*: type 1 tumors obtained from 3% O₂-expanded cells (expressing AC133) and type 2 tumors obtained from 21% O₂-expanded cells (no AC133 expression) (Fig. 6).

In conclusion, our present study underlines that non-physiological oxygen tension alters subsequent *in vitro* expansion and *in vivo* development of non-sorted human glioblastoma cells. With the preservation of AC133 expression, which can result from the prevention of AC133-positive cell death or from continuous prominin-1 gene expression, the 3% O₂ expansion condition mirrors much the biological reality. Thus, the timing of environmental pO₂ variations likely reflects a changing pattern of plasma membrane protein expression during glioblastoma growth that is associated with cell heterogeneity and resistance. The fact AC133 was here associated with an early glioblastoma phenotype suggests that identification of downstream cancer initiating cell markers as well as evaluation of relative anticancer

drug sensitivity of type I and type II tumors (Fig. 6) would also be helpful in the development of anti-glioblastoma strategies.

Acknowledgements

We would like to thank Catherine Guillet, Julien Daligault, and Laurence Preisser (Service Commun de Cytométrie et d'Analyse Nucléotidique, SCCAN, Angers, France) for their skillful technical support. We are also grateful to Pierre Legras and Jérôme Roux from the Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire (SCAHU, Angers, France). La Ligue Nationale Contre le Cancer 'Equipe Labellisée 2007' and Le Cancéropôle Grand-Ouest throughout the 'Réseau Gliome Grand-Ouest' (REGGO) and the 'Axe Cellules Souches et Cancer' supported this work. Erika Bourseau-Guilmain was a fellow of the Conseil Général de Maine-et-Loire and the Ligue Nationale Contre le Cancer. We also acknowledge the Comité Départemental de Maine-et-Loire de la Ligue Contre le Cancer.

References

- Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD and Steindler DA: Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers *in vitro*. *Glia* 39: 193-206, 2002.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, *et al*: Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828, 2003.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al*: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401, 2004.
- Jacques TS, Swales A, Brzozowski MJ, *et al*: Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *EMBO J* 29: 222-235, 2010.
- Visvader JE and Lindeman GJ: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8: 755-768, 2008.
- Mayol JF, Loeuillet C, Herodin F and Wion D: Characterisation of normal and cancer stem cells: one experimental paradigm for two kinds of stem cells. *Bioessays* 31: 993-1001, 2009.
- Mao XG, Zhang X, Xue XY, *et al*: Brain tumor stem-like cells identified by neural stem cell marker CD15. *Transl Oncol* 2: 247-257, 2009.
- Bao S, Wu Q, Li Z, *et al*: Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* 68: 6043-6048, 2008.
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, *et al*: A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90: 5013-5021, 1997.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, *et al*: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90: 5002-5012, 1997.
- Corbeil D, Roper K, Weigmann A and Huttner WB: AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 91: 2625-2626, 1998.
- Ferrandina G, Petrillo M, Bonanno G and Scambia G: Targeting CD133 antigen in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 13: 823-837, 2009.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, *et al*: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444: 756-760, 2006.
- Zobalova R, McDermott L, Stantic M, Prokopova K, Dong LF and Neuzil J: CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 567-571, 2008.
- Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, *et al*: Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 66: 7843-7848, 2006.
- Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, *et al*: Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 14: 123-129, 2008.

17. Joo KM, Kim SY, Jin X, *et al*: Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Lab Invest* 88: 808-815, 2008.
18. Garcion E, Naveilhan P, Berger F and Wion D: Cancer stem cells: Beyond Koch's postulates. *Cancer Lett* 278: 3-8, 2008.
19. Scadden DT: The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441: 1075-1079, 2006.
20. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, *et al*: A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11: 69-82, 2007.
21. Li Z, Bao S, Wu Q, *et al*: Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15: 501-513, 2009.
22. Pistollato F, Abbadi S, Rampazzo E, *et al*: Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma. *Stem Cells* 28: 851-862, 2010.
23. Panchision DM: The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol* 220: 562-568, 2009.
24. Evans SM, Judy KD, Dunphy I, *et al*: Hypoxia is important in the biology and aggression of human glial brain tumors. *Clin Cancer Res* 10: 8177-8184, 2004.
25. Platet N, Liu SY, Atifi ME, *et al*: Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett* 258: 286-290, 2007.
26. McCord AM, Jamal M, Shankavarum UT, Lang FF, Camphausen K and Tofilon PJ: Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133⁺ human glioblastoma cells in vitro. *Mol Cancer Res* 7: 489-497, 2009.
27. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, *et al*: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: Research0034, 2002.
28. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al*: Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 59: 5830-5835, 1999.
29. Wenger RH, Stiehl DP and Camenisch G: Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005: re12, 2005.
30. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, *et al*: Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10188-10193, 1998.
31. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T and Millhorn DE: Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* 278: 15911-15916, 2003.
32. Vordermark D and Brown JM: Evaluation of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) as an intrinsic marker of tumor hypoxia in U87 MG human glioblastoma: in vitro and xenograft studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56: 1184-1193, 2003.
33. Csete M: Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1049: 1-8, 2005.
34. Vaupel P, Kelleher DK and Hockel M: Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28: 29-35, 2001.
35. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, *et al*: Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9: 391-403, 2006.
36. Shervington A and Lu C: Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells. *Cancer Invest* 26: 535-542, 2008.
37. Huang X, Le QT and Giaccia AJ: MiR-210-micromanagement of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med* 16: 230-237, 2010.
38. Pistollato F, Chen HL, Rood BR, *et al*: Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma. *Stem Cells* 27: 7-17, 2009.
39. Dringen R, Pfeiffer B and Hamprecht B: Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci* 19: 562-569, 1999.
40. King FW, Ritner C, Liszewski W, *et al*: Subpopulations of human embryonic stem cells with distinct tissue-specific fates can be selected from pluripotent cultures. *Stem Cells Dev* 18: 1441-1450, 2009.
41. Wu Y and Wu PY: CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev* 18: 1127-1134, 2009.
42. Alcantara Llaguno S, Chen J, Kwon CH, *et al*: Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* 15: 45-56, 2009.
43. Wang Y, Yang J, Zheng H, *et al*: Expression of mutant p53 proteins implicates a lineage relationship between neural stem cells and malignant astrocytic glioma in a murine model. *Cancer Cell* 15: 514-526, 2009.
44. Hill RP: Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 66: 1890-1895, 2006.
45. Adams JM and Strasser A: Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res* 68: 4018-4021, 2008.
46. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, *et al*: Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444: 761-765, 2006.
47. Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA, *et al*: Identification of A2B5⁺CD133⁺ tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 62: 505-514, 2008.
48. Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O, *et al*: CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122: 761-768, 2008.
49. Soeda A, Park M, Lee D, *et al*: Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* 28: 3949-3959, 2009.
50. Bar EE, Lin A, Mahairaki V, Matsui W and Eberhart CG: Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres. *Am J Pathol* 177: 1491-1502, 2010.
51. Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, *et al*: mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res* 69: 7160-7164, 2009.
52. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB and Rich JN: The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8: 3274-3284, 2009.
53. Lopez-Barneo J, Pardal R and Ortega-Saenz P: Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 63: 259-287, 2001.
54. Arany Z, Foo SY, Ma Y, *et al*: HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* 451: 1008-1012, 2008.
55. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB and Simon MC: Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell* 21: 521-531, 2006.
56. Tabu K, Sasai K, Kimura T, *et al*: Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas. *Cell Res* 18: 1037-1046, 2008.
57. Yi JM, Tsai HC, Glockner SC, *et al*: Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors. *Cancer Res* 68: 8094-8103, 2008.
58. Wion D, Christen T, Barbier EL and Coles JA: PO(2) matters in stem cell culture. *Cell Stem Cell* 5: 242-243, 2009.
59. Lillien L and Raphael H: BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development* 127: 4993-5005, 2000.
60. Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, *et al*: A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17: 362-375, 2010.
61. Kemper K, Sprick MR, De Bree M, *et al*: The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res* 70: 719-729, 2010.
62. Campos B, Wan F, Farhadi M, *et al*: Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res* 16: 2715-2728, 2010.
63. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, *et al*: Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 4274-4280, 2011.

Ce travail a permis de souligner l'importance des conditions de culture, et plus particulièrement de la pO_2 , sur l'expression du marqueur, AC133/1, *in vitro* mais également sur les caractéristiques des tumeurs *in vivo*.

En effet, les résultats obtenus montrent que la pO_2 influence de façon irréversible le phénotype des cellules de GBM. En effet, la condition de culture en hypoxie (à 3% d' O_2) favorise l'expression d'AC133/1 dans différents types de cultures primaires de GBM. Les cellules poussant sous forme de sphéroïdes, un gradient d'oxygène peut donc être présent à l'intérieur des cellules. Dans le cas des cellules cultivées à 3% d' O_2 , la faible pO_2 présente à l'extérieure des cellules peut aboutir à une pO_2 encore plus faible au centre des sphéroïdes, ce qui pourrait contribuer au maintien de l'expression d'AC133/1.

La pO_2 ayant un impact sur l'expression d'AC133/1, par la suite, les études se sont intéressées à étudier l'effet d'un facteur de transcription régulé par la pO_2 , HIF-1 α , sur l'expression d'AC133/1. Les résultats concernant les effets du chlorure de cobalt, impliqué dans la dégradation de HIF montrent une tendance à augmenter de façon dose-dépendante l'expression d'AC133/1. Un knockdown d'HIF peut permettre une réduction de l'expression d'AC133/1.

Ce travail démontre que des cellules poussées à différentes pO_2 , ont une évolution différente lors de l'injection *in vivo*. Mais les deux types de sous-population ont la possibilité de former des tumeurs, une hypothèse peut être qu'il existe une hiérarchisation au sein des CCTS. L'hypothèse pourrait être que la perte d'AC133/1 serait un témoin de maturation des CCTS indifférenciées plus précoces vers un phénotype de CCTS plus tardifs, cette maturation pouvant être régulée par la pression partielle en oxygène. Ces deux types de sous-population donneraient naissance à des tumeurs *in vivo* phénotypiquement différentes. Dans ce contexte, nous avons établi qu'AC133/1 est un marqueur de non exposition à des pO_2 élevées et que l'expansion *in vitro* de CCTS à des pO_2 non physiologiques entraîne après leur implantation *in vivo* la formation de tumeurs de phénotypes distincts de ceux obtenus à des pO_2 physiologiques.

Des tests réalisés au laboratoire montrent que les cellules cultivées à 3% d' O_2 (cellules AC133/1-positives) produisent plus de VEGF que les cellules AC133/1-négatives. Ces résultats suggèrent que les cellules AC133/1-positives seraient capables d'induire la néoangiogénèse permettant l'augmentation de l'apport en oxygène aux cellules tumorales et la perte du marqueur AC133/1 accompagnant une « pseudo-différenciation » des CCTS vers des phénotypes tardifs distincts et multiples. Au sein d'une tumeur, une coexistence est donc possible entre des cellules souches plus résistantes et de nouveaux clones

émergents d'une entité causale initiale échappant au contrôle des thérapies (Adams and Strasser 2008). Il faudrait donc se concentrer au développement, en amont dans l'évolution de la tumeur, de nouvelles thérapies sur ces cellules, pour éviter les dérives phénotypiques. Dès lors que ces cellules auront été traitées, une action sur la masse tumorale avec les stratégies thérapeutiques existantes pourrait réduire l'expansion de la tumeur (**Figure 23**). Au vue de ces éléments, il semble donc intéressant de cibler ces cellules AC133/1-positives.

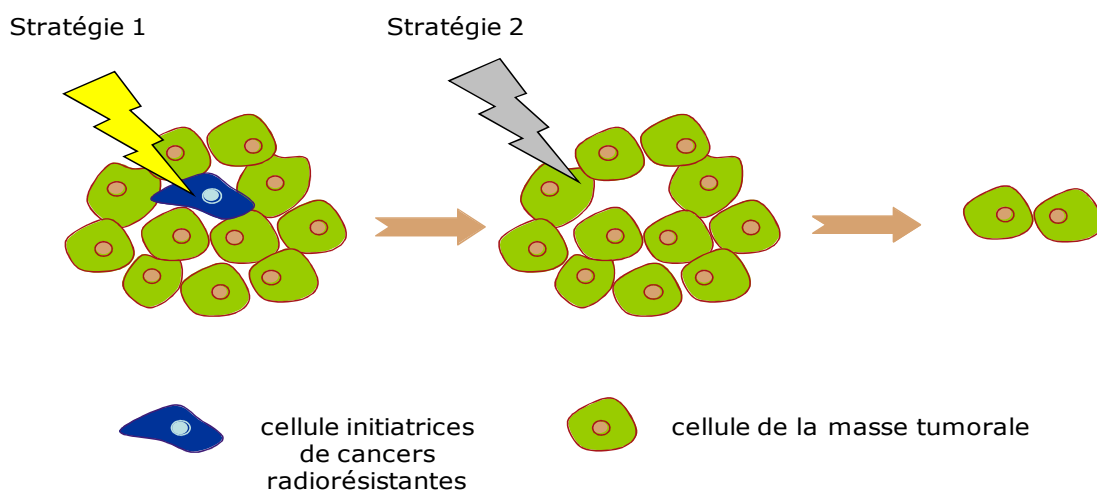


Figure 23 : Stratégies thérapeutiques envisagées pour éliminer, dans un premier temps, les cellules les plus résistantes (Stratégie 1), puis dans un second temps, les cellules de la masse tumorale (Stratégie 2)

La vascularisation de la tumeur peut résulter d'une part de l'angiogénèse c'est-à-dire de la prolifération des cellules endothéliales, et d'autre part, de la vasculogénèse, la colonisation des cellules endothéliales circulantes ou de la moelle osseuse qui présentent un marqueur CD11b+ (Kioi *et al.* 2010). Une étude montre qu'une implantation orthotopique de GBM chez la souris immunodéprimée combinée à de la radiothérapie, inhibe la voie de la vasculogénèse et permet un retard dans le développement de récives de la tumeur. En règle générale, il a été montré que l'irradiation augmente de façon significative le nombre de cellules myéloïdes CD11b+, très pro-angiogéniques, au sein de la tumeur. Ces cellules pourraient être une cible intéressante pour sensibiliser les cellules à l'irradiation (Kioi *et al.* 2010). Même si AC133/1 est un marqueur membranaire et de surcroît n'interfère pas avec les cellules CD11b+ dans les phénomènes d'angiogénèse (Yang *et al.* 2004) ou de néoangiogénèse (Kopp *et al.* 2006), il serait intéressant d'étudier le rôle d'AC133/1 au niveau des échanges intracellulaires.

1.2. Rôle pour AC133/1

Différentes études montrent que la protéine CD133 est liée au métabolisme cellulaire (Yang *et al.* 2007), mais également au stress bioénergétique (Griguer *et al.* 2008) et à la pression partielle en oxygène dans les GBM humains (Bourseau-Guilmain *et al.* 2011; Platet *et al.* 2007). La protéine CD133, localisée au niveau des protrusions de la membrane plasmique et des microvillosités (Huttner *et al.* 2008), a la capacité de se lier au cholestérol (Huttner *et al.* 2008) et présente un site de liaison aux gangliosides au niveau de son segment N-terminal (Taieb *et al.* 2009). CD133 étant une protéine membranaire, une de ses fonctions pourrait être associée aux échanges cellulaires comme l'endocytose et l'exocytose (Yang *et al.* 2007). A l'heure actuelle, une dizaine de voies d'endocytose simples ou par récepteurs sont connues (Doherty and McMahon 2009). Le rôle principal de l'endocytose est l'internalisation ou le transport des substrats de la membrane plasmique vers des sites cellulaires (Mallet and Maxfield 2000). En règle générale, l'endocytose se déroule en trois étapes. L'endocytose commence tout d'abord par une absorption spécifique de la particule sur les protéines, ensuite il y a invagination de la membrane, et pour finir, détachement et migration de la vacuole vers l'intérieur de la cellule (Doherty and McMahon 2009). Parmi les différentes voies d'endocytose, il y a la pinocytose, qui concerne des particules invisibles avec une taille inférieure à 150 nm, ainsi que la phagocytose qui est une voie consommant de l'ATP et qui s'intéresse plus particulièrement aux particules visibles. La phagocytose est un mécanisme utilisé par un certain nombre de cellules comme les macrophages, les polynucléaires et les neutrophiles, et joue un rôle important dans la défense contre les pathogènes. La pinocytose se découpe en plusieurs sous-groupes : la macropinocytose, la pinocytose clathrine-dépendante, la pinocytose cavéole-dépendante et la pinocytose cavéole- ou clathrine-indépendantes (**Figure 24**) (Conner and Schmid 2003; Doherty and McMahon 2009). La macropinocytose correspond à la formation de vésicules appelées macropinosomes de petites tailles (entre 0,5 et 5 μm) (Conner and Schmid 2003). La pinocytose clathrine-dépendante est responsable d'environ 50% de l'endocytose non liée à des récepteurs, et est présente chez tous les eucaryotes supérieurs (Geli and Riezman 1998). Deux types de récepteurs peuvent être internalisés par cette voie, certains le sont de manière 'naturelle' (comme par exemple la transferrine) et d'autres ont besoin de tout d'abord se lier au ligand (comme l'insuline). Cette voie est constituée de la clathrine, une protéine du manteau composée de trois chaînes lourdes et d'une chaîne légère (Kirchhausen 2000). Des protéines adaptatrices comme les protéines AP2 et la dynamine sont indispensables pour la réalisation de ce mécanisme (Conner and Schmid 2003). La pinocytose cavéole-dépendante est constituée de petites vésicules à cavéoline, une protéine transmembranaire riche en cholestérol. Des radeaux lipidiques contenant des récepteurs spécifiques sont ensuite créés (Conner and Schmid 2003).

La pinocytose cavéole- et clathrine-indépendantes est souvent utilisée par les virus ou les toxines (Conner and Schmid 2003).

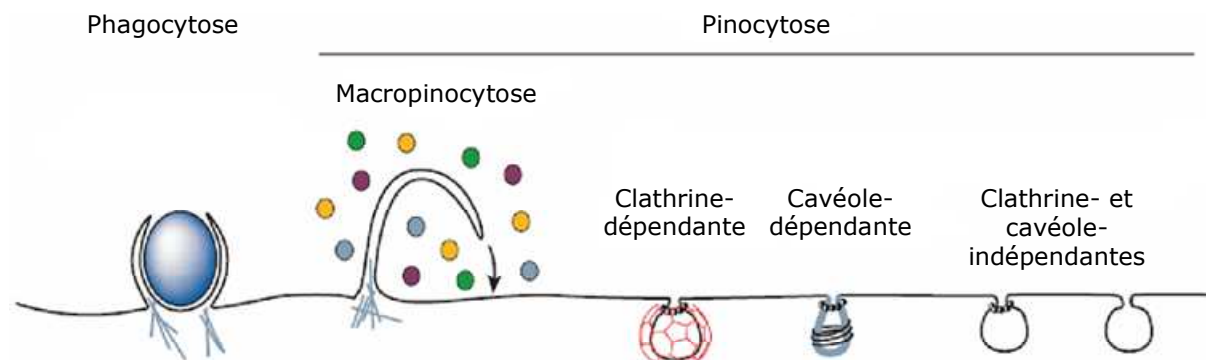


Figure 24 : Représentation des différentes voies d'endocytose, d'après (Conner and Schmid 2003)

Pour pouvoir étudier l'implication d'AC133/1-CD133 au sein des différentes voies d'endocytose, différents traceurs fluorescents sont utilisés comme la choléra-toxine pour la voie des cavéoles (Orlandi and Fishman 1998), la transferrine pour celle des clathrines et le dextran pour la pinocytose dans des cellules humaines Caco-2 d'adénocarcinome de colon, exprimant AC133/1-CD133 de manière constitutive.

Les résultats exposés dans ce deuxième article, permettent de mettre en évidence, dans un premier temps, l'implication de la protéine CD133 dans l'endocytose de la transferrine, un transporteur du fer. Puis, les expérimentations menées ont révélé, dans un second temps, un lien entre la protéine CD133 et le métabolisme du fer.

The Importance of the Stem Cell Marker Prominin-1/CD133 in the Uptake of Transferrin and in Iron Metabolism in Human Colon Cancer Caco-2 Cells

Erika Bourseau-Guilmain¹, Audrey Griveau¹, Jean-Pierre Benoit, Emmanuel Garcion*

Laboratoire d'Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, Inserm, UMR-S 646, Université d'Angers, Angers, France

Abstract

As the pentaspan stem cell marker CD133 was shown to bind cholesterol and to localize in plasma membrane protrusions, we investigated a possible function for CD133 in endocytosis. Using the CD133 siRNA knockdown strategy and non-differentiated human colon cancer Caco-2 cells that constitutively over-expressed CD133, we provide for the first time direct evidence for a role of CD133 in the intracellular accumulation of fluorescently labeled extracellular compounds. Assessed using AC133 monoclonal antibody, CD133 knockdown was shown to improve Alexa488-transferrin (Tf) uptake in Caco-2 cells but had no impact on FITC-dextran or FITC-cholera-toxin. Absence of effect of the CD133 knockdown on Tf recycling established a role for CD133 in inhibiting Tf endocytosis rather than in stimulating Tf exocytosis. Use of previously identified inhibitors of known endocytic pathways and the positive impact of CD133 knockdown on cellular uptake of clathrin-endocytosed synthetic lipid nanocapsules supported that CD133 impact on endocytosis was primarily ascribed to the clathrin pathway. Also, cholesterol extraction with methyl- β -cyclodextrine up regulated Tf uptake at greater intensity in the CD133^{high} situation than in the CD133^{low} situation, thus suggesting a role for cholesterol in the inhibitory effect of CD133 on endocytosis. Interestingly, cell treatment with the AC133 antibody down regulated Tf uptake, thus demonstrating that direct extracellular binding to CD133 could affect endocytosis. Moreover, flow cytometry and confocal microscopy established that down regulation of CD133 improved the accessibility to the TfR from the extracellular space, providing a mechanism by which CD133 inhibited Tf uptake. As Tf is involved in supplying iron to the cell, effects of iron supplementation and deprivation on CD133/AC133 expression were investigated. Both demonstrated a dose-dependent down regulation here discussed to the light of transcriptional and post-transcriptional effects. Taken together, these data extend our knowledge of the function of CD133 and underline the interest of further exploring the CD133-Tf-iron network.

Citation: Bourseau-Guilmain E, Griveau A, Benoit J-P, Garcion E (2011) The Importance of the Stem Cell Marker Prominin-1/CD133 in the Uptake of Transferrin and in Iron Metabolism in Human Colon Cancer Caco-2 Cells. PLoS ONE 6(9): e25515. doi:10.1371/journal.pone.0025515

Editor: Wael B-Rifai, Vanderbilt University Medical Center, United States of America

Received March 22, 2011; Accepted September 7, 2011; Published September 26, 2011

Copyright: © 2011 Bourseau-Guilmain et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", the "Axe Cellules Souches et Cancer" at the "Cancéropôle Grand-Ouest" and by "La Ligue Contre le Cancer" through an "Equipe Labellisée 2007" grant. Erika Bourseau was initially a PhD fellow with the "Conseil Général de Maine-et-Loire" and then a PhD fellow with the "Comité Départemental de Maine-et-Loire de La Ligue Contre le Cancer". Audrey Griveau was a PhD fellow with the "Conseil Général de Maine-et-Loire". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: emmanuel.garcion@univ-angers.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Following the use of new monoclonal antibodies raised against neuroepithelial and hematopoietic stem cells, CD133, also known in humans and rodents as Prominin-1, was first isolated and cloned in 1997 [1,2,3]. CD133 is a five-domain transmembrane protein, composed of an N-terminal extracellular tail, two small cytoplasmic loops, two large extracellular loops containing seven potential glycosylation sites and a short C-terminal intracellular tail that can be alternatively spliced [4] or phosphorylated [5].

Despite constant research efforts, the biological function of CD133 remains largely unknown. Among notorious phenotypes, it has been shown that a truncated CD133, which is not transported to cell membrane, leads to human retinal degeneration [6]. Underlining this important observation, analysis of a generation of CD133-deficient mice revealed that, while expressed very early during retinal development, CD133 acted as a key regulator of

disk morphogenesis and that loss of CD133 caused photoreceptor degeneration and blindness [7]. In addition, AC133, a glycosylated epitope of CD133 protein initially associated with embryonic stem cells [8] and a variety of somatic stem cells, was extensively described as a putative cancer stem cell marker in blood, brain, colon, prostate, lung, breast, liver, and skin cancers [9,10]. Other investigations revealed that CD133 is linked to cell metabolism as a glucose responsive gene in myotubes [11], as well as providing evidence for bioenergetic stress [12] and of non-exposure to high oxygen tension in gliomas (Bourseau-Guilmain et al., submitted).

At the subcellular level, CD133 is preferentially localized in plasma membrane protrusions and microvilli [13]. From there, CD133 can bind to cholesterol [14] and interact with gangliosides [15]. As membrane protrusions and microvilli enable extension of the membrane surface in order to increase cell exposure to the extracellular space, these observations provide important clues to identifying the molecular role of CD133, notably by considering

cellular exchanges with the microenvironment. Indeed, CD133 was found in membrane vesicles distinct from exosomes that were released from epithelial cells during differentiation [16].

In parallel to these outside-in signals, cholesterol and sphingolipids segregate in lipid raft membrane microdomains implicated in inside-out signaling and endocytosis [17,18]. Considering the tight relation between CD133 and cholesterol, plus its possible link to sphingolipids and exposure to the extracellular space, we hypothesized that CD133 is involved in endocytosis, a fundamental process by which extracellular compounds are internalized and distributed to intracellular compartments.

In the present study, using the RNA-interference strategy and undifferentiated human colon cancer Caco-2 cells that constitutively over-expressed CD133/ AC133, we provide for the first time evidence for a role of CD133 in the intracellular accumulation of extracellular compounds, notably exemplified by transferrin (Tf). In addition to data that establish a role for CD133 in endocytosis, we also demonstrate that CD133 itself is regulated by iron, thus supporting the existence of a Tf-CD133-iron network. These new observations are discussed in the light of the CD133 pattern of expression and current knowledge in the field.

Materials and Methods

Cell culture

Undifferentiated human colon carcinoma Caco-2 cells (American type culture collection: HTB-37™) were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Levallois-Perret, France) containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine. The medium was added with 10% of fetal bovine serum (FBS; Lonza, Verviers, Belgium), 1% antibiotics (10 units/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 25 ng/mL amphotericin B; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA, MO) and 1% of non-essential amino acids (NEAA; Lonza, Verviers, Belgium). When cells reached 80% confluence, they were dissociated in 0.5% porcine trypsin and 0.2 g/mL EDTA (Lonza, Verviers, Belgium) before re-plating on uncoated plastic flasks at 156 10³ cells/cm². Half the medium was replaced by fresh medium every two days.

siRNA knockdown of CD133

Caco-2 cells were plated in six-well plates with 2.36 10⁵ cells per well in 2 mL of the aforementioned medium for 24 h. Medium was removed and cells were transfected with 30 nM of RNA oligonucleotide duplexes (Sigma-Aldrich) using the N-TER reagent according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). N-TER/siRNA complexes were then incubated in Caco-2 medium for 48 h at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. siRNA were then removed and replaced by fresh medium for 24 h. A sequence scramble was used as negative control: 59-GUCCGGAAUACCAUGAGUdTdT-39. The sequence used to perform targeted RNA interference inhibition of CD133 was 59-CCCUUAAUGAUUACCGAdTdT-39.

AC133 immunolabeling

Caco-2 cells exposed to siRNA were collected and dissociated using Versene (Lonza). Cells were incubated with 5 mg/mL AC133 antibody (Miltenyi Biotec, Paris, France) or IgG1k isotype control (BD-Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 1 h at 4°C in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Cells were then washed three times in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, and incubated for 30 minutes at 4°C with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment polyclonal antibody (Dakocytomation, Trappes, France) at 20 ng/mL in

PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Following three more washes in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, cells were re-suspended in PBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide.

Flow cytometry

A BD FACSCalibur™ fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest™ software (BD-Biosciences) were used for flow cytometry acquisition. Analysis was carried out using WinMDI 2.9 software (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA).

Synthesis of Nile red-labeled lipid nanocapsules (NR-LNC)

50 nm Nile red (NR)-labeled lipid nanocapsules (LNC) (NR-LNC) that incorporated the fluorescent compound NR were prepared as previously described [19] by using a phase inversion process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing triglycerides (Labrafach WL 1349, Gattefossé, Saint-Priest, France), a non ionic hydrophilic surfactant (Solutol HHS 15, Gmbh, Ludwigshafen, Germany) and lecithins (Lipoid H S75-3, Gmbh). NR was dissolved in acetone at 1% (w/w), and the resulting NR solution was incorporated in Labrafach H at 1:10 (w/w). Thus, 846 mg Solutol H, 75 mg Lipoid H, 1029 mg Labrafach containing NR, 89 mg NaCl and 2975 mg water were mixed and heated under magnetic stirring up to 85°C. Three cycles of progressive heating and cooling in between 85°C and 60°C were then realized. They were finally followed by an irreversible shock induced by dilution with 12.5 mL of 0°C deionised water added into the inversion phase zone. Size exclusion and high-pressure liquid chromatography (HPLC) assays demonstrated a complete encapsulation and retention of NR as previously observed [19]. LNC were analysed for their size distribution using a Malvern Zetasizer Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK).

Internalization of transferrin (Tf), dextran (Dx), cholera toxin subunit B (CTB) and lipid nanocapsules (LNC)

The medium of transfected cells was removed and replaced by DMEM supplemented with 1% of serum-free N1 medium (Sigma Aldrich) for 1 h. The three following compounds, Tf-Alexa 488 at 0.5 and 5 mg/mL (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), Dx-FITC at 0.5 and 5 mg/mL (Sigma Aldrich) and CTB-FITC at 1 and 10 mg/mL (Invitrogen), or instead, NR-LNC at 1/1000 dilution from initial suspension thus corresponding to a 100 mg/mL concentration, were then added to the medium for 1 h. Cells were then dissociated using Versene (Lonza). To enable determination of the fraction of labeled molecules or particles that was effectively internalized within cells, extracellular fluorescence was quenched using 0.4% trypan blue (Sigma Aldrich). Cells were then washed in PBS and re-suspended in PBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide. Internalization of fluorescently labeled Tf, Dx, CTB and LNC was monitored by flow cytometry.

Analysis of the release of Tf from Caco-2 cells after internalization

Control and CD133-specific siRNA were used to generate CD133^{high} and CD133^{low} transfected Caco-2 cells, respectively. Cells were then incubated with Tf-Alexa 488 for 2 h at 37°C/5% CO₂ before the extracellular media was removed, washed and replaced by fresh medium free from Tf-Alexa 488. After further incubation at 37°C/5% CO₂ for 1 h, 2 h and 3 h, the remaining intracellular Tf-Alexa 488 fluorescence, representing the amount of Tf-Alexa 488 that was not recycled to the extracellular

compartment, was measured by semi-quantitative flow cytometry as described above.

Cell treatment with chemical inhibitors of endocytosis and cellular uptake of Tf

Previously identified chemical inhibitors of known endocytic pathways were used as previously described [19,20,21]. Briefly, transfected Caco-2 cells were pre-treated with inhibitors for 1 h at 37°C in N1 medium. Chlorpromazine (10 µg/mL; Sigma-Aldrich) was used to inhibit clathrin-mediated transport [22], while filipin (1 µg/L; Sigma-Aldrich) and dimethylamiloride (DMA, 10 nM; Sigma-Aldrich) were used to inhibit caveolae-dependent endocytosis [23] and macropinocytosis [24], respectively. Cholesterol depletion was obtained by a 2 h pretreatment with methyl- β -cyclodextrine (M β CD, 10 mM; Sigma-Aldrich) in the presence of lovastatin (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) [25,26]. Subsequently, cellular uptake of 5 µg/mL Tf-Alexa 488 was monitored by flow cytometry analysis as described above. For cholesterol inhibition, 1 µg/mL lovastatin was also maintained in the medium during the treatment with Tf-Alexa 488.

Analysis of Tf uptake by Caco-2 cells after treatment with the AC133 antibody

Caco-2 cells were plated at 2.36×10^5 in 24-well plates in 400 µL of serum containing medium. After a 24 h initial incubation at 37°C/ 5% CO₂ the initial medium was replaced by N1 serum free medium before incubation with either 0, 5, or 10 µg/mL of the AC133 antibody or of isotype control IgG1k. Tf-Alexa 488 was then added at 5 µg/mL and incubated at 37°C/ 5% CO₂ for 1 h to study the impact of the immunoglobulin treatment on Tf-Alexa 488 uptake. Tf-Alexa 488 uptake was quantified by flow cytometry as described above.

Antibody recognition of the Tf receptor at surface the Caco-2 cell depending on the level of CD133 expression

Caco-2 cells exposed to CD133 or control siRNA were collected and dissociated using Versene (Lonza). Cells were incubated with 5 µg/mL CD71 mouse monoclonal antibody that recognize the Tf receptor (TfR or CD71 antigen) (clone M-A712, BD-Biosciences) or with 5 µg/mL IgG2a, k isotype control (BD-Biosciences) to proceed for immunolabeling and flow cytometry as described above for AC133 cell surface recognition.

Immunocytochemistry combined with confocal laser scanning microscopy for the identification of AC133, CD71 and clathrin heavy chain within Caco-2 cells

Caco-2 cells were plated at 46×10^3 cells per well in eight-well Lab-Tek Chamber Slides (Nunc, Roskilde, Denmark) in 300 µL DMEM containing 10% FCS for 24 h. They were then exposed to CD133 or control siRNA as described above before to proceed to immunocytochemistry. Cells were then washed with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) for 20 minutes at 4°C. After washes in PBS, cells were exposed for 60 minutes at room temperature to a blocking solution of PBS containing 4% of bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) and 10% of normal goat serum (Sigma-Aldrich). Primary monoclonal antibodies against CD133 (IgG1k, Miltenyi Biotec), TfR or CD71 (IgG2ak, BD-Biosciences) or clathrin heavy chain (CHC) (IgG1, BD-Biosciences) were incubated at 5 µg/mL in PBS/ BSA 4% for overnight at 4°C. Note that for CHC intracellular immunolabeling, TritonHX-100 was added at 0.1% during the blocking procedure for cell permeation. After washes, a secondary horse anti-mouse biotin-conjugated antibody (Vector, Burlingame, CA) was applied at 1/

100 in PBS/ BSA 4% for 1 h at room temperature. After additional washes, Streptavidin Fluo Probe Alexa 488 (Interchim, Montluçon, France), diluted 1/ 700, was used. Cells were finally washed and mounted under coverslip in fluorescent mounting medium (Dakocytomation). Confocal microscope images were obtained by using an Olympus Fluoview™ FU 300 confocal laser scanning microscopy imaging system (Paris, France).

Iron treatments

Caco-2 cells were plated in six-well plates with 2.36×10^5 cells per well in 2 mL for 24 h. Before iron treatment started, FBS containing medium was replaced by serum free N1 medium for an additional 24 h. Cells were then treated with various concentrations (50–800 nM) of ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA) for 72 h at 37°C/ 5% CO₂, as indicated. Fe-NTA (molar ratio 1:4) was extemporaneously prepared as a 20-mM stock from NTA and ferric chloride hexahydrate (Sigma-Aldrich). Cells were alternatively treated with FeSO₄ (Sigma-Aldrich), another iron donor [27,28], at either 150 or 300 nM for 24 h.

Iron deprivation and treatment with hypoxia-mimetic agents

Following a similar culture procedure as before iron treatment, cells were instead treated for 24 h with an iron chelator, also known as a hypoxia-mimetic agent, Desferrioxamine (DFO, Sigma-Aldrich) at 100 and 150 nM [29,30]. Alternatively, they were treated for 24 h with a hypoxia-mimetic agent that works independently from iron deprivation, Cobalt dichloride (CoCl₂, Sigma-Aldrich) at 100 and 150 nM [31].

Database, bioinformatics

To search for putative iron responsive element (IRE) sequences within the 3' and 5' untranslated region (UTR) of human CD133 mRNA, the sequences used in this study (among which Homo sapiens prominin 1 transcript variant 2, NM_001145847.1) were obtained from NCBI GenBank. All sequence alignments were done using the ClustalW computer program from the EMBL European Bioinformatics Institute (Heidelberg, Germany). The SIREs (searching for IREs) web server (<http://ccbg.imppc.org/sires/>) was also used for prediction of iron responsive elements in RNA [32].

Statistical analysis

XLSTAT 2006 Version 2006.3 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. The statistical significance of each experiment was determined by a Dunnett's test. The tests were considered as significant with p values, 0.05.

Results

Impact of specific siRNA-mediated knockdown of CD133 on the intracellular accumulation of Tf, Dx and CTB in non-differentiated Caco-2 cells

To determine the potential influence of CD133 on the intracellular accumulation of extracellular compounds, non-differentiated human colon carcinoma Caco-2 cells, which naturally express high levels of CD133, were used. Using either siRNA that does not lead to transcriptional down-regulation (control siRNA) or siRNA that does down regulate targeted CD133 mRNA and protein expression (CD133 siRNA), two situations were analyzed: Caco-2 cells expressing high levels of CD133, and Caco-2 cells expressing low levels of CD133. Figure 1A shows that treatment of Caco-2 cells with 30 nM of

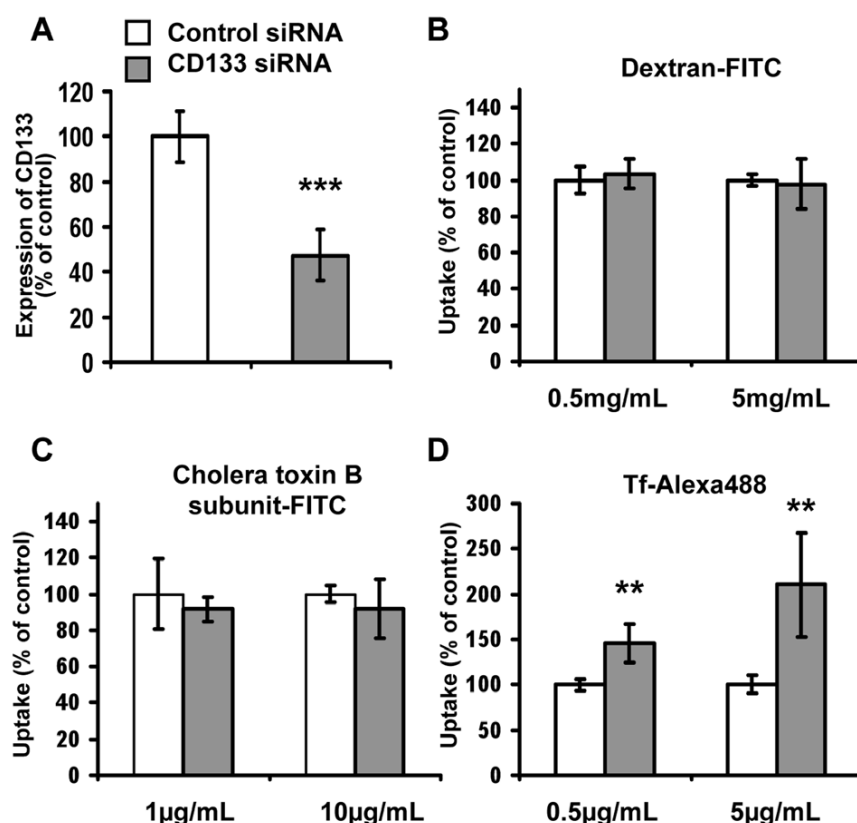


Figure 1. Specific siRNA mediated knockdown of CD133 within non-differentiated *Caco-2* cells led to an increase in Tf intracellular accumulation but had no impact on Dx and CTB uptake. A) Immunofluorescence associated flow cytometric analysis of CD133 expression on non-differentiated *Caco-2* cells treated with 30 nM of control or CD133-specific siRNA. Results are expressed as a percentage of the control treatment, representing the geomean fluorescence intensity levels obtained after AC133 immunostaining of cells treated with irrelevant siRNA (CD133^{high} *Caco-2* cells); note the effective down regulation of CD133 when CD133-specific siRNA (CD133^{low} *Caco-2* cells) was used. B–D) Flow cytometric analysis of intracellular uptake of Dx-FITC (B), CTB-FITC (C) and Tf-Alexa 488 (D) within CD133^{high} and CD133^{low} *Caco-2* cells after 1 h of incubation at 37°C/5%CO₂. Results are expressed as percentage of control, thus representing the geomean fluorescence intensity levels obtained for cells treated with vehicle alone. Data represented mean ± s.e.m. obtained from three independent experiments. Dunnett's test: **p, 0.01, ***p, 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0025515.g001

CD133 siRNA effectively led to a reduction of 52.6 ± 11% in CD133 protein expression, analyzed by flow cytometry immunofluorescence (AC133 antibody) compared to the control siRNA. To analyze *Caco-2* cell pinocytic ability in the CD133^{high} and CD133^{low} situations, the intracellular accumulation of exogenous markers of pinocytic pathways was then monitored. Although alternative internalization pathways have been described depending on cell types and differentiation status (for review see [33]), Tf-Alexa 488, Dx-FITC and CTB-FITC were used as prototype markers of receptor mediated endocytosis [34], fluid phase endocytosis [24,35] and caveolae dependent endocytosis [23,36], respectively. Flow cytometry measurement of intracellular fluorescence after 1 h exposure of CD133^{high}-*Caco-2* cells to either 0.5 or 5 mg/mL Dx-FITC, 1 or 10 µg/mL CTB-FITC and 0.5 or 5 µg/mL Tf-Alexa 488 enabled 100% uptake to be measured compared to the basal geomean fluorescent intensity of vehicle alone treated cells representing 0% uptake. Although CD133 knockdown had no impact on intracellular accumulation of Dx-FITC (Figure 1B) or on CTB-FITC (Figure 1C), cellular uptake of Tf-Alexa 488 was significantly amplified in CD133^{low}-*Caco-2* cells whatever the concentration tested (Figure 1D). These data thus established for the first time that CD133 act as a modulator of intracellular accumulation of exogenous compounds.

Effect of siRNA mediated knockdown of CD133 on Tf exocytosis

In view of the fact that CD133 appeared to be an inhibitor of cellular uptake of Tf while having no impact on Dx and CTB, we further focused on the relation between CD133 expression and Tf accumulation. The potential effect of siRNA mediated knockdown of CD133 on Tf-Alexa 488 exocytosis was therefore investigated. For this purpose, CD133^{high} and CD133^{low} non-differentiated *Caco-2* cells were incubated with Tf-Alexa 488 for 2 h at 37°C/5% CO₂ before the extracellular medium was removed, washed and replaced by fresh medium free from Tf-Alexa 488. After further incubation for 1, 2 and 3 h at 37°C/5% CO₂ the amount of Tf-Alexa 488 that was not recycled to the extracellular compartment was measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. Data presented in Figure 2 established that intracellular levels of Tf-Alexa 488 decreased with incubation time. After 1 h of incubation more than 80% of the internalized Tf-Alexa 488 remained within cells in both CD133^{high} and CD133^{low} expressing cells while after a 3 h of incubation, 54.6 ± 9% and 43.6 ± 4% of the internalized Tf-Alexa 488 remained within CD133^{high} and CD133^{low} expressing cells, respectively. However at all times studied, no significant difference was observed depending on CD133 expression levels (Figure 2). These

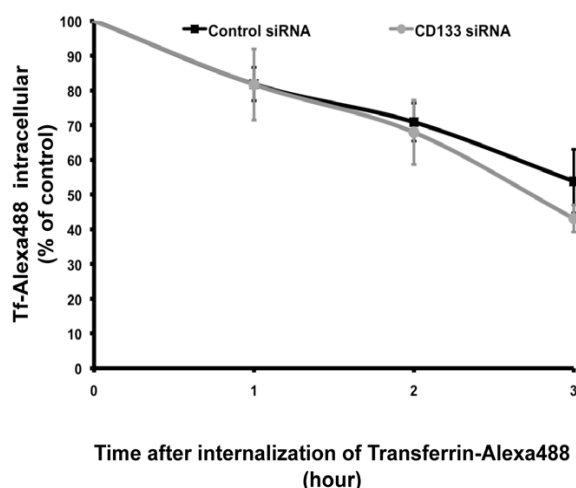


Figure 2. Specific siRNA mediated knockdown of CD133 within non-differentiated *Caco-2* cells did not affect short-term Tf exocytosis. CD133^{high} (control siRNA) and CD133^{low} (CD133 siRNA) non-differentiated *Caco-2* cells were exposed to Tf-Alexa 488 for 2 h at 37°C/5% CO₂ before the extracellular medium was removed, washed and replaced by fresh medium free from Tf-Alexa 488. Amounts of Tf-Alexa 488 that were not recycled to the extracellular compartment were measured by flow cytometric analysis after further cell incubation at 37°C/5% CO₂ for 1 to 3 h. Data are expressed as a % of Tf-Alexa 488 initially internalized. They represent mean $\pm$ s.e.m. obtained from three independent experiments.
doi:10.1371/journal.pone.0025515.g002

observations emphasized that although Tf recycling occurred in both CD133^{high} and CD133^{low} non-differentiated *Caco-2* cells, short term differences in intracellular Tf accumulation are due essentially to the impact of CD133 on endocytosis mechanisms rather than exocytosis.

Effect of chemical inhibitors of known endocytic pathways on the uptake of Tf by non-differentiated *Caco-2* cells depending on the level of CD133 expression underlined the importance of the clathrin pathway.

Having established that the level of expression of CD133 had an impact on Tf uptake within non-differentiated *Caco-2* cells but did not modulate Tf recycling, we then addressed the question whether CD133 is involved in specific pinocytic pathways [33]. For this purpose, uptake of Tf-Alexa 488 within CD133^{high} and CD133^{low} expressing cells was monitored after treatment with previously identified chemical inhibitors of known endocytic pathways. Chlorpromazine was used to inhibit clathrin mediated transport [22], filipin to inhibit caveolae dependent endocytosis [23] and DMA to inhibit macropinocytosis [24]. Flow cytometry established that pretreatment of control CD133^{high} *Caco-2* cells with filipin, chlorpromazine and DMA before exposure to 5 ng/mL Tf-Alexa 488, led to a 30%, 90% and non-significant reduction in Tf uptake, respectively (Figure 3A). The major impact of chlorpromazine combined with the slighter effect of filipin thus emphasized that Tf accumulation within non-differentiated *Caco-2* cells was mainly due to clathrin-mediated transport [37]. The filipin effect could be explained by the fact endocytosis of prototypic substrates for receptor-mediated endocytosis, such as LDL or Tf, which usually route to the intracellular compartment through the clathrin pathway, could alternatively use the caveolae pathway [38,39]. Moreover, as cholesterol has been shown to be involved in the formation of clathrin coated endocytic vesicles [26], filipin, which sequesters

cholesterol, may also have an indirect impact on clathrin endocytosis. Interestingly, when considering CD133 knockdown and CD133^{low} *Caco-2* cells, very similar data were obtained with filipin, chlorpromazine and DMA, leading to 18%, 85% and non-significant reduction in Tf uptake, respectively (Figure 3A). Thus, the quantitative effects of CD133 on Tf endocytosis appear to be mainly related to the clathrin-dependent pathway. Surprisingly, cholesterol depletion, achieved by using MbCD combined with lovastatin [25,26], which has been said to affect clathrin independent pathways and to some extent clathrin dependent pathways [26,40,41], resulted in a major improvement in Tf-Alexa 488 accumulation within CD133^{high} *Caco-2* cells (+49%, Figure 3A). Interestingly, the impact of cholesterol depletion on Tf-Alexa 488 uptake within CD133^{low} *Caco-2* cells was less marked (+21%, Figure 3A). These last data supported the hypothesis that CD133 interaction with intracellular cholesterol also has an impact on Tf endocytosis. To further corroborate a possible link between CD133 and the clathrin-dependent endocytosis pathway, impact of CD133 knockdown on the uptake of synthetic nanoparticles (LNC) that were previously described to use the clathrin pathway on route to the intracellular space of *Caco-2* cells [21] was investigated. Interestingly, as for fluorescent Tf, uptake of fluorescently tagged LNC (NR-LNC) was significantly higher in CD133^{low} *Caco-2* cells (Control siRNA) as compared with CD133^{high} *Caco-2* cells (CD133 siRNA) (Figure 3B).

Treatment of non-differentiated *Caco-2* cells with the AC133 antibody recognizing the extracellular domain of CD133 resulted in a reduction in Tf uptake

Having established that CD133 expression quantitatively affected Tf endocytosis, we then considered that a direct interaction between the CD133 protein and the Tf endocytic machinery would have been affected by extracellular ligand binding to CD133. As extracellular ligand of CD133 had not yet been identified and since monoclonal antibodies have already been used as activating or as function blocking immunoglobulins, for instance in interactions between integrins and extracellular matrix [42], the AC133 antibody, which recognizes an extracellular glycosylation associated epitope of CD133 [43], was then tested as CD133 ligand on living *Caco-2* cells. Interestingly, while treatment of non-differentiated *Caco-2* cells with an IgG1k isotype control immunoglobulin had no effect on the intracellular accumulation of Tf-Alexa 488 evaluated by flow cytometry (Figure 4A), treatment with the AC133 antibody resulted in a major reduction in Tf uptake of 38.6% and 75.6% at 5 and 10 ng/mL, respectively (Figure 4A). These data established that AC133 can effectively exert functional effects on living cells here ascribed to an interaction between CD133 itself and the Tf endocytic machinery in non-differentiated *Caco-2* cells.

siRNA knockdown of CD133 resulted in a strong improvement of the TfR accessibility from the extracellular space

To further assess the accessibility to the TfR (or CD71) from the extracellular compartment depending on the presence of CD133, expression of the TfR/CD71 at the plasma membrane was evaluated on CD133^{low} *Caco-2* cells (Control siRNA) and CD133^{high} *Caco-2* cells (CD133 siRNA). Immunofluorescence combined with flow cytometry analysis demonstrated a dramatic improvement of CD71/TfR recognition by the corresponding antibody when CD133 was concomitantly down regulated through siRNA knockdown (from 11.74 to 85.94 arbitrary units, p , 0.001, Figure 4B). Immunocytochemistry combined with

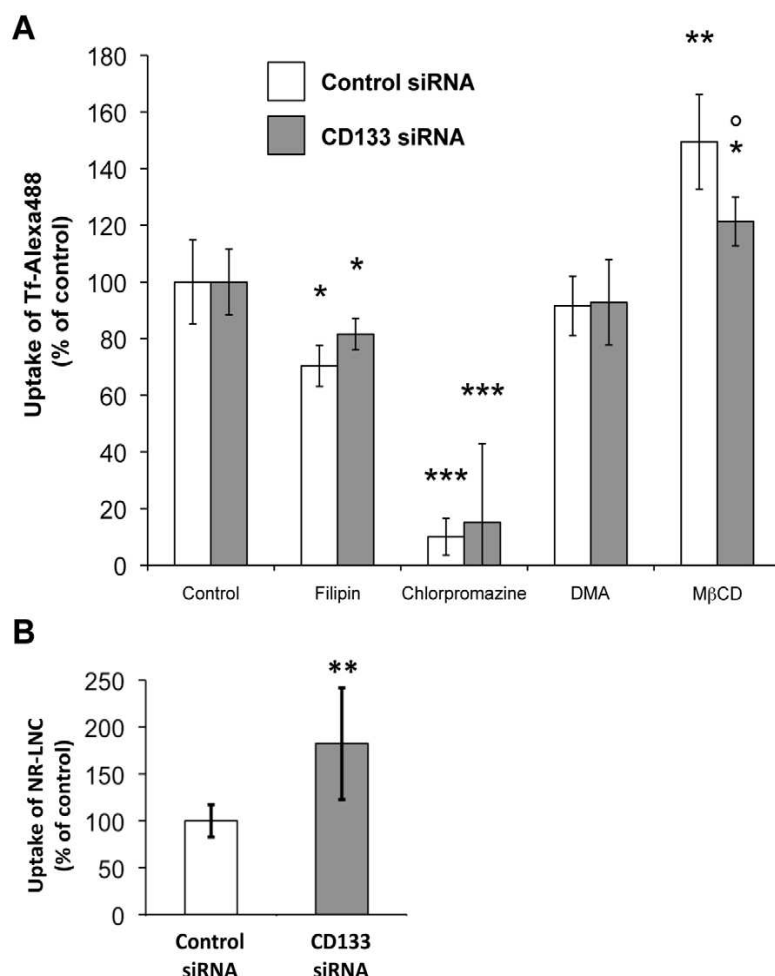


Figure 3. Implication of CD133 in endocytosis mainly involved the clathrin pathway. A) Consequences of CD133-specific siRNA knockdown for the effectiveness of chemical modulators of known endocytic pathways in modulating Tf uptake by non-differentiated Caco-2 cells. After treatment with either vehicle alone (control), filipin, chlorpromazine, DMA or MβCD added with lovastatin (MβCD), CD133^{high} (control siRNA) and CD133^{low} (CD133 siRNA) non-differentiated Caco-2 cells were exposed to 5 ng/mL Tf-Alexa 488. Cellular internalization of Tf-Alexa 488 was then monitored by flow cytometry. Results are expressed as a % of Tf-Alexa 488 amounts that were internalized in the vehicle treated control. Note the absence of effect of CD133-siRNA knockdown on the major inhibition of Tf-uptake caused by chlorpromazine. Note also the reduced up regulatory effect of cholesterol extraction in the CD133 low situation (MβCD). Data represented mean $\pm$ s.e.m. of a triplicate obtained from one representative experiment that was reproduced twice. Comparisons with control: Dunnett's test, *p, 0.05, **p, 0.01, ***p, 0.001; comparison between control siRNA and CD133 siRNA: Dunnett's test: p, 0.05. B) Specific siRNA mediated knockdown of CD133 within non-differentiated Caco-2 cells led to an increase in LNC intracellular accumulation. Flow cytometric analysis of intracellular uptake of NR-LNC within CD133^{high} (Control siRNA) and CD133^{low} (CD133 siRNA) Caco-2 cells after 1 h of incubation at 37°C/5%CO₂. Results are expressed as percentage of control, thus representing the geometric mean fluorescence intensity levels obtained for cells treated with vehicle alone. Data represented mean $\pm$ s.e.m. obtained from three independent experiments. Dunnett's test: **p, 0.01. doi:10.1371/journal.pone.0025515.g003

confocal laser scanning microscopy confirmed this observation (Figure 4C). Combined with the direct short-term effect of the AC133 antibody on the uptake of Tf, these data supported a direct or indirect interaction of CD133 with CD71/ TfR at the plasma membrane. In contrast, although the clathrin pathway was found to be the major endocytic process for Tf within Caco-2 cells, no evident differences were detected by immunocytochemistry in the pattern of expression of CHC (Figure 4C).

Relation between iron supplementation or deprivation and AC133/CD133 expression

Although Tf-independent iron transport can occur in mammalian cells [44], the majority of extracellular iron is bound to Tf [45]

and uptake of iron occurs from iron loaded Tf through TfR dependent endocytosis [33]. Interestingly, most of the proteins involved in iron metabolism are regulated by iron itself notably through iron regulatory proteins (IRP-1, IRP-2) that, in iron starved cells, bind to cis-acting elements called iron responsive elements (IREs) located in the 5' or 3'UTR of transcripts [46,47,48]. Thus, binding of IRPs to IREs located in the 5'UTR of targeted messengers leads to inhibition of translation, as exemplified by ferritin, which is up regulated in response to high iron concentrations [49]. In contrast, recognition of IREs located in the 3'UTR of transcripts lead to their stabilization, as exemplified by Tf, which is down regulated in response to high iron concentrations [50]. Since the present work established that

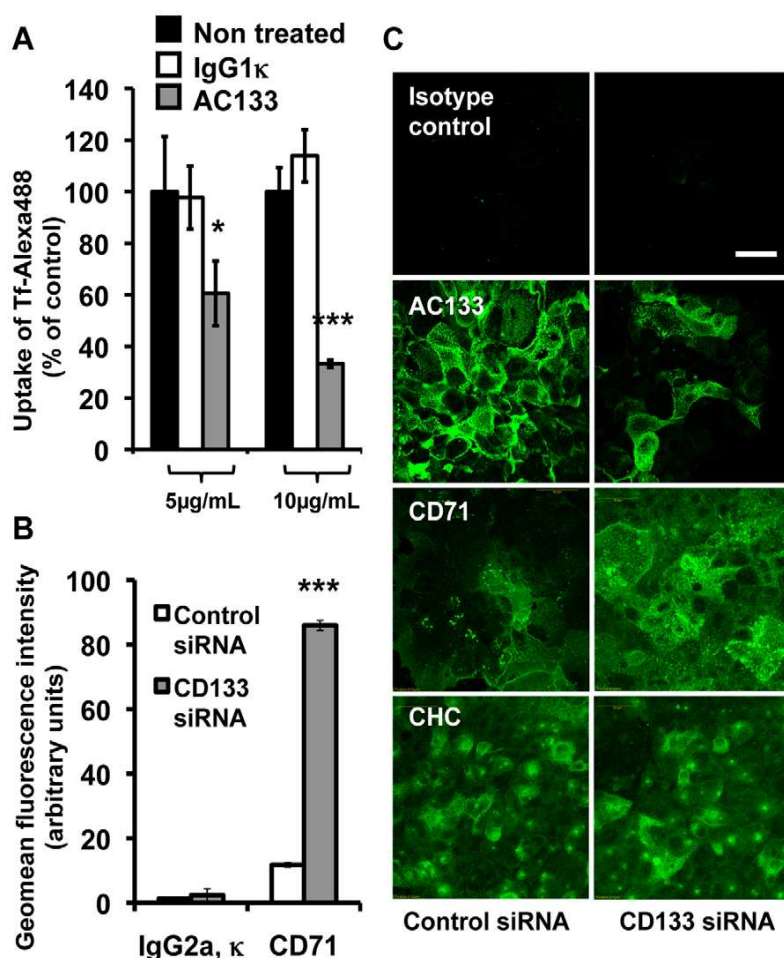


Figure 4. Recognition of CD133 and modulation of its expression interfere with Tf uptake and TfR accessibility in Caco-2 cells. A) AC133 antibody treatment inhibited Tf uptake. Constitutively CD133-expressing undifferentiated Caco-2 cells were exposed to Tf-Alexa 488 for 1 h at 37°C/5%CO₂ in the presence of 5 or 10 µg/ml of AC133 or IgG1κ immunoglobulin control. Tf-Alexa 488 that was effectively internalized within cells was then monitored by flow cytometry. Results are expressed as a % of Tf-Alexa 488 amounts that were internalized in the untreated control. Data represented mean $\pm$ s.e.m. from a triplicate obtained from one representative experiment. Dunnett's test: *p, 0.05, ***p, 0.001. B) Flow cytometric analysis of the expression of TfR (CD71) at the surface of CD133^{high} (Control siRNA) and CD133^{low} (CD133 siRNA) Caco-2 cells. Data represented mean $\pm$ s.e.m. obtained from three independent experiments. IgG2κ immunoglobulins were used as negative control immunostaining. Dunnett's test: ***p, 0.001. C) Analysis of the expression of AC133, TfR/CD71 and CHC within Caco-2 cells by immunocytochemistry combined with confocal laser scanning microscopy. Note the increase of CD71 expression while AC133 was depleted from the Control siRNA to the CD133 siRNA situation. Bar: 50 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0025515.g004

AC133/ CD133 regulated endocytosis of holo-Tf in Caco-2 cells, we further addressed the question whether AC133/ CD133 was in turn regulated by iron. For this reason, non-differentiated Caco-2 cells previously placed in serum free medium, were treated with extemporaneously prepared Fe-NTA (1:4) for 72 h at 37°C/ 5% CO₂ as described by others [44,51,52], thus allowing cells to improve their iron contents. The impact of Fe-NTA treatment on CD133/ AC133 expression was then assessed by flow cytometry (Figure 5A–C). As exposure to extracellular iron has previously been shown to be toxic for cells [53], we checked that Fe-NTA concentrations ranging from 50 to 800 nM had no impact on cell shape and attachment (data not shown) or on cell death (Figure 5A). Interestingly, while low concentrations of Fe-NTA did not alter CD133/ AC133 expression, 200 to 800 nM Fe-NTA induced dose dependent down regulation of cancer stem cell marker expression (Figure 5B–C). To confirm that iron supple-

mentation regulated CD133/ AC133 expression, Caco-2 cells were treated with FeSO₄, another iron donor [27,28]. As shown on Figure 5D, FeSO₄ at 300 nM lead to a down regulation of CD133/ AC133 expression, while having no effect at 150 nM. To further understand the modality of regulation of CD133/ AC133 expression by iron, iron chelation with DFO was also investigated. Interestingly, DFO treatment significantly reduced AC133 expression in Caco-2 cells in a dose dependent manner at 100 and 150 nM (Figure 5E). As iron supplementation expectedly had opposite effect as iron deprivation on intracellular iron content, the reduction of AC133 expression in both situations suggests the possibility that supplementation and deprivation may work on distinct pathways. As such, DFO is also known as a hypoxia-mimetic agent, which by inhibiting the activity of prolyl hydroxylases stabilizes the HIF-1α transcription factor [29,30]. To further cope with the hypothesis that DFO-induced hypoxia

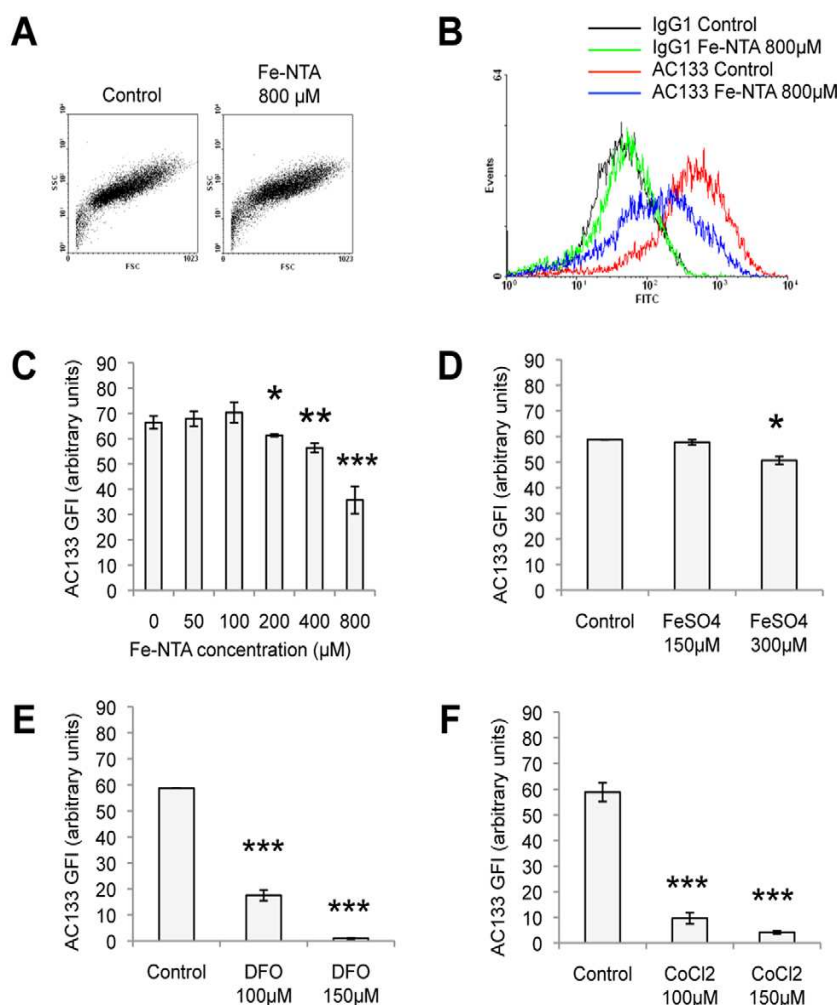


Figure 5. Iron supplementation down regulated AC133/CD133 expression in Caco-2 cells in a dose-dependent fashion. Combined immunofluorescence and flow cytometry was used to assess the impact of Fe-NTA treatment on AC133/CD133 expression in Caco-2 cells. A) Forward scatter (FSC, approximate cell size) and side scatter (SSC, cell complexity or granularity) profiles of vehicle only treated cells (control) versus Fe-NTA (800 nM) treated cells. B) Cell number distribution versus FITC-fluorescence (arbitrary units) in control and Fe-NTA (800 nM) treatments after IgG1 control or AC133 immunostaining. Dose-response histograms representing AC133/CD133 expression as a function of Fe-NTA (C), FeSO₄ (D), DFO (E) or CoCl₂ (F) treatments at different concentrations as indicated. GFI: geomean fluorescence intensity. Data represent mean $\pm$ s.e.m. of a triplicate obtained from one representative experiment. Dunnett's test: *p, 0.05, **p, 0.01, ***p, 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0025515.g005

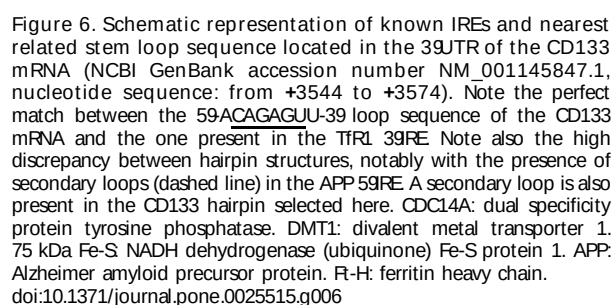
may down regulate the expression of AC133/CD133, effect of CoCl₂ [31], a hypoxia-mimetic agent that stabilize HIF-1 α and works independently from iron deprivation, was investigated. Figure 5F established that, similarly to DFO, CoCl₂ at 100 and 150 nM strongly inhibited the expression of AC133/CD133 within Caco-2 cells. This observation emphasized that control of AC133/CD133 expression by iron in Caco-2 cells may in parallel to mRNA stabilization, also involved transcriptional regulation notably through HIF-1 α .

To get more information on the direct or indirect effect of iron on AC133/CD133 expression, a search for putative IRE-like stem loops within the 5'UTR and 3'UTR of human CD133 mRNA was carried out using computer based sequence alignments as described in Materials and Methods. Although previously published IRE sequences [32,47,48,54,55,56,57,58] were not recognized, and the SIREs Web research [32] failed to detect any classical stem loop sequence within the 5'UTR and 3'UTR of

human CD133 mRNA, a hairpin loop presenting the non-canonical CAGAGU sequence as observed in the first IRE identified in the human TfR mRNA was identified in the 3'UTR. This selected sequence, which still requires investigation, is presented among validated IREs in Figure 6.

Discussion

Our results provide evidence for an important role of the 5-domain trans-membrane molecule CD133 in the regulation of cellular crosstalk with the extracellular microenvironment, revealed firstly by inhibition of Tf endocytosis in non-differentiated Caco-2 cells, secondly by the ability of the CD133-specific AC133 antibody to also inhibit Tf endocytosis and thirdly by the negative regulation of the TfR accessibility. Since Tf is the main iron carrier entry to the mammalian cell, the identification of a role of CD133 in endocytosis must be related to the regulation of CD133



The unique localization of the cholesterol binding protein CD133 in plasma membrane protrusions and microvilli, as well as in association with specific lipid raft microdomains that are sensitive to Triton X100 but resistant to Lubrol WX supported the hypothesis that CD133 has a significant function in plasma

membrane organization [14,59,60]. The role of CD133 was suggested by the generation of apical membrane protrusions from epithelial cells and notably in the release of extracellular membrane particles, which themselves carry CD133 [16,61,62]. By further establishing, to our knowledge for the first time, a role for CD133 in endocytosis, importantly the present study extends the functionality of CD133 at the plasma membrane interface. Thus, the quantitative effects of CD133 on Tf endocytosis, as well as on LNC, can be mainly ascribed to the clathrin pathway, which is the main Tf-internalization pathway within Caco-2 cells [33]. This assertion was also corroborated by the absence of effect of CD133 knockdown on the uptake of Dx and CTB that are usually internalized through fluid phase and caveolae dependent endocytosis, respectively [33]. Hence, CD133-dependent up regulation of Tf uptake after cholesterol extraction (MbCD treatment) supported the hypothesis that CD133, at least partially, inhibits Tf endocytosis via a cholesterol dependent mechanism. Accordingly, cholesterol extraction either up regulates Tf uptake via an unknown compensatory mechanism or alternatively, reduces constitutive extracellular Tf recycling. It has previously been established that acute cholesterol extraction can increase the number of TfR on the cell surface [41,63], thus explaining relatively higher Tf entry to the cell, notably in the inhibitory CD133^{high} situation. Also, absence of a differential effect of filipin treatment depending on CD133 expression emphasized the fact that cholesterol extraction (MbCD treatment) has different effects than cholesterol sequestration (filipin treatment) on pinocytic pathways. However, since the influence of CD133 on Tf endocytosis involved the clathrin pathway and cellular cholesterol, an interaction of the CD133 molecule with the TfR, whatever the endocytic pathway involved, cannot be excluded. Hence, the effect of the AC133 antibody on Tf endocytosis may either support steric shielding affecting the binding of Tf to its receptor or, instead, signaling through the CD133 molecule that affects Tf-TfR uptake. The dramatic up regulation of the TfR expression at the plasma membrane of Caco-2 cells when CD133 was concomitantly down regulated validated such interaction between CD133 and the TfR. Among signaling pathways, a previous work demonstrated CD133 phosphorylation of the cytoplasmic domain by Src and Fyn tyrosine kinases [5]. Whether the presence of the AC133 epitope in the CD133 extracellular domain and binding to an as yet unidentified ligand influences CD133 phosphorylation and resulting signaling remains a major question. CD133 may thus modulate Tf uptake through direct inhibitory effects on TfR or on the structure of TfR microdomains. Moreover, alteration of ongoing mechanisms that promote Tf-TfR turnover may be involved: for instance, insulin stimulated redistribution of TfR to the plasma membrane [64], hemochromatosis protein co-trafficked with the TfR to the cell surface [65] and PI3kinase-mTOR regulated the number of TfR per endocytic vesicle [66]. Alternatively, as CD133 is a glycosylated molecule, glycosylation could be important for the regulation of Tf binding to the cell surface and likely in iron metabolism [67].

Supporting the aerobic glycolysis of cancer cells first reported by Otto Warburg in the 1950s [68], it was recently established that CD133 expression is associated with high cellular glucose metabolism: CD133 was found to be a glucose responsive gene in L6 myotubes [11] and CD133 expression to be concomitant to high glucose cellular uptake in U251 glioma cells [12]. Since colocalization of glucose transporters with the TfR in intracellular vesicles has previously been observed [69,70,71], whether CD133 can regulate iron uptake together with glucose transport by

modulation of endocytosis remains an important question. The combined sequestration of TfR and glucose transporter at the plasma membrane would be expected to result in low iron levels combined with high glucose intracellular levels. As iron-sulfur cluster assembly [72] is an important process for mitochondria activity, inhibition of a respiratory phenotype may well fit with the appearance of a glycolytic one [73]. Having established here that CD133 knockdown up regulated holo-Tf uptake and that iron supplementation and deprivation down regulated CD133 expression, a role for CD133 as an integrator of iron metabolism, with CD133 and TfR being jointly modulated [48], is suspected. In line with this hypothesis, direct effects on putative IREs may be involved in the regulation of CD133 expression by iron. Considering homology but also a degree of variability among IREs, as for instance between TfR 39RE [48] and APP 59RE [58] (Figure 6), the stem loop sequence we selected for possible CD133 39RE (Figure 6) remained to be either validated or rejected. Alternatively, indirect regulation of CD133 expression may be implicated. As an illustration of the latter, also supported by our experiments using DFO and CoCl_2 , oxygen sensing [74,75] and mTOR [76] have been shown to regulate CD133 expression via activation of the HIF-1 α transcription factor. Since iron treatment can in turn modulate HIF-1 α activity [77,78,79], iron induced destabilization of HIF-1 α may also explain down regulation of CD133 expression in non-hypoxic conditions [80].

Consequences for cancer cell behavior and for detoxification status

It has previously been established that the AC133 epitope is lost during Caco-2 cell differentiation but not the CD133 protein [60]. In addition, differentiation of Caco-2 cells up regulates genes implicated in iron transport and metabolism, including ferroportin, Tf and TfR [81]. Thus, whether causative or not, improved iron metabolism appears to be correlated with the differentiation status of Caco-2 cells. Whether iron regulation of AC133 expression is a basic signal for differentiation or/and for cancer

cell recruitment to a secondary phenotype is of pivotal interest. Also, several extrinsic signaling molecules have already been linked to the loss of expression of AC133 associated with differentiation, notably in brain tumor stem cells with BMP-4 [82], retinoic acid [83] or oxygen [74,75]. Our identification of a role for CD133/AC133 in inhibiting endocytosis points to another consequence of cellular cross-talk between cancer cells and their microenvironment, or of cancer stem cells and the stem cell niche, that is a finest control of extrinsic signals. Indeed, corruption of the niche as well as the exclusion of toxic metabolites and xenobiotics appears to be an important mechanism to define the status of cancer stem cells, with the occurrence of side population cells that express specific efflux transporters [84]. Hence, a fine control of iron accumulation might prevent the generation of deleterious reactive oxygen species via iron catalyzed Fenton chemistry [46], with a possibly impact on iron-induced carcinogenesis [85] and on degenerative diseases [86,87]. Since a major phenotype for CD133 loss was disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration [7] and since iron toxicity can trigger retinal degeneration [88], the present work emphasized the need for further exploration of the newly revealed CD133-Tf-iron network.

Acknowledgments

We are grateful to the Service Commun de Cytochimie d'Analyses Nudéotidiques, SCCAN, Angers, France. We also thank Clovis Bondu and Marion Hingant for skillful technical support and Laetitia Fouasson (LEGTA, Le Fresnoy, Angers, France) for insightful discussion during the course of this study.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EG EBG. Performed the experiments: EBG AG EG. Analyzed the data: EBG AG EG. Contributed reagents/materials/analysis tools: JPB EG. Wrote the paper: EBG EG. Obtained funding sources: EG JPB. Provided administrative support: EG JPB. Gave final approval: EG JPB.

References

- Corbeil D, Roper K, Weigmann A, Huttner WB (1998) AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 91: 2625–2626.
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, et al. (1997) A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90: 5013–5021.
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB (1997) Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12425–12430.
- Shmelkov SV, Jun L, St Clair R, McGarrigle D, Derderian CA, et al. (2004) Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood* 103: 2055–2061.
- Boivin D, Labbe D, Fontaine N, Lamy S, Beaulieu E, et al. (2009) The stem cell marker CD133 (prominin-1) is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine-828 and tyrosine-852 by Src and Fyn tyrosine kinases. *Biochemistry* 48: 3998–4007.
- Maw MA, Corbeil D, Koch J, Hellwig A, Wilson-Wheeler JC, et al. (2000) A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum Mol Genet* 9: 27–34.
- Zachigna S, Oh H, Wilsch-Brauninger M, Missol-Kolka E, Jaszai J, et al. (2009) Loss of the cholesterol-binding protein prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration. *J Neurosci* 29: 2297–2308.
- King FW, Ritner C, Liszewski W, Kwan HC, Pedersen A, et al. (2009) Subpopulations of human embryonic stem cells with distinct tissue-specific fates can be selected from pluripotent cultures. *Stem Cells Dev* 18: 1441–1450.
- Ferrandina G, Petrillo M, Bonanno G, Scambia G (2009) Targeting CD133 antigen in cancer. *Expert Opin Ther Targets* 13: 823–837.
- Wu Y, Wu PY (2009) CD133 as a marker for cancer stem cells: progress and concerns. *Stem Cells Dev* 18: 1127–1134.
- Yang C, Yang Y, Gupta N, Liu X, He A, et al. (2007) Pentaspan membrane glycoprotein, prominin-1, is involved in glucose metabolism and cytoskeleton alteration. *Biochemistry (Mosc)* 72: 854–862.
- Griguer CE, Oliva CR, Gobin E, Marcocelles P, Benos DJ, et al. (2008) CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PLoS ONE* 3: e3655.
- Corbeil D, Roper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB (2001) Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic* 2: 82–91.
- Roper K, Corbeil D, Huttner WB (2000) Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nat Cell Biol* 2: 582–592.
- Taleb N, Maresca M, Guo XJ, Garmy N, Fantini J, et al. (2009) The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif. *Cancer Lett* 278: 164–173.
- Marzeco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, et al. (2005) Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* 118: 2849–2858.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, et al. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673–682.
- Singh RD, Marks DL, Holicky EL, Wheatley CL, Kaptzan T, et al. (2010) Gangliosides and beta1-integrin are required for caveolae and membrane domains. *Traffic* 11: 348–360.
- Garcion E, Lamprecht A, Haurault B, Paillard A, Aubert-Pouessel A, et al. (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther* 5: 1710–1722.
- Paillard A, Hindre F, Vignes-Colombeix C, Benoit JP, Garcion E (2010) The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials* 31: 7542–7554.
- Roger E, Lagarde F, Garcion E, Benoit JP (2009) Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J Control Release* 140: 174–181.
- Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG (1993) Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123: 1107–1117.

23. Orlandi PA, Fishman PH (1998) Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* 141: 905–915.
24. Liu NQ, Losinsky AS, Popik W, Li X, Gujuluva C, et al. (2002) Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* 76: 6689–6700.
25. Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 186: 17–22.
26. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, et al. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10: 961–974.
27. Zhang Z, Wei T, Hou J, Li G, Yu S, et al. (2003) Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid. *Eur J Pharmacol* 467: 41–47.
28. Zhu L, Glahn RP, Yeung CK, Miller DD (2006) Iron uptake by Caco-2 cells from NaFeEDTA and FeSO₄: Effects of ascorbic acid, pH, and a Fe(II) chelating agent. *J Agric Food Chem* 54: 7924–7928.
29. Mole DR (2010) Iron homeostasis and its interaction with prolyl hydroxylases. *Antioxid Redox Signal* 12: 445–458.
30. Woo KJ, Lee TJ, Park JW, Kwon TK (2006) Desferrioxamine, an iron chelator, enhances HIF-1alpha accumulation via cyclooxygenase-2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 8–14.
31. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE (2003) Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* 278: 15911–15916.
32. Campillos M, Cases I, Hentze MW, Sanchez M (2010) SIREs: searching for iron-responsive elements. *Nucleic Acids Res* 38: W360–367.
33. Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37–44.
34. Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K (2002) Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev* 54: 561–587.
35. Yang Z, Vadlamudi RK, Kumar R (2005) Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis. *J Biol Chem* 280: 654–659.
36. Torgersen ML, Skretting G, van Deurs B, Sandvig K (2001) Internalization of cholera toxin by different endocytic mechanisms. *J Cell Sci* 114: 3737–3747.
37. Liu AP, Aguet F, Danuser G, Schmid SL (2010) Local clustering of transferrin receptors promotes clathrin-coated pit initiation. *J Cell Biol* 191: 1381–1393.
38. Chang J, Jallouli Y, Kroubi M, Yuan XB, Feng W, et al. (2009) Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. *Int J Pharm* 379: 285–292.
39. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, et al. (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 138: 877–889.
40. Nabi IR, Le PU (2003) Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 161: 673–677.
41. Subtil A, Gaidarov I, Kobylarz K, Lampson MA, Keen JH, et al. (1999) Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6775–6780.
42. Gardon E, Faissner A, French-Constant C (2001) Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128: 2485–2496.
43. Kemper K, Sprick MR, de Bree M, Scopelliti A, Vermeulen L, et al. (2010) The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res* 70: 719–729.
44. Inman RS, Westling-Resnick M (1993) Characterization of transferrin-independent iron transport in K562 cells. Unique properties provide evidence for multiple pathways of iron uptake. *J Biol Chem* 268: 8521–8528.
45. Richardson DR, Ponka P (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 1331: 1–40.
46. Hentze MW, Kuhn LC (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8175–8182.
47. Piccinelli P, Samuelsson T (2007) Evolution of the iron-responsive element. *RNA* 13: 952–966.
48. Theil EC (1994) Iron regulatory elements (IREs): a family of mRNA non-coding sequences. *Biochem J* 304 (Pt 1): 1–11.
49. Hentze MW, Rouault TA, Caughman SW, Dancis A, Harford JB, et al. (1987) A cis-acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6730–6734.
50. Erlitzki R, Long JC, Theil EC (2002) Multiple, conserved iron-responsive elements in the 3' untranslated region of transferrin receptor mRNA enhance binding of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem* 277: 42579–42587.
51. Jacotot S, Ferec C, Mura C (2008) Iron responses in hepatic, intestinal and macrophage/monocyte cell lines under different culture conditions. *Blood Cells Mol Dis* 41: 100–108.
52. Teichmann R, Stremmel W (1990) Iron uptake by human upper small intestine microvillous membrane vesicles. Indication for a facilitated transport mechanism mediated by a membrane iron-binding protein. *J Clin Invest* 86: 2145–2153.
53. He WL, Feng Y, Li XL, Wei YY, Yang XE (2008) Availability and toxicity of Fe(II) and Fe(III) in Caco-2 cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 707–712.
54. Cmejla R, Petrak J, Cmejlova J (2006) A novel iron responsive element in the 3'UTR of human MRCK alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 158–166.
55. Martini LA, Tchack L, Wood RJ (2002) Iron treatment downregulates DMT1 and IREG1 mRNA expression in Caco-2 cells. *J Nutr* 132: 693–696.
56. Sanchez M, Galy B, Muckenthaler MU, Hentze MW (2007) Iron-regulatory proteins limit hypoxia-inducible factor-2alpha expression in iron deficiency. *Nat Struct Mol Biol* 14: 420–426.
57. Lin E, Graziano JH, Freyer GA (2001) Regulation of the 75-kDa subunit of mitochondrial complex I by iron. *J Biol Chem* 276: 27685–27692.
58. Cho HH, Cahill CM, Vanderburg CR, Scherzer CR, Wang B, et al. (2010) Selective translational control of the Alzheimer amyloid precursor protein transcript by iron regulatory protein-1. *J Biol Chem* 285: 31217–31232.
59. Giebel B, Corbell D, Beckmann J, Hohn J, Freund D, et al. (2004) Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 104: 2332–2338.
60. Corbell D, Roper K, Helwig A, Tavian M, Miraglia S, et al. (2000) The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 275: 5512–5520.
61. Corbell D, Marzocco AM, Wilsch-Brauninger M, Huttner WB (2010) The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Lett* 584: 1659–1664.
62. Huttner HB, Janich P, Kohrmann M, Jaszi J, Siebzehnrbil F, et al. (2008) The stem cell marker prominin-1/CD133 on membrane particles in human cerebrospinal fluid offers novel approaches for studying central nervous system disease. *Stem Cells* 26: 698–705.
63. Nunez MT, Glass J (1982) Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. *Biochemistry* 21: 4139–4143.
64. Davis RJ, Corvera S, Czech MP (1986) Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J Biol Chem* 261: 8708–8711.
65. Enns CA (2001) Pumping iron: the strange partnership of the hemochromatosis protein, a class I MHC homolog, with the transferrin receptor. *Traffic* 2: 167–174.
66. Galvez T, Teruel MN, Heo WD, Jones JT, Kim ML, et al. (2007) siRNA screen of the human signaling proteome identifies the PtdIns(3,4,5)P3-mTOR signaling pathway as a primary regulator of transferrin uptake. *Genome Biol* 8: R142.
67. Bhatt L, Murphy C, O'Driscoll LS, Carmo-Fonseca M, McCaffrey MW, et al. (2010) N-glycosylation is important for the correct intracellular localization of HFE and its ability to decrease cell surface transferrin binding. *FEBS J* 277: 3219–3234.
68. Warburg O (1956) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124: 269–270.
69. Antonescu CN, Diaz M, Femia G, Planas JV, Klip A (2008) Clathrin-dependent and independent endocytosis of glucose transporter 4 (GLUT4) in myoblasts regulation by mitochondrial uncoupling. *Traffic* 9: 1173–1190.
70. Tanner LI, Lienhard GE (1989) Localization of transferrin receptors and insulin-like growth factor II receptors in vesicles from 3T3-L1 adipocytes that contain intracellular glucose transporters. *J Cell Biol* 108: 1537–1545.
71. Livingstone C, James DE, Rice JE, Hanpeter D, Gould GW (1996) Compartment ablation analysis of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 315 (Pt 2): 487–495.
72. Stehling O, Sheftel AD, Lill R (2009) Chapter 12 Controlled expression of iron-sulfur cluster assembly components for respiratory chain complexes in mammalian cells. *Methods Enzymol* 456: 209–231.
73. Alirio E, Martinou JC (2006) Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? *Oncogene* 25: 4706–4716.
74. Platet N, Liu SY, Atifi ME, Oliver L, Vallette FM, et al. (2007) Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett* 258: 286–290.
75. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, et al. (2009) Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* 28: 3949–3959.
76. Matsumoto K, Arai T, Tanaka K, Kaneda H, Kudo K, et al. (2009) mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res* 69: 7160–7164.
77. Eckard J, Dai J, Wu J, Jan J, Yang Q, et al. (2010) Effects of cellular iron deficiency on the formation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Iron deficiency and angiogenesis. *Cancer Cell Int* 10: 28.
78. Knowles HJ, Mole DR, Ratcliffe PJ, Harris AL (2006) Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulation of the labile iron pool in differentiating U937 macrophages: effect of natural resistance-associated macrophage protein 1. *Cancer Res* 66: 2600–2607.
79. Guzy RD, Hoyos B, Robin E, Chen H, Liu L, et al. (2005) Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1: 401–408.
80. Dery MA, Michaud MD, Richard DE (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 535–540.

81. Bedrine-Ferran H, Le Meur N, Gicquel I, Le Cunff M, Soriano N, et al. (2004) Transcriptome variations in human CaCo-2 cells: a model for enterocyte differentiation and its link to iron absorption. *Genomics* 83: 772–789.
82. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, et al. (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444: 761–765.
83. Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, et al. (2010) Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res* 16: 2715–2728.
84. Kondo T, Setoguchi T, Taga T (2004) Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 781–786.
85. Toyokuni S (1996) Iron-induced carcinogenesis: the role of redox regulation. *Free Radic Biol Med* 20: 553–566.
86. Mastroberardino PG, Hoffman EK, Horowitz MP, Betarbet R, Taylor G, et al. (2009) A novel transferrin/ TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 34: 417–431.
87. Jiang D, Li X, Williams R, Patel S, Men L, et al. (2009) Ternary complexes of iron, amyloid-beta, and nitrilotriacetic acid: binding affinities, redox properties, and relevance to iron-induced oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochemistry* 48: 7939–7947.
88. He X, Hahn P, Iacovelli J, Wong R, King C, et al. (2007) Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 26: 649–673.



Ce travail a permis de mettre en évidence une fonction d'AC133/1-CD133 dans l'accumulation intracellulaire de composés extracellulaires, avec un effet majeur dans l'inhibition de l'endocytose de transferrine. La transferrine est une β -globuline transporteur de fer et l'holo-transferrine est internalisée par les cellules par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant impliquant majoritairement la voie des clathrines (Conner and Schmid 2003). Après routage dans les endosomes, le fer est libéré des endolysosomes par le transporteur DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) puis les vésicules sont recyclées vers la membrane plasmique permettant la libération de l'apo-transferrine.

La régulation négative de CD133 améliore l'accessibilité au récepteur de la transferrine, CD71. La transferrine étant impliquée dans l'approvisionnement des cellules en fer, les effets de la supplémentation (par l'utilisation d'acide nitrilotriacétique ferrique FeNTA et du sulfate de fer (II) FeSO_4) et de la déplétion en fer (par l'utilisation de la desferrioxamine DFO et du chlorure de cobalt (II) CoCl_2) sur l'expression d'AC133/1-CD133 ont par la suite été investigués. Ce travail démontre, réciproquement, que la supplémentation ou la déplétion en fer régule l'expression d'AC133/1-CD133. Cette régulation pourrait être liée à la coexistence d'au moins deux mécanismes pouvant impliquer des protéines dont l'activité est liée au fer : les « iron responsive proteins » et les prolyl-hydroxylases. En effet, le fer est impliqué dans la dégradation de HIF-1 α (Carroll and Ashcroft 2005), il se pourrait donc que le fer régule l'expression d'AC133/1 par le biais d'HIF-1 α . Le fer, en présence d'eau oxygénée, peut également produire des espèces oxygénées réactives, lors de la réaction de Fenton.

Les premières études menées sur la fonction de la protéine CD133 ont démontré l'implication de cette protéine dans les dégénérescences rétinienne congénitales (Maw *et al.* 2000; Zacchigna *et al.* 2009). En effet, une augmentation du taux de fer dans la rétine chez des patients atteints de dégénérescence maculaire, entraîne des dégradations des protéines, des lipides et de l'ADN par la création d'espèces réactives oxygénées (Blasiak *et al.* 2009). De ce fait, l'implication de la protéine CD133 dans les métabolismes du fer pourrait être liée aux dégénérescences rétinienne.

Ce travail met en évidence un partenariat entre la protéine CD133, le récepteur de la transferrine et le fer, dans lequel CD133 apparaît comme un intégrateur membranaire régulant le métabolisme du fer, la protéine CD133 n'est donc pas seulement décorative. Lors de ce travail, les données ont été établies dans un premier temps dans le modèle cellulaire Caco-2.

Ces résultats sont corroborés dans une primo-culture de GBM, cultivée à 3% d'O₂ (pression partielle en oxygène où l'expression d'AC133/1 est la plus importante). La DFO, le FeNTA ainsi que le FeSO₄ down-régulent l'expression d'AC133/1-CD133 (**Figure 25**).

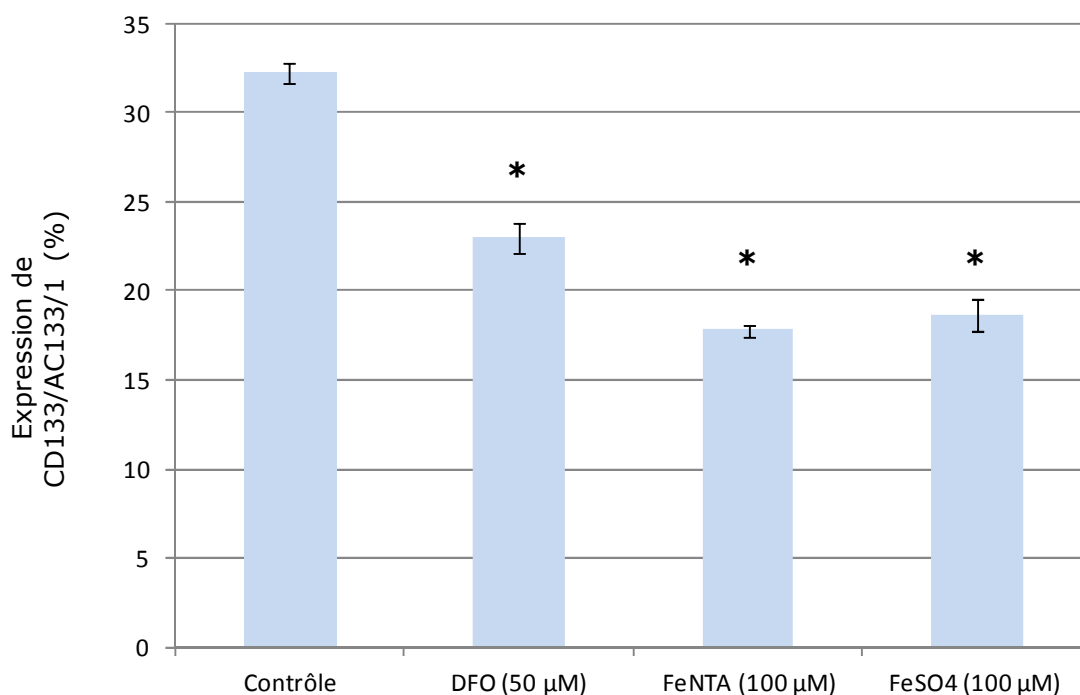


Figure 25 : Effets de modulateurs du fer sur l'expression de CD133 dans une primo-culture de GBM cultivée à 3% d'O₂, Test de Dunnett : * p<0.001, comparaison avec le contrôle

2. Un nouveau marqueur de radiorésistance : les microARN ?

Parmi les molécules biologiques présentes au sein des CCTS lors de la mise en place des réponses cellulaires à la radiothérapie, les miARN pourraient exercer un rôle de témoins d'irradiation et/ou de régulateurs mécanistiques influençant la radiorésistance. Diverses études suggèrent déjà que les miARN sont des modulateurs importants de l'adaptation des CCTS dans le microenvironnement tumoral. D'une part, leur implication dans les réponses à l'hypoxie (Chen *et al.* 2010) et dans l'angiogénèse (Wurdinger and Tannous 2009) est avérée. D'autre part, des rôles des miARN dans le contrôle du comportement des cellules souches (Mallanna and Rizzino 2010) et plus particulièrement des CCTS (DeSano and Xu 2009) ont été identifiés. La résistance des gliomes et plus particulièrement des CCTS à la condition environnementale « radiothérapie » (Bao *et al.* 2006) montre l'intérêt de comprendre le développement des GBM et le comportement des CCTS au regard de l'expression des miARN en réponse à la radiothérapie.

Des études récentes ont mis en évidence un lien entre les irradiations et l'expression de miARN au sein de différents cancers (poumon, prostate, carcinome, glioblastome, pancréas) (Chaudhry *et al.* 2010; Josson *et al.* 2008; Shin *et al.* 2009; Shin *et al.* 2009; Wang *et al.* 2013; Wang *et al.* 2011; Wei *et al.* 2013) mais également dans des cellules non cancéreuses (cellules thyroïdiennes, cellules endothéliales, fibroblastes, lymphoblastes) (Cha *et al.* 2009; Cha *et al.* 2009; Nikiforova *et al.* 2011; Simone *et al.* 2009; Wagner-Ecker *et al.* 2011). A l'heure actuelle, aucune étude concernant l'implication des radiations ionisantes sur l'expression de miARN n'a été démontré dans des cellules primaires de GBM. En effet, il est quasi impossible de récupérer des prélèvements issus de patients ayant subi des irradiations.

2.1. Établissement d'une collection de CCTS de glioblastome

C'est pourquoi, une collection de CCTS a été réalisée à partir d'exérèse de GBM de patients du CHU d'Angers et du CHU de Poitiers. Après récupération des prélèvements d'exérèse de patients, les cellules sont cultivées sous forme de neurosphères flottantes dans un milieu permettant la sélection des CCTS (milieu contenant de l'EGF, du bFGF, de l'héparine ainsi que des additifs nécessaires B27 et N2). Ces cellules sont également soumises à deux pressions partielles en oxygène : 21 et 3% d'O₂. Pour s'assurer que nos cellules sont bien des CCTS, différents tests *in vitro* et *in vivo* sont en amont investigués. Les cellules sont caractérisées au niveau de leur expansion clonale sous forme de sphéroïdes, l'expression de marqueurs associés aux CCTS (CD133, CXCR4, Nestine, Sox2, Oct4), leur capacité à exprimer après déplétion en facteur de croissance des marqueurs de

différenciations neurales est également étudiée (GFAP, β -3-tubuline, O₄) ainsi que leur capacité à former des tumeurs chez la souris immunodéprimée (**Figure 26**).

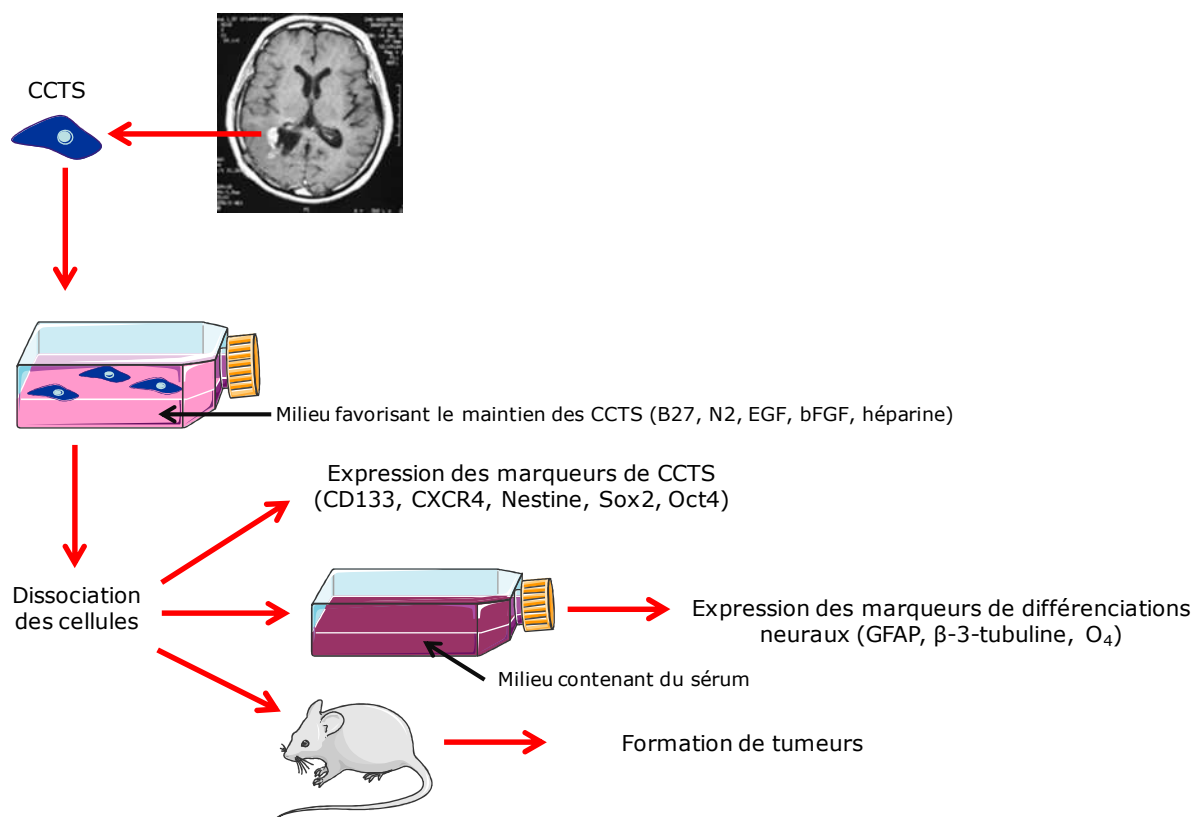


Figure 26 : Mise en culture et caractérisation des CCTS de GBM

Notre collection de CCTS de GBM est constituée de 12 patients, et les cellules issues de l'exérèse de chaque patient sont cultivées aux deux pO₂ précédemment décrites. Pour étudier l'impact de la radiothérapie sur l'expression des miARN, deux types de radiothérapie ont été investigués : la radiothérapie externe et la radiothérapie interne. Pour pouvoir comparer l'effet de la radiothérapie sur l'expression des miARN, des échantillons des patients ne subiront aucune radiothérapie, ce qui permettra d'avoir le niveau 'basal' des miARN. Cette analyse a pour but de déterminer des profils d'expression de miARN en réponse à des traitements radio-thérapeutiques (externes et internes) *in vitro*.

2.2. Exposition des cellules à deux types de radiations

2.2.1. Radiothérapie externe : Rayons X

Les cellules sont par la suite exposées à deux types de radiations. Il y a, d'une part, la radiothérapie externe qui consiste à l'émission d'un faisceau de rayons créé par un accélérateur de particules. Les irradiations externes des cellules, réalisées à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest d'Angers et au CHU de Poitiers, nécessite l'utilisation d'un accélérateur linéaire Clinac® 2100C/D. Une seule dose, 4 Gray, a été initialement choisie pour ne pas multiplier les conditions. Après cette irradiation, les cellules ont été récupérées à deux temps : un temps précoce, 4 heures, et un temps un peu plus tardif, 24 heures.

2.2.2. Radiothérapie interne : Nanocapsules lipidiques de Rhénium 188 (^{188}Re -NCLs)

Le deuxième type de radiothérapie est la radiothérapie interne qui va utiliser des nano-objets de ^{188}Re -NCLs, formulation qui est déjà au point au sein de notre unité (Vanpouille-Box *et al.* 2011). Le principe de formulation des ^{188}Re -NCLs consiste à l'encapsulation au cœur de la NCL d'un radio-pharmaceutique. Pour pouvoir réaliser l'encapsulation, une première étape est nécessaire pour permettre l'obtention d'un complexe lipophile [$^{188}\text{Re}(\text{PhCS}_3)_2(\text{PhCS}_2)$]. Ce complexe est réalisé en deux étapes, la première consiste à l'ajout de sodium gluconate au ^{188}Re -perrhenate ($^{188}\text{ReO}_4^-$), cet intermédiaire [$^{188}\text{ReO}(\text{gluc})_2^-$] est par la suite chélaté par un ligand labile, le dithiobenzoate de sodium (PhCS_2H). Le complexe est par la suite ajouté aux autres composants des NCLs et les cycles de chauffage/refroidissement sont par la suite réalisés comme pour une formulation classique (décrit précédemment dans l'introduction). Ces ^{188}Re -NCLs ont été mis en contact avec les cellules pendant 2 heures à la concentration de 200 $\mu\text{g/mL}$ soit une activité de 540 kBq/mL. Les cellules ont été récupérées 3 heures et 23 heures, après les 2 heures d'incubation avec les ^{188}Re -NCLs.

2.3. Extractions des miARN

Les extractions des ARN totaux de chaque échantillon ont été réalisées à l'aide du kit «mirVana™ miRNA Isolation Kit». Les extractions se réalisent de la manière suivante : les cellules sont tout d'abord lavées avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) puis lysées à l'aide de deux solutions. Une extraction organique avec de l'acide phénol/ chloroforme est ensuite réalisée. La phase aqueuse est ensuite déposée sur un filtre qui est par la suite lavé avec différentes solutions. Pour finir, une élution est réalisée grâce à une solution d'élution.

2.4. Analyse des données

L'analyse des données est ensuite réalisée par la plate-forme Génomique Santé de Biogenouest par l'UMR CNRS 6061 de Rennes. Seuls les ARN de bonne qualité, c'est-à-dire avec une concentration comprise entre 50 et 100 ng/μL, un ratio 260/230 > 1,8 et un RIN > 7 (RNA Integrity Number) seront analysés sur puces «Agilent Human miRNA 8x60K». Ces lames contiennent des miARN humains et viraux issus de la base de données de miRBase 16.0 (Sanger). L'ARN total de chaque échantillon sera marqué et hybridé selon les recommandations du fabricant, puis les données d'expression brutes seront obtenues après lecture des lames et la quantification des signaux se fera par le logiciel Feature Extraction (Agilent). Les données brutes seront par la suite normalisées à l'aide du logiciel GeneSpring GX (Agilent) afin de prendre en compte la variabilité intra-lame et la variabilité inter-lame. Les données seront filtrées afin d'éliminer les mesures de moindre qualité ou de faible répétabilité et de limiter le nombre de données manquantes. Chaque 'patient' à une pO₂ donnée possède cinq échantillons : non traité, 4 Gy-4 heures, 4 Gy-24 heures, ¹⁸⁸Re-NCLs-3 heures, ¹⁸⁸Re-NCLs-23 heures (**Tableau 3**). Des tests de comparaison de moyennes pour données appariées (test t de Student ou test de Wilcoxon) seront utilisés pour identifier les miARN dont l'expression est modifiée par la radiothérapie interne ou externe et d'évaluer l'impact de l'environnement oxique sur la modulation par la radiothérapie de l'expression des miARN. La prise en compte de la multiplicité des tests sera assurée par le contrôle du FDR (False Discovery Rate, méthode de Benjamini-Hochberg).

Patients	Nombre d'échantillons
3% O ₂	n = 12
3% O ₂ 4 Gy-4 heures	n = 12
3% O ₂ 4 Gy-24 heures	n = 12
3% O ₂ ¹⁸⁸ Re-NCLs-3 heures	n = 12
3% O ₂ ¹⁸⁸ Re-NCLs-23 heures	n = 12
21% O ₂	n = 12
21% O ₂ 4 Gy-4 heures	n = 12
21% O ₂ 4 Gy-24 heures	n = 12
21% O ₂ ¹⁸⁸ Re-NCLs-3 heures	n = 12
21% O ₂ ¹⁸⁸ Re-NCLs-23 heures	n = 12

Tableau 3 : Récapitulatif des différents échantillons

Les résultats de cette étude doivent permettre de mettre en évidence, les miARN exprimés en réponse aux radiations (**Figure 27**).

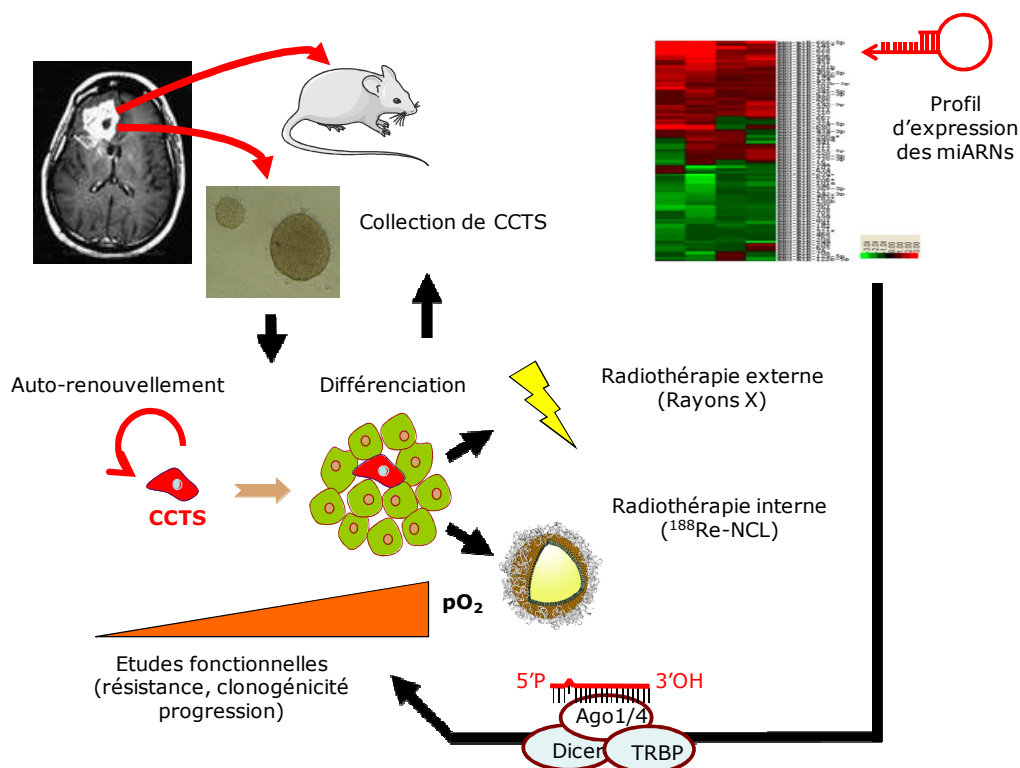


Figure 27 : Schéma représentant le travail sur la mise en évidence de miARN impliqués dans la radorésistance

La valorisation du travail devrait pouvoir s'exprimer rapidement de deux façons : par la valorisation scientifique et par la valorisation industrielle. Au moins une publication Angers-Poitiers-Rennes sur la régulation de miARN par les radiothérapies doit émerger avec un comparatif entre radiothérapies interne/externe et normoxie/hypoxie. La possibilité de définir une base pronostique ou théranostique en revenant sur la clinique des patients traités par radiothérapie et le profil des miARN répondant à la radiothérapie *in vitro* peut aussi aboutir au dépôt de brevets basé sur l'expression de miARN spécifiques ou sur des variations de ratio d'un miARN par rapport à un autre (constituant des facteurs prédictifs ou influençant le choix d'une thérapie). A noter que dans les modèles animaux, la radiothérapie interne vectorisée s'est montrée supérieurement bénéfique à la radiothérapie externe. Un impact direct sur des miARN à ce niveau pourrait avoir une signification particulière.

Notre étude serait un complément d'une étude réalisée à Grenoble, qui s'est intéressée à identifier les niveaux d'expression de 282 miARN dans des oligodendrogliomes,

des GBM et des tissus cérébraux sains. Cette étude a mis en évidence que 26 miARN étaient dérégulés au sein de ces pathologies (Lages *et al.* 2011).

Des études concernant l'impact des miARN et de la radiothérapie au sein de certains cancers ont déjà été réalisées. De nombreuses études ont été investiguées sur les miARN en réponse à la radiothérapie dans les cancers du poumon à petites cellules. Une étude a été réalisée sur 30 patients atteints d'un cancer du poumon à petites cellules, certains étant sensibles et d'autres résistants au traitement par radiothérapie. Cette étude a révélée la surexpression, par l'induction de la radiothérapie, de miR-126 qui inhibe la croissance tumorale des cellules et induit l'apoptose cellulaire (Wang *et al.* 2011). MiR-9 et let-7g pourraient quant à eux améliorer l'efficacité de la radiothérapie dans ce cancer (Arora *et al.* 2011), tout comme miR-34b (Balca-Silva *et al.* 2012). Un autre miARN, miR-214, a été mis en évidence comme modulant la réponse à la radiothérapie (Salim *et al.* 2012). Plus récemment, c'est l'expression de miR-210 qui a été décrite comme étant augmentée suite à la radiothérapie (Grosso *et al.* 2013).

Dans les cancers humains gastriques, ce sont miR-221 et miR-222 qui ont été mis en évidence comme des régulateurs positifs de la radiosensibilité (Chun-Zhi *et al.* 2010). MiR-302 est quant à lui sous-régulé dans les cellules cancéreuses du sein irradiées (Liang *et al.* 2012).

Notre travail est donc axé sur le même genre d'étude dans le GBM, pour permettre de mettre en évidence les miARN répondent à la radiothérapie pour pouvoir par la suite agir dessus.

CHAPITRE II

Chapitre II : Développement de nanomédecine permettant le ciblage d'AC133/1 et de miARN

1. Immunonanociblage de l'épitope AC133/1

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que l'expression d'AC133/1 était un signe de mauvais pronostic d'évolution de la tumeur dans nos modèles. De ce fait, le ciblage de l'épitope AC133/1 par l'utilisation des nanomédecines, peut être une stratégie thérapeutique intéressante dans le cas des GBM.

La possibilité de cibler des cellules dans le cerveau de rat, a dans un premier temps été testé avec des anticorps OX26 couplés à des liposomes contenant un agent antinéoplasique, la daunomycine. L'anticorps a dans un premier temps était thiolé, puis greffé à des liposomes pegylés. L'utilisation de ces immunoliposomes a permis d'augmenter l'action du médicament (Huwyler *et al.* 1996). Par la suite, la surface des nanocapsules lipidiques (NCLs) a été modifiée par greffage du même anticorps (Beduneau *et al.* 2008). Cette étude consistait à post-insérer dans la coque de la NCL, un polymère bifonctionnel, le DSPE-PEG-maléimide (Perrier *et al.* 2010) couplé à des anticorps thiolés. Dans ce cas, la méthode de thiolation, c'est-à-dire l'ajout d'une fonction thiol sur les fonctions hydroxyles libres des sucres des immunoglobulines, est réalisé grâce au 3-(2-Pyridyldithio)propionyl hydrazide (PDPH). Cette méthode est coûteuse puisque le DSPE-PEG-maléimide, utilisé en excès, est une molécule onéreuse ; de plus de nombreuses étapes de purification sont nécessaires tout au long de la synthèse.

Dans ce chapitre, des immuno-nanocapsules ont été synthétisées. Cette méthode de synthèse a été modifiée au niveau de l'étape de thiolation en utilisant le réactif de Traut qui réagit avec les amines primaires et produit un groupement sulfhydryle sur l'anticorps. Cette nouvelle méthode, utilisant moins de DSPE-PEG-maléimide, doit permettre l'obtention d'immuno-nanocapsules permettant de cibler les cellules exprimant l'épitope AC133/1 à leur surface. Ces immuno-nanocapsules ont été par la suite évaluées dans un modèle cellulaire d'adénocarcinome humain exprimant constitutivement AC133/1.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Development and characterization of immuno-nanocarriers targeting the cancer stem cell marker AC133

E. Bourseau-Guilmain^{a,b}, J. Béjaud^{a,b}, A. Griveau^{a,b}, N. Lautram^{a,b}, F. Hindré^{a,b}, M. Weyland^{a,b}, J.P. Benoit^{a,b}, E. Garcion^{a,b,*}^a INSERM, U646, F-49933 Angers, France^b LUNAM Université, Ingénierie de la Vectorisation Particulaire, F-49933 Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2011

Received in revised form 30 May 2011

Accepted 1 June 2011

Available online 12 June 2011

Keywords:

Nanoparticles

CD133

Specific targeting

Antibody

Lipid nanocapsules

Caco-2

Targeted therapies

Stem cells

ABSTRACT

In the context of targeted therapy, we addressed the possibility of developing a drug delivery nanocarrier capable to specifically reach cancer cells that express the most prominent marker associated with cancer stem cell (CSC) phenotype, AC133. For this purpose, 100 nm lipid nanocapsules (LNCs) were functionalized with a monoclonal antibody (mAb) directed against AC133 according to two distinct methods: firstly, post-insertion within 100 nm LNCs of a lipid poly(ethylene glycol) functionalized with reactive-sulphydryl maleimide groups (DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide) followed by thiolated mAb coupling, and, secondly, creation of a thiolated lipo-immunoglobulin between DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide and AC133, then post-inserted within LNCs. Due to the reduced number of purification steps, lower amounts of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide that were necessary as well as lower number of free maleimide functions present onto the surface of immuno-LNC, the second method was found to be more appropriate. Thus, 126 nm AC133-LNC with a zeta potential of −22 mV while keeping a narrow distribution were developed. Use of the IgG1κ isotype control-immunoglobulins produced similar control IgG1-LNCs. Micro-Bradford colorimetric assay indicated a fixation of about 40 immunoglobulins per LNC. Use of human Caco-2 cells that constitutively express AC133 (Caco-2-AC133^{high}) allowed addressing the behavior of the newly functionalized immuno-LNCs. siRNA knockdown strategy permitted to obtain Caco-2-AC133^{low} for comparison. Immunofluorescence-combined flow cytometry analysis demonstrated that the epitope-recognition function of AC133 antibody was preserved when present on immuno-LNCs. Although grafting of immunoglobulins onto the surface of LNCs repressed their internalization within Caco-2 cells as evaluated by flow cytometry, AC133-specific cellular binding was obtained with AC133-LNC as assessed by computer-assisted fluorescence microscopy. In conclusion, interest of AC133-LNCs as niche carriers is discussed toward the development of CSC targeted chemo- or radio-nanomedicines.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The cancer stem cell (CSC) model propose that cancer initiating cells capable to self-renew *ad infinitum* and to divide asymmetrically, thus expressing markers of differentiation, would be responsible of an evolutionary hierarchy among tumor cells (Visvader and Lindeman, 2008). Consequently, ongoing therapeutic strategies would preferentially target rapid dividing committed tumor cells that contribute to the tumor mass while neglecting rare slowly dividing CSCs capable to generate resistant clones. There-

fore, the recognized and characterized CSC gives further hope to tumor treatment.

Among intrinsic indicators that are susceptible to tag CSCs, AC133, a glycosylation-associated epitope of the pentaspan protein CD133/prominin-1, is the best documented (Corbeil et al., 1998; Miraglia et al., 1997). Thus, AC133 monoclonal antibody-based flow cytometry and magnetic cell sorting allowed the enrichment and isolation of CSCs from a large panel of tumor types that includes blood, brain, skin, prostate, lung, breast, liver and colon cancers (Ferrandina et al., 2009; Wu and Wu, 2009). Although the role of CD133 is largely unknown and remains to be elucidated, AC133 has been linked to aggressive phenotype and associated with poor clinical outcome, notably in gliomas (Zeppernick et al., 2008) and colorectal cancers (Horst et al., 2009). In addition, *in vitro* and *in vivo* studies established that AC133-positive CSC populations survive remarkably to beam radiation (Bao et al., 2006) and are particularly resistant to chemotherapy (Angelastro and Lame,

* Corresponding author at: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm U646, IBS – CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France. Tel.: +33 2 44 68 85 43; fax: +33 2 44 68 85 46.

E-mail address: emmanuel.garcion@univ-angers.fr (E. Garcion).

2010; Todaro et al., 2007). For those reasons, AC133-expressing CSCs located within the tumor bulk or, instead, hidden within the macroscopically normal tissue, represent significant targets to focus on.

The idea of targeted therapy, emerging from the concept of “magic bullet” proposed by Paul Ehrlich at the end of the 19th century (Winau et al., 2004), took all its significance from the work of Cesar Milstein and Georges Köhler in early 70s who developed the technique to produce monoclonal antibodies (mAbs) (Schrama et al., 2006). Although recognition can be obtained as well by use of various types of ligands, among which peptides or aptamers, mAbs are the most widely tested in the clinic, especially to block or neutralize specific molecular targets involved in cancer (Schrama et al., 2006). For instance, rituximab directed against CD20 is used within the context of lymphoma treatment (Schulz et al., 2007), trastuzumab (Herceptin®) against Her2/neu/ErbB2 within the context of breast cancer treatment (Morris and Carey, 2006), cetuximab/panitumumab against EGFR within the context of colorectal cancer treatment (Morrison et al., 2007) and bevacizumab (Avastin®) against VEGF within the context of glioblastoma treatment (Miletic et al., 2009). mAbs are also combined to radiopharmaceuticals for locoregional internal radiation therapy as exemplified within the context of glioblastoma treatment by use of ^{131}I -tenascin antibodies (Reardon et al., 2008) or ^{188}Re -nimotuzumab directed against the EGFR (Casaco et al., 2008). Alternatively, mAbs are conjugated to drug in order to make them capable to cross physiological barriers such as the blood-brain barrier as demonstrated for BDNF combined to a rat transferrin receptor mAbs (Pardridge et al., 1998) or for GDNF fusion protein combined to a human insulin receptor mAbs (Boado et al., 2008).

Recent advances in nanomedicines gave as well further resonance to targeted therapies (Peer et al., 2007). Anticancer drug combined to new nanocarriers could, indeed, present a better biodistribution profile with improved biological barrier crossing properties, leading to substantial clinical advantages including dose reduction, prevention of side effects and improvement of bioavailability within the targeted tumor cell (Peer et al., 2007). Moreover, nanoparticle combination to well define targeting agent including mAbs can greatly improve drug affinity and selectivity (Peer et al., 2007). In this context, lipid nanocapsules (LNCs) synthesized from FDA approved components through a phase-inversion process represent an alternative (Heurtault et al., 2002). With a size that can be adjusted from 20 to 100 nm with a narrow distribution, lipoprotein-like LNCs could indeed convey several anticancer drug within cancer cells among which paclitaxel (Garcion et al., 2006; Roger et al., 2009), etoposide (Lacoeuille et al., 2007) and radiopharmaceuticals (Allard et al., 2008). Their structure confer them specific skills such as multidrug resistance inhibition (Garcion et al., 2006; Roger et al., 2010), endo-lysosomal escape (Paillard et al., 2010) and capability to reach the mitochondria membrane (Weyland et al., 2011). In addition, by post-inserting a bifunctional polymer, the distearoylphosphatidylethanolamine-PEG₂₀₀₀-maleimide (DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide) in their shell to allow covalent coupling to protein thanks to creation of a thioether bond, LNCs can be functionalized and combined to thiolated proteins including monoclonal mAbs (Beduneau et al., 2007).

Thus, the objective of the present work was to develop a therapeutic drug delivery nanocarrier capable to recognize AC133-positive cells within tumors. Immuno-LNCs were synthesized by use of two distinct methods: firstly, post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide to LNCs followed by mAb coupling, and, secondly, creation of a lipo-immunoglobulin between DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide and AC133, then post-inserted within LNCs. The binding specificity of immuno-LNCs and their ability to be internalized within AC133-expressing cancer cells were evaluated on human colorectal adenocarcinoma Caco-2 cells.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture

MOPC-31C (IgG1κ producing cells) (CCL-130™) and AC133.1 hybridomas (HB-12346™) were obtained from ATCC (American Type Culture Collection) and LGC (Laboratory of the Government Chemist) standard (Molsheim, France). MOPC-31C and AC133.1 hybridomas were cultured in RPMI 1640 medium (Lonza, Verviers, Belgium) and DMEM 4.5 g/L glucose (Lonza), respectively, supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS; Lonza) and 1% antibiotics (10 units of penicillin, 10 mg of streptomycin, 25 µg amphotericin B/mL; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Cells were plated in uncoated flask at 2×10^4 cells/mL and maintained at 37 °C and 5% CO₂ until they reach a concentration of 10^6 cells/mL, before replating and purification of immunoglobulins from supernatants.

Human colon carcinoma Caco-2 cells, obtained from ATCC and LGC standard (HTB-37™), were cultured in DMEM (Lonza) containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine. The medium was added with 10% of FBS (Lonza), 1% antibiotics (Sigma-Aldrich) and 1% of non-essential amino acids (Lonza). When cells reached 80% confluence, they were dissociated with 0.5% porcine trypsin and 0.2 g/mL EDTA (Lonza) and re-plated on uncoated plastic flasks at 15×10^3 cells/cm². Medium was renewed every two days.

2.2. Synthesis of immuno-LNCs

2.2.1. mAb purification and thiolation

Supernatant harvested from cultures of the AC133.1 and MOPC-31C hybridoma cell lines containing AC133 and IgG1κ isotype control mAbs, respectively, was concentrated using Centricon centrifugal filter units (30 000 MWCO) according to manufacturer's instructions (Millipore, Billerica, USA). Immunoglobulins were then purified by passage over a high performance HiTrap Protein G HP column (GE Healthcare, Orsay, France) followed by elution in acid conditions and immediate neutralization according to the manufacturer's directions. mAbs buffer was changed by dialysis in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS; Cambrex, Verviers, Belgium) using overnight membrane dialysis (15 000 MWCO; Fisher bioblock scientific, Illkirch, France) and then concentrated with Microcon centrifugal filter units (30 000 MWCO; Millipore). The antibody concentration was determined by micro-Bradford colorimetric assay (PIERCE, Rockford, USA) according to manufacturer's instructions. For thiolation, mAbs in DPBS were incubated with 1 mg/mL of 2-iminothiolane (Traut's reagent, Fisher, Illkirch, France) for one hour in darkness under agitation. Traut's reagent was eliminated by purification of relational medium on Sephadex G25 gel filtration column (Sigma-Aldrich). mAbs were then re-concentrated to 2 mg/mL in DPBS by use of Microcon centrifugal filter units (30 000 MWCO). Thiolation of mAbs was confirmed through a colorimetric sulfhydryl assay using Ellman's reagent (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) (Sigma-Aldrich) as previously described (Beduneau et al., 2007; Iznaga Escobar et al., 1996). Briefly, 100 µL of 4 mg/mL Ellman's reagent were dissolved in DPBS and added to 1 mL of about 1 mg/mL thiolated mAb for 20 min incubation at room temperature. Free sulfhydryl levels were determined from the absorbance at 412 nm by referring to a cysteine standard curve.

2.2.2. Synthesis of LNCs

LNCs were synthesized as described previously (Heurtault et al., 2002) by using a phase inversion-based process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily fatty phase (triglycerides: Labrafac®), a non ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate: Solutol®) and a lipophilic surfactant (lecithins: Lipoid®). Briefly, Solutol® HS15, Lipoid®,

Labrafac®, NaCl and deionised water obtained from a Milli-Q plus® system (Millipore, Billerica, USA) were mixed and heated under magnetic stirring up to 85 °C. Three cycles of progressive heating and cooling in between 85 °C and 60 °C were then realized. They were finally followed by an irreversible shock induced by dilution with 0 °C de-ionized water added into the inversion phase zone. Afterwards, slow magnetic stirring was applied to the suspension for 5 min. For fluorescent staining of LNCs, the liposoluble fluorescent probe, Nile red (NR) (Sigma–Aldrich) was used as previously described (Garcion et al., 2006; Paillard et al., 2010).

2.2.3. Coupling mAbs to LNCs

Method 1: DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) was added as a powder to a LNC suspension in order to obtain a 22 mM final concentration (optimized to incorporate a maximum amount of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide within the LNC shell). LNC and DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide micelles were co-incubated for 2 h at 60 °C. A 1.5 cm × 40 cm Sepharose CL4-B column (Sigma–Aldrich) equilibrated with HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4) was used to separate functionalized LNCs containing DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide from micelles composed of free DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide (loading volume: 1–1.5 mL, elution volume: 70 mL). Thus, 70 fractions of 1 mL each were sequentially collected. PEG concentration within fractions was determined using a colorimetric method based on the formation of a complex between PEG and iodine (Sims and Snape, 1980). Briefly, 5 µL of a KI/I₂ solution was added to 200 µL of sample diluted at 1:10 and the resulting absorbance of the medium was detected at 492 nm using a Multiskan® microplate spectrophotometer (Thermo Electron, Saint-Herblain, France). 10 mg of functionalized LNC containing DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide were then incubated overnight at 4 °C under nitrogen atmosphere with 2 mg of thiolated mAbs on a rotating plate set at a low speed. Unbound biomolecules were removed by using a second sepharose CL-4B column as described above. Turbidimetric measurements at 600 nm were performed to evaluate LNC concentrations within the collected fractions. MicroBCA protein assay (Pierce) was used according to the manufacturer's instructions with DO analysis at 580 to determine corresponding mAbs concentrations. The number of mAbs per LNC was determined as described previously (Beduneau et al., 2007).

Method 2: DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide was solubilized in DPBS through slight magnetic stirring for 30 min at room temperature. DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide was then added to a solution of DPBS containing 2 mg of thiolated mAbs to obtain an equimolar concentration of 0.05 mM for the two reactive species (DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide and thiolated mAbs) within a final volume of 400 µL. Overnight incubation was then performed at room temperature under low agitation. 10 mg of LNCs corresponding to 50 µL of initial suspension were then added to the formed “lipo-immunoglobulins” for 4 h incubation at 37 °C. To separate the functionalized LNC containing the newly formed lipo-immunoglobulins from micelles composed of free lipo-immunoglobulins, a sepharose CL4-B column was used as described above (method 1). Turbidimetric measurements at 600 nm and microBCA assays were performed to determine LNC and mAbs concentrations within the collected fractions as well as to calculate the number of mAbs per LNC.

2.3. Characterization of LNCs and immuno-LNCs

LNCs and immuno-LNCs were characterized for size, polydispersity index and charge distribution by dynamic light scattering using a Zetasizer® Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). LNCs and immuno-LNCs were diluted 1:1000

(v/v) in de-ionized water in order to ensure a convenient scattered intensity on the detector.

2.4. AC133 immunolabeling

Caco-2 cells were collected and dissociated using Versene (Lonza). They were then incubated with 5 µg/mL AC133 antibody (Miltenyi Biotec, Paris, France) or IgG1 isotype control (BD-Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 1 h at 4 °C in DPBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. After three washes in DPBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, they were further incubated for 30 min at 4 °C in DPBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide with 20 µg/mL FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment (Dakocytomation, Trappes, France). Following three more washes, cells were re-suspended in DPBS added with 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide before flow cytometry analysis.

2.5. Flow cytometry

A BD FACSCalibur™ fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest™ software (BD-Biosciences) were used in order to proceed to flow cytometry acquisition. Analysis was carried out using WinMDI 2.9 software (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA).

2.6. MTS/PMS surviving cell assay

2.3×10^5 Caco-2 cells were plated in 24-well plates in 400 µL of Caco-2 cell medium. After 24 h incubation at 37 °C/5% CO₂, they were treated with 20 µg/mL of AC133 antibody (Miltenyi Biotec) or immuno-LNCs at 1.1 mg/mL, thus corresponding to the same 20 µg/mL mAb concentration. After 1 h incubation at 37 °C, non-adherent cells were washed with DPBS and adherent surviving cell levels were evaluated with MTS/PMS assay using a celltiter 96 Aqueous non radioactive cell proliferation assay kit according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières, France). Briefly, a MTS/PMS reagent diluted in DPBS (1:5) was added to the cells and incubated for 2 h at 37 °C. The soluble formazan generated by the live cells was proportional to the number of initially adherent live cells and the resulting absorbance was recorded at 490 nm using a Multiskan Ascent® microplate reader (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

2.7. siRNA mediated knockdown of CD133

24 h after initial plating (see below, binding of immuno-LNCs), Caco-2 cells were transfected with 30 nM of duplex RNA oligonucleotides (Sigma–Aldrich, Saint-Louis, USA) using N-TER peptide (Sigma–Aldrich, Saint-Louis, USA) according to manufacturer's instructions. N-TER/siRNA complexes were incubated in Caco-2 cell medium during 48 h at 37 °C/5% CO₂. The sequence used to inhibit CD133 was as following: 5'-CCCUGAAUGAUUACCUGAdTdT-3'; a sequence scramble was used as negative control 5'-GUCCGGAUUAACCAUGAGUdTdT-3'. Caco-2 cell medium was then replaced by serum-free medium containing 50% DMEM, 50% Ham's F12 (Biowhittaker) and N1 supplement (Sigma).

2.8. Binding of immuno-LNCs

Caco-2 cells were initially plated in eight-well Labtech chambers at 2×10^4 cells per well in 400 µL of serum containing Caco-2 cell medium. After siRNA treatment (see above), they were treated in serum-free medium with 23 µg/mL NR-LNCs or 23 µg/mL NR-immuno-LNCs, thus equivalent to 0.42 µg/mL of mAb, for 20 min at 4 °C under gentle agitation. The medium was then removed and

cells were washed three times with DPBS. Labtech chamber slides (Fisher bioblock scientific) were finally mounted under coverslips in fluorescent mounting medium (Dakocytomation) mixed with DPBS (1:1). Images were obtained from a fluorescence microscope (Axioscope® 2 optical, Carl-Zeiss, Le Pecq, France) and acquired through a Photometrics CoolSNAP ES camera equipped with a QImaging CRI Micro Color 2 RGB Liquid Crystal filter and by using the MetaVue™ imaging system (all from Roper Scientific, Evry, France). The images were then analysed using the MetaMorph® image analysis Software (Roper Scientific).

2.9. Cellular uptake of immuno-LNC

Caco-2 cells were plated in six-well plates with 2.3×10^5 cells per well in 2 mL of serum containing medium for 24 h. Caco-2 cell medium was then replaced by serum-free medium before Caco-2 cells were treated with 230 µg/mL NR-LNCs or NR-Immuno-LNCs thus corresponding to 4.2 µg/mL of mAb. After 2 h of incubation at 37 °C, cells washed 3 times with DPBS and dissociated using Versene (Lonza). To enable determination of the labeled molecule fraction that was effectively internalized within cells, extracellular fluorescence was quenched using 0.4% trypan blue (Sigma–Aldrich) as previously described (Paillard et al., 2010). Cells were re-suspended in DPBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide before assessing LNC cellular internalization by flow cytometry.

2.10. Statistical analysis

XLSTAT 2011 Version 2011.1.01 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. Statistical significance for each experiment was determined by a Dunnett's test. The tests were considered as significant with *p* values of less than 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Design of immuno-LNCs

3.1.1. Thiolation of AC133 mAb and assessment of recognition integrity

In order to functionalize LNCs with mAbs, the bifunctional polymer DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide was used: the distearoyl function being useful as a LNC shell anchor and maleimide as a chemically reactive group for conjugation with mAbs. As a prerequisite to obtain operational mAbs for conjugation to maleimide, thiol groups were introduced within AC133 mAb and IgG1κ isotype control immunoglobulins by using Traut's reagent. Traut's reagent reacted with primary amine (lysine and N-terminus) thus producing terminal sulfhydryl groups on mAbs. Although, the localization of primary amine on immunoglobulins was not exactly identified, a colorimetric sulfhydryl assay using Ellman's reagent permitted to assess that the thiolation was successful with an average of one to two thiols per immunoglobulin. As this reaction has already been described to cause loss of recognition activity, the capacity of recognition of thiolated versus native AC133 mAb was addressed on non-differentiated human colon cancer adenocarcinoma Caco-2 cells that constitutively over-express the AC133 epitope. Immunocytochemistry combined flow cytometry allowed establishing that Caco-2 cells were specifically recognized by both native and thiolated AC133 mAbs (Fig. 1A). Likewise, very similar deviations of geometric fluorescence intensity from matching IgG1κ control were obtained with native and thiolated AC133 mAbs (Fig. 1B). Those observations thus established that the thiolation of AC133 mAb by Traut's reagent have not affected the antigen-binding site of the antibody.

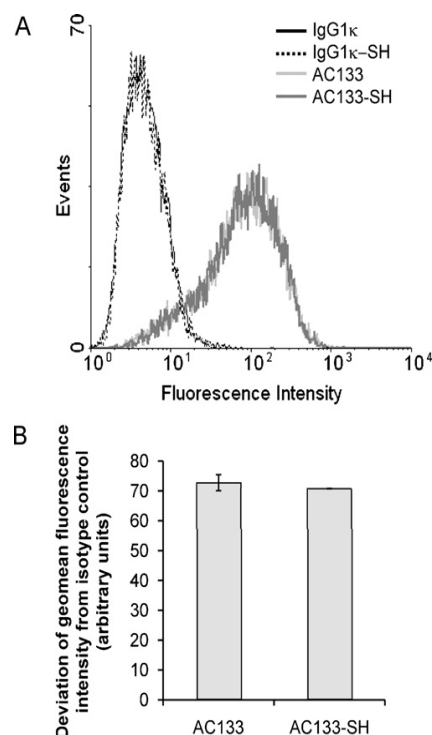


Fig. 1. mAbs thiolation does not affect the recognition site of AC133. Caco-2 cells overexpressing AC133 were incubated for 1 h at 4 °C with native and thiolated (-SH) antibodies. FITC-conjugated F(ab')₂ fragments were then added to the cell suspension for 30 min at 4 °C. (A) Representative immunofluorescence combined flow cytometry analysis profiles. (B) Semi-quantitative analysis representing the deviation of geometric fluorescence intensity from isotype control obtained with native versus thiolated AC133-mAb (AC133-SH). Data represented mean $\pm$ s.e.m. of three independent experiments.

3.1.2. mAbs conjugation to LNCs and assessment of recognition activity

In order to covalently attach thiolated mAbs to LNCs, two distinct methods based on the incorporation of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide within the LNC shell were used. Firstly, as initially developed to build immunoliposomes (Huwylar et al., 1996) and utilized on LNCs for conjugation to OX26 antibody (Beduneau et al., 2007), a method of post-insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide at 60 °C within LNCs followed by mAb coupling was applied (Fig. 2, method 1). Secondly, a lipo-immunoglobulin between DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide and mAbs was created before being post-inserted at low temperature within the LNC shell. This last method allowed reducing the number of purification steps and the amount of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide used (Fig. 2, method 2). As immunoglobulins are proteins of about 150 kDa, the size of the LNC shell represented an important parameter to permit the coupling to an optimum number of mAbs. As such, immunoliposomes of 100 nm bearing about 30 whole antibodies were previously found optimal for targeting efficacy (Huwylar et al., 1996; Maruyama et al., 1995). Hence, conjugation of the AC133 mAbs or IgG1κ immunoglobulins was realized on native 100 nm LNCs that presented a narrow distribution and a zeta potential of about -6 mV (Table 1). Physicochemical characterization demonstrated a switch between native- and AC133-LNCs from 100 nm to 187 nm with method 1 and to 126 nm with method 2 while keeping a polydispersity index under 0.2 with both methods (Table 1). Use of the IgG1κ isotype control immunoglobulins produced similar control IgG1-LNCs (Table 1). The evolution of LNC size demonstrated the incorporation either of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide then conjugated to mAbs with method 1 or of lipo-immunoglobulins with

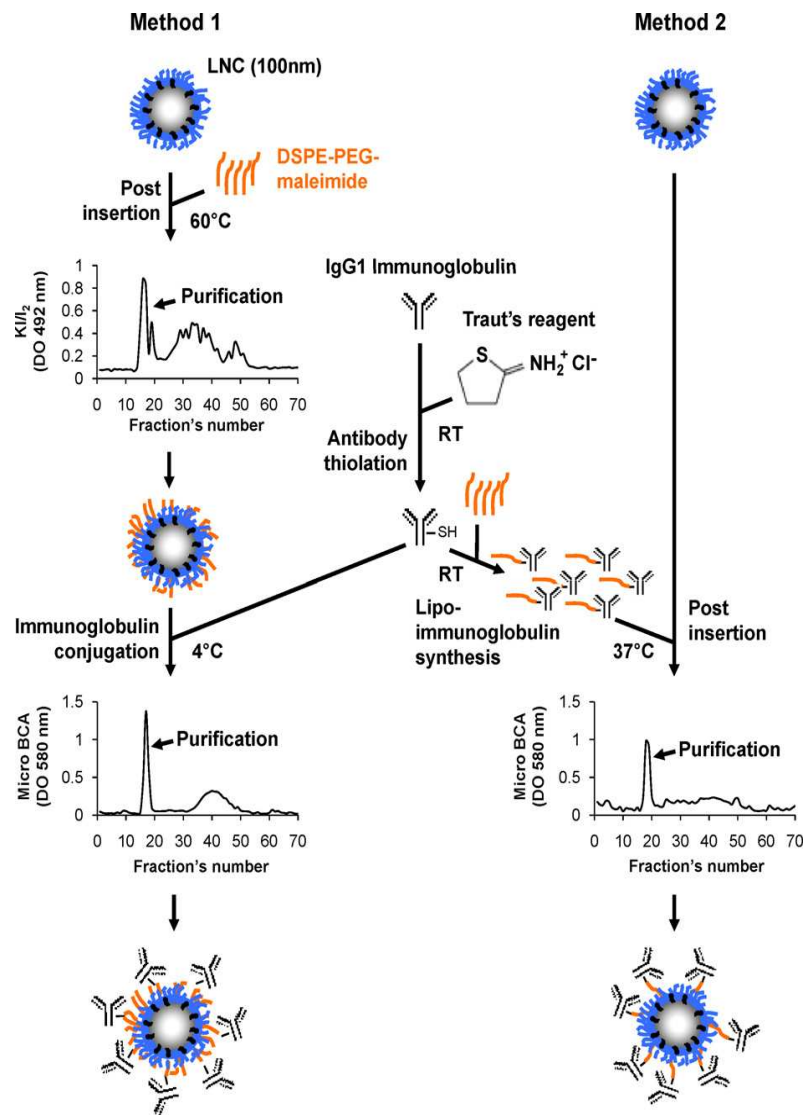


Fig. 2. Schematic representation of methods 1 and 2 for the synthesis of immuno-LNCs. Method 1 combined a first step with the insertion of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide within the LNC shell (at 60 °C) to a second step consisting in thiolated mAb conjugation to the maleimide extremity (at 4 °C). Method 2 included a first step with the creation of a lipo-immunoglobulin monomer after reaction between the thiolated mAb and the DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide (at room temperature; RT) and a second step that was the post-insertion of the lipo-immunoglobulin monomer within the LNC shell (at 37 °C). Each incubation stage with LNCs was followed by a purification step onto exclusion columns as described in Section 2; arrows in front of the peak elution fractions corresponded to LNCs.

method 2. In line with this, incubation of native LNCs for 2 h at 60 °C (post-insertion parameters of method 1) or for 4 h at 37 °C (post-insertion parameters of method 2) had no impact on their initial physicochemical characteristics (size, zeta potential, polydispersity) (cf. Table 1). Thus, reduction in size increase of immuno-LNCs obtained with method 2 when compared with method 1 could

be attributed to two parameters: (i) the amount of bifunctional polymer molecules that have been effectively incorporated (Tirosh et al., 1998) and (ii) the impact of post-insertion temperature on the conformation of incorporated bifunctional polymer that can be “brush” or “mushroom” (Tirosh et al., 1998). In spite of those evident differences, no significant variations of zeta poten-

Table 1
Characteristics of the different LNCs. PDI: polydispersity index. Note the size increase between native- and immuno-LNCs. Also the size differences between immuno-LNCs obtained with method 1 and those obtained with method 2.

LNC	Method 1		Method 2	
	IgG1-LNC	AC133-LNC	IgG1-LNC	AC133-LNC
Size (nm)	100.1 ± 3.7	190.4 ± 7.7 [#]	145.4 ± 38.4 ^{#,*}	126 ± 10.5 ^{#,*}
PDI	0.05 ± 0.007	0.181 ± 0.011 [#]	0.123 ± 0.008 [#]	0.138 ± 0.040 [#]
Zeta potential (mV)	-6.4 ± 3.6	-24.2 ± 0.9 [#]	-20.2 ± 0.6 [#]	-22.8 ± 4.1 [#]
mAb/LNC	-	54 ± 6	28 ± 10	37 ± 13

[#] p < 0.01 differences from native LNCs (Dunnett's test).
^{*} p < 0.01 differences between method 1 and 2 (Dunnett's test).

tials were found between the two methods (Table 1). Moreover, small micro-Bradford colorimetric assay associated with turbidimetric measurements established a fixation of 40 ± 8 and 37 ± 13 AC133 mAbs per LNC with method 1 and 2, respectively (Table 1). Thus, independently from the method used, immuno-LNCs displayed a conform number of immunoglobulins onto their surface to further support their functionality (Beduneau et al., 2007). However, smaller LNCs obtained when applying method 2 may be more appropriate to keep biological barrier crossing properties of the immuno-nanocarrier (Garcion et al., 2006; Paillard et al., 2010). In addition, the use of DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide in large excess in method 1 (440-fold increase while leading to the same LNC antibody load as compared with method 2, cf. Section 2) conducted to a higher number of free maleimide functions at the surface of LNCs, already noticed with OX26 decorated-liposomes (Huwyler et al., 1996) and -LNCs (Beduneau et al., 2007). This fact could be ascribed to the steric barrier created by LNC shell components among which is Solutol® and DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide itself. The presence of free maleimide functions at the surface of LNCs may also represent the basis of undesirable side effects resulting from the interaction with free sulfhydryl functions present on natural biomolecules as exemplified by the important anti-oxidative molecule glutathione (Dringen, 2000; Friedmann, 1952).

To further validate method 2 versus method 1, recognition activity of the AC133 mAb when present on immuno-LNCs was tested on Caco-2 cells. As physicochemical characteristics of newly developed immuno-LNCs (Table 1) were found to be stable from the purification step to at least three weeks at 4 °C, immuno-LNCs were used in biological assays during this three-week period. Immunocytochemistry combined flow cytometry established that AC133 mAbs present on AC133-LNCs obtained from method 1 were capable to label Caco-2 cells with a slight increase in geomean fluorescence intensity as compared to free AC133 mAbs (Fig. 3A). Experiments developed with IgG1-LNCs demonstrated the specificity of the recognition process (Fig. 3A). The augmentation in recognition with immuno-LNCs could likely be attributed to the number of mAbs present at the surface of LNCs, thus amplifying the signal obtained from secondary antibody fixation. This is also indicative of the fact that immuno-LNCs remained stable during the staining procedure and that DSPE-PEG₂₀₀₀-coupling to mAb at the surface of immuno-LNCs had minor impact on the recognition integrity of thiolated AC133 mAb. Interestingly, immunocytochemistry combined flow cytometry with AC133 mAbs present on AC133-LNCs obtained from method 2 led to very similar data (Fig. 3B). Those observations demonstrated therefore the specific activity of AC133-mAbs when present on immuno-LNCs whatever the conjugation method used and conducted to use advantageous method 2 for further biological evaluation.

3.1.3. Biological properties of AC133-LNCs during incubation with Caco-2 cells

mAbs have already been used as activating- (Hicks et al., 2002) or, instead, as function blocking-immunoglobulins (Garcion et al., 2001). Although the function of the CD133 protein has not been yet elucidated, the impact of increasing concentrations (5, 10 and 20 µg/mL) of AC133 mAb versus IgG1κ control immunoglobulin was investigated on Caco-2 cell integrity (attachment and survival). Interestingly, 1-hour treatment of Caco-2 cells at 37 °C with AC133 mAb at 20 µg/mL induced a dramatic cell detachment from plastic dishes that was not observed with IgG1κ control (Fig. 4A). Caco-2 cell treatment with AC133 mAb at the dose of 5 and 10 µg/mL was not capable to trigger this effect (data not shown). Since it was previously observed that soluble and attached immunoglobulins could trigger distinct biological effects (Schwartz et al., 1991), this cell-detachment assay was used to investigate the impact of AC133 recognition on living Caco-2 cells when AC133 mAb was presented

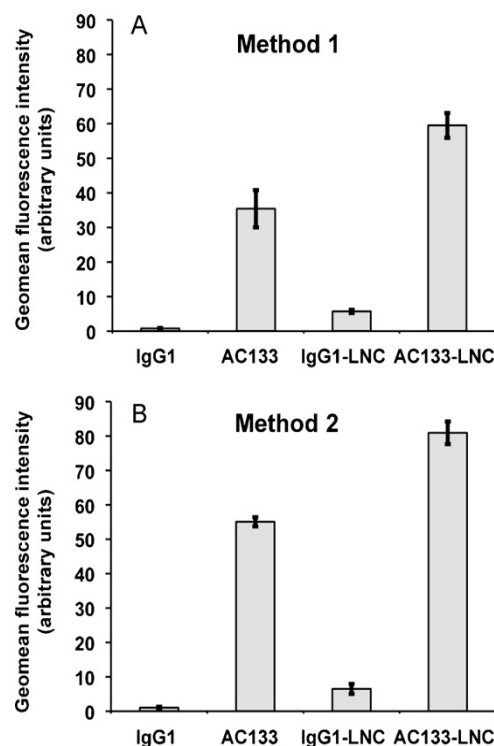


Fig. 3. AC133 coupling to LNCs does not affect its recognition site. Immunofluorescence combined flow cytometry analysis of AC133 expression was performed on AC133 expressing Caco-2 cells by using 5 µg/mL of free or LNC-bound AC133 or IgG1κ control mAbs. (A) Data obtained with mAbs conjugated to LNCs by method 1. (B) Data obtained with mAbs conjugated to LNCs by method 2. Results, expressed as mean fluorescence intensity (MFI; arbitrary units), represented mean $\pm$ s.e.m. of three independent experiments.

from AC133-LNCs. Caco-2 cells were, therefore, treated for 1-hour at 37 °C with 20 µg/mL of free mAb (AC133 versus IgG1κ isotype control) or 20 µg/mL mAb present at the surface of functionalized-LNC (thus corresponding to a 1.1 mg/mL concentration of AC133- or IgG1-LNCs). The percentage of attached living cells was then quantified by use of a MTS/PMS survival assay. Although treatment with free AC133 mAb led to $87.1 \pm 0.2\%$ detachment of Caco-2 cells from plastic dishes, treatment with AC133-LNCs did not (Fig. 4B). Those results emphasized, therefore, that AC133 mAb attached to the “LNC matrix” do not trigger similar signals as free AC133 mAb on Caco-2 cells. They also supported that immuno-LNCs do not release fully initially bound mAbs during the 1-h incubation time with AC133 expressing Caco-2 cells in the reaction medium at 37 °C, thus maintaining, at least partially, specific cell recognition capabilities.

3.2. Evaluation of AC133-specific cellular binding and uptake of AC133-LNCs

3.2.1. Binding of AC133-LNCs onto AC133 expressing Caco-2 cells

In order to plainly define the interest of AC133-LNCs to target AC133-expressing CSCs, binding of immuno-LNCs at the surface of Caco-2 cells expressing distinct levels of AC133 was investigated. siRNA-mediated knockdown of CD133 was used to down regulate AC133 expression at the surface of Caco-2 cells, thus permitting to obtain high and low AC133 expressing cells, named Caco-2-AC133^{high} and Caco-2-AC133^{low}, respectively. Fig. 5A illustrated that use of 30 nM of siRNAs (as described in the Material and Method section) led to more than 50% reduction of AC133 expression at the surface of Caco-2 cells. Binding analysis was then performed by applying 23 µg/mL of NR-stained immuno-LNCs (carrying 0.42 µg/mL of mAbs) onto Caco-2-AC133^{high} and Caco-2-

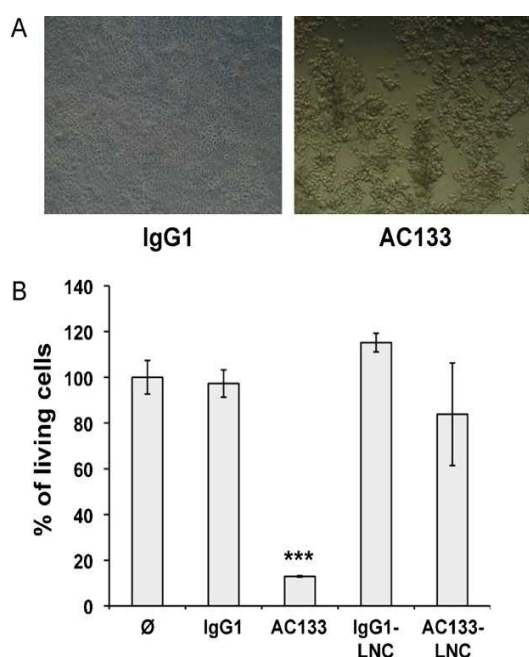


Fig. 4. Cell detachment assay corroborated the integrity immuno-LNCs during the recognition step of AC133 expressing cells. (A) Photomicrographs demonstrating that treatment of Caco-2 cell monolayers for 1 h at 37 °C with 20 μ g/mL AC133 mAb triggered cell detachment while control IgG1 κ immunoglobulins did not. (B) Caco-2 cells were treated for 1 h at 37 °C with IgG1 κ immunoglobulins, AC133 mAb, IgG1-LNCs and AC133-LNCs at the equivalent mAb concentration of 20 μ g/mL (thus corresponding to 1.1 mg/mL of LNCs). Remaining amount of attached cells was quantified by using the colorimetric MTS/PMS surviving assay. Data represented mean $\pm$ s.e.m. of three independent experiments. Dunnett's test: comparison with control untreated cells ($\emptyset$), *** p < 0.001.

AC133^{low} cell monolayers for 20 min at 4 °C under gentle agitation. LNC binding at the cell surface was evaluated by semi-quantitative computer assisted fluorescence microscopy image analysis after thresholding. As illustrated in Fig. 5B and semi-quantified in Fig. 5C, AC133-LNCs attached much better than their IgG1 κ counterparts onto Caco-2 cell monolayers. In addition, reduction of AC133 expression by siRNA knockdown also led to a reduction of the binding of AC133-LNCs to Caco-2 cells (Fig. 5B and C). Importantly, whatever the situation analysed (Caco-2-AC133^{high} with control siRNA or Caco-2-AC133^{low} with CD133 siRNA) the specificity of the AC133-LNC binding was demonstrated and preserved. Those data thus established that AC133-LNCs represented a new tool to improve drug distribution and retention in the close vicinity of AC133 expressing CSCs. As such, they represented the third AC133 targeting tool and the second AC133-specific nano-object that has been so far developed with monomethyl auristatin F/AC133-mAb drug conjugates (Smith et al., 2008) and AC133-conjugated carbon nanotubes (Wang et al., 2011) both used to eliminate CSCs.

3.2.2. Uptake of AC133-LNCs by AC133 expressing Caco-2 cells

Having established that AC133-LNCs were capable to bind specifically to AC133-positive cells, it was further investigated whether AC133-LNCs can be internalized within Caco-2 cells. Thus, 230 μ g/mL of NR-stained LNCs or immuno-LNCs (carrying 4.2 μ g/mL mAbs) were incubated for 2 h at 37 °C with Caco-2 cells. After quenching of the extracellular fluorescence using trypan blue, intracellular accumulation of NR-stained LNCs was evaluated by flow cytometry. Although native LNCs were, as previously described (Garcion et al., 2006; Paillard et al., 2010; Roger et al., 2009), clearly accumulated within cells, internalization was dramatically reduced when using immuno-LNCs (Fig. 6). The inhibition of internalization of immuno-LNCs can be mainly explained by the

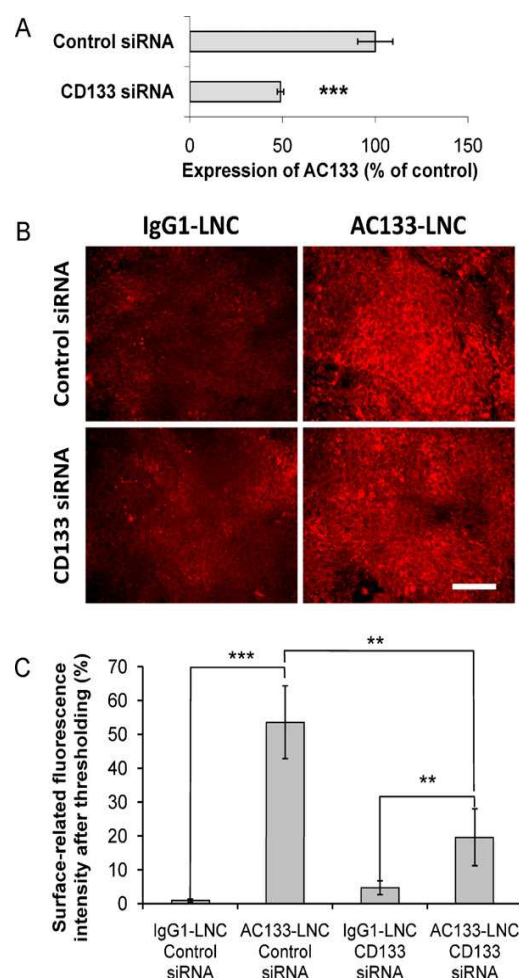


Fig. 5. AC133-dependent binding of NR-loaded AC133-LNCs onto the surface of AC133 expressing Caco-2 cells. (A) Flow cytometry analysis of AC133 expression assessing the efficiency of siRNA-mediated knockdown within Caco-2 cells. Control siRNA allowed obtaining high AC133 expressing cells (Caco-2-AC133^{high}) while CD133 siRNA allowed obtaining low AC133 expressing cells (Caco-2-AC133^{low}). (B) Fluorescent images acquired from Axioscope® 2 optical microscope of the binding of NR-loaded AC133-LNCs onto the surface of Caco-2 cells. 23 μ g/mL of NR-stained immuno-LNCs (thus corresponding to 0.42 μ g/mL of mAbs) were applied for 20 min at 4 °C under gentle agitation onto Caco-2 cell monolayers that have been submitted to siRNA knockdown before washing and analysis of cell surface bound fluorescence. Note that AC133-LNCs attached much better to Caco-2 cells than their IgG1 κ counterparts. Note also the reduction surface bound fluorescence when expression of AC133 was reduced by use of siRNA knockdown. Bar: 50 μ m. (C) Semi-quantitative evaluation of LNC binding by computer assisted fluorescence microscopy image analysis after thresholding. Results represented mean $\pm$ s.e.m. of three independent experiments. Dunnett's test: ** p < 0.01, *** p < 0.001.

physical characteristics of those particles, among which their size and negative zeta potential, that may have reduce their non-specific interactions with the negatively charged extracellular surface of the cell plasma membrane. As the presence of AC133 mAbs in place of IgG1 κ immunoglobulins onto the surface of LNCs did not improved LNC internalization within Caco-2 cells, it can be concluded that AC133 epitope does not work as a receptor for endocytosis in contrast to LDL- (Dehouck et al., 1997; Kreuter et al., 2003) or transferrin-receptors (Olivier et al., 2002) widely used for intracellular accumulation of ApoE- or OX26-combined nanoparticles, respectively. However, a reduced cellular uptake would not necessarily preclude drug activity that is also dependent on subcellular bioavailability. As such recent data obtained with monomethyl auristatin F/AC133-mAb drug conjugates on Hep3B hepatocellular carcinoma and Kato III stomach cancer cells suggested that more

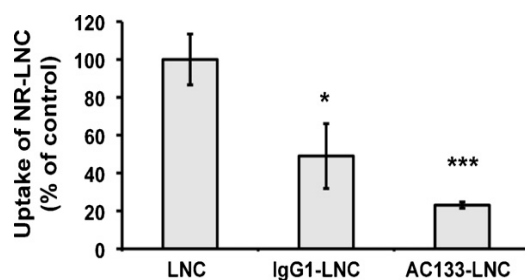


Fig. 6. Internalization of native LNCs versus immuno-LNCs within Caco-2 cells. Flow cytometry analysis revealed that treatment of Caco-2 cells for 2 h at 37 °C with either fluorescently labeled-LNCs, -IgG1-LNCs or -AC133-LNCs at 230 µg/mL (thus corresponding to 4.2 µg/mL of mAbs) led to a strongly reduced intracellular accumulation of IgG1-LNCs and AC133-LNCs as compared to native LNCs. Results represented mean $\pm$ s.e.m. of two independent experiments realized in triplicate. Dunnett's test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

than intracellular accumulation, routing to the lysosome may have dictated the anticancer drug activity (Smith et al., 2008). Toward the development of CSC targeted therapeutic strategies, this last data emphasized the importance of studying intracellular trafficking behavior of CSC therapeutic ligands that recognized epitopes without well-established biological functions.

4. Conclusion

In conclusion, by using the bifunctional polymer DSPE-PEG₂₀₀₀-maleimide and synthesizing lipo-immunoglobulins further post-inserted within the LNC shell, a new nanocarrier capable to target CSCs through specific recognition of the AC133 epitope was developed. Although internalization and intracellular trafficking properties of the AC133-LNCs need further investigation, specific binding capacities onto AC133 expressing CSCs represented an interesting basis to further apply targeted therapeutic strategies notably within solid tumors. Thus, to revert CSC resistance to chemotherapy or radiotherapy, three major strategies ascribed to AC133 recognition by hydrophobic drug-loaded AC133-LNCs could be further investigated: (i) improvement of radionuclide activity-gradients exemplified by lipophilic ¹⁸⁸Rhenium complexes for induction of cell death (Allard et al., 2008), (ii) deregulation of signaling pathways normally activated, such as inhibition of sonic hedgehog pathways by cyclopamine (Bar et al., 2007), or (iii) differentiation toward a phenotype more sensitive to classical treatment by using for instance retinoic acid (Campos et al., 2010; Niu et al., 2010).

Acknowledgments

We are grateful to the Service Commun de Cytométrie d'Analyses Nucléotidiques, SCCAN, Angers, France, for skilful technical support. This work was supported by the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale", the "Axe Vectorisation Tumorale" from the "Cancéropôle Grand-Ouest" and by "La Ligue Contre le Cancer" throughout an "Equipe Labellisée 2007" grant. Erika Bourseau was initially a PhD fellow from the "Conseil Général de Maine-et-Loire" and then a PhD fellow from the "Comité Départemental de Maine-et-Loire de La Ligue Contre le Cancer". Audrey Griveau was a PhD fellow from the "Conseil Général de Maine-et-Loire".

References

- Allard, E., Hindre, F., Passirani, C., Lemaire, L., Lepareur, N., Noiret, N., Menei, P., Benoit, J.P., 2008. 188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 35, 1838–1846.

- Angelastro, J.M., Lame, M.W., 2010. Overexpression of CD133 promotes drug resistance in C6 glioma cells. *Mol. Cancer Res.* 8, 1105–1115.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., Rich, J.N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.
- Bar, E.E., Chaudhry, A., Lin, A., Fan, X., Schreck, K., Matsui, W., Piccirillo, S., Vescovi, A.L., DiMeco, F., Olivi, A., et al., 2007. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 25, 2524–2533.
- Beduneau, A., Saulnier, P., Hindre, F., Clavreul, A., Leroux, J.C., Benoit, J.P., 2007. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials* 28, 4978–4990.
- Boado, R.J., Zhang, Y., Wang, Y., Pardridge, W.M., 2008. GDNF fusion protein for targeted-drug delivery across the human blood–brain barrier. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 387–396.
- Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K.E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., et al., 2010. Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin. Cancer Res.* 16, 2715–2728.
- Casaco, A., Lopez, G., Garcia, I., Rodriguez, J.A., Fernandez, R., Figueredo, J., Torres, L., Perera, A., Batista, J., Leyva, R., et al., 2008. Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with 188 Re in adult recurrent high-grade glioma. *Cancer Biol. Ther.* 7, 333–339.
- Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A., Huttner, W.B., 1998. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood* 91, 2625–2626.
- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G., Cecchelli, R., 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood–brain barrier. *J. Cell Biol.* 138, 877–889.
- Dringen, R., 2000. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 62, 649–671.
- Ferrandina, G., Petrillo, M., Bonanno, G., Scambia, G., 2009. Targeting CD133 antigen in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 823–837.
- Friedmann, E., 1952. Spectrophotometric investigation of the interaction of glutathione with maleimide and n-ethylmaleimide. *Biochim. Biophys. Acta* 9, 65–75.
- Garcion, E., Faissner, A., French-Constant, C., 2001. Knockout mice reveal a contribution of the extracellular matrix molecule tenascin-C to neural precursor proliferation and migration. *Development* 128, 2485–2496.
- Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., Benoit, J.P., 2006. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1710–1722.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P., 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19, 875–880.
- Hicks, C., Ladi, E., Lindsell, C., Hsieh, J.J., Hayward, S.D., Collazo, A., Weinmaster, G., 2002. A secreted Delta1-Fc fusion protein functions both as an activator and inhibitor of Notch1 signaling. *J. Neurosci. Res.* 68, 655–667.
- Horst, D., Scheel, S.K., Liebmann, S., Neumann, J., Maatz, S., Kirchner, T., Jung, A., 2009. The cancer stem cell marker CD133 has high prognostic impact but unknown functional relevance for the metastasis of human colon cancer. *J. Pathol.* 219, 427–434.
- Huwylar, J., Wu, D., Pardridge, W.M., 1996. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 14164–14169.
- Iznaga Escobar, N., Morales, A., Nunez, G., 1996. Micromethod for quantification of SH groups generated after reduction of monoclonal antibodies. *Nucl. Med. Biol.* 23, 641–644.
- Kreuter, J., Ramge, P., Petrov, V., Hamm, S., Gelperina, S.E., Engelhardt, B., Alyautdin, R., von Briesen, H., Begley, D.J., 2003. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. *Pharm. Res.* 20, 409–416.
- Lacoeuille, F., Garcion, E., Benoit, J.P., Lamprecht, A., 2007. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 4612–4617.
- Maruyama, K., Takizawa, T., Yuda, T., Kennel, S.J., Huang, L., Iwatsuru, M., 1995. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol)s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 74–80.
- Miletic, H., Niclou, S.P., Johansson, M., Bjerkvig, R., 2009. Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 455–468.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K., Buck, D.W., 1997. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013–5021.
- Morris, S.R., Carey, L.A., 2006. Trastuzumab and beyond: new possibilities for the treatment of HER2-positive breast cancer. *Oncology (Williston Park)* 20, 1763–1771, discussion 1771–1762, 1774–1766.
- Morrison, P.F., Lonser, R.R., Oldfield, E.H., 2007. Convective delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human putamen. *J. Neurosurg.* 107, 74–83.
- Niu, C.S., Li, M.W., Ni, Y.F., Chen, J.M., Mei, J.M., Li, J., Fu, X.M., 2010. Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 29, 113.
- Olivier, J.C., Huertas, R., Lee, H.J., Calon, F., Pardridge, W.M., 2002. Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm. Res.* 19, 1137–1143.

- Paillard, A., Hindre, F., Vignes-Colombeix, C., Benoit, J.P., Garcion, E., 2010. The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials* 31, 7542–7554.
- Pardridge, W.M., Wu, D., Sakane, T., 1998. Combined use of carboxyl-directed protein pegylation and vector-mediated blood-brain barrier drug delivery system optimizes brain uptake of brain-derived neurotrophic factor following intravenous administration. *Pharm. Res.* 15, 576–582.
- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2, 751–760.
- Reardon, D.A., Zalutsky, M.R., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Herndon 2nd, J.E., McLendon, R.E., Pegram, C.N., Quinn, J.A., Rich, J.N., et al., 2008. A pilot study: 131I-antitumescin monoclonal antibody 81c6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. *Neuro Oncol.* 10, 182–189.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., Benoit, J.P., 2009. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J. Control Release* 140, 174–181.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., Benoit, J.P., 2010. Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 422–429.
- Schrama, D., Reisfeld, R.A., Becker, J.C., 2006. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 147–159.
- Schulz, H., Bohlus, J.F., Trelle, S., Skoetz, N., Reiser, M., Kober, T., Schwarzer, G., Herold, M., Dreyling, M., Hallek, M., et al., 2007. Immunotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 706–714.
- Schwartz, M.A., Lechene, C., Ingber, D.E., 1991. Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 7849–7853.
- Sims, G.E., Snape, T.J., 1980. A method for the estimation of polyethylene glycol in plasma protein fractions. *Anal. Biochem.* 107, 60–63.
- Smith, L.M., Nesterova, A., Ryan, M.C., Duniho, S., Jonas, M., Anderson, M., Zabinski, R.F., Sutherland, M.K., Gerber, H.P., Van Orden, K.L., et al., 2008. CD133/prominin-1 is a potential therapeutic target for antibody-drug conjugates in hepatocellular and gastric cancers. *Br. J. Cancer* 99, 100–109.
- Tirosch, O., Barenholz, Y., Katzhendler, J., Priev, A., 1998. Hydration of polyethylene glycol-grafted liposomes. *Biophys. J.* 74, 1371–1379.
- Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P., et al., 2007. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1, 389–402.
- Visvader, J.E., Lindeman, G.J., 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat. Rev. Cancer* 8, 755–768.
- Wang, C.H., Chiou, S.H., Chou, C.P., Chen, Y.C., Huang, Y.J., Peng, C.A., 2011. Photothermalysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody. *Nanomedicine* 7, 69–79.
- Weyland, M., Manero, F., Paillard, A., Gree, D., Viault, G., Jarnet, D., Menei, P., Juin, P., Chourpa, I., Benoit, J.P., et al., 2011. Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1. *J. Control Release* 151, 74–82.
- Winau, F., Westphal, O., Winau, R., 2004. Paul Ehrlich – in search of the magic bullet. *Microbes Infect.* 6, 786–789.
- Wu, Y., Wu, P.Y., 2009. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem Cells Dev.* 18, 1127–1134.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., Herold-Mende, C.C., 2008. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin. Cancer Res.* 14, 123–129.

Ce chapitre montre la possibilité de réaliser la synthèse d'immuno-nanocapsules capables de reconnaître les cellules AC133/1 en utilisant le réactif de Traut pour l'étape de thiolation. La méthode retenue comporte deux étapes : d'une part, la synthèse des lipo-immunoglobulines par incubation de l'anticorps thiolé et du DSPE-PEG-maléimide, et d'autre part, la post-insertion des lipo-immunoglobulines à la surface des NCLs de 100 nm. Après une étape de purification, des immuno-nanocapsules aux caractéristiques suivantes sont obtenues : une taille monodisperse d'environ 150 nm, un potentiel zêta de -20 mV et la présence d'environ 40 anticorps par NCL.

Pour la preuve de concept, les cellules utilisées sont des cellules indifférenciées humaines d'adénocarcinome de colon Caco-2 exprimant de manière constitutive AC133/1. Des tests *in vitro* ont permis de confirmer la spécificité des immuno-nanocapsules à reconnaître l'épitope. Cette spécificité est très importante dans les stratégies thérapeutiques, car ce vecteur pourrait être combiné à un agent chimiothérapeutique, ce qui permettrait d'avoir la double activité : spécificité et activité sur des cellules qui possèdent l'épitope AC133/1.

Par contre, l'internalisation de ces immuno-nanocapsules n'est pas réalisable dans les cellules Caco-2, ceci pouvant s'expliquer par les caractéristiques physico-chimiques de la particule : par la taille de la particule, mais également par la charge négative de celle-ci qui peut créer des interactions avec le compartiment extracellulaire. Une internalisation de la particule n'est peut être pas forcément nécessaire. En effet, les effets de différents anticancéreux encapsulés à l'intérieur de la NCL ont été démontrés (e.g. paclitaxel (Garcion *et al.* 2006; Roger *et al.* 2009), etoposide (Lacoeuille *et al.* 2007) et radio-pharmaceutiques (Allard *et al.* 2008; Vanpouille-Box *et al.* 2011)). Une combinaison entre ces immuno-nanocapsules et l'encapsulation d'agents anticancéreux diffusibles pourraient être envisagée. Cette combinaison permettrait après fixation de l'immuno-nanocapsule, de « libérer » l'agent anticancéreux pour qu'il puisse agir. Ces immuno-nanocapsules pourraient par la suite être administrées *in vivo* en locorégional par simple diffusion ou convection. En effet, au cours du ciblage actif, le vecteur fonctionnalisé va se lier à une protéine ou à un récepteur membranaire exprimé spécifiquement sur les cellules cibles, afin d'être internaliser et de libérer le principe actif à l'intérieur de la cellule tumorale. De plus en périphérie, l'effet EPR, observé dans différents cancers humains comme le cerveau, le foie, le rein et le poumon (Maeda *et al.* 2000), permettrait une accumulation passive des nanovecteurs dans les tissus tumoraux (Liu *et al.* 2006; Matsumura and Maeda 1986).

2. Complexation d'acides nucléiques aux NCLs

2.1. Complexation de l'ADN plasmidique ou de siARN aux NCLs

L'utilisation de l'ADN plasmidique ou des siARN pour des stratégies thérapeutiques est empêchée par des problèmes liés à leurs efficacités et à leurs délivrances. Pour améliorer ces problèmes, les acides nucléiques ont donc besoin d'atteindre les compartiments subcellulaires tels que le noyau pour l'ADN plasmidique et le complexe RISC situé dans le cytoplasme pour les siARN. Pour cela, plusieurs barrières tissulaires et cellulaires devront être franchies, et plus particulièrement l'absorption intracellulaire qui est très nettement déjouée par la charge négative et l'hydrophilie des acides nucléiques (Lam *et al.* 2012), par la capacité d'échappement à l'endolysosome (El Ouahabi *et al.* 1997) et par leur sensibilité à la dégradation par les nucléases (Kawabata *et al.* 1995).

Une des possibilités investiguée est la fonctionnalisation de la surface des NCLs par l'utilisation de peptides L1 dérivés de papillomavirus. En effet, des résultats de microscopie électronique ont montré la capacité que les peptides dérivés de papillomavirus humains ont à former des interactions avec de l'ADN circulaire ou linéaire (Bousarghin *et al.* 2002). En effet, ces peptides possèdent une affinité pour les héparanes sulfates et sont surtout capables de se combiner aux acides nucléiques (Bousarghin *et al.* 2003; Bousarghin *et al.* 2003; Bousarghin *et al.* 2004; Bousarghin *et al.* 2002; Bousarghin *et al.* 2009). L'ancrage du peptide à la NCL se fait grâce à une solution de DSPE-PEG-maléimide, la fonction maléimide du surfactant se greffe à la fonction cystéine du peptide. Deux types de méthodes ont été testés pour formuler ce nouvel outil :

- la méthode 1 consiste à formuler dans un premier temps des NCLs de 50 nm, d'y insérer par la suite le DSPE-PEG-maléimide au niveau de la coque de la NCL, puis de conjuguer le peptide
- la méthode 2 est basée sur la synthèse d'un monomère de lipopeptides (DSPE-PEG-maléimide + peptide) puis de post-insérer le tout dans la coque de la NCL de 50 nm.

Le choix de la méthode a été fonction des caractéristiques physico-chimiques du nano-objet ainsi que de sa capacité à être internalisé au sein de cellules. Par la suite, ce nouvel outil caractérisé a été testé fonctionnellement en présence d'ADN plasmidique et de siARN spécifiques.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Lipid nanocapsule functionalization by lipopeptides derived from human papillomavirus type-16 capsid for nucleic acid delivery into cancer cells

M. Weyland ^{a,b,1}, A. Griveau ^{a,b,1}, J. Bejaud ^{a,b}, J.-P. Benoit ^{a,b}, P. Coursaget ^c, E. Garcion ^{a,b,*}

^a Inserm U1066, Micro et nanomédecines biomimétiques, F-49933 Angers, France

^b LUNAM Université, F-49933 Angers, France

^c Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31 Avenue Monge, F-37200 Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 February 2013

Received in revised form 6 June 2013

Accepted 10 June 2013

Available online 14 June 2013

Keywords:

Papillomavirus derived peptide

Nanoparticles

DNA

siRNA

Vectorization

Cancer

ABSTRACT

Plasmid DNA (pDNA) and small interfering RNAs (siRNAs) are very useful tools for the treatment of cancer. However, pDNA and siRNAs efficacy is restricted by their negative charge and susceptibility to degradation by endonucleases that prevent them penetrating tissue and cellular barriers such as the plasma and endolysosomal membranes. Viral vectors have some advantages but their use is largely limited by their immunogenicity. On the other hand, synthetic nanoparticles have advantage of being relatively non-immunogenic but their ability to deliver nucleic acids remains less efficient than their viral counterparts. The present study is focussed on the development and evaluation of biomimetic lipid nanocapsules (LNCs) functionalized with a L1 papillomavirus type-16 capsid-derived lipopeptide on their surface, for transfection of U87MG glioma cells and Caco-2 colorectal adenocarcinoma cells with pDNA or siRNAs. Since the L1-peptide has been described as a nuclear localization signal able to complex with nucleic acids and bind to heparan sulfate on the cell surface, the structure and function of L1-peptide bound to LNCs (L1-LNCs) were investigated. Although L1-LNCs were shown to complex with both pDNA and siRNAs, the pDNA-L1-LNC complexes showed only weak transfection efficiency. In contrast, siRNA-L1-LNC complexes appeared as effective repressors of targeted messengers.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Since cancer development relies on the acquired or inherited genetic and epigenetic activation of oncogenes and on the inactivation of tumour suppressor genes, substituting altered genes by healthy plasmid DNA (pDNA) copies may be used for therapy (Ortiz and Endy, 2012). Gene insertion into cancer cells using pDNA may also be useful to render them more sensitive to radio-chemotherapy or to introduce discriminatory suicide genes (Zhang et al., 2008). pDNA-based therapy would also be beneficial for vaccination by generating adaptive immunity against tumour cells notably through MHC class I restricted cytolytic T-lymphocyte responses (Liu, 2011). As well as pDNA, small interfering RNAs (siRNAs), 20–25-nucleotide long double-stranded RNA (dsRNA) fragments, have demonstrated their capacity to mediate specific silencing of homologous genes (Elbashir et al., 2001; Fire et al.,

1998; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000). By interacting with the RNA-induced silencing complex (RISC) located in the cell cytoplasm, siRNAs lead to the degradation of complementary mRNA sequences and thus specifically down regulate the production of the encoded protein. The therapeutic potential of siRNAs has been investigated with some success, leading to clinical trials (Davis et al., 2010).

However, the use of pDNA or siRNAs for therapeutic purposes copies is hindered by efficacy, safety and delivery concerns that limit their clinical application. In order to have the intended effect these nucleic acids need to reach their subcellular targets: the nucleus for pDNA and the RISC complex in the cytoplasm for siRNAs. Hence, multiple tissue and cellular barriers need to be overcome, including intracellular uptake, largely prevented because of their negative charge and hydrophilicity (Lam et al., 2012), ability to escape endolysosomal maturation (El Ouahabi et al., 1997) and susceptibility to degradation by nucleases (Kawabata et al., 1995).

In this context, nanomedicine, represented by liposomes, polymeric nanospheres, lipid nanoparticles or nano-emulsions, may provide a solution. When encapsulated or complexed, the nucleic acid is no longer dependent only on its intrinsic properties but also on those of its carrier. Substantial benefits would be obtained

* Corresponding author at: Inserm U1066, IBS-CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France. Tel.: +33 2 44 68 85 43; fax: +33 2 44 68 85 46.

E-mail address: emmanuel.garcion@univ-angers.fr (E. Garcion).

¹ These authors contributed equally to this work.

in the crossing of biological barriers, the kinetics of nucleic acid release, bioavailability and efficacy in the target organs and cells, preventing side effects and permitting reduction of doses (Peer et al., 2007; Torchilin, 2009). However, although relatively non-toxic or non-immunogenic, non-viral vectors to deliver nucleic acids with only weak transfection efficacy (Perez-Martinez et al., 2011). In contrast, viral vectors are known for their high efficacy of transfection notably due to their well-adapted endolysosomal escape signals (Cho et al., 2003), but faces major limitations due to their immunogenicity and the risk of triggering serious side effects (Hacein-Bey-Abina et al., 2008).

One possibility would be, therefore, to combined the advantages of each of these strategies by functionalizing nanoparticles with biomimetic peptides (Ma et al., 2012). Indeed, following the discovery of the first cell penetrating peptide derived from *Drosophila antennapedia homeodomain* (Derossi et al., 1994), they were investigated for their ability to deliver active molecules into cells (Poillot and De Waard, 2011). Furthermore, for potential therapeutic applications they were combined with nanoparticles (Torchilin, 2009). Biomimetic peptides may be used as active entities on their own or as targeting moieties capable to recognize specific biological components or receptors (Kim and Huang, 2012; Pearce et al., 2012; Ruoslahti, 2012; Su et al., 2012). In this respect, it was recently established that an L1 motif sequence (TSTTA KRKKRKLK) derived from papillomavirus type 16 capsid protein was sufficient to trigger heparan sulfate recognition, endocytosis and efficient gene transfer into target cells (Bousarghin et al., 2003a,b, 2004, 2009).

Thus, by focusing on lipid nanocapsules (LNCs) that have been confirmed as carriers for conventional anticancer drugs (Garcion et al., 2006; Lacoëuille et al., 2007; Weyland et al., 2011) and radiopharmaceutics (Vanpouille-Box et al., 2011), while also eliciting beneficial adjuvant effect such as inhibition of multidrug resistance (Garcion et al., 2006) or endolysosomal escape (Paillard et al., 2010; Roger et al., 2010), the aim of the present study was to develop LNCs combined with the L1-peptide and to investigate their aptitude for the delivery of pDNA and siRNAs to cancer cells.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of control LNCs and Nile Red-loaded LNCs (NR-LNCs)

50 nm LNCs were prepared according to the process described elsewhere (Garcion et al., 2006), using a phase inversion process following the formation of an oil/water microemulsion containing an oily/fatty phase (caprylic-capric acid triglycerides: Labrafac® WL 1349; Gattefossé, Saint-Priest, France), a non-ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate: Solutol® HS15; Basf, Ludwigshafen, Germany) and a lipophilic surfactant (soybean lecithin containing at least 69% of phosphatidylcholine: Lipoid® S75-3; Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany). Briefly, Solutol® HS15, Lipoid® S75-3, Labrafac® WL 1349, NaCl and water (846, 75, 1028, 89 and 2962 mg respectively) were mixed and heated under magnetic stirring to 90 °C. Then, three cycles of progressive heating and cooling between 90 °C and 60 °C were carried out, followed by an irreversible shock induced by dilution with 5 mL of cool deionized water added to the mixture at 80 °C. For the synthesis of fluorescent LNCs, the fluorescent compound Nile Red (NR; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) was used as previously described (Garcion et al., 2006). Briefly, NR was dissolved in acetone at 0.1% (w/w), and the 0.1% NR solution in acetone was incorporated in Labrafac® at 1:10 (w/w). Then, LNCs were prepared as described above with complete evaporation of the acetone during the process. Size exclusion and high-pressure liquid chromatography (HPLC) assays demonstrated a complete

encapsulation and retention of NR within the LNCs (Garcion et al., 2006).

2.2. Method 1: Incorporation of DSPE-PEG2000-maleimide into the LNC shell and peptide conjugation

Firstly, 20 mg DSPE-PEG2000-maleimide (2941.605 g/mol, Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) powder diluted in HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4), was added to 60 mg of LNCs suspension in order to obtain a final concentration of 20 mM. LNCs and DSPE-PEG2000-maleimide were incubated for 2 h at 60 °C. A Sepharose® CL4-B column (Sigma-Aldrich), equilibrated with HEPES buffer, was used to separate the functionalized LNCs from free DSPE-PEG2000-maleimide. The LNC concentration of the mixture was estimated by turbidity at 580 nm using a Multiskan® microplate spectrophotometer (Thermo Electron, Saint-Herblain, France). Secondly, 1.2 mg functionalized LNCs containing DSPE-PEG2000-maleimide were incubated with different amounts (between 0.6 µg and 6 µg of peptides) of L1 papillomavirus-derived peptide (L1; sequence: CTSTTA KRKKRKLK, 1313 g/mol; Millegen, Labège, France) or control peptide (CP; sequence: CLVEETSFIDAGAPS, 1280 g/mol; Millegen) overnight in HEPES buffer at room temperature under magnetic stirring. A Sephadex™ G25 Medium column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) equilibrated with HEPES buffer was used to remove unbound peptides. Turbidimetry measurement was performed for each fraction to detect the nanocapsules. Then, they were pooled and its concentration was assessed by turbidimetric measurement at 580 nm. The amount of peptide grafted in the particles was determined by a micro Bradford colorimetric protein assay kit (microBCA, Perbio Science, Courtaboeuf, France).

2.3. Method 2: Lipopeptide monomer formation and post-insertion in LNC shell

A 1 mM DSPE-PEG2000-maleimide solution was prepared by dissolving 4.3 mg of DSPE-PEG2000-maleimide powder in 1.5 mL of HEPES buffer. To synthesize lipopeptides, DSPE-PEG2000-maleimide solution was incubated in the presence of different amounts of peptide (L1 or CP) overnight, at room temperature under magnetic stirring. The molar ratio of DSPE-PEG2000-maleimide/peptide was varied from 1/0.9 to 1/2.

100 µL of control LNCs at 200 mg/mL were incubated with 1 mL of lipopeptide solution for 4 h at 37 °C under magnetic stirring. A Sephadex™ G25 medium column equilibrated with HEPES buffer was used to separate the peptide-LNCs (L1- or CP-LNCs) from free DSPE-PEG2000-maleimide. To determine the peptide concentrations grafted onto the LNCs, a microBCA assay kit was used according to the manufacturer's instructions. The concentration of LNCs was evaluated by turbidimetric measurements at 580 nm using a Multiskan® microplate spectrophotometer.

2.4. Calculation of the number of peptides at the surface of LNCs following coupling by methods 1 and 2

Considering that all the excipients used in the formulation contribute to the formation of LNCs and the volume of these nanocapsules is mainly due to the Labrafac® (whose relative density is 0.94), it was possible to estimate the number of peptides (NP) on the surface of a single nanoparticle in each sample with the formula: $NP = ([\text{peptide}] \times N_A) / (V_{\text{Labrafac}} / V_{\text{LNC}})$, where [peptide] is the amount of peptide as a molar concentration, N_A is the Avogadro number, V_{Labrafac} is the volume of Labrafac® in the sample and V_{LNC} is the volume of a single LNC calculated from the size measurements employing the volume of sphere formula, $4/3\pi R^3$.

2.5. Formation of nucleic acid-peptide-LNC complexes

Negative control siRNA (control siRNA, sequence: 5'-GUCC-GGAAUUAACCAUGAGU-3'), a siRNA that inhibits the expression of CD133 (CD133 siRNA, sequence: 5'-CCCUUAAUGAUUACCUGA-3') and a siRNA that inhibits the expression of Bcl-2 (Bcl-2 siRNA, sequence: 5'-GUACGAUAACCGGGAGAU-3') were obtained from Sigma-Aldrich. For the formation of complexes, 90 ng of DNA or 0.02 nM of siRNAs were incubated for 90 min at room temperature with different amounts of control LNCs, L1-LNCs or CP-LNCs (from 6 to 300 µg) in a final volume of 20 µL in RNase-free water. The concentration of siRNAs was 1 µM and LNCs concentration varied from 3 to 9 g/L.

2.6. Characterization of LNCs

Suspensions (control LNCs, L1-LNCs and CP-LNCs) were characterized using Zetasizer® Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) for their size, polydispersity index (Pdl) and zeta potential. Before the analysis, the particles were diluted 1/60 times (v/v) in deionized water in order to ensure an appropriate signal intensity at the detector.

2.7. Gel retardation assays

Complexes, diluted in 1X TBE (Tris-Borate-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); Sigma-Aldrich) and gel loading solution (Sigma-Aldrich), were loaded in a 1% agarose gel containing 0.5 µg/mL of ethidium bromide (Sigma-Aldrich). Electrophoresis was carried out at 100 V for 45 min in 1X TBE as running buffer. The gel was visualized under UV lamps using a Vilber Lourmat ChemiSmart 3000 transilluminator (Marne-la-Vallée, France).

2.8. Cell culture

Malignant human glioma cells U87MG and COS-7 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC-LGC Promochem, Molsheim, France). They were cultured at 37 °C/5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Verviers, Belgium) containing 4.5 g/L glucose, 1% antibiotics from stock solution (10,000 units of penicillin, 10 mg of streptomycin, 25 µg amphotericin B/mL; Sigma-Aldrich) supplemented with 10% of foetal bovine serum (FBS; Lonza). They were passaged with 0.5% porcine trypsin and 0.2 mg/mL EDTA (Lonza) when they reached 80% confluence. The medium was replaced with every 3 days. Undifferentiated human colon carcinoma Caco-2 cells, obtained from ATCC-LGC Promochem, were cultivated in DMEM (Lonza) containing 4.5 g/L glucose, 1% antibiotics (Sigma-Aldrich) and 1X non-essential amino acids (NEAA; Lonza) supplemented with 10% of FBS (Lonza). The cells were dissociated in the same way as for the glioblastoma cells lines and the medium was replaced every 2 days until they reached 80% confluence.

2.9. Luciferase expression assays to assess transfection efficacy

In order to test the efficacy of the transfection using nanocarriers, a standardized luciferase assay was performed on COS-7 cell line transfected with firefly luciferase gene containing pGL4 luc2 plasmid transfected with different transfection agents as previously described (Bousarghin et al., 2003a, 2009; Combélas et al., 2010). Briefly, after washing with serum-free medium, COS-7 cells were exposed to the pGL4 luc2 luciferase reporter plasmid (10 µg/mL; Promega, Madison, USA) in the presence of the indicated transfection agent (control LNCs, lipopeptide grafted-LNCs or lipofectamine). Luciferase gene expression was measured by

luminescence assay using the Firefly luciferase assay kit (Interchim Montluçon, France). The luminescence was integrated over 10 s using a Victor2 plate reader (Wallac, PerkinElmer). The results were expressed as counts per second (cps) per well.

2.10. Cellular uptake of NR-LNCs by flow cytometry

U87MG cells were plated at 6×10^4 per wells in 6-well plates in 2 mL of DMEM containing 10% FBS and 1% antibiotics. After 3 days incubation at 37 °C/5% CO₂, serum depletion was carried out for 24 h by replacing the original medium by serum-free DMEM with 1% N1 supplement (Sigma-Aldrich) and 1% antibiotics. U87MG cells were then incubated for 2 h in serum-free medium with NR-LNCs, L1-NR-LNCs or CP-NR-LNCs, derived from method 1 or method 2, at a concentration of 100 µg/mL. Cells were then detached by trypsinization. After centrifugation, they were re-suspended for 1 min in 0.4% (w/v) trypan blue solution in HBSS (Lonza) to quench the extracellular fluorescence, thus enabling the determination of the fraction that was actually internalized. The treated samples were subsequently washed twice in PBS and re-suspended in PBS containing 2% formaldehyde (Prolabo, Fontenay sous Bois, France) and 0.02% azide (Sigma-Aldrich) before analysis by flow cytometry in at least triplicate experiments, with 3000 to 10,000 cells measured in each sample. A BD FACSCalibur™ fluorescent-activated flow cytometer and the BD CellQuest™ software (BD Biosciences, San Jose, California) were used to perform flow cytometry. Analysis was carried out using WinMDI 2.9 software (Scripps Institute, La Jolla, CA, USA). The same experimentation was realized with fluorescent siRNAs coupled with Alexa 488 (Sigma-Aldrich).

2.11. siRNA interference with Bcl-2 expression in U87MG and CD133 expression in Caco-2 cells

U87MG or Caco-2 cells were plated in 6-well plates with 2.5×10^5 cells per well in 2 mL of DMEM containing 10% FBS, 1% antibiotics and 1X NEAA for 24 h at 37 °C/5% CO₂. Serum depletion was carried out for 24 h by replacing the original medium by serum-free DMEM added with 1X N1 supplement and 1% antibiotics. U87MG or Caco-2 cells were transfected for 2 h at 37 °C/5% CO₂ in serum-free medium with 25 nM of siRNAs and 100 µg/mL LNCs (50 µL suspension in the 2 mL wells). N-TER reagent (Sigma-Aldrich) was used as the control agent of transfection and the transfection was performed according to the manufacturer's instructions. The cells were incubated with 5 µg/mL AC133 antibody (Miltenyi Biotec, Paris, France) or with 4 µg/mL Bcl-2 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) or with IgG1 isotype control (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) for 1 h at 4 °C in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Cells were washed three times in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, and incubated for 30 min at 4 °C with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment polyclonal antibody (Dakocytomation, Trappes, France) at 20 µg/mL in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. Following three more washes in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide, cells were re-suspended in PBS containing 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide. A BD FACSCalibur™ and the BD CellQuest™ software were used to acquire the flow cytometry data and the analysis was carried out using WinMDI 2.9 software.

2.12. Reverse transcription and quantitative PCR (RTqPCR)

The cells are recovered and RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), included a QIAshredder step (Qiagen), and a first DNase treatment with a RNase-Free DNase Set (Qiagen). The DNase treatment was carried out with a Turbo DNase Free kit (Ambion, Life Technologies, Paisley, UK) in a final

volume of 25 μ L. RNA was precipitated in ethanol, and the qualitative analysis of RNA from the extract was realized on an Agilent Nano RNA chip. Reverse transcription (RT) reaction from 0.75 μ g of RNA was made with an AccuScript High Fidelity 1st strand kit (Agilent Technologies, les Ulis, France). Quantitative PCR was realized with 1 μ L of the RT sample by a Brilliant II FAST SYBR[®] Green QPCR Master Mixes (Agilent). qPCR was made in Mx3005P (Agilent), with the primer concentration of 400 nM. The expression of three genes was analyzed: β -actin and hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HGPRT, as controls and CD133. The primers for CD133 were those used in the publication of [Platet et al., 2007](#)). The data were analyzed by REST 2009 software.

2.13. Statistical analysis

XLSTAT 2012 Version 2012.6.09 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. Statistical significance for each experiment was determined by Dunnett's test. The tests were considered as significant if the *p* values were less than 0.05.

3. Results and discussion

3.1. Functionalization of the surface of LNCs for nucleic acid delivery: evaluation of two post-insertion methods for the L1-papillomavirus-derived peptide

To investigate the benefit of attaching an L1 papillomavirus derived-peptide to LNCs to improve the delivery of nucleic acids to cancer cells, the ability of control LNCs to bind to DNA was first investigated. As shown on [Fig. 1A](#), after incubation of 90 ng of DNA with increasing amounts of LNCs (between 6 to 300 μ g), control LNCs were not capable of retaining DNA within the wells of agarose gel, indicating their low ability to form complexes with DNA.

In order to complex LNCs with nucleic acids, the possibility of functionalizing them by coupling the L1-peptide derived from human papillomavirus type-16 capsid protein ([Fig. 1B](#)) onto their surface was investigated. Submicron sizes LNCs were synthesized as described in the materials and methods section. Two methods of attachment of the L1-peptide onto the surface of LNCs, both performed on pre-formed LNCs, were investigated ([Fig. 1C](#)). Method 1 used a bi-functional DSPE-PEG2000-maleimide polymer containing a sulfhydryl-reactive maleimide group that was first inserted into the LNCs and then allowed to react with the thiol-function presents on the N-terminal cysteine of the L1-peptide or CP-peptide (as control) ([Fig. 1C](#) and [D](#)). In contrast, in method 2 the same bi-functional polymer was first coupled with the thiolated peptide to form a lipopeptide, which was then inserted into the LNCs ([Fig. 1C](#)). In order to reduce potential alterations in the peptide when it was combined with the DSPE-PEG, the temperature of the insertion step was decreased from 60 °C to 37 °C, and the reaction time was doubled, from 2 h to 4 h. A steric exclusion column was used to separate peptide bound to LNCs from free peptide ([Fig. 1E](#)). Thus, different types of LNCs were obtained all presenting a monomodal size distribution ([Table 1](#)): control LNCs (composed exclusively of a triglyceride core and a shell containing lecithin and an amphiphilic surfactant, the hydroxystearate of polyethylene glycol) and functionalized LNCs carrying DSPE-PEG2000-maleimide (M-LNCs, method 1), L1-LNCs or CP-LNCs from method 1 (10 μ g of peptide for 20 mg LNCs) and L1-LNCs or CP-LNCs from method 2 (1 mg of peptide for 20 mg LNCs was used) ([Fig. 1C](#), [Table 1](#)). The microBCA assay was used to determine the yield of peptide incorporation into LNCs and indicated that about 85% of the peptides used were incorporated onto the LNC surface whatever the method ([Fig. 1E](#)). With method 1, we obtained between 16 and

160 peptides per LNC, whereas with method 2, this number varied between 2066 and 2327 peptides per LNC ([Table 2](#)). The insertion of DSPE-PEG2000-maleimide within the LNC shell by method 1 resulted in a marked reduction of the zeta potential (from –6 to –37 mV) and a clear increase in size (from 50 to 70 nm). Whatever the peptide used, control or L1, for functionalization of LNCs using method 1, the zeta potential of the particle remained clearly negative (–26/–38 mV) ([Table 1](#)). In contrast, during method 2, the zeta potential of newly formed nanocarriers appeared directly dependent on the peptide used and reflected either the positive charge of the L1-peptide or the negative charge of the CP-peptide ([Table 1](#)). Hence, the zeta potential of L1-LNCs was +17 mV while that of CP-LNCs was –27 mV. Interestingly, the post-insertion procedure used in method 2 after the synthesis of the lipopeptide resulted in a moderate change of the LNC size (from 50 to 60 nm for all LNCs) ([Table 1](#)). Although method 1 was previously reported to allow the grafting of immunoglobulin onto the surface of LNCs with a good efficiency ([Beduneau et al., 2008](#)), it is important to note the necessity of using a large excess of DSPE-PEG2000-maleimide to obtain a significant amount of antibody or peptide incorporation. Since the molar ratio between peptide and DSPE-PEG2000-maleimide was about 1/23, many sulfhydryl-reactive maleimide groups were not functionalized after the chemical reaction with method 1. In line with this, it is important to note that the quantity of peptide used for incorporation with method 1 (10 μ g for 20 mg LNCs) was much lower than the amount used with method 2 (1 mg for 20 mg LNCs). However, increasing the amount of peptide during the thiol-maleimide reaction did not result in any improvement of its incorporation, indicating a limited access of the thiolated peptide to sulfhydryl-reactive maleimide group present at the surface of LNCs. Thus, after using method 1, the zeta potential of LNCs remained essentially that of the free negative sulfhydryl-reactive maleimide functions. In contrast, method 2 permitted a 3-fold reduction of the amount of the DSPE-PEG2000-maleimide per LNC, and an increase in the number of peptides present at the surface of the LNC by a factor up to 150 ([Table 2](#)). Since the molar ratio between DSPE-PEG2000-maleimide/peptide was about 1/1, this very efficient incorporation indicated that not only the thiol/maleimide reaction was complete but also the post-insertion of the lipopeptide monomer. As a result, the surface of LNCs functionalized via method 2 appeared to be totally biomimetic and displayed the properties of the L1- or CP-peptides characteristics.

3.2. Evaluation of the ability of LNCs to be internalized by U87MG glioma cells depending on the method of L1-peptide incorporation

In order to further investigate the differences between the two methods of peptide incorporation, LNC internalization by U87MG glioma cells was studied. Thus, peptide-LNCs incorporating the fluorescent tracer Nile red were incubated with U87MG cells for 2 h before determining LNC uptake by fluorescence-activated flow cytometry. To discriminate between association with the cell surface and true internalization, Nile red extracellular fluorescence was quenched by the addition of trypan blue, the non quenched fraction thus representing internalized LNCs ([Paillard et al., 2010](#)). As shown in [Fig. 2](#), Nile red uptake was considerably lower when method 1 was used to functionalize the LNCs (about –40% for M-LNCs and L1-LNCs, and –20% for CP-LNCs) than when LNCs functionalized by method 2 were used (80% for L1-LNCs and 70% for CP-LNCs). Although negatively-charged nanocarriers have been described to be internalized by U87MG cells, the low zeta potential of the nanoparticles prepared by method 1 may have reduced their interaction with the cell-surface negative charges ([Chang et al., 2012](#)). Another important consideration is the free PEG-maleimide functional group present at the surface of the lipid nanocarriers prepared by method 1 may have greatly reduced their uptake though

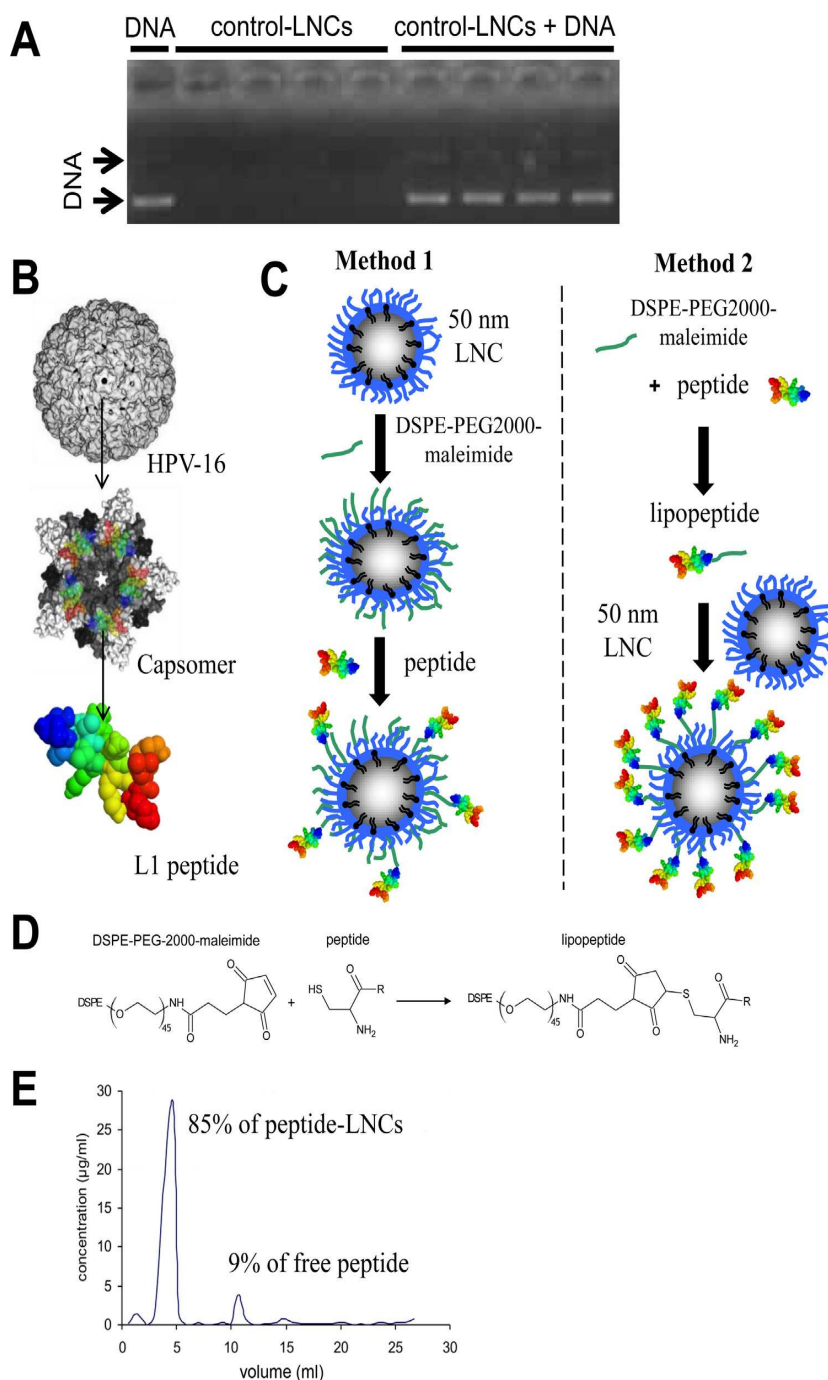


Fig. 1. Interaction of control LNCs with nucleic acids and functionalization using the L1-peptide. A) Gel retardation assay of control LNCs incubated with plasmid DNA. The amount of DNA amount in each well was 90 ng while the amount of LNC was increased from 120 to 300 μg. B) Schematic illustration of the L1-peptide origin from human papillomavirus type 16 capsid representing human papillomavirus type 16 model (HPV-16), isolated capsomer, and L1-peptide. Note that, although the C-terminal part of the L1 protein is situated inside the HPV-16 capsid, its exact localization remains unknown. C) Schematic representation of the coupling peptide to LNCs using two methods: i) method 1: the insertion of DSPE-PEG2000-maleimide in the LNC shell is made before a sulfhydryl-maleimide reaction that allows the grafting of the peptide, ii) method 2: the sulfhydryl-maleimide reaction is first carried out to form a DSPE-PEG2000-peptide monomer that is then inserted in the LNC shell. D) Reaction of the sulfhydryl group of the peptide cysteine and the maleimide extremity of the DSPE-PEG2000-maleimide leads to a stable thioether bonds. E) MicroBCA determination of peptide per fraction recovered in the Sephadex™ G25 medium column. The larger peak corresponds to peptides inserted within LNCs (85%) while the lower represents free peptide (9%).

repulsion, sequestration within the extracellular matrix or adsorption of proteins containing cysteine thiol groups (Salvati et al., 2013). Taking into the relatively low uptake of LNCs prepared with method 1 that was possibly due to low peptide incorporation and the presence of excess free maleimide functional group at the surface, all further experiments were carried out using LNCs prepared by method 2.

3.3. Development and biological evaluation of DNA-L1-LNC complexes

In order to analyze the formation of complexes between L1-LNCs and nucleic acids, the interaction of LNCs with DNA was investigated by a gel retardation assay. For this purpose, increasing amounts of LNCs (6–300 μg) were incubated with a constant

Table 1

Physicochemical characteristics of control and peptide-LNCs obtained with method 1 and 2, including mean diameter, Pdl and zeta potential. Data were obtained from three independent experiments ($n = 3$). Pdl: polydispersity index. Dunnett's test: * $p < 0.001$, comparison with control LNCs; ° $p < 0.001$, comparison between method 1 and method 2.

	Formulations	Mean diameter (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
Control LNCs	LNC	49.4 ± 1.4	0.04 ± 0.01	−6.2 ± 0.4
	NR-LNC	49.1 ± 1.0	0.03 ± 0.01	−5.6 ± 1.2
Peptide LNCs (method 1)	M-LNC	71.8 ± 1.6 *	0.03 ± 0.01	−37.4 ± 2.6 *
	L1-LNC	71.2 ± 1.2 *	0.06 ± 0.01	−38.8 ± 1.5 *
	CP-LNC	72.5 ± 1.5 *	0.07 ± 0.02	−36.2 ± 0.7 *
	M-NR-LNC	70.8 ± 2.0 *	0.18 ± 0.03	−26.9 ± 1.3 *
	L1-NR-LNC	71.8 ± 1.4 *	0.12 ± 0.02	−34.2 ± 1.6 *
	CP-NR-LNC	71.4 ± 1.2 *	0.09 ± 0.02	−33.6 ± 1.2 *
Peptide LNCs (method 2)	L1-LNC	61.5 ± 2.5 *°	0.106 ± 0.02	+17.9 ± 0.5 *°
	CP-LNC	58.5 ± 1.6 *°	0.087 ± 0.01	−28.4 ± 1.5 *°
	L1-NR-LNC	57.3 ± 2.1 *°	0.049 ± 0.02	+17.1 ± 1.3 *°
	CP-NR-LNC	59.9 ± 1.8 *°	0.201 ± 0.02	−26.3 ± 1.8 *°

Table 2

Quantifications of the amount of peptide per LNC associated by method 1 and method 2 expressed as the mass of DSPE-PEG2000-maleimide per mass of LNC, as mass of peptide per mass of LNC and by number of peptides per LNC.

	µg of DSPE-PEG2000-maleimide/mg of LNCs	µg of peptides/mg of LNCs	Peptides/LNC
Method 1	333 µg	2 µg	between 16 and 160
Method 2	99 µg	44 µg	between 2066 and 2327

amount of plasmid DNA (90 ng) in 20 µL for 90 min at room temperature. While L1-LNCs were able to delay or block the migration of DNA in the agarose gel (Fig. 3A), CP-LNCs did not change this DNA migration whatever the concentration tested (Fig. 3B). Decoration of the LNC shell with L1-peptide was, therefore, responsible for the acquisition of a new functionality: the formation of complexes with DNA. Full complexation of the 90 ng of DNA used occurred when 240 µg of L1-LNCs were used (Fig. 3A). In order to define the biological significance of this new property of interaction of L1-LNCs with DNA, transfection of COS-7 cells with a plasmid DNA (pGL4 luc2) expressing the firefly luciferase was investigated using different LNC formulations and lipofectamine as a transfection control. Luciferase expression was followed by luminescence as described above (Section 2.9). Although luciferase activity was detected in the presence of lipofectamine, no luciferase expression was detected when transfected with DNA complexed with control, non-functionalized LNCs (Fig. 3C). Functionalization of LNCs with

L1- or CP-peptide almost had no impact on the expression of pDNA transfected (Fig. 3C). Considering the fact that LNC entry into cells was demonstrated for both types of LNCs combined with DNA: L1-LNCs + DNA (forming complexes) and CP-LNCs + DNA (not forming complexes) (Fig. 3D), this observation suggests that the DNA transported by LNCs cannot reach the nucleus of transfected cells. While they can form complexes with DNA, L1-LNCs do not appear to be an effective transfection agent. Therefore, their utility for the delivery of siRNAs to cancer cells was investigated.

3.4. Development, biological evaluation and physicochemical characterization of siRNA-L1-LNC complexes

In order to determine the ability of the LNCs developed during this work to complex with siRNAs, a siRNA gel retardation assay in the presence of different LNCs was performed. About 133 ng of siRNA was incubated for 90 min at room temperature with 60–180 µg of LNCs in 20 µL of TBE buffer (corresponding final concentrations: 1 µM siRNAs and 3–9 g/L LNCs) before electrophoretic migration. As shown in Fig. 4A, gel retardation demonstrated the complexation of siRNAs to the L1-LNCs but not to the control or CP-LNCs. About 180 µg of L1-LNCs for 133 ng of siRNAs was found to be the best condition for complete complexation of siRNAs (Fig. 4A).

To further investigate the complexation of siRNA with functionalized-LNCs, the physicochemical properties of peptide-LNCs combined with siRNA were analyzed. As shown in Table 3 (in comparison with Table 1), a 12-nm increase in size of LNCs was observed when 133 ng of siRNA was incubated with 180 µg of L1-LNCs in 20 µL (L1-LNC + siRNA). In contrast, no change in size was seen when siRNA was incubated with CP-LNCs (Table 3). In terms of zeta potential, a slight decrease in positive charge was observed for L1-LNCs incubated with siRNA while a slight increase in negative charge was observed for CP-LNCs incubated with siRNA (Table 3). These observations indicate that although siRNAs modify the charge at the surface of L1-LNCs and CP-LNCs, significant complex formation only occurs with L1-LNCs, as shown by the increase in size when combined with siRNAs and the delay in their migration in agarose gel.

The specific silencing capacity of these siRNA-bearing LNCs was then studied in living cells. Two molecular targets were chosen:

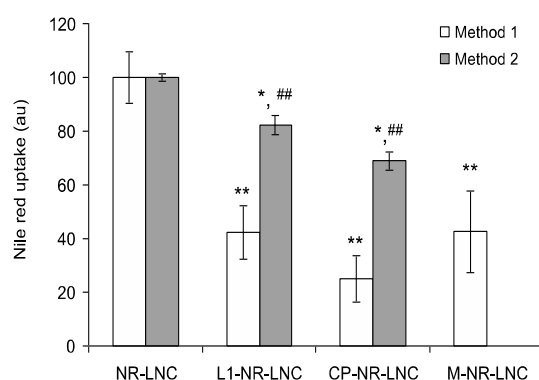


Fig. 2. Comparison of the relative Nile red uptake by U87MG cells between the LNCs (NR-LNC, L1-NR-LNC and CP-NR-LNC) synthesized by method 1 and method 2. U87MG cells were transfected during 2 h at 37 °C and cellular uptake was determined by flow cytometry. Dunnett's test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, comparison with NR-LNCs; ## $p < 0.01$, comparison between method 1 and method 2.

Table 3

Physicochemical characteristics of peptide-LNCs complexed with siRNAs obtained with method 2, including mean diameter, Pdl and zeta potential. Data were obtained from three independent experiments ($n = 3$). Pdl: polydispersity index.

	Mean diameter (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)
L1-LNCs + siRNA	73.4 ± 2.2	0.191 ± 0.05	+11.3 ± 1.9
CP-LNCs + siRNA	60.5 ± 0.7	0.095 ± 0.04	−22.9 ± 0.5

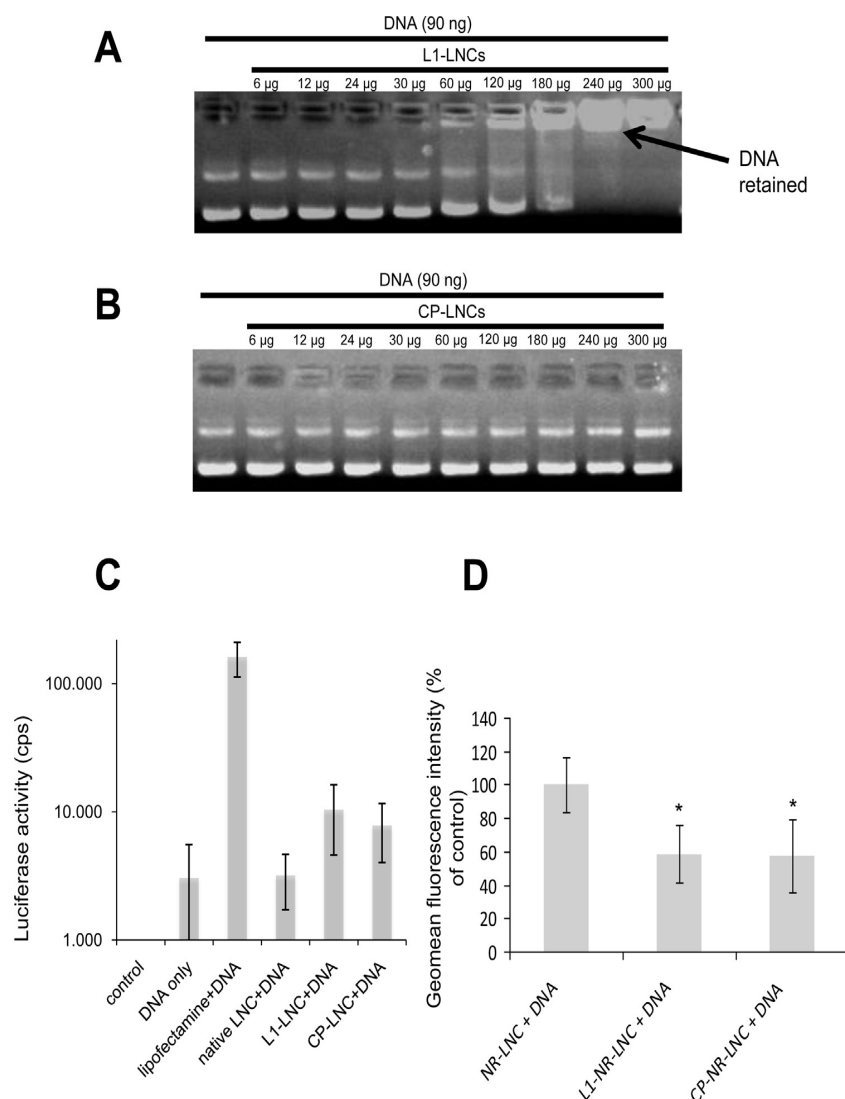


Fig. 3. Gel retardation assay of DNA and functional study. A) Gel retardation assay of DNA complexed with L1-LNCs B) and with CP-LNCs. The amount of DNA was the same in each well: 90 ng. The amount of LNCs was increased from 6 to 300 µg. Lane 1: DNA. Lanes 2 to 10: L1- or CP-LNCs + DNA. C) Efficiency of transfection of COS-7 cells by distinct LNCs formulations in the presence of the pGL4 luc2 plasmid assessed by luminescence measurements. Data were obtained from three independent experiments ($n=3$). cps: count per second. D) Flow cytometry analysis of the relative Nile red uptake within U87MG cells using different LNCs formulations combined with DNA (NR-LNC + DNA, L1-NR-LNC + DNA, CP-NR-LNC + DNA). Data were obtained from three independent experiments ($n=3$). Dunnett's test: * $p < 0.05$, comparison with NR-LNC + DNA.

CD133, the mRNA expression of which was investigated in Caco-2 cells, and Bcl-2, the expression of which was investigated in U87MG cells. As shown in Fig. 4B, RTqPCR assays demonstrated a potent activity of CD133 siRNAs combined with both N-TER peptide and L1-LNCs on CD133 mRNA expression in Caco-2 cells. In contrast, CD133 siRNAs combined with CP-LNCs and control siRNAs in all formulations tested had no effect on CD133 mRNA expression (Fig. 4B). As far as the Bcl-2 target was concerned, flow cytometry analysis demonstrated that treatment of U87MG cells with Bcl-2 siRNAs combined with L1-LNCs resulted in a strong inhibition of the expression of the protein with a fluorescence intensity as low as that obtained with an IgG1 control immunoglobulin (Fig. 4C). All other formulations containing the specific siRNA, including the N-TER peptide, did not produce any significant effect on the Bcl-2 protein expression (Fig. 4C). Although the gene suppression studies were made at the protein level, this observation contrasted with that made on CD133 mRNA expression in Caco-2 cells, in which the N-TER reagent had a similar effect to L1-LNCs. This suggests that the modalities of siRNA silencing triggered by N-TER and L1-LNCs are distinct.

Among the mechanisms that may explain these differences in behaviour between the different nanoparticle systems are differences in endocytosis pathways that have been described for the uptake of non-viral gene delivery systems, including clathrin-mediated endocytosis, caveolae-mediated endocytosis and macropinocytosis (Khalil et al., 2006; Torchilin, 2009). To consider this possibility, the uptake of fluorescent siRNAs into cells was investigated when combined with N-TER peptide, L1-LNCs or CP-LNCs. As shown in Fig. 4D, N-TER peptide was more efficient than L1-LNCs in promoting siRNAs internalization by the cells. Confirming the hypothesis that siRNAs cannot be internalized alone, siRNAs combined with CP-LNCs were not found in the cells after two hours of incubation at 37 °C (Fig. 4D). In parallel, the uptake of Nile red-labelled LNCs complexed with siRNAs was followed in the same cells. Interestingly, although both L1- and CP-LNCs combined with siRNAs were internalized, a more pronounced uptake was observed with L1-LNCs that were complexed with siRNAs (Fig. 4E). This point demonstrated, therefore, that siRNA-L1-LNC complexes are effectively captured by cells, probably due to their size and their positive surface charge allowing interaction with the negatively

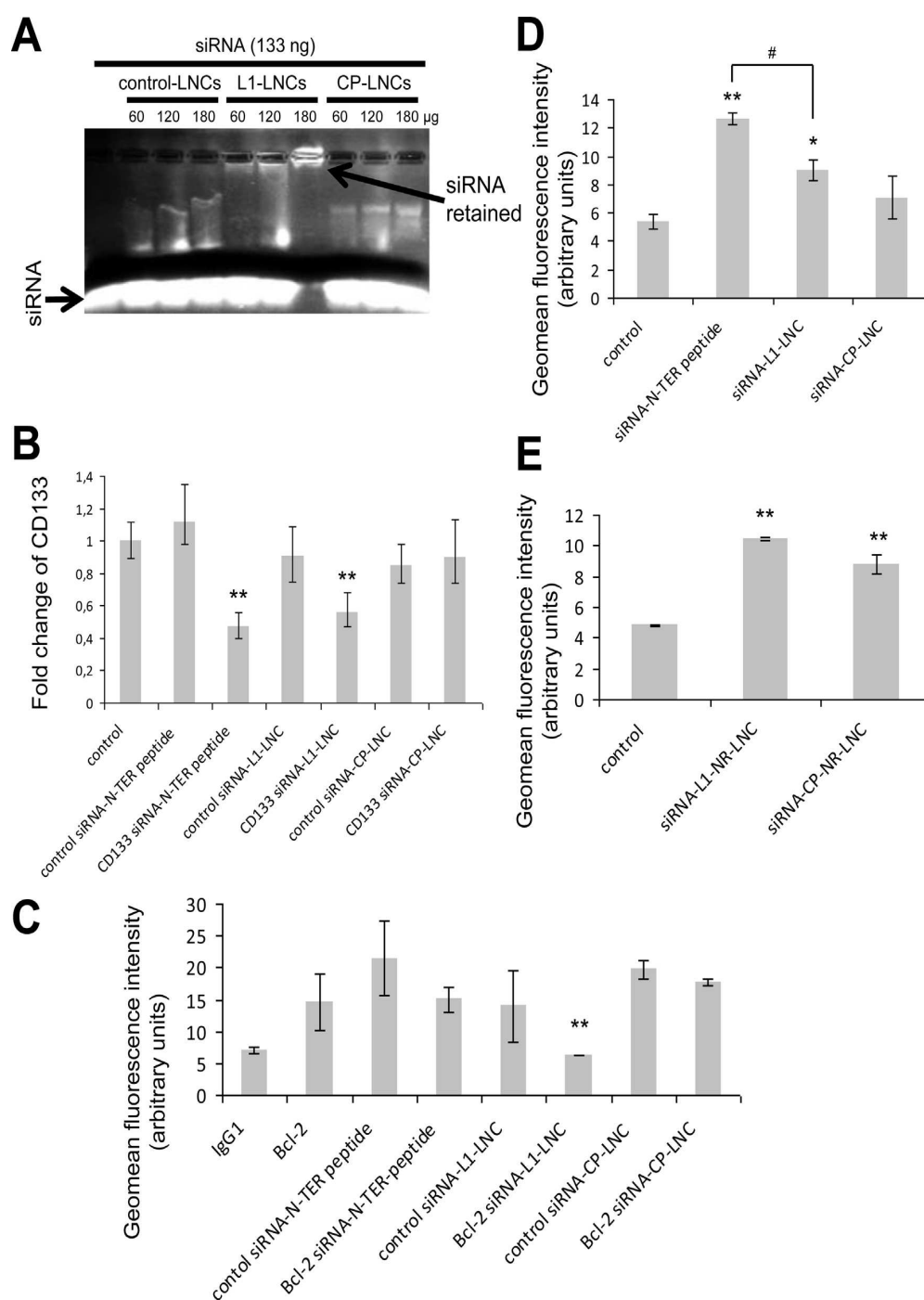


Fig. 4. Gel retardation assay of siRNAs and functional study. A) Gel retardation assay of siRNAs complexed with control LNCs, L1-LNCs and CP-LNCs. siRNA is retained when it is complexed with L1-LNCs. siRNA concentration was the same for each well: 1 µM. The amount of LNCs in each well was increased from 60 to 180 µg. B) RTqPCR analysis of CD133 expression in Caco-2 cells after transfection with control siRNA and CD133 siRNA in different formulations (N-TER, L1-LNC and CP-LNC). Data are normalized with respect to β-actin and were obtained from three independent experiments (n = 3). Dunnett's test: **p < 0.01, comparison with untreated control cells. C) Flow cytometry analysis of Bcl-2 expression in U87MG cells after transfection with control siRNA and Bcl-2 siRNA in different formulations (L1-LNC, CP-LNC and N-TER). Data were obtained from three independent experiments (n = 3). Dunnett's test: **p < 0.01, comparison with cells were treated with Bcl-2. D) Flow cytometry analysis of the relative fluorescent siRNA uptake from different formulations (N-TER, L1-LNC and CP-LNC). Data were obtained from three independent experiments (n = 3). Dunnett's test: **p < 0.01 and *p < 0.05, comparison with untreated control cells; #p < 0.05, comparison between siRNA-N-TER peptide and siRNA-L1-LNC. E) Flow cytometry analysis of the relative Nile red uptake with in L1-LNC and in CP-LNC. Data were obtained from three independent experiments (n = 3). Dunnett's test: **p < 0.01, comparison with untreated control cells.

charged lipids in the outer plasma membrane leaflet (Table 3). Although both N-TER and L1-LNCs promoted siRNAs uptake by cells, the route of endocytosis, the contribution of each pathway and the capability to escape from the endolysosomal compartment may be different (Paillard et al., 2010), thus explaining the different efficiency of silencing. The intracellular distribution of the siRNAs,

which may depend on the carrier system, also represents an important parameter together with potential variations in the localization of the selected mRNA targets within the cell. Finally, the release kinetics and the stability of the siRNAs when complexed to their carrier is also a pivotal issue and may differ between N-TER and L1-LNCs.

4. Conclusion

In conclusion, these data established that the presentation of the L1 papillomavirus-derived peptide at the surface of the nanocarriers might represent a useful tool to deliver siRNAs, while being insufficient to allow gene delivery. In the case of L1-LNCs, this strategy might be valuable not only as siRNA therapeutics for monotherapies using siRNAs but also as adjuvants that can allow downregulation of the expression of a gene for the permissive action of a chemotherapeutic or a radiopharmaceutic agents.

Acknowledgements

We would like to thank Jérôme Cayon and Catherine Guillet from the «Service Commun de Cytométrie et d'Analyses Nucléotidiques» (SCCAN, Angers, France) for skilful technical support. This work was supported by the «Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale» (INSERM), by «La Ligue Nationale Contre le Cancer» throughout an «Equipe Labellisée 2012» grant and by the «Axe Vectorisation et Radiothérapies of the Cancéropôle Grand-Ouest». Marie Weyland was a fellow from «Angers Loire Métropole» and Audrey Griveau a PhD fellow from the «Conseil Général de Maine-et-Loire».

References

- Beduneau, A., Hindre, F., Clavreul, A., Leroux, J.C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2008. Brain targeting using novel lipid nanovectors. *J. Control Release* 126, 44–49.
- Bousarghin, L., Touze, A., Combata-Rojas, A.L., Coursaget, P., 2003a. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J. Gen. Virol.* 84, 157–164.
- Bousarghin, L., Touze, A., Sizaret, P.Y., Coursaget, P., 2003b. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J. Virol.* 77, 3846–3850.
- Bousarghin, L., Touze, A., Yvonnet, B., Coursaget, P., 2004. Positively charged synthetic peptides from structural proteins of papillomaviruses abrogate human papillomavirus infectivity. *J. Med. Virol.* 73, 474–480.
- Bousarghin, L., Touze, A., Gaud, G., Iochmann, S., Alvarez, E., Reverdiu, P., Gaitan, J., Jourdan, M.L., Sizaret, P.Y., Coursaget, P.L., 2009. Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs. *Mol. Cancer Ther.* 8, 357–365.
- Chang, J., Paillard, A., Passirani, C., Morille, M., Benoit, J.P., Betbeder, D., Garcion, E., 2012. Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells. *Pharm. Res.* 29, 1495–1505.
- Cho, Y.W., Kim, J.D., Park, K., 2003. Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 55, 721–734.
- Combela, N., Saussereau, E., Fleury, M.J., Ribeiro, T., Gaitan, J., Duarte-Forero, D.F., Coursaget, P., Touze, A., 2010. Papillomavirus pseudovirions packaged with the L2 gene induce cross-neutralizing antibodies. *J. Transl. Med.* 8, 28.
- Davis, M.E., Zuckerman, J.E., Choi, C.H., Seligson, D., Tolcher, A., Alabi, C.A., Yen, Y., Heidel, J.D., Ribas, A., 2010. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature* 464, 1067–1070.
- Derossi, D., Joliet, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A., 1994. The third helix of the *Antennapedia* homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450.
- El Ouahabi, A., Thiry, M., Pector, V., Fuks, R., Ruysschaert, J.M., Vandenbranden, M., 1997. The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids. *FEBS Lett.* 414, 187–192.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188–200.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., Benoit, J.P., 2006. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1710–1722.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., Asnafi, V., MacIntyre, E., Dal Cortivo, L., Radford, I., Brousse, N., Sigaux, F., Moshous, D., Hauer, J., Borkhardt, A., Belohradsky, B.H., Wintergerst, U., Velez, M.C., Leiva, L., Sorensen, R., Wulffraat, N., Blanche, S., Bushman, F.D., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., 2008. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Invest.* 118, 3132–3142.
- Kawabata, K., Takakura, Y., Hashida, M., 1995. The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm. Res.* 12, 825–830.
- Khalil, I.A., Kogure, K., Akita, H., Harashima, H., 2006. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* 58, 32–45.
- Kim, S.K., Huang, L., 2012. Nanoparticle delivery of a peptide targeting EGFR signaling. *J. Control Release* 157, 279–286.
- Lacoeuille, F., Garcion, E., Benoit, J.P., Lamprecht, A., 2007. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 4612–4617.
- Lam, J.K., Liang, W., Chan, H.K., 2012. Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1–15.
- Liu, M.A., 2011. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol. Rev.* 239, 62–84.
- Ma, Y., Nolte, R.J., Cornelissen, J.J., 2012. Virus-based nanocarriers for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 811–825.
- Ortiz, M.E., Endy, D., 2012. Engineered cell–cell communication via DNA messaging. *J. Biol. Eng.* 6, 16.
- Paillard, A., Hindre, F., Vignes-Colombeix, C., Benoit, J.P., Garcion, E., 2010. The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials* 31, 7542–7554.
- Pearce, T.R., Shroff, K., Kokkoli, E., 2012. Peptide targeted lipid nanoparticles for anticancer drug delivery. *Adv. Mater.* 24, 3803–3822, 3710.
- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2, 751–760.
- Perez-Martinez, F.C., Guerra, J., Posadas, I., Cena, V., 2011. Barriers to non-viral vector-mediated gene delivery in the nervous system. *Pharm. Res.* 28, 1843–1858.
- Platet, N., Liu, S.Y., Atifi, M.E., Oliver, L., Vallette, F.M., Berger, F., Wion, D., 2007. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett.* 258, 286–290.
- Poillot, C., De Waard, M., 2011. Potential of cell penetrating peptides for cell drug delivery. *Med. Sci. (Paris)* 27, 527–534.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., Benoit, J.P., 2010. Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 422–429.
- Ruotsahti, E., 2012. Peptides as targeting elements and tissue penetration devices for nanoparticles. *Adv. Mater.* 24, 3747–3756.
- Salvati, A., Pitek, A.S., Monopoli, M.P., Prapainop, K., Bombelli, F.B., Hristov, D.R., Kelly, P.M., Aberg, C., Mahon, E., Dawson, K.A., 2013. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* 8, 137–143.
- Su, W., Wang, H., Wang, S., Liao, Z., Kang, S., Peng, Y., Han, L., Chang, J., 2012. PEG/RGD-modified magnetic polymeric liposomes for controlled drug release and tumor cell targeting. *Int. J. Pharm.* 426, 170–181.
- Torchilin, V., 2009. Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 431–444.
- Vanpouille-Box, C., Lacoeuille, F., Belloche, C., Lepareur, N., Lemaire, L., Lejeune, J.J., Benoit, J.P., Menei, P., Couturier, O.F., Garcion, E., Hindre, F., 2011. Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* 32, 6781–6790.
- Weyland, M., Manero, F., Paillard, A., Gree, D., Vault, G., Jarret, D., Menei, P., Juin, P., Chourpa, I., Benoit, J.P., Gree, R., Garcion, E., 2011. Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1. *J. Control Release* 151, 74–82.
- Wianny, F., Zernicka-Goetz, M., 2000. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell. Biol.* 2, 70–75.
- Zhang, Y., Wang, C.W., Wang, Z.G., Ma, D.X., Pan, S., Zhu, S.G., Li, F., Wang, B., 2008. Construction of double suicide genes system controlled by MDR1 promoter with targeted expression in drug-resistant glioma cells. *J. Neurooncol.* 86, 3–11.

Le but de ce travail a été de réaliser la synthèse de nanocapsules lipidiques capables de véhiculer des acides nucléiques grâce à l'utilisation d'un peptide dérivé de papillomavirus. La nanocapsule retenue de par ses caractéristiques physico-chimiques et sa capacité à être internalisée dans les cellules est synthétisée de la manière suivante. Un lipopeptide (c'est à dire la mise en incubation d'un peptide et d'une solution de DSPE-PEG-maléimide) est synthétisé, puis celui-ci est post-inséré sur une NCL de 50 nm de diamètre. Cette méthode de synthèse se révèle avantageuse : le nombre de peptide greffé par NCL est considérablement augmenté, son potentiel zêta est dépendant de la charge du peptide post-inséré, l'utilisation du DSPE-PEG-maléimide est réduite. Cette fonctionnalisation de la NCL permet d'obtenir une surface biomimétique des propriétés des peptides greffés. De plus, même modifiées les NCLs présentent une bonne capacité à être internalisées dans les cellules (Paillard *et al.* 2010) (entre 70 et 80%).

La première validation de ce nouveau nano-objet a été réalisée avec de l'ADN plasmidique. La formation de ce complexe a été caractérisée physico-chimiquement puis a été testée biologiquement sur une lignée de GBM, les U87MG. Les résultats montrent que l'ADN plasmidique porté par des NCLs fonctionnalisées n'est pas capable d'atteindre le noyau cellulaire. Suite à ces résultats, les NCLs fonctionnalisées ont été complexées avec des siARN. Par la suite, des études étudiant l'impact de siARN spécifiques de deux cibles moléculaires ont été investiguées : i) sur l'expression de la protéine CD133 dans les cellules Caco-2 (Platet *et al.* 2007) et ii) sur l'expression de la protéine Bcl-2 dans les cellules U87MG.

En ce qui concerne la protéine CD133, son expression est réduite lorsque le siARN est combiné à un agent de transfection commercial (le N-TER peptide) ou aux NCLs fonctionnalisées. Par contre, une réduction de l'expression de la protéine Bcl-2 n'est présente que lorsque le siARN est complexé aux NCLs fonctionnalisées. La différence de mécanismes entre ces deux cibles moléculaires peut s'expliquer par les voies d'endocytose empruntées par les NCLs fonctionnalisées d'une part et par l'agent de transfection commercial d'autre part (Torchilin 2009).

Ce travail a mis en évidence le développement d'un nano-objet fonctionnalisé à sa surface par un peptide dérivé de papillomavirus, qui peut représenter un outil pour la délivrance de siARN. Ce nouvel nano-objet peut également être combiné à l'action d'agents chimio/radiopharmaceutiques.

2.2. Complexation avec des Locked Nucleic Acid

Un nouvel outil a précédemment été développé et caractérisé pour sa capacité à véhiculer des petits acides nucléiques de type, siARN. Dans le contexte du développement de nouvelles approches pour le ciblage spécifique des voies de miARN impliqués dans la radiorésistance des GBM, l'utilisation de ce nouveau nano-objet semble intéressante pour délivrer des leurres oligonucléotides antisens qui interfèrent avec les oncomiRs (Broderick and Zamore 2011). Différentes molécules sont actuellement sur le marché, mais notre choix s'est tourné vers les Locked Nucleic Acid (LNA), des analogues d'acides nucléiques présentant un pont méthylène entre le 2'O et le 4'C du ribose, capables de se lier de manière quasi-irréversible au miR, une résistance accrue aux exo et endonucléases ainsi qu'une inhibition constitutive de l'activité du miARN (Kurreck *et al.* 2002; Stenvang and Kauppinen 2008), mais où il n'existe pas d'endocytose ni d'efficacité de LNA libres.

En nous focalisant sur trois miARN (miR-21, miR-210 et miR-221) décrits comme étant des oncomiRs dans le GBM, la transposition de cet objet pour véhiculer des LNA spécifiques a été investiguée dans une lignée humaine de GBM, les U87MG. L'impact de cette nanomédecine sur la radiosensibilisation des cellules est également étudié.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpharm

Silencing of miR-21 by locked nucleic acid–lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death

A. Griveau^{a,b}, J. Bejaud^{a,b}, S. Anthiya^{a,b}, S. Avril^{a,b}, D. Autret^c, E. Garcion^{a,b,*}^a Inserm U1066, Micro et nanomédecines biomimétiques, F-49933 Angers, France^b LUNAM Université, F-49933 Angers, France^c Institut de Cancérologie de l'Ouest, F-49933 Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 February 2013

Received in revised form 23 April 2013

Accepted 23 May 2013

Available online 31 May 2013

Keywords:

Glioblastoma

MicroRNA

Locked nucleic acid

Lipid nanocapsules

Radiotherapy

ABSTRACT

The recent discovery of microRNA (miRNA) as major post-transcriptional repressors prompt the interest of developing novel approaches to target miRNA pathways to improve therapy. In this context, although the most significant barrier to their widespread clinical use remains delivery, nuclease-resistant locked nucleic acid (LNA) that bind specifically and irreversibly to miRNA represent interesting weapons. Thus, by focusing on oncogenic miR-21 miRNA, which participate to cancer cell resistance to apoptotic signals, the aim of the present study was to investigate the possibility of silencing miRNA by LNA conjugated to lipid nanocapsules (LNCs) as miRNA-targeted nanomedicines in U87MG glioblastoma (GBM) cells. After synthesis of an amphiphilic lipopeptide affine for nucleic acids, a post-insertion procedure during the LNC phase inversion formulation process allowed to construct peptide-conjugated LNCs. Peptide-conjugated LNCs were then incubated with LNAs to allow the formation of complexes characterized in gel retardation assays and by their physicochemical properties. U87MG cell treatment by LNA–LNC complexes resulted in a marked reduction of miR-21 expression as assessed by RTqPCR. In addition, exposure of U87MG cells to LNA–LNC complexes followed by external beam radiation demonstrated a significant improvement of cell sensitivity to treatment and emphasizes the interest to investigate further this miRNA-targeted strategy.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glioblastomas (GBM) are the most common and aggressive primary tumours of the central nervous system (CNS). Despite increasing incidence, their conventional treatment has hardly evolved over the last forty years and remains palliative. It consists of a surgical resection, when possible, combined with a chemoradiotherapy (Stupp et al., 2005). Hence, recurrences are inevitable and patients continue to die within few months. This therapeutic failure raises at least two major problems: firstly, the identification of relevant targets and secondly, the resistance to treatment (Grossman and Bata, 2004).

Among new targets potentially capable of revolutionizing the therapeutic approach of GBM, microRNAs (miRNAs) represent an essential line of research. Indeed, since the first miRNA-identification in 1993 in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993), those single-stranded RNAs of approximately

18–25 nucleotides long revealed their mode of action as post-transcriptional repressors (Bartel, 2009; Carthew and Sontheimer, 2009). They are synthesized as primary miRNAs (pri-miRNAs) from miRNA genes essentially contained in intron sequences of the genome or alternatively in exons. Pri-miRNAs are cleaved in the nucleus by a complex formed by the enzymes Drosha and Pasha for the formation of pre-miRNAs. Pre-miRNAs, about 70-nucleotide long, are then translocated from the nucleus to the cytosol by a GTP-dependant transport involving the exportin-5. Hence, an enzyme from the Dicer family cleaves them allowing the hydrolysis of the hairpin structure to release the miRNA. The double stranded miRNA then interact with a protein from the Argonaute family to form the RNA-induced silencing complex or RISC complex (Bartel, 2009; Carthew and Sontheimer, 2009). During the formation of the RISC complex, there is a transition of miRNA from a double stranded to a single stranded form. By pairing to target messenger RNAs within the RISC complex, miRNAs guide their degradation or repress their translation into protein. Several hundred genes of miRNAs are contained in the genomes of most multicellular organisms and represented, therefore, major regulatory elements (Bartel, 2009; Carthew and Sontheimer, 2009).

* Corresponding author at: Inserm U1066, IBS-CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France. Tel.: +33 2 44 68 85 43; fax: +33 2 44 68 85 46.
E-mail address: emmanuel.garcion@univ-angers.fr (E. Garcion).



Although the miRNA signature in cancer is not fully known and is not yet an element of diagnosis (Calin and Croce, 2006), the role of “oncomiRs” begins to be documented (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). Functional characterization of miRNAs in GBM demonstrate significant roles for miR-21, miR-210 and miR-221 (Malzkorn et al., 2010; Novakova et al., 2009; Pang et al., 2009; Silber et al., 2009). miR-21 is involved in cell resistance to apoptosis (Chan et al., 2005), miR-210 is induced by hypoxia and related to tumour initiation (Huang et al., 2010) and miR-221 induces tumour progression by activating the Akt signalling pathway (Zhang et al., 2010).

In this context, developing novel approaches to target specific miRNA pathways involved in GBM growth or resistance represents a pivotal issue and may result in a major benefit for human health. Hence, for selective modulation of miRNA activity, decoy antisense oligonucleotides that would interfere with oncomiRs have been developed (Broderick and Zamore, 2011). Among those, locked nucleic acid-modified oligonucleotides (LNAs) are single stranded bicyclic RNA analogues composed of ribonucleotides with a methylene bridge which connects the 2' oxygen with the 4' carbon of the ribose (Kurreck et al., 2002; Stenvang and Kauppinen, 2008). LNAs present strong advantages for application to therapy as they are resistant to exo- and endonucleases and irreversibly bind to miRNAs, leading to a constitutive inhibition of their activity (Kurreck et al., 2002). As a matter of fact, the first human phase II miRNA-based therapy was developed in 2010 for hepatitis C and use LNAs synthesized as unconjugated LNA/DNA mixmers (miravirsin, SPC3649, LNA-antimiR™-122, Santaris Pharma) (Elmen et al., 2008; Lanford et al., 2009). Although the complete phosphorothioate backbone of those LNAs is assumed to improve their stability and supports delivery of naked, single-stranded, uncomplexed oligonucleotides to the liver, major obstacles remains to custom miRNA antagonist therapeutics to a larger field of human disease applications, among which stability in specific biological situations, safety, biodistribution and delivery in general. Thus, any improvement in miRNA responsive or targeted chemical design and pharmacokinetic properties will broaden the utility of miRNA therapeutics among which LNAs.

The emergence of nanotechnology and nanomedicines offers here interesting perspectives (Peer et al., 2007). Due to their submicron size and their versatile physicochemical properties, liposomes, polymeric nanospheres, polymeric nanocapsules, lipid nanoparticles or nano-emulsions, can indeed interact in unique fashion with biological systems and offer new opportunities for the delivery of active molecular entities for better efficiency, specificity and biological safety (Peer et al., 2007). Thus, substantial benefits can be obtained concerning biological barriers crossing, kinetics of drug release, drug bioavailability in the target organs and cells, prevention of side effects and reduction of doses (Peer et al., 2007). As such, lipid nanocapsules (LNCs), synthesized without the use of organic solvent according to a phase inversion process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing, an oily/fatty phase, a non-ionic hydrophilic surfactant and a lipophilic surfactant can be adjusted to specific sizes (e.g. 20 nm, 50 nm, 100 nm) with a narrow distribution (Heurtault et al., 2002). They can transport conventional anticancer drug (paclitaxel, etoposide, ferrocifen derivatives, HA14-1 analogues) (Allard et al., 2008; Garcion et al., 2006; Lacoëuille et al., 2007; Paillard et al., 2010; Roger et al., 2009, 2010a,b; Weyland et al., 2011) or radiopharmaceuticals (^{99m}technetium (^{99m}Tc), ¹⁸⁸rhenium (¹⁸⁸Re)) (Ballot et al., 2006; Paillard et al., 2010; Vanpouille-Box et al., 2011). LNCs are also capable to perform intrinsic biological effects among which ability to cross the plasma membrane (Garcion et al., 2006; Lacoëuille et al., 2007), inhibition of multidrug resistance (Garcion et al., 2006; Roger et al., 2010b) and escape from the lysosomal compartment as an important pre-requisite for drugs susceptible to degradation in the endo-lysosomal compartment or required in the cytoplasm and

specialized organelles to exert their action (Paillard et al., 2010). We also demonstrated that surface functionalization of LNCs, especially at chains of poly (ethylene glycol) by incorporating immunoglobulins, offer the possibility of active targeting (Bourseau-Guilmain et al., 2012).

By focusing on known oncongenic miRNAs and on human U87MG GBM cells, the aim of the present work was, therefore, to investigate the possibility of a selective miRNA silencing by LNAs conjugated to LNCs. A new nanomedicine has been developed together with evaluation of the impact of specific miRNA-dedicated “switching off” nanomedicine on sensitization of U87MG cell to radiation induced cell death. Thereby, this work represented a pre-requisite to broaden future miRNA-dedicated LNC applications in pre-clinical and clinical evaluations.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of native LNCs

About 50 nm LNCs were synthesized as described previously (Heurtault et al., 2002) by using a phase inversion process that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily/fatty phase (triglycerides: Labrafac® WL 1349; Gattefossé S.A., Saint-Priest, France), a non ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate: Solutol® HS15; Basf, Ludwigshafen, Germany) and a lipophilic surfactant (lecithins: Lipoïd® S75-3; Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany). Briefly, 846 mg Solutol®, 75 mg Lipoïd®, 1029 mg Labrafac®, 89 mg NaCl and 2975 mg water were mixed and heated up to 85 °C under magnetic stirring. Three cycles of progressive heating and cooling in between 85 and 60 °C were then realized. The lipid nanocapsules were finally obtained by an irreversible shock induced by a rapid dilution with 5 mL of ice-cold deionized water (~0 °C) 1–3 °C below the phase inversion temperature of 80 °C.

2.2. Synthesis of lipopeptides

A 1 mM solution of DSPE-PEG2000-maleimide was prepared by dissolving 4.3 mg of DSPE-PEG2000-maleimide powder (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) in 1.5 mL of HEPES buffer (0.1 M, pH 7.4). To realize the formation of lipopeptides, 1 mL of this DSPE-PEG2000-maleimide solution was incubated in the presence of 1 mg of a L1 papillomavirus-derived peptide (L1, sequence: CTST-TAKRKKRKLK, 1313 g/mol; Millegen, Labège, France) or, instead, a control peptide (CP, sequence: CLVEETSFIDAGAPS, 1280 g/mol; Millegen), for overnight and at room temperature, on a rotating plate set at a low speed. Equimolar ratios of peptides and DSPE-PEG2000-maleimide were used to allow an optimal chemical reaction (Pounder et al., 2008).

2.3. Lipopeptide post-insertion within LNCs

About 100 µL of native LNCs at 200 mg/mL were incubated with 1 mL lipopeptide solutions for 4 h at 37 °C under magnetic stirring. Peptides grafted onto LNCs were separated from free peptides on a PD-10 desalting column containing 8.3 mL of Sephadex™ G-25 Medium (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) and equilibrated with HEPES buffer. To determine peptide concentrations onto LNCs, a micro Bradford colorimetric protein assay (microBCA kit, Perbio Science, Courtaboeuf, France) was performed according to the manufacturer's instructions. Concentrations of L1-conjugated (L1-LNCs) or CP-conjugated LNCs (CP-LNCs) were evaluated by turbidimetric measurements at 580 nm using a Multiskan® microplate spectrophotometer (Thermo Electron, Saint-Herblain, France). Considering that all the excipients used in the formulation contribute to the LNCs and the volume of these nanocapsules is mainly

due to the Labrafac® (whose density is 0.94), it was possible to estimate the approximate number of peptides (NP) on the surface of a single nanoparticle in each sample with the formula: $NP = ([\text{peptide}] \times N_A) / (V_{\text{Labrafac}} / V_{\text{LNC}})$, where $[\text{peptide}]$ is the amount of peptide in mol per unit of volume of sample, N_A is Avogadro number, V_{Labrafac} is the volume of Labrafac® in the sample and V_{LNC} is the volume of a single LNC calculated from size measurements and using the formula of sphere, $4/3 \Delta R^3$.

2.4. Formation of complexes between LNCs and LNAs

Negative control LNAs (LNA control, sequence: 5'-GTGTAACAGCTCTATACGCCA-3') and decoy oligonucleotides LNA-antagomiRs that target human miR-21 and human miR-210 (LNA21, sequences: 5'-CAACATCAGTCTGATAAGCT-3' and LNA210, 5'-GCCGTGTACACGCACA-3', respectively) were obtained from Exiqon (Vedbaek, Denmark). About 0.02 nmol of individual LNAs were incubated with varying amounts of lipopeptide grafted LNCs (60, 120 and 180 µg) and was made to a final volume of 20 µL, using RNase free water. These LNAs/LNCs ratio was used for both gel retardation assays and cell treatments and adapted in volume depending on the experimental requirement. The corresponding concentration of LNAs was 1 µM while the concentration of LNCs varied from 3 to 9 g/L.

2.5. Gel retardation assays

LNA-LNC complexes were diluted in 1× TBE buffer (Tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and gel loading solution (Sigma-Aldrich) before deposition on 1.4% agarose gel containing 4× SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen™, Life Technologies, Paisley, UK) or 0.5 µg/mL ethidium bromide (Sigma-Aldrich). The electrophoretic migration in the gel was then carried out in 1× TBE buffer at 5 V/cm. The gel was photographed under UV illumination using a Vilber Lourmat ChemiSmart 3000 transilluminator (Marne-la-Vallée, France).

2.6. Size and zeta potential determination of LNCs and LNA-LNC complexes

Native LNCs, peptide-conjugated LNCs and LNA-LNC complexes were analysed for their size distribution and zeta potential using a Zetasizer® Nano Series DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcester, UK). Native LNCs, peptide-conjugated LNCs and LNA-LNC complexes were diluted to a ratio 1:60 (v/v) in deionised water in order to ensure a convenient scattered intensity on the detector.

2.7. Cell culture

U87MG glioma cells were obtained from ATCC (LGC Promochem, Molsheim, France). They were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 4.5 g/L glucose and L-glutamine (DMEM, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% of foetal bovine serum (FBS, Lonza) and 1% antibiotics (10 units of penicillin, 10 mg of streptomycin, 25 µg amphotericin B/mL; Sigma-Aldrich) and maintained at 37 °C and 5% CO₂. For passaging, U87MG cells were dissociated with 0.5% porcine trypsin and 0.2 mg/mL EDTA (Lonza) when they reached 80% confluence. The medium was changed every 3 days.

2.8. Cell transfections

U87MG cells were plated at 2×10^5 cells per well in 6-well plates in 2 mL of DMEM containing 10% FBS and 1% antibiotics and

incubated for 24 h. Serum depletion was then allowed for 6 hours by replacing the original medium by serum free DMEM added with 1% N1 supplement (Sigma-Aldrich) and 1% antibiotics. Hence, transfection was made by treating U87MG cells for 4 h at 37 °C/5% CO₂ with 50 µL per 2 mL well of LNA-LNC complexes containing 1 µM LNAs and 7.5 g/L LNCs. Final concentrations on U87MG cells were therefore 25 nM for LNAs and 62.5 mg/L for LNCs. N-TER reagent (Sigma-Aldrich) was used as positive transfection control with LNAs (25 nM final) according to the manufacturer's instructions. Negative controls included treatment of U87MG cells with L1- and CP-LNCs in the absence of LNAs. After transfection treatment, the medium was replaced by DMEM supplemented with 3% FBS and 1% antibiotics, before cells were incubated at 37 °C/5% CO₂ for additional 24, 48 or 72 hours.

2.9. Extraction of miRNAs from cultured cells

Total RNAs were extracted from U87MG cells using the mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion®, AM1560, Life Technologies, Paisley, UK) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were washed with PBS solution (Phosphate Buffer Saline, Lonza) and lysed in lysis/binding buffer and combined to with miRNA homogenate additive. An organic extraction was then carried out with acid phenol/chloroform. The aqueous phase was then applied to a filter cartridge depositing total RNA in the filter. Finally, miRNAs were washed with different wash solutions and eluted using an RNase free elution solution before their concentration was verified and measured using NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

2.10. Reverse transcription

About 45 ng of extracted miRNA were diluted in 3 µL of RNase free water and was used for reverse transcription using the TaqMan® microRNA reverse transcription kit and pre-designed miR-specific TaqMan® MicroRNA Assay primers (Applied Biosystems, Life Technologies). Each 15 µL reverse transcription mix contained 1.01 µL of nuclease-free water, 1.5 µL of 10× reverse transcription buffer, 0.19 µL of RNase-inhibitor (20 U/µL), 0.3 µL of 100 mM dNTPs with dTTP, 3 µL of Multiscribe™ reverse transcription enzyme (50 U/µL) and 6 µL of reverse transcription primer 0.2× (TaqMan® miRNA Assays, SM Scale, Applied Biosystems, Life Technologies). The primers were chosen to specifically to amplify the following targets with the specific sequences, mature hsa-miR-21-5p – UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA, mature hsa-miR-210-3p – CUGUGCGUGUGACAGCGGUGA, mature hsa-miR-221-3p – AGCUACAUGUGUGUGUGUUUC and ATTTGCTATCTGAGAGATG-GTGATGACATTTTAAACCACCAAGATCGCTGATGCA for endogenous control RNU24. Reverse transcription reaction was performed on a MyCycler™ Thermal Cycler (BioRad, Hercules, California) by incubating samples for 30 min at 16 °C, then 30 min at 42 °C and 5 min at 85 °C.

2.11. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RTqPCR)

Onto a 96-well plate, 1.3 µL of the reverse transcription product was transferred into each well and mixed with 18.7 µL of qPCR reaction mix consisting of 1.125 µL of qPCR primer 0.8× (TaqMan® miRNA Assays, SM Scale, Life Technologies), 11.25 µL of TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies) and 8.365 µL of nuclease-free water (Sigma-Aldrich). The qPCR reaction was performed on a Chromo 4™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) programmed for 10 min at 95 °C for, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 60 s at 60 °C. To calculate RTqPCR results, the Ct algorithm method was used with the amount of target, normalized to an endogenous reference and

relative to a control condition, given by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ratio of miRNA target gene in treatment (Sample A) versus control condition (Sample B). $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{miR}} - C_{t_{endogenous\ control}})_{Sample\ A} - (C_{t_{miR}} - C_{t_{endogenous\ control}})_{Sample\ B}$. C_t : threshold cycle for target amplification.

2.12. Combinative radiochemotherapeutic cell treatment

U87MG cells were plated for 24 h at 5×10^4 in 24-well plates in 400 μ L of cell medium of DMEM containing 10% FBS and 1% antibiotics. They were then treated in serum free medium as described in paragraph 2.8 with 25 nM LNAs and 62.5 mg/L LNCs final before being incubated for additional 24 h in DMEM supplemented with 3% FBS and 1% antibiotics at 37 °C/5% CO₂. U87MG cells were then irradiated at 4 Grey (Gy) as indicated using a Clinac® 2100 C/D linear accelerator (Varian Medical Systems, Salt Lake City, USA). The one-photon beam was of 6 MV-energy and the radiation field was 20 cm $\times$ 20 cm at source-axis distance of 100 cm. After irradiation U87MG cells were incubated for additional 48 h in DMEM, 3% FBS, 1% antibiotics at 37 °C/5% CO₂ before performing cell survival analysis.

2.13. MTS cell survival assay

U87MG cell survival was determined using MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) reagent and the CellTiter 96® aqueous non-radioactive cell proliferation assay kit according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières, France). MTS reagent was diluted (1:5) in U87MG cell medium and incubated for 2 h at 37 °C. The absorbance was measured at 492 nm using a Multiskan® microplate spectrophotometer (Thermo Scientific).

2.14. Statistical analysis

XLSTAT 2012 Version 2012.6.09 (Addinsoft Paris, France) was used for data analysis. Statistical significance for each experiment was determined by a Dunnett's test. The tests were considered as significant with *p*-values of less than 0.05.

3. Results

3.1. Expression of miRNAs of interest in U87MG cells

As a first step in the development of a selective miRNA-silencing in GBM employing LNAs conjugated to LNCs, expression of three miRNAs previously described to be associated with GBM growth and development was investigated in U87MG human GBM cells. RTqPCR analysis focused on miR-21, miR-210 and miR-221, with RNU24 as endogenous control, indicated that average threshold cycle for target amplification (*Ct*-values) was low (under 30) for both miR-21 and miR-210, while high (up to 30) for miR-221 (Table 1). Theoretical interpretation of this analysis (Li et al., 2010) established that both miR-210 and miR-21 were effectively

Table 1

Quantification of the expression of miR-221, miR-210 and miR-21 in U87MG cells by RTqPCR analysis normalized to RNU24. Data are expressed as average *Ct*-values from three independent experiments (*n* = 3). *Ct*: threshold cycle.

	Average <i>Ct</i> -values	Standard error
miR-221	31.44	1.30
miR-210	23.14	0.36
miR-21	24.48	0.37

expressed in U87MG cells while miR-221 was expressed only minimally. As a consequence, our following work was focused on the targeting of decoy oligonucleotide LNA-antagomiRs in U87MG cells against human miR-21 and human miR-210 only.

3.2. Development of LNA-LNC complexes

3.2.1. Formation and characterization of peptide-conjugated LNCs

To functionalize the surface of LNCs in order to exhibit a biomimetic papillomavirus, a papillomavirus L1 protein derived peptide (L1 peptide) that can complex with nucleic acids (Bousarghin et al., 2003), an amphiphilic lipopeptide was synthesized for further post-insertion within the LNC shell. To realize the formation of L1-lipopeptide (or CP-lipopeptide as control), the bi-functional DSPE-PEG2000-maleimide polymer containing a sulfhydryl-reactive maleimide group was allowed to react with the thiol-function presents in a N-terminal cysteine of the L1- or CP-synthetic peptides, as described in the Materials and Methods section and shown on Fig. 1A. A post-insertion procedure was then performed to incorporate L1- or CP-lipopeptides into the LNC shell. About 1 μ mol of freshly synthesized lipopeptides (0.91 mM final), obtained from an equimolar mix between 1 μ mol of peptide and 1 μ mol of DSPE-PEG2000-maleimide, was incubated with 20 mg of native-LNCs in 1.1 mL of HEPES buffer at 37 °C for 4 h under magnetic stirring (Fig. 1A). LNCs were then separated from unconjugated peptides and free lipopeptides on a size exclusion column equilibrated with HEPES buffer as described in Section 2. Resulting native-, L1- and CP-LNCs were characterized for size, polydispersity index (PDI) and zeta potential. As shown in Table 2, native LNCs presented a size of about 53 nm and a slightly negative zeta potential of −6 mV. After post-insertion of the lipopeptides, LNCs increased in their size after post-insertion procedure by about 20 nm for CP-LNCs (71 nm) and 30 nm for L1-LNCs (88 nm) while preserving their narrow distribution indicated by a PDI less than 0.1. Strong modifications of the zeta potential were also observed, with L1-LNCs displaying a positive surface charge of +11 mV and CP-LNCs displaying a negative surface charge of −36 mV. This enlargement of LNCs in size and changes in zeta potential, recapitulating the cationic charge of the L1-peptide and anionic charge of CP-peptide, supported both the formation the lipopeptide and the post-insertion of the lipopeptide within the LNC shell. As a confirmation, turbidimetric measurements of the concentrations of L1-LNCs and CP-LNCs combined with microBCA protein quantification demonstrated that 53 nmol of L1-peptide were introduced per mg of L1-LNCs and 47 nmol of CP-peptide per mg of CP-LNCs, thus representing a yield of incorporation within LNCs of 87% and 88% for L1- and CP-peptide,

Table 2

Physicochemical characteristics of native- and peptide-LNCs including mean diameter, PDI, zeta potential and amount of peptide per amount of LNC. Data were obtained from three independent experiments (*n* = 3). PDI: polydispersity index. Dunnett's test: **p* < 0.001, comparison with native LNCs.

Formulations	Mean diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)	nmol peptide/ mg LNC
Native LNCs	53.24 $\pm$ 0.31	0.035 $\pm$ 0.017	−6.00 $\pm$ 0.02	0
L1-LNCs	88.21 $\pm$ 2.14	0.084 $\pm$ 0.017	11.09 $\pm$ 1.09*	53
CP-LNCs	71.65 $\pm$ 2.12	0.085 $\pm$ 0.027	−36.00 $\pm$ 2.04*	47

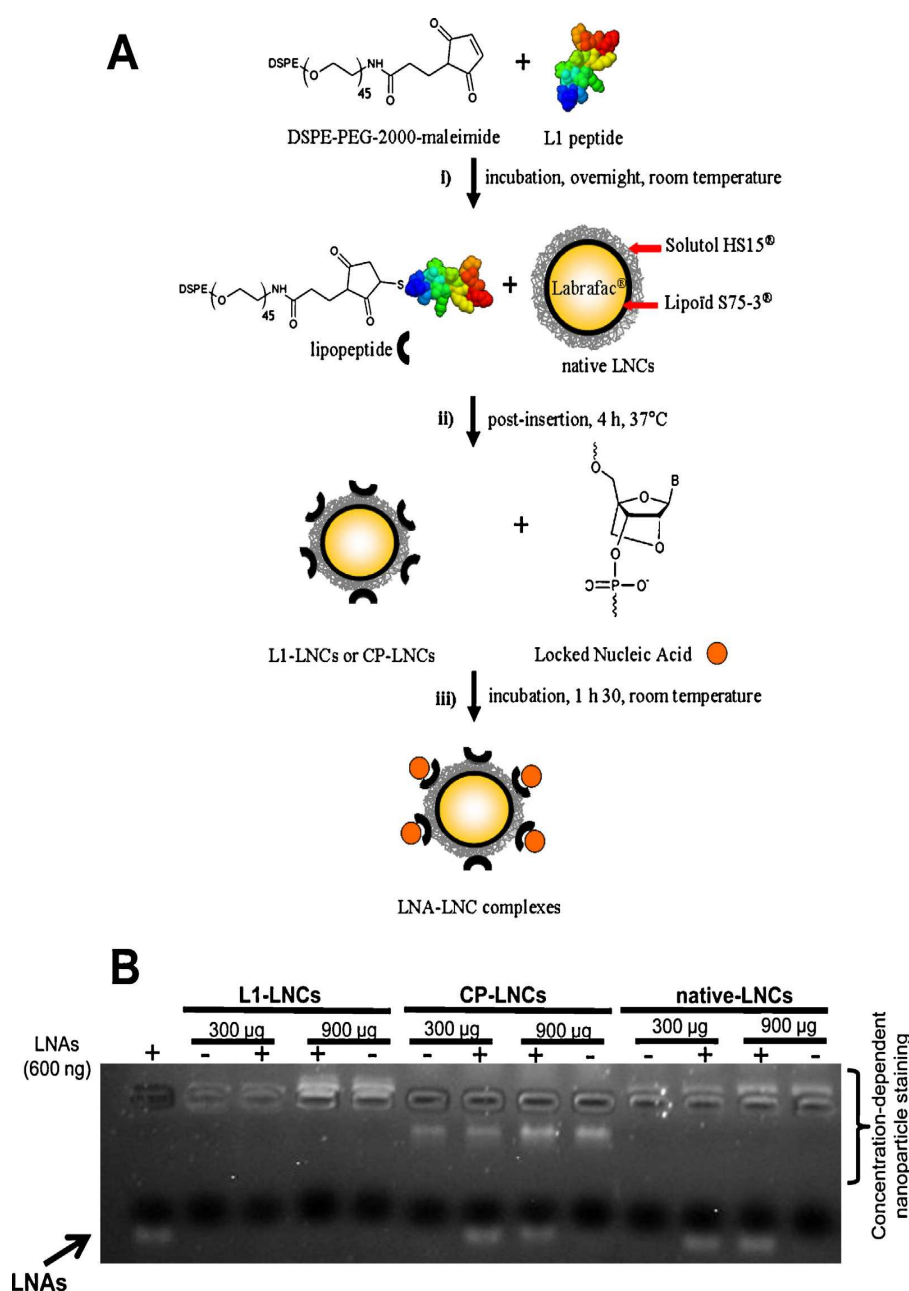


Fig. 1. Synthesis of L1-LNCs and complex formation with LNAs. (A) Schematic representation of the synthesis of LNA-LNC complexes. (i) Firstly, DSPE-PEG2000-maleimide and peptide were incubated to form a lipopeptide, which is then (ii) post-inserted onto native LNCs. (iii) Incubation between peptide-LNCs and LNAs allows the formation of LNA-LNC complexes. (B) Gel retardation assay of LNAs with SYBR[®] Gold. Different complexes were formed between native LNCs and LNAs, L1-LNCs and LNAs as well as CP-LNCs and LNAs. LNA amount was 600 ng each well. LNC concentration increases from 6 to 9 µg/µL in each well.

respectively (Table 2). Number of peptides per single LNC was thus estimated to be approximately, 2327 for L1-LNCs and 2066 for CP-LNCs (see Section 2.3). This indicated that the nature of the peptide used (L1 or CP) did not interfere with the formulation process and supported that an equimolar ratio between thiol (peptides) and maleimide functions was appropriated for lipopeptide formation and post-insertion within the LNC shell (Pounder et al., 2008).

3.2.2. Formation and characterization of LNA-LNC complexes

To study the interaction between LNCs and miRNA-decoy oligonucleotide LNAs on gel, 600 ng (0.1 nmol) of LNAs was incubated with increasing amount of LNCs (300 µg, 600 µg and 900 µg) corresponding to the ratio of 0.02 nmol LNAs to 3–9 g/L LNCs. The

resulting LNA-LNC complexes were allowed to migrate under an electric field. As shown in Fig. 1B and Supplemental Fig. 1, native- or CP-LNCs were unable to effectively bind to LNAs and hence appear on the gel whereas, L1-LNCs were able to bind effectively to the LNAs and do not release the LNAs under the given migration conditions. But, due to the limitation of detection of single stranded LNAs with SYBR[®] Gold Nucleic Acid Gel Stain or with ethidium bromide, a clear dose-dependent binding of LNAs at concentrations ranged between 6 and 9 g/L of LNCs (120 and 180 µg in 20 µL) could not be determined precisely by this method. Considering physicochemical parameters reported in Table 3, LNAs were, as predictable, unable to complex with native LNCs from which the mean diameter was almost unchanged after co-incubation. In contrast,

Table 3

Physicochemical characteristics of LNA–LNC complexes including mean diameter, PDI and zeta potential. Data were obtained from three independent experiments ($n=3$). PDI: polydispersity index. Dunnett's test: $^*p<0.001$, comparison with native LNC–LNA complexes.

Formulations	Mean diameter (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
Native LNCs + LNA21	63.56 $\pm$ 1.30	0.151 $\pm$ 0.029	−0.32 $\pm$ 0.09
Native LNCs + LNA210	68.18 $\pm$ 2.65	0.128 $\pm$ 0.015	−0.45 $\pm$ 0.18
Native LNCs + LNA control	65.05 $\pm$ 1.02	0.103 $\pm$ 0.048	−0.90 $\pm$ 0.56
L1–LNCs + LNA21	99.77 $\pm$ 1.70*	0.174 $\pm$ 0.030	0.94 $\pm$ 0.15
L1–LNCs + LNA210	100.17 $\pm$ 1.43*	0.203 $\pm$ 0.014	1.04 $\pm$ 0.13
L1–LNCs + LNA control	100.05 $\pm$ 2.10*	0.112 $\pm$ 0.068	0.67 $\pm$ 0.07
CP–LNCs + LNA21	93.14 $\pm$ 5.45*	0.196 $\pm$ 0.023	−27.20 $\pm$ 4.70*
CP–LNCs + LNA210	91.41 $\pm$ 2.10*	0.141 $\pm$ 0.056	−25.10 $\pm$ 1.22*
CP–LNCs + LNA control	93.20 $\pm$ 3.81*	0.201 $\pm$ 0.095	−25.30 $\pm$ 2.34*

both L1–LNCs and CP–LNCs presented a 20 nm enlargement after complex formation with LNAs (Table 3). The gel retardation assay thus supports the fact that there are partial interactions of LNAs with CP–LNCs, they did not form stable LNA–LNC complexes in contrast to L1–LNCs. The increase in the polydispersity index after LNAs/LNCs co-incubation supported a heterogeneous complex formation and alternatively the presence of free LNAs. Modifications of the zeta potential in the three formulations recapitulated an average between the positive LNC surface charge and the negative charge of LNAs. Thus, L1–LNCs incubated with different LNAs do not displayed anymore a positive surface charge (+11.09 mV) but instead a neutral one (between +0.67 and +1.04 mV) due to the formation of complexes with LNAs at the concentration of 7.5 g/L (Table 3). Thus, the concentrations of 1 μ M LNAs and 7.5 g/L LNCs were retained for the formation of LNA–LNC complexes further used in functional assays.

3.3. Effect of LNA–LNC complexes on specific mature miRNA levels

To detail the mechanism of action of decoy oligonucleotide LNA-antagomiRs and study their impact on specific miRNA levels, U87MG cells were treated as described in the Materials and Methods section with LNA–LNC complexes or instead with LNAs mixed with N-TER reagent, used as a positive transfection control. 24, 48 or 72 h after transfection, total miRNAs were extracted from U87MG cells. Mature miR-21 and miR-210 expression was then analysed by RTqPCR with RNU24 representing the endogenous reference. As shown in Fig. 2A (48 h after transfection), while the relative expression of miR-21 was specifically reduced by the LNA21–L1–LNCs treatment (45% inhibition), neither LNA control–L1–LNCs treatment nor LNA210–L1–LNCs treatment modified miR-21 levels. Very similar data were obtained when using the N-TER reagent, with a robust inhibition of miR-21 by LNA21–N-TER mix (85%) and an absence of effect of LNA control–N-TER mix or LNA210–N-TER mix on miR-21. Interestingly, although LNA21–N-TER was having the strongest impact on miR-21 expression at 24 and 48 h after transfection, this effect disappeared at 72 h when LNA21–L1–LNCs were still inhibiting miR-21 expression (Fig. 1B, Supplemental Fig. 2). This observation is important as not only the amplitude but also the kinetic of LNA inhibitory effects would affect related miRNA networks. On the contrary when using LNAs targeting miR-210 no effects of LNA–LNC complexes or LNAs combined with N-TER reagent were observed (Fig. 2C). This observation is in favour of distinct modalities of regulation of mature miR-210 as compare with mature miR-21 and/or a low functional impact of the LNA210 sequence used in this study, on U87MG cells grown in hyperoxic conditions (21% O₂), while being already described to inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3 in endothelial cells grown in hypoxia (1% O₂) (Fasanaro et al., 2008).

3.4. Functional effect of LNA–LNC complexes on U87MG cell survival

To study the functional effectiveness of targeted miRNA-silencing in cancer cells in the context of resistance to radiotherapy, U87MG cells were exposed to LNA–LNC complexes alone or in combination with radiation beam. The N-TER reagent was used as a control for transfection. U87MG cells were exposed for 4 hours to LNA–LNC complexes in serum-free medium as described in Section 2. After renewal of the medium the cells were incubated for 24 hours at 37 °C/5%CO₂ before being submitted to external beam radiation at the dose of 4 Gy. An additional incubation of 48 hours at 37 °C/5%CO₂ was applied before analysis of cell survival by use of the MTS assay. As shown in Fig. 3 and in all conditions considered (0 or 4 Gy), when combined with N-TER transfection reagent, neither LNA control, LNA21 nor LNA210 had an impact on U87MG cell viability. In contrast, when complexed with L1–LNCs, LNA21 strongly reduced cell viability already in the absence of irradiation (60% decrease) (Fig. 3). This effect is further amplified by irradiation with an 80% decrease of cell survival induced by LNA21 L1–LNCs. Importantly, although L1–LNCs treatment in the absence of LNAs proved its harmlessness against U87MG cells in all conditions tested, LNA control–L1–LNCs treatment reduced U87MG cell survival. Interestingly, this effect of the LNA control was non synergistic of irradiation (Fig. 3). In comparison to LNA21, LNA210 complexed with L1–LNCs a minor effect on U87MG cell survival (Fig. 3). Finally, treatments using LNAs combined with CP–LNCs, which demonstrated their inability to form stable complexes with LNAs, were unable to affect U87MG cell survival (Fig. 3).

4. Discussion

Due to the role of miRNAs in the molecular control of biological events, specific targeting of the miRNA machinery may result in a major breakthrough in the development of effective strategies against human diseases. The present study demonstrated that newly designed LNCs are capable to deliver active miRNA-selective decoy antisense LNA oligonucleotides within GBM cancer cells. It also emphasized the contribution of miR-21 in glioma cell survival in response to beam radiation.

4.1. LNA-antagomiRs vectorization by LNCs

Due to their high stability and high potency binding to miRNA targets with increased specificity and sensitivity as compared to classical DNA- or RNA-oligonucleotide probes, LNA antisense oligonucleotides represented important weapons against oncomiRs. In the multiplicity of possibilities for their delivery, and considering the large variety of nanocarriers available, LNCs were investigated. These nanoparticles are composed of FDA approved

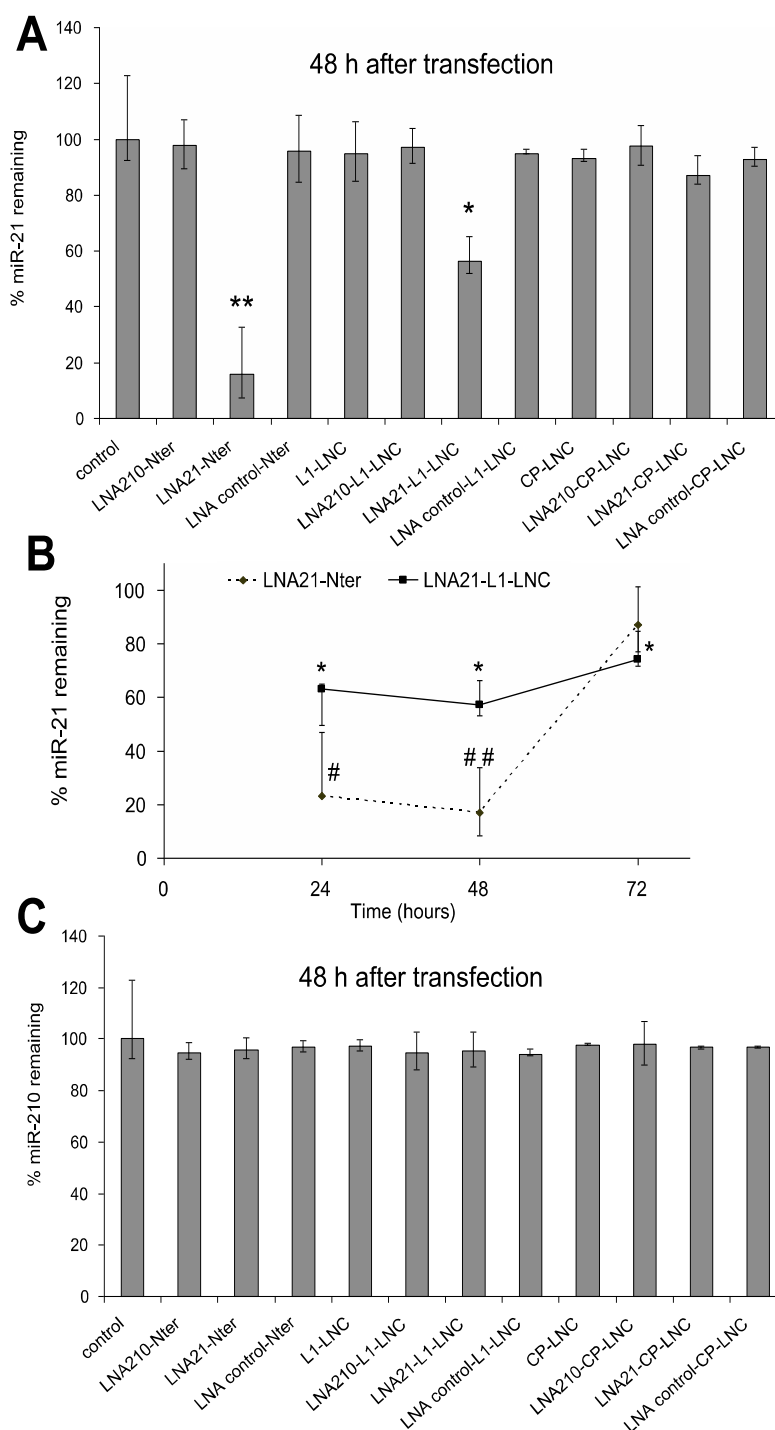


Fig. 2. RTqPCR analysis of miRNA silencing in U87MG cells after treatment with LNA control, LNA21 and LNA210 in distinct formulations (N-TER, L1-LNCs and CP-LNCs). (A) miR-21 expression after 48 h. (B) Kinetics of miR-21 expression after LNA21–N-TER and LNA21–L1-LNCs transfection. (C) miR-210 expression after 48 h. Data are normalized with respect to RNU24 and were obtained from three independent experiments ($n=3$). Note the selectivity of the LNA21 treatment on miR-21 with an absence of effect of LNA210 on miR-21 (A) and reciprocally an absence of effect of LNA21 on miR-210 (C). Dunnett's test: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, comparison with untreated control cells; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$, comparison with untreated control cells (LNA21–N-TER, (B)).

excipients and have the potential to overcome several technological bottlenecks inherent to the activity of LNAs that include: intracellular uptake (Garcion et al., 2006; Lacoeuille et al., 2007), endolysosomal escape (Paillard et al., 2010) and a sufficient time residence within the cytoplasm for LNAs to find their miRNA targets (Garcion et al., 2006; Paillard et al., 2010). Moreover, LNCs can be administered locally in GBM tumour by stereotactic surgery

(Vinchon-Petit et al., 2009). The LNCs have a lipophilic core in which it has been possible to encapsulate numerous hydrophobic anticancer drugs (Garcion et al., 2006; Lacoeuille et al., 2007; Vanpouille-Box et al., 2011; Weyland et al., 2011) and in which it is theoretically possible to incorporate hydrophilic drugs (Anton et al., 2010; Vrignaud et al., 2011). It is also possible to functionalize the LNC shell for targeting purposes (Beduneau et al., 2008;

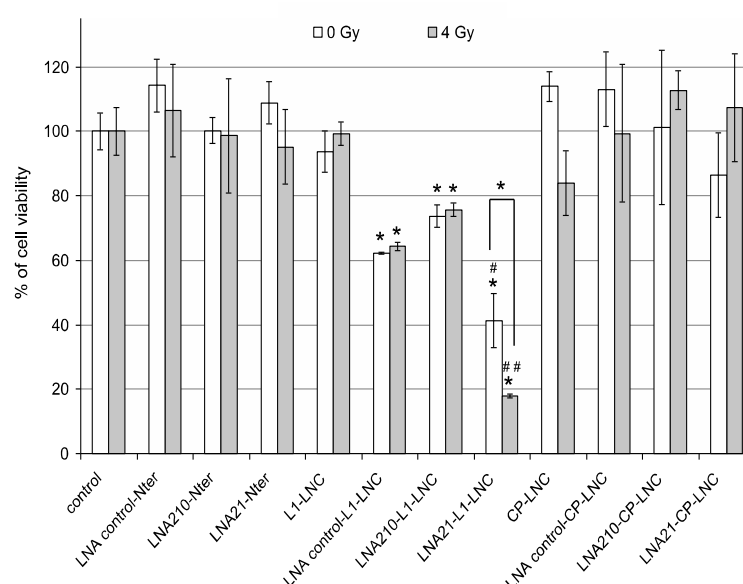


Fig. 3. Effect of a combination treatment between miRNA silencing and irradiation on U87MG cell survival. U87MG cell survival was assessed by MTS assay. Cells were treated with LNA control, LNA21 and LNA210 in distinct formulations (N-TER, L1-LNCs and CP-LNCs) at the concentration of 25 nM before being submitted to external beam radiations at 4 Gy. 48 h after irradiation, an MTS assay was performed. Note the effect of LNA21–L1-LNCs in contrast with L1-LNCs alone or with LNA21–N-TER. Note also the potentiating effect when combined with irradiation that had no effect on its own. Gy: Grey. Dunnett's test: * $p < 0.01$, comparison with untreated or vehicle treated cells with or without external beam radiation; # $p < 0.01$ and ## $p < 0.001$, comparison between LNA control and LNA21; ⊙ $p < 0.01$, comparison between LNA21–0 Gy and LNA21–4 Gy.

Bourseau-Guilmain et al., 2012). In the context of the circumvention of the resistance to therapy and to consider the use of LNAs as synergistic signals for cancer cell sensitiveness to LNCs delivered drugs, surface functionalization of LNCs for their complexation with LNAs has been considered. The zeta potential of native LNCs is slightly negative (–6 mV) and do not confer them the possibility to complex with negatively charged single-stranded LNAs. Thus, by incorporating within the LNC shell a biomimetic amphiphilic lipopeptide derived from an L1 papillomavirus sequence that can complex with nucleic acids it has been possible to modify the surface charge of the LNCs with a clearly positive zeta potential (+11 mV) while keeping their size under 100 nm. Interestingly, with a very high yield of lipopeptide incorporation (of about 90% by consideration of initial peptide amounts), the estimated number of peptides at the surface of a single nanoparticle was found to be up to 2000, thus supporting for L1-LNCs a great capacity of interaction with LNAs. With respect to the equimolar ratios of peptides and DSPE-PEG2000-maleimide used in this study to allow an optimal chemical reaction (Pounder et al., 2008), the quasi-absence of free maleimide functions at the surface of LNCs can be deduced. Gel retardation assays as well as physicochemical characterization of L1-LNCs after complex formation with LNAs confirmed these statements with a zeta potential back to neutral, a slight increase of LNCs in size (105 nm) and an inhibition of the migration of LNAs in agarose gels. In contrast, although CP-LNCs increase their size after incubation with LNAs, their zeta potential remained strongly negative and they were unable to delay LNAs migration in agarose gels. Importantly, the neutral charge of LNA–L1-LNCs supported their endocytosis by U87MG glioma cells. In contrast, LNA–CP-LNCs, which appears as separate entities, with one side LNAs and the other CP-LNCs, would likely not be capable to interfere with negatively charge plasma membranes for further cellular uptake. If the formation of LNA–L1-LNC complexes is here demonstrated, the ability of L1-LNCs to convey unaltered LNAs within cells remained to be established. In this sense, the degree of interaction between LNAs and the surface of LNCs is an important parameter. In this study, given the observed efficacy of

LNA21–L1-LNCs, a single concentration of post-inserted lipopeptide was tested. However, it would have been possible to reduce the amount of peptide on the surface of LNCs to reduce their binding capacity to the LNAs in order they can be released to display their activity as free decoy oligonucleotides within the cell cytoplasm (Tarahovsky et al., 2004). Alternatively, the complexation of LNAs with LNCs may reinforce their already good stability until they reach their intracellular miRNA target (Raouane et al., 2012).

4.2. Functional impact of LNA–L1-LNCs on selective miRNA targets and synergy with beam radiation on cancer cell survival

Based on RTqPCR experiments that relate the amount of a given mature miRNAs within U87MG cells and thus the potency of LNAs to selectively bind and sequestrate or sequester them, the activity of LNA–L1-LNCs was in this study demonstrated. Although, the activity of the N-TER reagent was also observed, the relation between the amount of mature miRNA targets and the biological function, here sensitiveness to irradiation was not systematic. As such, LNA21–L1-LNCs had an effect on the survival of U87MG cells while LNA21–N-TER treatment had not. By consideration of the kinetic and the amplitude of expression of miR-21, the robust and transient effect of LNA21–N-TER appears less efficient than the low but long-lasting effect of LNA21–L1-LNCs to induce cell death related to the inhibition of miR-21. Hence, the RTqPCR reflects a snapshot that does not allow access to all the mechanisms regulating miRNAs in terms of kinetic. As such a negative feedback has been described between miR-9 and CREB within glioma cells in which CREB stimulated miR-9 synthesis while miR-9 directly target the 3'UTR of CREB (Tan et al., 2012). Moreover, if miR-210 do not appears to be modulated by LNA210 whatever the carrier system used, a negative effect of LNA210–L1-LNCs was observed on the survival of U87MG cells after beam radiation, like with LNA control–L1-LNCs. This indicated that the LNA control used in this study is not fully ineffective, as free L1-LNCs were not affecting cell survival on their own even when combined with irradiation. In line with this, an adjuvant effect of

LNCs when combined with LNAs may occur, thus resulting in LNA sequence-independent radiation-induced cell death. However, as the physicochemical parameters of the LNA–LNC complexes do not differ depending on the LNA sequence used, the differences in cell death induction observed while using distinct LNA–LNC complexes should be primarily ascribe to the bio-molecular activity of LNAs rather than to the toxicity of LNA–LNC complexes. Alternatively, adjuvant effects of LNCs could be involved to further potentiate the activity of LNAs, like intrinsic properties they displayed on endolysosomal escape (Paillard et al., 2010) or on multidrug resistance bypass (Garcion et al., 2006). As such, endolysosomal escape of LNAs is important to keep them intact but also to allow them finding their target. The data obtained demonstrated, therefore, the efficacy of a silencing of miR-21 by LNA–LNC complexes that sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. The timing between the treatment with LNAs and irradiation should consider the subcellular bioavailability of LNAs and their time-dependent effects on miRNAs and related downstream protein targets. Hence, the notion of critical period is important as if *in vitro* activity of LNA–L1–LNCs has been established the timing of LNA efficacy when followed by irradiation remains to be determined *in vivo*. In this sense, the opposite combination with irradiation followed by LNA treatment that we have also investigated had no effect on cell viability (Griveau et al., unpublished observations).

4.3. Particular features of the nanocarrier of LNA developed

The use of LNA21 has already been investigated in U87MG cells. As such, Corsten et al., demonstrated that in the presence of lipofectamine, 50 nM LNA21 reduced the survival of U87MG cells by 20% and potentiate the efficacy of a chemotherapeutic treatment targeting S-TRAIL (Corsten et al., 2007). Interestingly, although the dose of LNA21 used in our study was 25 nM, the impact of LNA21–L1–LNCs is also potentiating radiotherapeutic efficacy against U87MG cells. Among the already developed LNA-delivery nanosystems, exemplified by solid lipid nanoparticle incorporating lipoplexes (Shi et al., 2012), or by polyethyleneimine-grafted graphene nanoribbon (Dong et al., 2011), these LNCs, presenting a L1 peptide onto their surface, offer the opportunity to deliver LNAs from the shell that can be ultimately combined to a hydrophobic drug (Garcion et al., 2006) or a radiopharmaceutic (Vanpouille-Box et al., 2011) released from the core, thus leading to a synergistic action. In addition, the possibility of integrating a targeting moiety that can be associated with the L1 peptide onto their surface by using the same monomer post-insertion method may confer further functionality to this nanomedicine (Bourseau-Guilmain et al., 2012). In parallel of studies that aim to determine relevant human GBM miRNA targets specially expressed in response to radiotherapy and involved in radioresistance (Stupp et al., 2005), *in vivo* studies using LNA21–L1–LNCs combined with external beam radiation will be now investigated.

5. Conclusion

Taken together our data demonstrated that newly developed LNCs represented an interesting tool to convey LNAs within GBM cells to silence well define miRNA pathways. Moreover they emphasized that application of selective LNA–LNCs in combination with beam radiation could trigger beneficial synergistic effects to overcome radioresistance.

Acknowledgements

We would like to thank Jérôme Cayon from the “Service Commun de Cytométrie et d’Analyses Nucléotidiques” (SCCAN, Angers,

France) and Magali Edouard from the “Institut de Cancérologie de l’Ouest” (ICO, Angers, France) for skilful technical support. This work was supported by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), by “La Ligue Nationale Contre le Cancer” throughout an “Equipe Labellisée 2012” grant and by the “Axe Vectorization and Radiothérapies de the Cancéropôle Grand-Ouest” throughout the “Appel d’Offre Interne (AOI) 2011: soutien à l’émergence de nouveaux projets de recherche” and the contribution of “La Région des Pays de la Loire”. Audrey Griveau was a Ph.D. fellow from the “Conseil Général de Maine-et-Loire”. Shubaash Anthiya was a Ph.D. fellow from the Erasmus Mondus NanoFar European doctorate program in nanomedicine and pharmaceutical innovation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.049>.

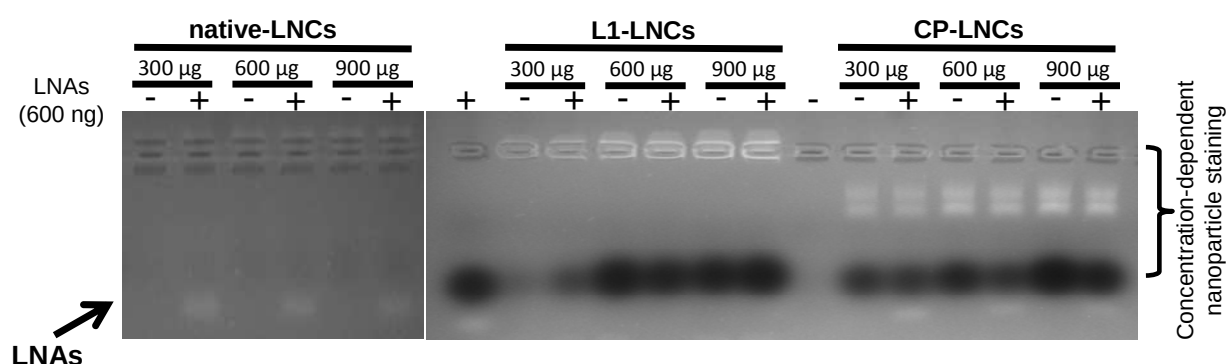
References

- Allard, E., Passirani, C., Garcion, E., Pigeon, P., Vessieres, A., Jaouen, G., Benoit, J.P., 2008. Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas. *J. Control. Release* 130, 146–153.
- Anton, N., Mojzisova, H., Porcher, E., Benoit, J.P., Saulnier, P., 2010. Reverse micelle-loaded lipid nano-emulsions: new technology for nano-encapsulation of hydrophilic materials. *Int. J. Pharm.* 398, 204–209.
- Ballot, S., Noiret, N., Hindre, F., Denizot, B., Garin, E., Rajerison, H., Benoit, J.P., 2006. ^{99m}Tc/188Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and biodistribution. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 33, 602–607.
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Beduneau, A., Hindre, F., Clavreul, A., Leroux, J.C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2008. Brain targeting using novel lipid nanovectors. *J. Control. Release* 126, 44–49.
- Bourseau-Guilmain, E., Bejaud, J., Griveau, A., Lautram, N., Hindre, F., Weyland, M., Benoit, J.P., Garcion, E., 2012. Development and characterization of immunonanocarriers targeting the cancer stem cell marker AC133. *Int. J. Pharm.* 423, 93–101.
- Bousarghin, L., Touze, A., Combata-Rojas, A.L., Coursaget, P., 2003. Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor. *J. Gen. Virol.* 84, 157–164.
- Broderick, J.A., Zamore, P.D., 2011. MicroRNA therapeutics. *Gene Ther.* 18, 1104–1110.
- Calin, G.A., Croce, C.M., 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857–866.
- Carthew, R.W., Sontheimer, E.J., 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M., Kosik, K.S., 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65, 6029–6033.
- Corsten, M.F., Miranda, R., Kasmieh, R., Krichevsky, A.M., Weissleder, R., Shah, K., 2007. MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth *in vivo* and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res.* 67, 8994–9000.
- Dong, H., Ding, L., Yan, F., Ji, H., Ju, H., 2011. The use of polyethyleneimine-grafted graphene nanoribbon for cellular delivery of locked nucleic acid modified molecular beacon for recognition of microRNA. *Biomaterials* 32, 3875–3882.
- Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H.F., Berger, U., Gullans, S., Kearney, P., Sarnow, P., Straarup, E.M., Kauppinen, S., 2008. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896–899.
- Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., 2006. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259–269.
- Fasanaro, P., D’Alessandra, Y., Di Stefano, V., Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., Martelli, F., 2008. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3. *J. Biol. Chem.* 283, 15878–15883.
- Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., Menei, P., Benoit, J.P., 2006. A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1710–1722.
- Grossman, S.A., Batara, J.F., 2004. Current management of glioblastoma multiforme. *Semin. Oncol.* 31, 635–644.
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoit, J.P., 2002. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 19, 875–880.

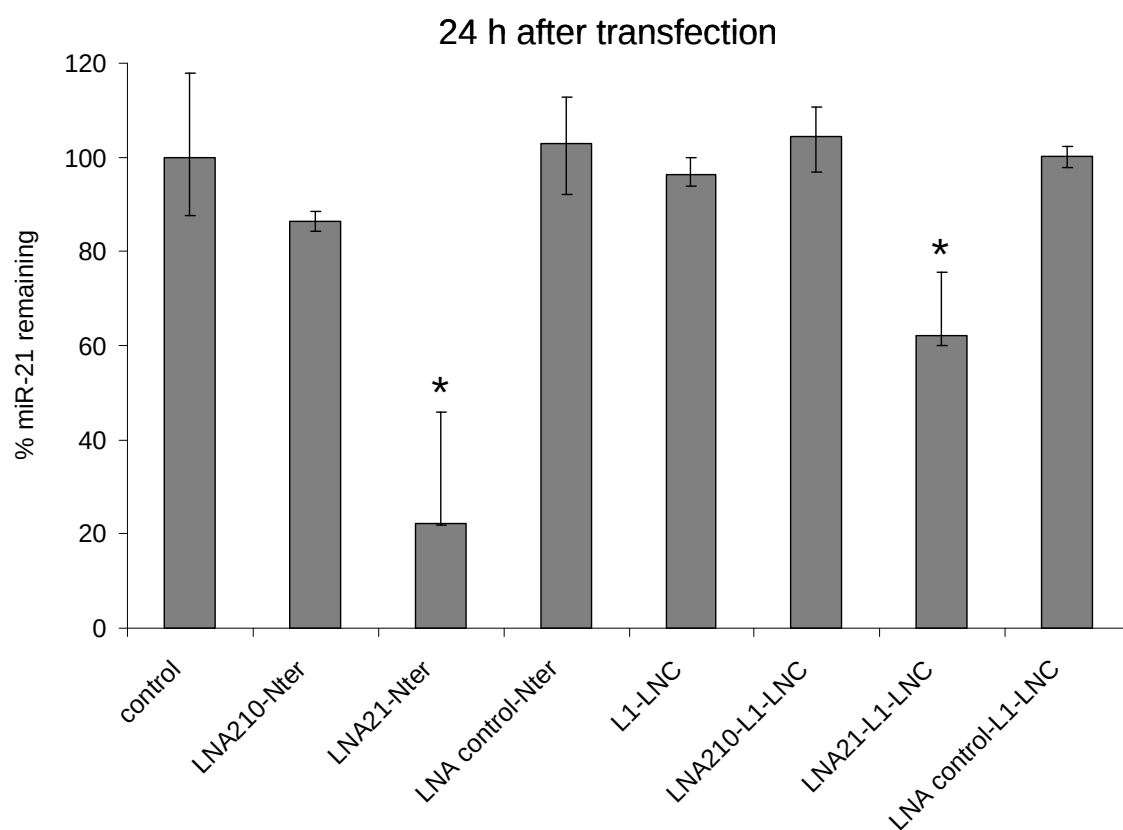
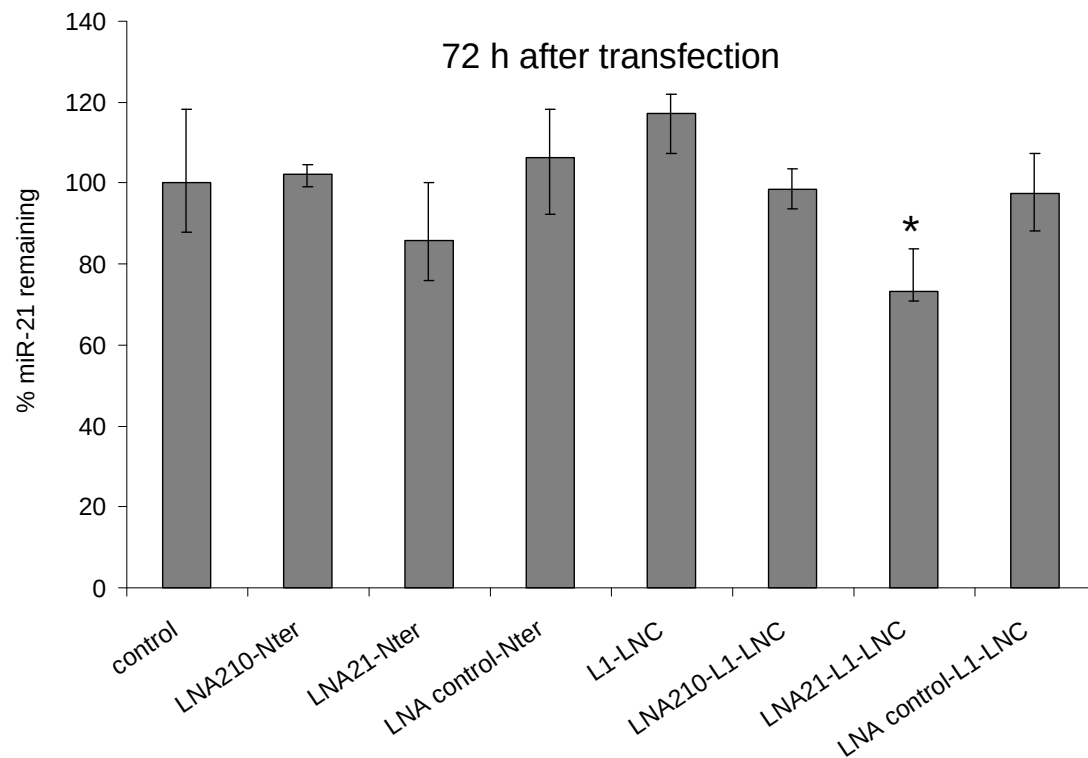
- Huang, X., Le, Q.T., Giaccia, A.J., 2010. *Mir-210—micromanage of the hypoxia pathway*. *Trends Mol. Med.* 16, 230–237.
- Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., Erdmann, V.A., 2002. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 30, 1911–1918.
- Lacoeuille, F., Garcion, E., Benoit, J.P., Lamprecht, A., 2007. Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 4612–4617.
- Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., Kauppinen, S., Orum, H., 2009. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198–201.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Li, T., Cao, H., Zhuang, J., Wan, J., Guan, M., Yu, B., Li, X., Zhang, W., 2010. Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin. Chim. Acta* 412, 66–70.
- Malzkorn, B., Wolter, M., Liesenberg, F., Grzendowski, M., Stuhler, K., Meyer, H.E., Reifemberger, G., 2010. Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol.* 20, 539–550.
- Novakova, J., Slaby, O., Vyzula, R., Michalek, J., 2009. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 1–5.
- Paillard, A., Hindre, F., Vignes-Colombeix, C., Benoit, J.P., Garcion, E., 2010. The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials* 31, 7542–7554.
- Pang, J.C., Kwok, W.K., Chen, Z., Ng, H.K., 2009. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 117, 599–611.
- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2, 751–760.
- Pounder, R.J., Stanford, M.J., Brooks, P., Richards, S.P., Dove, A.P., 2008. Metal free thiol-maleimide 'Click' reaction as a mild functionalisation strategy for degradable polymers. *Chem. Commun. (Camb)*, 5158–5160.
- Raouane, M., Desmaele, D., Urbinati, G., Massaad-Massade, L., Couvreur, P., 2012. Lipid conjugated oligonucleotides: a useful strategy for delivery. *Bioconjug. Chem.* 23, 1091–1104.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., Benoit, J.P., 2009. Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis. *J. Control. Release* 140, 174–181.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., Benoit, J.P., 2010a. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. *Nanomedicine (Lond)* 5, 287–306.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., Benoit, J.P., 2010b. Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 422–429.
- Shi, S.J., Zhong, Z.R., Liu, J., Zhang, Z.R., Sun, X., Gong, T., 2012. Solid lipid nanoparticles loaded with anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) for suppression of microRNA-21 functions in human lung cancer cells. *Pharm. Res.* 29, 97–109.
- Silber, J., James, C.D., Hodgson, J.G., 2009. microRNAs in gliomas: small regulators of a big problem. *Neuromolecular Med.* 11, 208–222.
- Stenvang, J., Kauppinen, S., 2008. MicroRNAs as targets for antisense-based therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 59–81.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Tan, X., Wang, S., Yang, B., Zhu, L., Yin, B., Chao, T., Zhao, J., Yuan, J., Qiang, B., Peng, X., 2012. The CREB-miR-9 negative feedback microcircuitry coordinates the migration and proliferation of glioma cells. *PLoS ONE* 7, e49570.
- Tarahovsky, Y.S., Koynova, R., MacDonald, R.C., 2004. DNA release from lipoplexes by anionic lipids: correlation with lipid mesomorphism, interfacial curvature, and membrane fusion. *Biophys. J.* 87, 1054–1064.
- Vanpouille-Box, C., Lacoeuille, F., Roux, J., Aube, C., Garcion, E., Lepareur, N., Oberti, F., Bouchet, F., Noiret, N., Garin, E., Benoit, J.P., Couturier, O., Hindre, F., 2011. Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model. *PLoS ONE* 6, e16926.
- Vinchon-Petit, S., Jarret, D., Paillard, A., Benoit, J.P., Garcion, E., Menei, P., 2009. In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy. *J. Neurooncol.* 97, 195–205.
- Vrignaud, S., Benoit, J.P., Saulnier, P., 2011. Strategies for the nanoencapsulation of hydrophilic molecules in polymer-based nanoparticles. *Biomaterials* 32, 8593–8604.
- Weyland, M., Manero, F., Paillard, A., Gree, D., Vault, G., Jarret, D., Menei, P., Juin, P., Chourpa, I., Benoit, J.P., Gree, R., Garcion, E., 2011. Mitochondrial targeting by use of lipid nanocapsules loaded with SV30, an analogue of the small-molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1. *J. Control. Release* 151, 74–82.
- Zhang, J., Han, L., Ge, Y., Zhou, X., Zhang, A., Zhang, C., Zhong, Y., You, Y., Pu, P., Kang, C., 2010. miR-221/222 promote malignant progression of glioma through activation of the Akt pathway. *Int. J. Oncol.* 36, 913–920.

Supplemental Figure 1. Gel retardation assay of LNAs with ethidium bromide. Different complexes were formed between native LNCs and LNAs, L1-LNCs and LNAs as well as CP-LNCs and LNAs. LNA amount was the same in each well: 600 ng. LNC concentration increases from 6, 7.5 to 9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in each well.

Supplemental Figure 2. RTqPCR analysis of miRNA silencing in U87MG cells after treatment with LNA control, LNA21 and LNA210 in distinct formulations (N-TER, L1-LNCs and CP-LNCs). A) miR-21 expression after 24 hours. B) miR-21 expression after 72 hours. Data are normalized with respect to RNU24 and were obtained from three independent experiments (n=3). Dunnett's test: *p<0.05 and **p<0.01, comparison with untreated control cells.



Griveau *et al.* Supplemental Figure 1

A**B**Griveau *et al.* Supplemental Figure 2

Le but de ce travail est l'inhibition par un nanovecteur de miARN spécifiques exprimés dans le GBM. Le nanovecteur que l'on a utilisé est la nanocapsule lipidique fonctionnalisée à sa surface par un peptide dérivé d'un papillomavirus.

Initialement, l'étude de trois miARN (miR-21, miR-210 et miR-221) décrits comme étant impliqués dans le GBM fut envisagée dans notre modèle U87MG en culture adhérente. En effet, les rôles de miR-21 et de miR-221 ont été démontrés dans les GBM (Malzkorn *et al.* 2010; Novakova *et al.* 2009; Pang *et al.* 2009; Silber *et al.* 2009). Un autre miARN, induit par l'hypoxie (Huang *et al.* 2010), est également associé au GBM (Malzkorn *et al.* 2010), et plus particulièrement à l'initiation tumorale (Huang *et al.* 2009). Ce travail focalisé sur des oncomiRs déjà décrits dans le GBM doit permettre d'étudier leur modulation négative par l'utilisation de LNA combinés à une nanomédecine.

Les différentes validations ont permis de confirmer la possibilité de réaliser une NCL fonctionnalisée complexée à un LNA. Des améliorations sur ce vecteur peuvent être envisagées comme la réduction de la quantité de peptides à la surface des NCLs pour permettre aux LNA une meilleure libération au niveau des cellules (Tarahovsky *et al.* 2004). La complexation entre le LNA et les NCLs fonctionnalisées peut, peut être, par une stabilité du complexe permettre d'atteindre la machinerie miARN intracellulaire (Raouane *et al.* 2012).

Basé sur des expérimentations de RTqPCR, deux miARN ont été mis en évidence dans notre lignée de GBM : miR-21 et miR-210. Le potentiel du complexe NCL fonctionnalisée et LNA spécifique de miARN donné a été investigué. Aucun impact sur l'expression de miR-210 n'a été observé quel que soit le type de formulation testé. L'inhibition de l'expression de miR-21 est réalisable lorsque son LNA spécifique est combiné à un agent de transfection commercial ou aux NCLs fonctionnalisées avec le peptide L1. Une cinétique de l'expression de miR-21 en fonction de ces deux types de formulations a été réalisée. Ces résultats montrent deux profils de cinétique différents, avec une action de l'agent commercial plus transitoire contrairement aux NCLs fonctionnalisées avec le peptide L1. La différence de mode d'action peut s'expliquer par leurs propriétés à l'échappement endolysosomal (Paillard *et al.* 2010) ou par le contournement à la « multidrug resistance » (Garcion *et al.* 2006).

MiR-21 a été mis en évidence comme étant impliqué dans la croissance tumorale *in vivo* (Ji *et al.* 2010). L'inhibition de miR-21 ayant été réalisée par les NCLs fonctionnalisées, une combinaison de cet objet au traitement conventionnel a été investiguée. La formation du complexe entre le LNA21 et les NCLs fonctionnalisées sensibilise les cellules à la

radiothérapie, en effet, la combinaison des traitements dans le sens inverse n'a aucun effet sur la viabilité cellulaire.

Ce travail a mis en évidence le développement d'un nouvel outil capable de véhiculer des leurres oligonucléotides inhibant l'expression de miARN, les LNA. La combinaison de cet outil à la radiothérapie externe s'est révélée comme étant un atout majeur pour pallier la radiorésistance des cellules de GBM.

CHAPITRE III

Chapitre III : Expérimentations *in vivo* testant la combinaison du nano-objet complexé aux LNA et aux irradiations externes

La stratégie de combinaison entre les LNA complexés aux NCLs fonctionnalisées et l'irradiation externe ayant montré des résultats intéressants *in vitro*, le passage au *in vivo* a donc été envisagé.

1. Implantation des cellules de glioblastome par stéréotaxie

La stéréotaxie est une technique utilisée en neurochirurgie pour atteindre des zones du cerveau de manière précise, elle permet de définir la position d'une structure grâce à un système de coordonnées dans les trois plans de l'espace. Cette technique va nous permettre d'injecter les cellules tumorales dans le cerveau de l'animal, et plus particulièrement dans le striatum droit.

L'injection des cellules tumorales en intracérébrale s'effectuera par stéréotaxie sous anesthésie générale. Cette anesthésie générale est réalisée par injection par voie intrapéritonéale aux animaux d'un mélange d'un anesthésique la Kétamine (Clorkétam™, 10 mg/kg) et d'un analgésique la Xylazine (Rompun™, 50 mg/kg). Ce protocole est réalisé en normothermie en 30 minutes.

Dans un premier temps, la souris (souris SCID femelles, 20 g, 8 semaines) est placée sur un cadre de stéréotaxie et une incision sur le dessus de la tête est réalisée à l'aide d'un scalpel (**Figure 28**). Une craniotomie de 2 mm de diamètre est réalisée aux coordonnées souhaitées (0,5 mm vers le nez de l'animal, 2 mm vers la droite par rapport à un point : le bregma ; et 3 mm en profondeur).

Ensuite, 5 µL de suspension cellulaire contenant 50 000 cellules U87MG sont injectés à l'aide d'une seringue Hamilton à un débit de 1 µL par minute. Un temps d'attente, après l'injection, est nécessaire pour éviter un reflux de la suspension cellulaire, puis l'aiguille est remontée doucement à raison de 0,5 mm par minute. L'incision est par la suite refermée avec quelques points de sutures.



Figure 28 : Exemple d'une souris Nude placée sur un cadre de stéréotaxie

2. Injection des NCLs complexés à des Locked Nucleic Acid (LNA) par la méthode de CED

Cinq jours après implantation des cellules, les différents traitements sont administrés au niveau locorégional par application d'un gradient de pression (« Convection Enhanced Delivery » ou CED) grâce à une seringue Hamilton reliée à une pompe automatique selon le débit de $0,5 \mu\text{L}/\text{min}$ pour un volume total de $20 \mu\text{L}$ (**Figure 29**). Au préalable de cette injection, une anesthésie générale (un mélange de : Kétamine, $10 \text{ mg}/\text{kg}$ et de Xylazine, $50 \text{ mg}/\text{kg}$) est réalisée sur les animaux par voie intra-péritonéale.

Avant l'injection des différents traitements, des mesures d'osmolarité et de pH de nos différents traitements ont été réalisées.

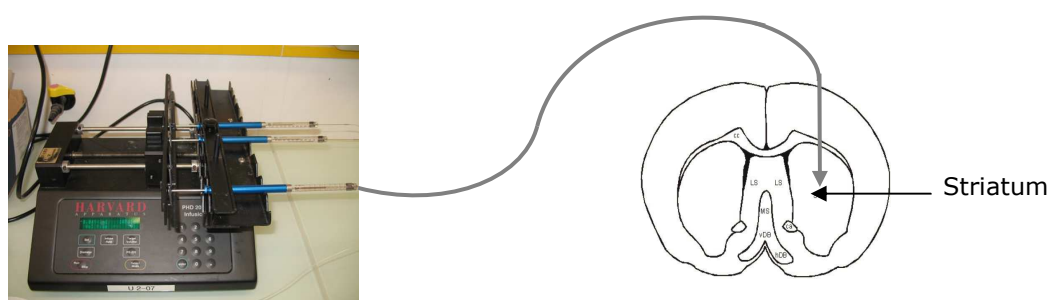


Figure 29 : Principe de la 'Convention Enhanced Delivery'

3. Irradiations externes des animaux

Deux jours après l'administration des traitements, les animaux subissent des irradiations externes réalisées par un irradiateur petit animal XRAD à 225 kVp situé à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest de Nantes. L'avantage de ce système est la capacité de l'appareil à cibler une zone particulière de l'animal, dans notre cas, le cerveau (**Figure 30**).

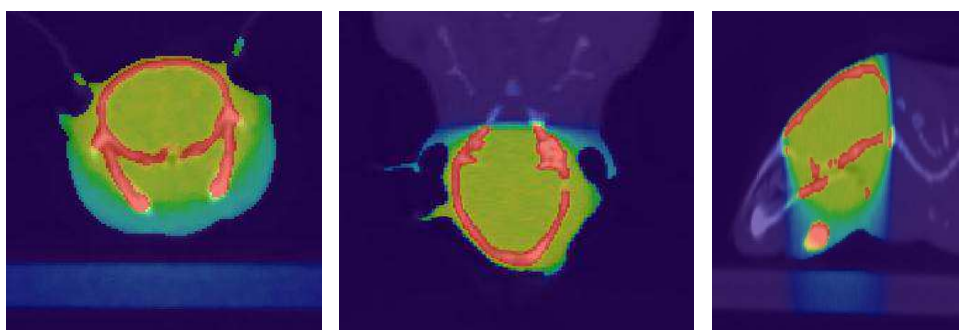


Figure 30 : Imagerie d'un cerveau de souris par l'XRAD

Des tests préliminaires ont été réalisés en amont pour évaluer la tolérance des animaux à différentes doses d'irradiations : 2, 4 et 6 Grays. Les animaux ont survécus à toutes les doses.

4. Protocole 1 : Étude de l'efficacité du traitement combiné à une irradiation

Un premier type de protocole a été mis en place suivant le chronogramme présenté en **figure 31**.

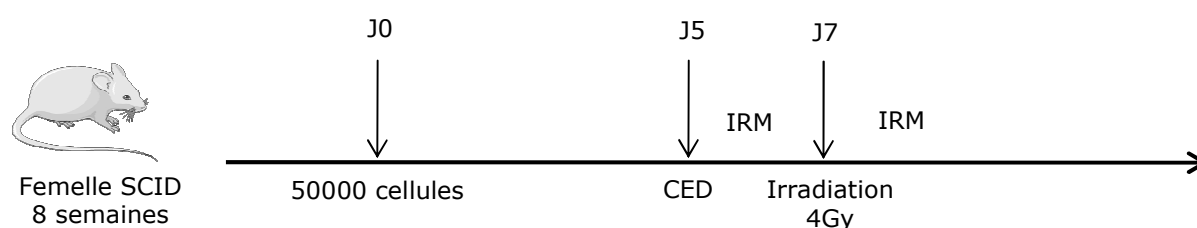


Figure 31 : Chronogramme représentant le protocole 1

Au cours de ce premier protocole, différents traitements ont été administrés aux animaux à J5, et par la suite ces animaux ont été irradiés à 4 Grays.

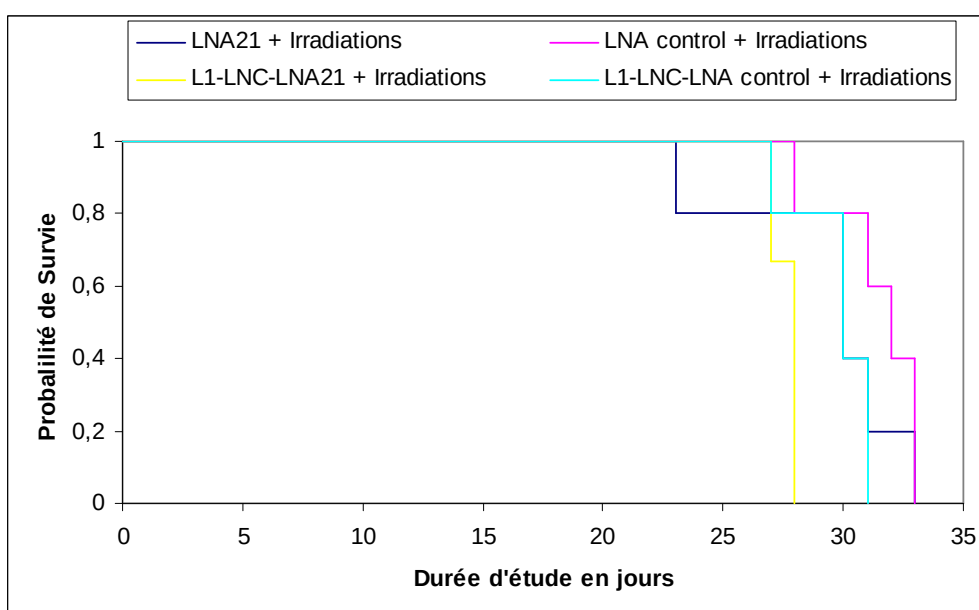
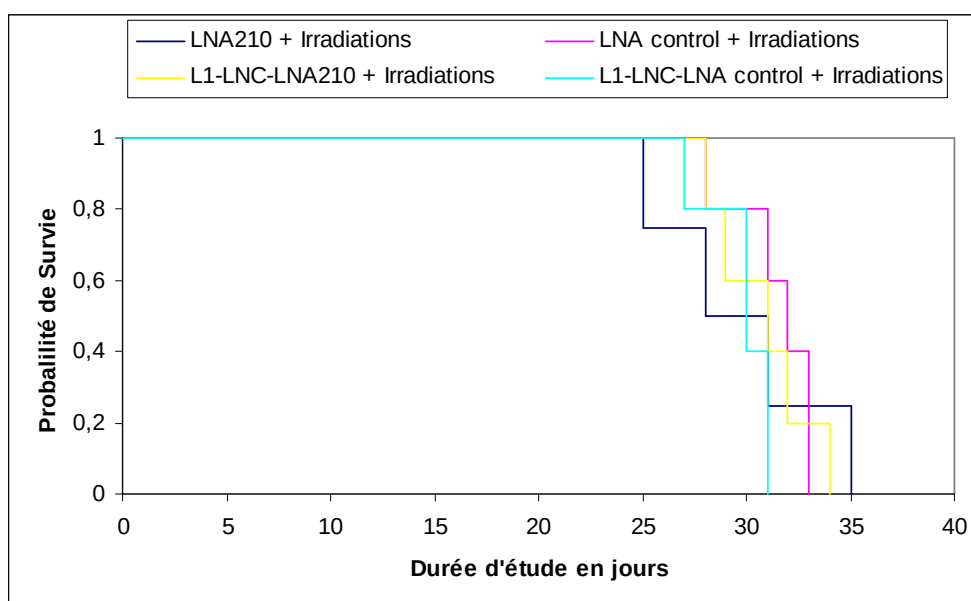
Voici les différents groupes d'animaux :

- **Groupe 1** : cellules + PBS, n = 5
- **Groupe 2** : cellules + PBS + Irradiation, n = 5
- **Groupe 3** : cellules + LNA21 + Irradiation, n = 5
- **Groupe 4** : cellules + LNA210 + Irradiation, n = 5
- **Groupe 5** : cellules + LNA control + Irradiation, n = 5
- **Groupe 6** : cellules + L1-NCL + Irradiation, n = 5
- **Groupe 7** : cellules + L1-NCL-LNA21 + Irradiation, n = 5
- **Groupe 8** : cellules + L1-NCL-LNA210 + Irradiation, n = 5
- **Groupe 9** : cellules + L1-NCL-LNA control + Irradiation, n = 5

Les LNA seuls ont été administrés à une concentration de 5 nmol/kg d'animaux. En ce qui concerne, les LNA complexés aux L1-NCLs, la concentration correspond à celle qui a permis d'obtenir une efficacité *in vitro*, ce qui revient à 1 nmol/kg. A noter que le numéro indiqué à la suite du LNA correspond au miARN ciblé.

Les conclusions que l'on peut extraire de ce travail sont les suivantes :

- les animaux ont toléré l'administration par CED de notre nouvel nano-objet combiné aux LNA,
- aucun effet de l'irradiation sur la survie des animaux,
- pas d'effet 'propre' des LNA seuls à 5 nmol/kg,
- les traitements L1-NCLs n'ont aucun effet sur la survie des animaux (**Figure 32**).



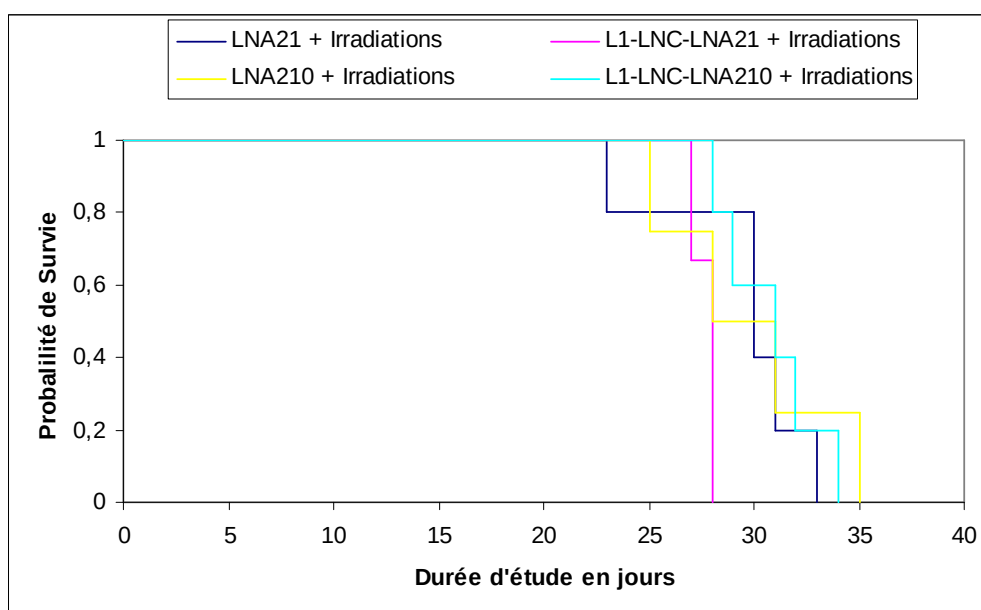


Figure 32 : Courbes de Kaplan Meier comparant les différents traitements administrés aux souris

5. Protocole 2 : Étude de l'efficacité du traitement combiné à une irradiation fractionnée

Suite aux résultats obtenus, un deuxième protocole a par la suite été investigué en modifiant certains paramètres.

Une étude de 2008 a montré une réduction de l'expression de miR-122 par administration d'un LNA dirigé contre miR-122, chez les primates. Les doses de LNA utilisées sont comprises entre 1 et 10 mg de LNA/kg, ce qui correspond à une concentration comprise entre 3,2 et 32 nmol/kg (Elmen *et al.* 2008).

Pour ce second protocole, nous avons donc décidé d'avoir, pour tous les types de traitements, une concentration de LNA comprise entre les valeurs de l'étude d'Elmen, nous avons choisi d'administrer 5 nmol/kg de LNA.

La deuxième modification apportée au protocole est le passage à une irradiation en fractionnée avec une augmentation de la dose, à 6 Grays (**Figure 33**). Les animaux ont bien supporté l'augmentation de la concentration des LNA complexés aux L1-NCLs. Malheureusement, les animaux n'ont pas survécus aux irradiations fractionnées à 6 Grays.

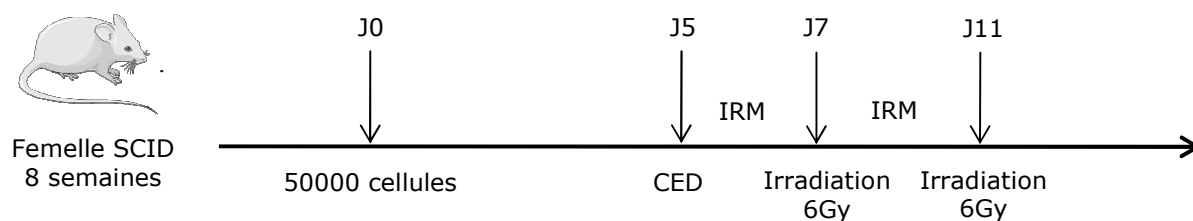


Figure 33 : Chronogramme représentant le protocole 2

Les résultats que nous avons obtenus au niveau *in vivo* sont à améliorer et à approfondir. En effet, ces expérimentations démontrent la difficulté d'extrapoler les résultats obtenus *in vitro* au *in vivo*. Des améliorations sont à apporter au niveau de la cinétique d'irradiations mais également au niveau de la dose d'irradiation.

DISCUSSION
GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES

Discussion Générale et Perspectives

Le GBM est un des cancers les plus dramatiques, puisque la moyenne de survie des patients est courte, ceci étant dû en grande partie aux échecs thérapeutiques (Bao *et al.* 2006). En effet, à l'heure actuelle, les traitements ne sont que palliatifs et un des problèmes majeurs est l'apparition de résistances aux traitements. Pour pallier les problèmes de résistances, de nouvelles thérapies doivent être envisagées et développées de manière à obtenir des thérapies plus efficaces au travers la mise en évidence de nouvelles cibles ; ou alors les traitements actuels doivent être améliorés en conséquence, au vue de la mise en évidence de nouvelles cibles. L'objectif de ma thèse est d'étudier la pertinence du ciblage thérapeutique de deux marqueurs de radiorésistance dans le GBM : l'épitope AC133/1 et certains microARN.

Le premier chapitre de la thèse s'est donc interrogé sur la signification de l'expression de ces marqueurs au sein des GBM.

1. Études de deux marqueurs de radiorésistance au sein des glioblastomes

1.1. L'épitope AC133/1 de la protéine CD133

1.1.1. Impact du microenvironnement tumoral sur l'expression d'AC133/1

Les cellules cancéreuses de type souche (CCTS) sont des cellules capables d'initier des tumeurs résistantes aux thérapies (Bao *et al.* 2006). Il paraît donc possible que les CCTS soient définies comme une cible importante à prendre en compte pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cas du GBM. Depuis plusieurs années, des études ont été menées sur les CCTS et ont permis d'identifier la présence de différents marqueurs associés à ces CCTS, dont la protéine CD133 auquel est associé l'épitope AC133/1 (Liu *et al.* 2006).

Une première partie s'est donc intéressée à étudier le lien entre l'expression d'AC133/1, la pression partielle en oxygène et l'agressivité tumorale. Nous avons montré que des primo-cultures de GBM humains, cultivées dans des conditions hypoxiques (3% d'O₂), permettent l'expression d'AC133/1, cette expression est quasi inexistante à 21% d'O₂. Les injections, par stéréotaxie, de ces deux types de sous-populations, les cellules

AC133/1-positives et les cellules AC133/1-négatives, dans le cerveau de souris immunodéprimées donnent naissance à des tumeurs de phénotypes différents.

Les GBM sont des tumeurs hautement vascularisées et représentent donc une cible intéressante dans les traitements anti-angiogéniques (Jain *et al.* 2007). En effet, des études ciblant des molécules induisant l'angiogénèse ont déjà été effectuées, c'est le cas de celles réalisées sur le VEGF qui est reconnu comme étant un stimulateur de l'angiogénèse (Carmeliet and Jain 2000). L'inactivation du VEGF, par blocage de son récepteur VEGFR-2, a été réalisée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal, le bevacizumab, commercialisé sous le nom d'Avastin®. L'action de cet anticorps est en partie liée à l'hypoxie générée au sein de la tumeur. L'Avastin®, utilisé dans le traitement de différents cancers (Jubb and Harris 2010), est l'un des premiers anticorps à avoir reçu l'accord de la FDA (Food and Drug Administration) dans le cas des traitements des GBM (Lai *et al.* 2011). Mais malheureusement, les résultats obtenus sur des patients traités avec l'Avastin®, n'ont pas donnés de résultats concluants, puisque l'apparition de récurrences est toujours présente. Différents modèles montrent que ce traitement, seul ou en association avec de la chimio ou de la radiothérapie, inhibe la croissance tumorale en induisant le rétablissement de la balance entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques et en diminuant l'hypoxie tumorale. Ce phénomène d'hypoxie induit, dans les GBM, un échappement des cellules cancéreuses ainsi qu'une invasion du parenchyme (Keunen *et al.* 2011).

Au vue de nos résultats, les cellules AC133/1-positives pourraient donc jouer un rôle intéressant au sein de l'angiogénèse et être responsables des résistances envers les traitements anti-angiogéniques.

1.1.2. Fonction pour la protéine CD133

Après avoir mis en évidence, le fait qu'AC133/1 est un marqueur de non exposition à des pO_2 élevées et que l'expansion *in vitro* de CCTS à des pO_2 non physiologiques entraîne après leur implantation *in vivo* la formation de tumeurs de phénotypes distincts de ceux obtenus à des pO_2 physiologiques (Bourseau-Guilmain *et al.* 2012). Il nous est apparu pertinent de mieux comprendre la fonction membranaire de la protéine CD133 ; en effet, à l'heure actuelle, aucun rôle de la protéine CD133 au sein des GBM n'a été mis en évidence. C'est pourquoi, en tenant compte de la localisation d'AC133/1 au sein de protrusions membranaires, nous avons étudié son implication dans les échanges entre les milieux extra et intracellulaires.

En utilisant la stratégie siARN knockdown sur des cellules humaines Caco-2 d'adénocarcinome de colon exprimant AC133/1-CD133 de manière constitutive, nous avons découvert une fonction pour AC133/1-CD133 dans l'accumulation intracellulaire de composés extracellulaires. AC133/1-CD133 a donc un effet majeur dans l'inhibition de l'endocytose de transferrine. La modulation de son expression est liée à l'accessibilité au récepteur de la transferrine à partir du compartiment extracellulaire. Nous avons également démontré que la supplémentation ou la déplétion en fer régule l'expression de CD133 au travers d'au moins deux mécanismes, les « iron responsive proteins » et les prolyl-hydroxylases hydroxylant la sous-unité α d'HIF. Ce travail met en évidence un partenariat entre la protéine CD133, le récepteur de la transferrine et le fer ; dans lequel la protéine CD133 apparaît comme un intégrateur membranaire régulant le métabolisme du fer (Bourseau-Guilmain *et al.* 2011). La protéine CD133 apparaît donc comme une molécule dépendante de l'environnement cellulaire (**Figure 34**).

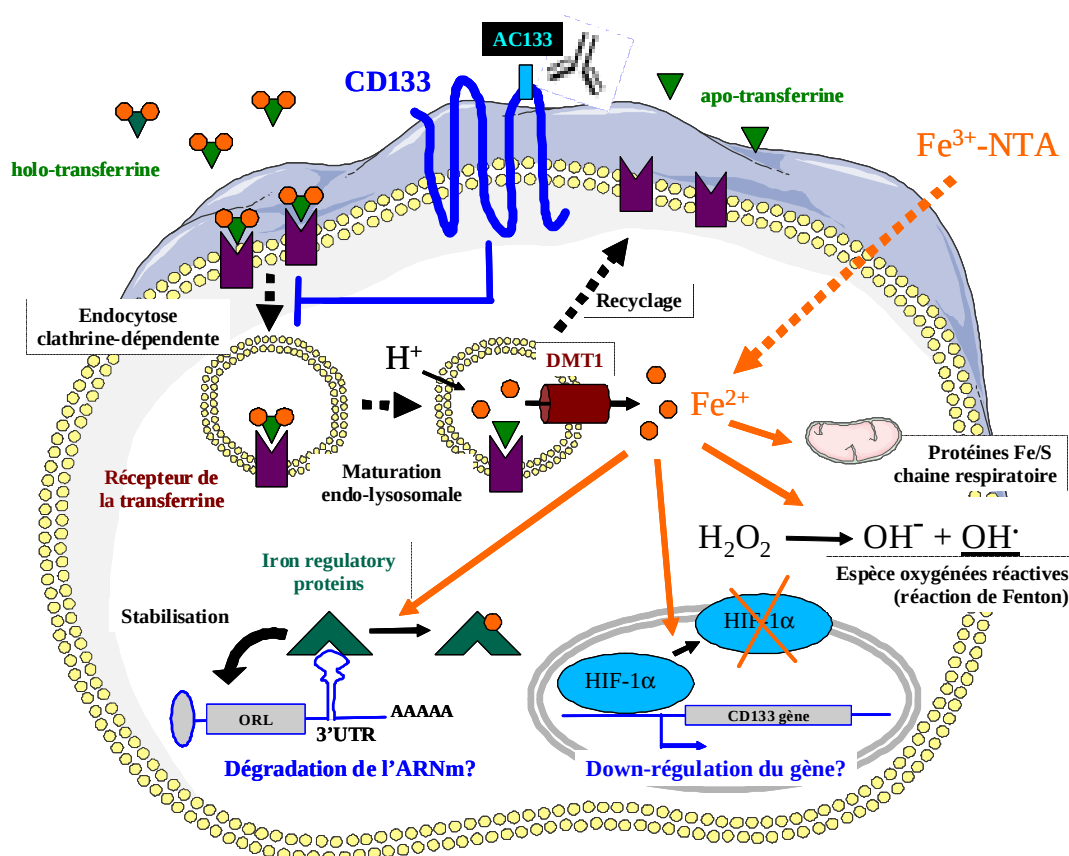


Figure 34 : Schéma représentant les liens entre la protéine CD133, le métabolisme du fer et l'internalisation de la transferrine

En effet, différentes études mettent en évidence un lien entre la protéine CD133 et des modulateurs extrinsèques. Au sein de ces modulateurs, deux types existent : ceux qui vont favoriser le maintien de l'expression d'AC133/1-CD133 et donc privilégier les cellules AC133/1-positives ; et d'autres qui vont tendre à réduire l'expression d'AC133/1-CD133 et privilégier les cellules AC133/1-négatives.

Le premier type de modulateurs, déjà précédemment évoqué, est l'hypoxie, favorisant l'expression de CD133 dans des cultures cellulaires (Bourseau-Guilmain *et al.* 2012; Platet *et al.* 2007). En effet, l'expression des cellules AC133/1-positives est maintenue en hypoxie par le biais d'un facteur de transcription HIF-1 α . Deux autres molécules favorisent également les cellules AC133/1-positives, c'est le cas de la roténone et du bromure d'éthidium (Griguer *et al.* 2008).

Des modulateurs, tendant à « entraîner » les cellules dans le compartiment des cellules AC133/1-négatives, existent. C'est le cas de la protéine BMP-4 (Bone Morphogenetic Protein 4), régulée par l'hypoxie, qui réduit d'environ 50% le pool de cellules AC133/1-positives en induisant la différenciation des cellules souches (Piccirillo *et al.* 2006). Un autre modulateur de ces cellules peut être l'acide rétinoïque. L'action d'un des dérivés de l'acide rétinoïque encapsulé a été testé chez des rats atteints de GBM, cette étude a révélée une induction de la différenciation cellulaire des cellules tumorales (Yokosawa *et al.* 2010). L'acide rétinoïque permet donc de bloquer le comportement migratoire et invasif de la tumeur (Yung *et al.* 1996). D'autres études ont montré que l'acide rétinoïque différenciait les cellules cancéreuses de type souche, il semblerait donc que l'acide rétinoïque induit des effets anti-tumoraux ainsi que des effets anti-angiogéniques (Campos *et al.* 2010).

Des études ont montré que CD133 était impliquée dans le métabolisme du glucose chez le rat (Yang *et al.* 2007), il serait donc intéressant d'étudier les interactions entre les transporteurs du glucose et la protéine CD133. En effet, CD133 ayant un impact sur l'internalisation du fer, il se pourrait donc qu'il y ait une mise en place de la glycolyse au détriment de la chaîne respiratoire.

L'action de ces différents modulateurs pourrait également être utilisée pour le passage d'un compartiment cellulaire à un autre, en effet les cellules AC133/1-positives sont des cellules radorésistantes, il serait donc intéressant de les emmener vers un stade de cellules AC133/1-négatives plus sensibles aux différentes thérapies.

1.2. Les microARN

Parallèlement à ces nouvelles imputations étiologiques cellulaires, la régulation de l'expression des gènes annexée par la découverte de miARN représente une piste de recherche dans la compréhension du développement tumoral, pour la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans la littérature, différents microARN ont déjà été décrits comme étant impliqués dans le développement des GBM, c'est le cas de miR-21, miR-210, miR-221/222, miR-181a et miR-181b, miR-7, miR-128, miR-124 ou encore miR-137 ... (Ciafre *et al.* 2005; Godlewski *et al.* 2008; Kefas *et al.* 2008; Novakova *et al.* 2009; Shi *et al.* 2008; Silber *et al.* 2008). Le traitement de base des GBM reste la radiothérapie associée à de la chimiothérapie, mais malheureusement des résistances à cette combinaison de traitements existent. C'est pourquoi, nous nous sommes demandé si des microARN n'étaient pas exprimés en réponse aux irradiations. En effet, des études ont déjà été menées sur l'expression de miARN en réponse à la radiothérapie dans certains cancers (Arora *et al.* 2011; Balca-Silva *et al.* 2012; Chun-Zhi *et al.* 2010; Grosso *et al.* 2013; Liang *et al.* 2012; Salim *et al.* 2012; Wang *et al.* 2011), mais aucune étude n'a été réalisée sur des GBM humains.

C'est pourquoi, un travail réalisé à partir d'exérèses de 12 patients atteints de GBM, doit nous permettre d'établir un miRnome relatant l'expression d'un panel de miARN en réponse ou non à la radiothérapie. En effet, les miARN actuellement décrits comme étant surexprimés dans les GBM, ne sont pas forcément ceux qui peuvent être responsables des phénomènes de radiorésistance. L'effet de miR-181a a été mis en évidence dans la radiosensibilisation des cellules U87MG par le ciblage de Bcl-2 (Chen *et al.* 2010). Ce travail est important car une étude réalisée dans un type de cancer n'est pas extrapolable aux autres cancers. C'est le cas de miR-95, qui entraîne la radiorésistance des cellules de différents cancers en ciblant la sphingolipide phosphatase SGPP1 (Huang *et al.* 2013) mais qui est sous-régulé dans le GBM (Li *et al.* 2013).

Des études récentes ont montré que les miARN pouvaient réguler la protéine CD133. C'est le cas, dans les cellules rénales où deux miARN (miR-1915 et miR-1255-5p) régulent l'expression de différents marqueurs dont CD133 (Sallustio *et al.* 2013). Dans le cas, du cancer du foie, le miR-150 inhibe les cellules AC133/1-positives par le biais de la sous-régulation du facteur de transcription c-Myb (Zhang *et al.* 2012). Le même phénomène se produit également dans le cancer de l'ovaire, avec le miR-200a (Wu *et al.* 2011). Dans les cas présentés précédemment, les miARN réduisent l'expression de CD133 ou les cellules AC133/1-positives, mais dans d'autre cas les miARN peuvent contribuer à favoriser la protéine CD133. C'est le cas dans les cellules érythroïdes, la surexpression de miR-451 implique la différenciation des cellules AC133/1-positives (Kouhkan *et al.* 2013).

Les résultats de nos expérimentations ainsi que la littérature montrent l'intérêt et la pertinence d'étudier ces deux marqueurs dans les phénomènes de radiorésistance du GBM. L'étude de ces marqueurs est primordiale pour comprendre leurs fonctionnements ainsi que leurs rôles, mais il est également important de pouvoir agir sur ces marqueurs ou sur les effets qu'ils peuvent engendrer.

C'est pourquoi, l'émergence et les progrès récents des nanomédecines dans les thérapies semblent intéressants à investiguer pour la reconnaissance de ces marqueurs de radiorésistance (Peer *et al.* 2007). Ce deuxième axe de thèse s'est intéressé à la possibilité de cibler ces marqueurs de radiorésistance par les nanovecteurs.

2. Développement de nanomédecines permettant le ciblage de marqueurs de radiorésistance

2.1. Nanovecteur permettant le ciblage des cellules AC133/1 positives

Un nanovecteur capable de cibler les cellules AC133/1-positives a été développé et s'est révélé être très spécifique de sa cible, mais n'a pas pour autant la capacité de s'internaliser. Un inconvénient que peut développer ce vecteur, est que la protéine CD133 est également un marqueur associé à des cellules souches neurales classiques (Huttner *et al.* 2008). Mais, il faut savoir que les cellules neurales représentent une faible quantité et le fait de cibler l'épitope AC133/1 peut n'avoir aucun effet sur le rôle fonctionnel de ces cellules. Et en ce qui concerne, une atteinte des cellules hématopoïétiques, le risque est moindre puisque le traitement par les immuno-nanocapsules sera réalisé par injection locale.

La protéine CD133 est importante au sein des cellules de GBM tant au niveau de son expression que de sa fonction, mais elle reste également difficile à appréhender du fait qu'elle soit régulée par autant de paramètres environnementaux. Il est possible de la cibler par des nanovecteurs, mais ces nanovecteurs doivent être :

- modifiés pour améliorer leurs internalisations au sein des cellules cancéreuses,
- ou encapsulés à l'intérieur des immuno-nanocapsules un agent anticancéreux qui pourra être libéré après reconnaissance de sa cible. En effet, les NCLs ont la capacité d'encapsuler dans le cœur huileux de différents anticancéreux hydrophobes (Lacoeuille *et al.* 2007; Roger *et al.* 2009; Vanpouille-Box *et al.* 2011).

2.2. Nanovecteur se combinant à des acides nucléiques

Un second type de nanovecteur, capables de se complexer aux acides nucléiques, a également été développé, caractérisé et testé *in vitro*. La synthèse de ce nanovecteur est différente du précédent, car ce ne sont pas des anticorps qui fonctionnalisent la surface de la NCL mais des peptides, nous sommes donc en présence d'un nanovecteur biomimétique. Ce nanovecteur s'est révélé compétent en le combinant à des leurres oligonucléotides antisens, dans notre étude les « Locked Nucleic Acids », des complexes capables de réduire l'expression du miARN ciblé. Ce nano-objet a également démontré ses capacités à radiosensibiliser les cellules de GBM. Dès lors que le miRnome sera réalisé et sachant que la synthèse de ce nanovecteur est maîtrisée, il sera facile d'extrapoler ses expérimentations pour cibler d'autres miARN. Une des perspectives à ce nanovecteur peut être la combinaison de plusieurs LNA ciblant différents miARN, car en effet, au sein d'une tumeur, plusieurs miARN peuvent être surexprimés.

La stratégie pour contrecarrer l'activité de miARN exprimés a été de bloquer l'activité des oncomiRs par l'utilisation de leurres oligonucléotides. Une autre stratégie peut être utilisée en augmentant la proportion de miARN suppresseurs de tumeurs.

Durant ma thèse, j'ai également travaillé avec d'autres types de nanovecteurs, comme des lipopolyplexes ou des nanoparticules polysaccharidiques composées de lipides anioniques en majorité et de lipides cationiques. Les LNA sont capables de former des complexes avec ces deux types de nanoparticules (**Figure 35**). Quelques résultats préliminaires montrent qu'une action sur l'expression du miARN cible est observée. Ces résultats sont à confirmer dans un premier temps, puis à combiner avec l'action de la radiothérapie, pour voir si l'on retrouve l'effet radiosensibilisant des cellules obtenu avec les nanocapsules lipidiques complexés au LNA leurrant le miR-21. Ce screening de nanovecteurs *in vitro* est très utile, car il permet d'optimiser les effets souhaités (toxicité, relargage du LNA, cinétique d'action) avant le passage sur l'animal.

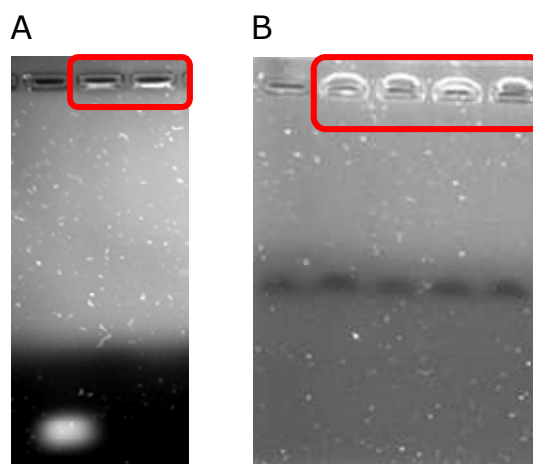


Figure 35 : Gels Retards visualisant la formation de complexes entre les LNA et des lipopolyplexes (A) ou des NPS (B)

En effet, une combinaison des NCLs fonctionnalisées complexées à des LNA administrés en local avec une radiothérapie externe a été testée chez des souris immunodéprimées. Deux protocoles ont été évalués, mais malheureusement dans les deux cas, aucun résultat concluant n'a pu être rapporté : soit la dose d'irradiation était trop faible et donc aucune action de l'irradiation n'a été observée, ou soit celle-ci a été trop élevée et a donc tué les animaux. La mise en place d'un protocole d'irradiation ciblant la tête des animaux est donc à développer, pour pouvoir tester dans des conditions optimales l'efficacité du LNA combiné aux effets de l'irradiation.

Un autre mécanisme peut être important à prendre en compte, c'est l'activité des « P-bodies » qui sont des foyers cytoplasmiques des cellules eucaryotes impliqués dans le recyclage des ARNm et qui jouent des rôles essentiels dans la réduction des niveaux d'ARNm et dans le « silencing » des ARNm contrôlé par les miARN (Eulalio *et al.* 2008; Liu *et al.* 2005). Le fait que les protéines nécessaires à l'activité des miARN soient localisées dans les « P-bodies », telles GW182, argonaute ; un lien entre « P-bodies » et miARN pourrait être établi (Brengues *et al.* 2005; Stupp *et al.* 2005). Par contre, les spécificités d'action des « P -bodies », tout comme les mécanismes qui permettent la réinitialisation de la traduction ne sont pas connus. Des études sur les « P-bodies », des nanovecteurs portant des LNA et l'irradiation pourraient donc contribuer à étayer ce travail.

Conclusion

En conclusion, cette thèse illustrée par la **figure 36** est un travail axé sur le développement de thérapies innovantes basées sur le ciblage de nouvelles entités tumorales radorésistantes. Au cours de ce travail, deux marqueurs potentiels de radorésistance dans le glioblastome ont été étudiés : l'épitope AC133/1 et les onco-microARN. Puis, dans un second temps, un aspect technologique a été appréhendé par le développement d'immunonanoparticules capables de véhiculer des chimiothérapies ou des radiopharmaceutiques vers cet épitope fonctionnel d'une part, et des nanocapsules lipidiques biomimétiques présentant à leur surface des peptides de papillomavirus capables de se complexer avec des acides nucléiques antagonistes de microARN d'autre part. Ces résultats soulignent la pertinence d'appliquer de nouvelles nanomédecines ciblées pour le contournement de la radorésistance dans le glioblastome.

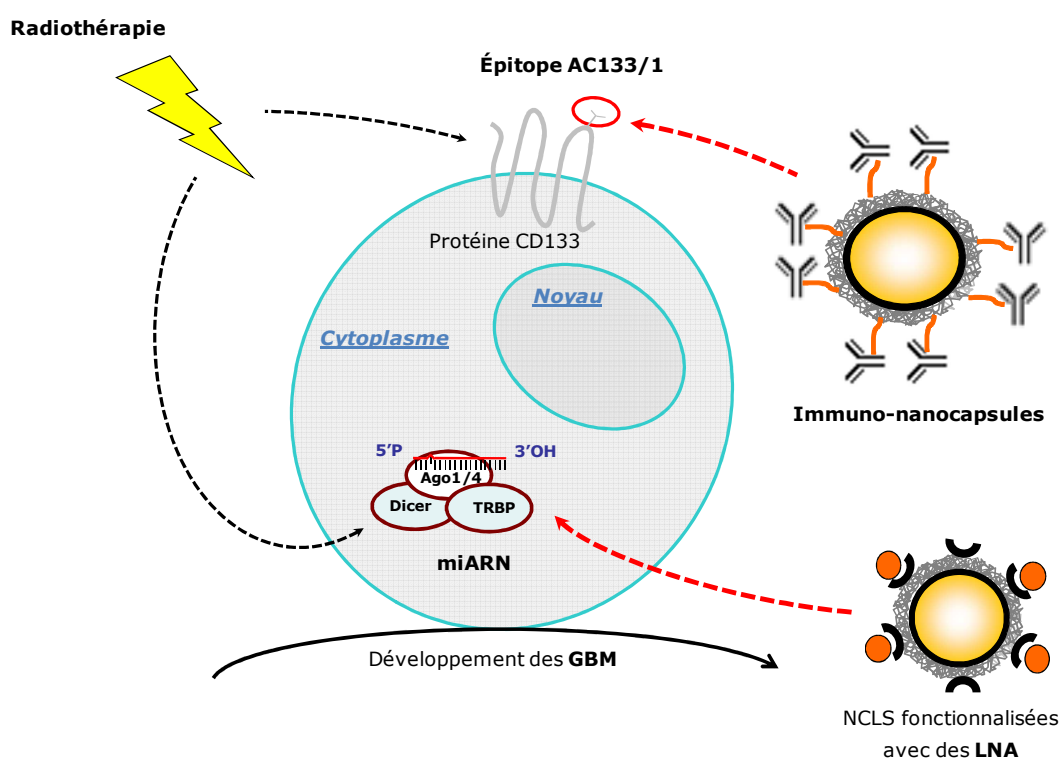


Figure 36 : Représentation schématique du travail de thèse

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

1. Abelson, J. F., K. Y. Kwan, B. J. O'Roak, D. Y. Baek, A. A. Stillman, T. M. Morgan, C. A. Mathews, D. L. Pauls, M. R. Rasin, M. Gunel, N. R. Davis, A. G. Ercan-Sencicek, D. H. Guez, J. A. Spertus, J. F. Leckman, L. S. t. Dure, R. Kurlan, H. S. Singer, D. L. Gilbert, A. Farhi, A. Louvi, R. P. Lifton, N. Sestan and M. W. State (2005). "Sequence variants in SLITRK1 are associated with Tourette's syndrome." Science 310(5746): 317-20.
2. Adams, B. D., K. P. Claffey and B. A. White (2009). "Argonaute-2 expression is regulated by epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinase signaling and correlates with a transformed phenotype in breast cancer cells." Endocrinology 150(1): 14-23.
3. Adams, J. M. and A. Strasser (2008). "Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones?" Cancer Res 68(11): 4018-21.
4. Allard, E., C. Passirani and J. P. Benoit (2009). "Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors." Biomaterials 30(12): 2302-18.
5. Allard, E., F. Hindre, C. Passirani, L. Lemaire, N. Lepareur, N. Noiret, P. Menei and J. P. Benoit (2008). "188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas." Eur J Nucl Med Mol Imaging 35(10): 1838-46.
6. Ardekani, A. and M. Naeini (2010). "The role of microRNAs in human diseases." Avicenna Journal of Medical Biotechnology 2.
7. Arora, H., R. Qureshi, S. Jin, A. K. Park and W. Y. Park (2011). "miR-9 and let-7g enhance the sensitivity to ionizing radiation by suppression of NFkappaB1." Exp Mol Med 43(5): 298-304.
8. Azzam, E. I., J. P. Jay-Gerin and D. Pain (2012). "Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury." Cancer Lett.
9. Balca-Silva, J., S. Sousa Neves, A. C. Goncalves, A. M. Abrantes, J. Casalta-Lopes, M. F. Botelho, A. B. Sarmiento-Ribeiro and H. C. Silva (2012). "Effect of miR-34b overexpression on the radiosensitivity of non-small cell lung cancer cell lines." Anticancer Res 32(5): 1603-9.

10. Balss, J., J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann and A. von Deimling (2008). "Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors." Acta Neuropathol 116(6): 597-602.
11. Bandres, E., E. Cubedo, X. Agirre, R. Malumbres, R. Zarate, N. Ramirez, A. Abajo, A. Navarro, I. Moreno, M. Monzo and J. Garcia-Foncillas (2006). "Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues." Mol Cancer 5: 29.
12. Bao, S., Q. Wu, Z. Li, S. Sathornsumetee, H. Wang, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2008). "Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth." Cancer Res 68(15): 6043-8.
13. Bao, S., Q. Wu, R. E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A. B. Hjelmeland, M. W. Dewhirst, D. D. Bigner and J. N. Rich (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." Nature 444(7120): 756-60.
14. Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-97.
15. Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell 136(2): 215-33.
16. Baumann, M., M. Krause, H. Thames, K. Trott and D. Zips (2009). "Cancer stem cells and radiotherapy." Int J Radiat Biol 85(5): 391-402.
17. Beduneau, A., F. Hindre, A. Clavreul, J. C. Leroux, P. Saulnier and J. P. Benoit (2008). "Brain targeting using novel lipid nanovectors." J Control Release 126(1): 44-9.
18. Bidlingmaier, S., X. Zhu and B. Liu (2008). "The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells." J Mol Med 86(9): 1025-32.
19. Blasiak, J., J. Szaflik and J. P. Szaflik (2009). "Implications of altered iron homeostasis for age-related macular degeneration." Front Biosci 16: 1551-9.
20. Bourseau-Guilmain, E., A. Griveau, J. P. Benoit and E. Garcion (2011). "The Importance of the Stem Cell Marker Prominin-1/CD133 in the Uptake of Transferrin and in Iron Metabolism in Human Colon Cancer Caco-2 Cells." PLoS One 6(9): e25515.
21. Bourseau-Guilmain, E., L. Lemaire, A. Griveau, E. Hervouet, F. Vallette, F. Berger, P. Menei, J. P. Benoit, D. Wion and E. Garcion (2012). "In vitro expansion of human

- glioblastoma cells at non-physiological oxygen tension irreversibly alters subsequent in vivo aggressiveness and AC133 expression." Int J Oncol.
22. Bousarghin, L., A. Touze, A. L. Combata-Rojas and P. Coursaget (2003). "Positively charged sequences of human papillomavirus type 16 capsid proteins are sufficient to mediate gene transfer into target cells via the heparan sulfate receptor." J Gen Virol 84(Pt 1): 157-64.
 23. Bousarghin, L., A. Touze, P. Y. Sizaret and P. Coursaget (2003). "Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells." J Virol 77(6): 3846-50.
 24. Bousarghin, L., A. Touze, B. Yvonnet and P. Coursaget (2004). "Positively charged synthetic peptides from structural proteins of papillomaviruses abrogate human papillomavirus infectivity." J Med Virol 73(3): 474-80.
 25. Bousarghin, L., A. L. Combata-Rojas, A. Touze, S. El Mehdaoui, P. Y. Sizaret, M. M. Bravo and P. Coursaget (2002). "Detection of neutralizing antibodies against human papillomaviruses (HPV) by inhibition of gene transfer mediated by HPV pseudovirions." J Clin Microbiol 40(3): 926-32.
 26. Bousarghin, L., A. Touze, G. Gaud, S. Iochmann, E. Alvarez, P. Reverdiau, J. Gaitan, M. L. Jourdan, P. Y. Sizaret and P. L. Coursaget (2009). "Inhibition of cervical cancer cell growth by human papillomavirus virus-like particles packaged with human papillomavirus oncoprotein short hairpin RNAs." Mol Cancer Ther 8(2): 357-65.
 27. Brengues, M., D. Teixeira and R. Parker (2005). "Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies." Science 310(5747): 486-9.
 28. Broderick, J. A. and P. D. Zamore (2011). "MicroRNA therapeutics." Gene Ther 18(12): 1104-10.
 29. Cai, X., C. H. Hagedorn and B. R. Cullen (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." Rna 10(12): 1957-66.
 30. Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." Nat Rev Cancer 6(11): 857-66.
 31. Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15

- and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 99(24): 15524-9.
32. Calin, G. A., C. G. Liu, C. Sevignani, M. Ferracin, N. Felli, C. D. Dumitru, M. Shimizu, A. Cimmino, S. Zupo, M. Dono, M. L. Dell'Aquila, H. Alder, L. Rassenti, T. J. Kipps, F. Bullrich, M. Negrini and C. M. Croce (2004). "MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias." Proc Natl Acad Sci U S A 101(32): 11755-60.
 33. Calin, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med 353(17): 1793-801.
 34. Campos, B., F. Wan, M. Farhadi, A. Ernst, F. Zeppernick, K. E. Tagscherer, R. Ahmadi, J. Lohr, C. Dictus, G. Gdynia, S. E. Combs, V. Goidts, B. M. Helmke, V. Eckstein, W. Roth, P. Beckhove, P. Lichter, A. Unterberg, B. Radlwimmer and C. Herold-Mende (2010). "Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells." Clin Cancer Res 16(10): 2715-28.
 35. Capela, A. and S. Temple (2002). "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal." Neuron 35(5): 865-75.
 36. Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature 407(6801): 249-57.
 37. Carroll, V. A. and M. Ashcroft (2005). "Targeting the molecular basis for tumour hypoxia." Expert Rev Mol Med 7(6): 1-16.
 38. Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." Cell 136(4): 642-55.
 39. Cha, H. J., K. M. Seong, S. Bae, J. H. Jung, C. S. Kim, K. H. Yang, Y. W. Jin and S. An (2009). "Identification of specific microRNAs responding to low and high dose gamma-irradiation in the human lymphoblast line IM9." Oncol Rep 22(4): 863-8.
 40. Cha, H. J., S. Shin, H. Yoo, E. M. Lee, S. Bae, K. H. Yang, S. J. Lee, I. C. Park, Y. W. Jin and S. An (2009). "Identification of ionizing radiation-responsive microRNAs in the IM9 human B lymphoblastic cell line." Int J Oncol 34(6): 1661-8.

41. Chamberlain, R. H. (1953). "The place of physics in clinical radiology." Radiology 60(3): 331-47.
42. Chan, J. A., A. M. Krichevsky and K. S. Kosik (2005). "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." Cancer Res 65(14): 6029-33.
43. Chang, C. J., C. C. Hsu, M. C. Yung, K. Y. Chen, C. Tzao, W. F. Wu, H. Y. Chou, Y. Y. Lee, K. H. Lu, S. H. Chiou and H. I. Ma (2009). "Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression." Biochem Biophys Res Commun 380(2): 236-42.
44. Chatel, M., M. Frenay, C. Lebrun, V. Bourg and F. Fauchon (2005). "High grade gliomas: anaplastic astrocytomas and glioblastomas." EMC- Neurologie 2: 257-278.
45. Chaudhry, M. A., H. Sachdeva and R. A. Omaruddin (2010). "Radiation-induced micro-RNA modulation in glioblastoma cells differing in DNA-repair pathways." DNA Cell Biol 29(9): 553-61.
46. Chen, C., D. A. Ridzon, A. J. Broomer, Z. Zhou, D. H. Lee, J. T. Nguyen, M. Barbisin, N. L. Xu, V. R. Mahuvakar, M. R. Andersen, K. Q. Lao, K. J. Livak and K. J. Guegler (2005). "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR." Nucleic Acids Res 33(20): e179.
47. Chen, G., W. Zhu, D. Shi, L. Lv, C. Zhang, P. Liu and W. Hu (2010). "MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2." Oncol Rep 23(4): 997-1003.
48. Chen, H., Z. Luo, L. Dong, Y. Tan, J. Yang, G. Feng, M. Wu, Z. Li and H. Wang (2013). "CD133/prominin-1-mediated autophagy and glucose uptake beneficial for hepatoma cell survival." PLoS One 8(2): e56878.
49. Chen, Z., Y. Li, H. Zhang, P. Huang and R. Luthra (2010). "Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression." Oncogene 29(30): 4362-8.
50. Chuang, J. C. and P. A. Jones (2007). "Epigenetics and microRNAs." Pediatr Res 61(5 Pt 2): 24R-29R.
51. Chun-Zhi, Z., H. Lei, Z. An-Ling, F. Yan-Chao, Y. Xiao, W. Guang-Xiu, J. Zhi-Fan, P. Pei-Yu, Z. Qing-Yu and K. Chun-Sheng (2010). "MicroRNA-221 and microRNA-222 regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN." BMC Cancer 10: 367.

52. Ciafre, S. A., S. Galardi, A. Mangiola, M. Ferracin, C. G. Liu, G. Sabatino, M. Negrini, G. Maira, C. M. Croce and M. G. Farace (2005). "Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma." Biochem Biophys Res Commun 334(4): 1351-8.
53. Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A 102(39): 13944-9.
54. Cohen-Jonathan Moyal, E. (2012). "[From bench to bedside: experience of the glioblastoma model for the optimization of radiosensitization]." Cancer Radiother 16(1): 25-8.
55. Combs, S. E., S. Rieken, W. Wick, A. Abdollahi, A. von Deimling, J. Debus and C. Hartmann (2011). "Prognostic significance of IDH-1 and MGMT in patients with glioblastoma: one step forward, and one step back?" Radiat Oncol 6: 115.
56. Conner, S. D. and S. L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell." Nature 422(6927): 37-44.
57. Cornelissen, B. and K. A. Vallis (2010). "Targeting the nucleus: an overview of Auger-electron radionuclide therapy." Curr Drug Discov Technol 7(4): 263-79.
58. Corsten, M. F., R. Miranda, R. Kasmieh, A. M. Krichevsky, R. Weissleder and K. Shah (2007). "MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas." Cancer Res 67(19): 8994-9000.
59. Couvreur, P., G. Barratt, E. Fattal, P. Legrand and C. Vauthier (2002). "Nanocapsule technology: a review." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 19(2): 99-134.
60. Dalmay, T. (2008). "MicroRNAs and cancer." J Intern Med 263(4): 366-75.
61. Dendy, P. P. and P. Wardman (2006). "Hypoxia in biology and medicine: the legacy of L H Gray." Br J Radiol 79(943): 545-9.
62. DeSano, J. T. and L. Xu (2009). "MicroRNA regulation of cancer stem cells and therapeutic implications." Aaps J 11(4): 682-92.
63. Doherty, G. J. and H. T. McMahon (2009). "Mechanisms of endocytosis." Annu Rev Biochem 78: 857-902.

64. Ebert, M. S. and P. A. Sharp (2010). "MicroRNA sponges: progress and possibilities." Rna 16(11): 2043-50.
65. Eiring, A. M., J. G. Harb, P. Neviani, C. Garton, J. J. Oaks, R. Spizzo, S. Liu, S. Schwind, R. Santhanam, C. J. Hickey, H. Becker, J. C. Chandler, R. Andino, J. Cortes, P. Hokland, C. S. Huettner, R. Bhatia, D. C. Roy, S. A. Liebhauer, M. A. Caligiuri, G. Marcucci, R. Garzon, C. M. Croce, G. A. Calin and D. Perrotti (2010). "miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts." Cell 140(5): 652-65.
66. El Ouahabi, A., M. Thiry, V. Pector, R. Fuks, J. M. Ruyschaert and M. Vandenbranden (1997). "The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids." FEBS Lett 414(2): 187-92.
67. Elmen, J., M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup and S. Kauppinen (2008). "LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates." Nature 452(7189): 896-9.
68. Esau, C. C. (2008). "Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides." Methods 44(1): 55-60.
69. Esteller, M., M. Toyota, M. Sanchez-Cespedes, G. Capella, M. A. Peinado, D. N. Watkins, J. P. Issa, D. Sidransky, S. B. Baylin and J. G. Herman (2000). "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis." Cancer Res 60(9): 2368-71.
70. Eulalio, A., E. Huntzinger and E. Izaurralde (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." Cell 132(1): 9-14.
71. Fargeas, C. A., D. Corbeil and W. B. Huttner (2003). "AC133 antigen, CD133, prominin-1, prominin-2, etc.: prominin family gene products in need of a rational nomenclature." Stem Cells 21(4): 506-8.
72. Figarella-Branger, D., C. Colin, B. Coulibaly, B. Quilichini, A. Maues De Paula, C. Fernandez and C. Bouvier (2008). "[Histological and molecular classification of gliomas]." Rev Neurol (Paris) 164(6-7): 505-15.

73. Frankel, L. B., N. R. Christoffersen, A. Jacobsen, M. Lindow, A. Krogh and A. H. Lund (2008). "Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells." J Biol Chem 283(2): 1026-33.
74. Friedman, H. S., T. Kerby and H. Calvert (2000). "Temozolomide and treatment of malignant glioma." Clin Cancer Res 6(7): 2585-97.
75. Furnari, F. B., T. Fenton, R. M. Bachoo, A. Mukasa, J. M. Stommel, A. Stegh, W. C. Hahn, K. L. Ligon, D. N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R. A. DePinho and W. K. Cavenee (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." Genes Dev 21(21): 2683-710.
76. Galardi, S., N. Mercatelli, E. Giorda, S. Massalini, G. V. Frajese, S. A. Ciafre and M. G. Farace (2007). "miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1." J Biol Chem 282(32): 23716-24.
77. Galli, R., E. Binda, U. Orfanelli, B. Cipelletti, A. Gritti, S. De Vitis, R. Fiocco, C. Foroni, F. Dimeco and A. Vescovi (2004). "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma." Cancer Res 64(19): 7011-21.
78. Garcion, E., A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei and J. P. Benoit (2006). "A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats." Mol Cancer Ther 5(7): 1710-22.
79. Garzon, R. and C. M. Croce (2008). "MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis." Curr Opin Hematol 15(4): 352-8.
80. Garzon, R., G. Marcucci and C. M. Croce (2010). "Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges." Nat Rev Drug Discov 9(10): 775-89.
81. Geli, M. I. and H. Riezman (1998). "Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different." J Cell Sci 111 (Pt 8): 1031-7.
82. Gillies, J. K. and I. A. Lorimer (2007). "Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma." Cell Cycle 6(16): 2005-9.
83. Giraldez, A. J., R. M. Cinalli, M. E. Glasner, A. J. Enright, J. M. Thomson, S. Baskerville, S. M. Hammond, D. P. Bartel and A. F. Schier (2005). "MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish." Science 308(5723): 833-8.

84. Godlewski, J., M. O. Nowicki, A. Bronisz, S. Williams, A. Otsuki, G. Nuovo, A. Raychaudhury, H. B. Newton, E. A. Chiocca and S. Lawler (2008). "Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal." Cancer Res 68(22): 9125-30.
85. Goodell, M. A., K. Brose, G. Paradis, A. S. Conner and R. C. Mulligan (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med 183(4): 1797-806.
86. Gref, R., Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin and R. Langer (1994). "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres." Science 263(5153): 1600-3.
87. Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch and R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." Nature 432(7014): 235-40.
88. Griguer, C. E., C. R. Oliva, E. Gobin, P. Marcorelles, D. J. Benos, J. R. Lancaster, Jr. and G. Y. Gillespie (2008). "CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma." PLoS One 3(11): e3655.
89. Grossman, S. A. and J. F. Batara (2004). "Current management of glioblastoma multiforme." Semin Oncol 31(5): 635-44.
90. Grosso, S., J. Doyen, S. K. Parks, T. Bertero, A. Paye, B. Cardinaud, P. Gounon, S. Lacas-Gervais, A. Noel, J. Pouyssegur, P. Barbry, N. M. Mazure and B. Mari (2013). "MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines." Cell Death Dis 4: e544.
91. Han, J., Y. Lee, K. H. Yeom, J. W. Nam, I. Heo, J. K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B. T. Zhang and V. N. Kim (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell 125(5): 887-901.
92. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.
93. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-74.
94. Hariharan, M., V. Scaria, B. Pillai and S. K. Brahmachari (2005). "Targets for human encoded microRNAs in HIV genes." Biochem Biophys Res Commun 337(4): 1214-8.

95. Harrison, L. B., M. Chadha, R. J. Hill, K. Hu and D. Shasha (2002). "Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes." Oncologist 7(6): 492-508.
96. Hasselbalch, B., U. Lassen, H. S. Poulsen and M. T. Stockhausen (2010). "Cetuximab insufficiently inhibits glioma cell growth due to persistent EGFR downstream signaling." Cancer Invest 28(8): 775-87.
97. Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido and T. Takahashi (2005). "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation." Cancer Res 65(21): 9628-32.
98. He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." Nature 435(7043): 828-33.
99. Hemmati, H. D., I. Nakano, J. A. Lazareff, M. Masterman-Smith, D. H. Geschwind, M. Bronner-Fraser and H. I. Kornblum (2003). "Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors." Proc Natl Acad Sci U S A 100(25): 15178-83.
100. Hertel, J., M. Lindemeyer, K. Missal, C. Fried, A. Tanzer, C. Flamm, I. L. Hofacker and P. F. Stadler (2006). "The expansion of the metazoan microRNA repertoire." BMC Genomics 7: 25.
101. Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J. E. Proust and J. P. Benoit (2002). "A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers." Pharm Res 19(6): 875-80.
102. Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, M. C. Venier-Julienne, J. E. Proust, R. Phan-Tan-Luu and J. P. Benoit (2003). "The influence of lipid nanocapsule composition on their size distribution." Eur J Pharm Sci 18(1): 55-61.
103. Hobert, O. (2008). "Gene regulation by transcription factors and microRNAs." Science 319(5871): 1785-6.
104. Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst 93(4): 266-76.
105. Hsieh, C. H., C. H. Lee, J. A. Liang, C. Y. Yu and W. C. Shyu (2010). "Cycling hypoxia increases U87 glioma cell radioresistance via ROS induced higher and long-term HIF-1 signal transduction activity." Oncol Rep 24(6): 1629-36.

106. Huang, L. E., J. Gu, M. Schau and H. F. Bunn (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A 95(14): 7987-92.
107. Huang, X., Q. T. Le and A. J. Giaccia (2010). "MiR-210--micromanager of the hypoxia pathway." Trends Mol Med 16(5): 230-7.
108. Huang, X., L. Ding, K. L. Bennewith, R. T. Tong, S. M. Welford, K. K. Ang, M. Story, Q. T. Le and A. J. Giaccia (2009). "Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation." Mol Cell 35(6): 856-67.
109. Huang, X., S. Taeb, S. Jahangiri, U. Emmenegger, E. Tran, J. Bruce, A. Mesci, E. Korpela, D. Vesprini, C. S. Wong, R. G. Bristow, F. F. Liu and S. K. Liu (2013). "miRNA-95 mediates radioresistance in tumors by targeting the sphingolipid phosphatase SGPP1." Cancer Res.
110. Hudziak, R. M., E. Barofsky, D. F. Barofsky, D. L. Weller, S. B. Huang and D. D. Weller (1996). "Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation." Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6(4): 267-72.
111. Huttner, H. B., P. Janich, M. Kohrmann, J. Jaszai, F. Siebzehnruhl, I. Blumcke, M. Suttorp, M. Gahr, D. Kuhnt, C. Nimsky, D. Krex, G. Schackert, K. Lowenbruck, H. Reichmann, E. Juttler, W. Hacke, P. D. Schellinger, S. Schwab, M. Wilsch-Brauninger, A. M. Marzesco and D. Corbeil (2008). "The stem cell marker prominin-1/CD133 on membrane particles in human cerebrospinal fluid offers novel approaches for studying central nervous system disease." Stem Cells 26(3): 698-705.
112. Huwyler, J., D. Wu and W. M. Pardridge (1996). "Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes." Proc Natl Acad Sci U S A 93(24): 14164-9.
113. Ichimura, K., D. M. Pearson, S. Kocialkowski, L. M. Backlund, R. Chan, D. T. Jones and V. P. Collins (2009). "IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas." Neuro Oncol 11(4): 341-7.
114. Iorio, M. V., M. Ferracin, C. G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini and C. M. Croce (2005). "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." Cancer Res 65(16): 7065-70.

115. Ivan, M., K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane and W. G. Kaelin, Jr. (2001). "HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing." Science 292(5516): 464-8.
116. Jain, R. K., E. di Tomaso, D. G. Duda, J. S. Loeffler, A. G. Sorensen and T. T. Batchelor (2007). "Angiogenesis in brain tumours." Nat Rev Neurosci 8(8): 610-22.
117. Ji, Q., D. Karnak, P. Hao, R. Wang and L. Xu (2010). "No small matter: microRNAs - key regulators of cancer stem cells." Int J Clin Exp Med 3(1): 84-7.
118. Ji, Q., X. Hao, M. Zhang, W. Tang, M. Yang, L. Li, D. Xiang, J. T. Desano, G. T. Bommer, D. Fan, E. R. Fearon, T. S. Lawrence and L. Xu (2009). "MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells." PLoS One 4(8): e6816.
119. Johnson, S. M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown and F. J. Slack (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." Cell 120(5): 635-47.
120. Jossion, S., S. Y. Sung, K. Lao, L. W. Chung and P. A. Johnstone (2008). "Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines." Prostate 68(15): 1599-606.
121. Jubb, A. M. and A. L. Harris (2010). "Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer." Lancet Oncol 11(12): 1172-83.
122. Kanu, O. O., B. Hughes, C. Di, N. Lin, J. Fu, D. D. Bigner, H. Yan and C. Adamson (2009). "Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways." Clin Med Oncol 3: 39-52.
123. Kawabata, K., Y. Takakura and M. Hashida (1995). "The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake." Pharm Res 12(6): 825-30.
124. Kefas, B., J. Godlewski, L. Comeau, Y. Li, R. Abounader, M. Hawkinson, J. Lee, H. Fine, E. A. Chiocca, S. Lawler and B. Purow (2008). "microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma." Cancer Res 68(10): 3566-72.
125. Kefas, B., L. Comeau, D. H. Floyd, O. Seleverstov, J. Godlewski, T. Schmittgen, J. Jiang, C. G. diPierro, Y. Li, E. A. Chiocca, J. Lee, H. Fine, R. Abounader, S. Lawler and B. Purow (2009). "The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors." J Neurosci 29(48): 15161-8.

126. Kessler, J., A. Hahnel, H. Wichmann, S. Rot, M. Kappler, M. Bache and D. Vordermark (2010). "HIF-1alpha inhibition by siRNA or chetomin in human malignant glioma cells: effects on hypoxic radioresistance and monitoring via CA9 expression." BMC Cancer 10: 605.
127. Keunen, O., M. Johansson, A. Oudin, M. Sanzey, S. A. Rahim, F. Fack, F. Thorsen, T. Taxt, M. Bartos, R. Jirik, H. Miletic, J. Wang, D. Stieber, L. Stuhr, I. Moen, C. B. Rygh, R. Bjerkvig and S. P. Niclou (2011). "Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A 108(9): 3749-54.
128. Kioi, M., H. Vogel, G. Schultz, R. M. Hoffman, G. R. Harsh and J. M. Brown (2010). "Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice." J Clin Invest 120(3): 694-705.
129. Kirchhausen, T. (2000). "Clathrin." Annu Rev Biochem 69: 699-727.
130. Kleihues, P. and L. H. Sobin (2000). "World Health Organization classification of tumors." Cancer 88(12): 2887.
131. Kluiver, J., B. J. Kroesen, S. Poppema and A. van den Berg (2006). "The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies." Leukemia 20(11): 1931-6.
132. Kong, W., L. He, M. Coppola, J. Guo, N. N. Esposito, D. Coppola and J. Q. Cheng (2010). "MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer." J Biol Chem 285(23): 17869-79.
133. Kopp, H. G., C. A. Ramos and S. Rafii (2006). "Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue." Curr Opin Hematol 13(3): 175-81.
134. Kouhkan, F., M. Soleimani, M. Daliri, M. Behmanesh, N. Mobarra, M. Mossahebi Mohammadi, S. Mohammad, M. Mokhtari and R. Lahmy (2013). "miR-451 Up-regulation, Induce Erythroid Differentiation of CD133+cells Independent of Cytokine Cocktails." Iran J Basic Med Sci 16(6): 756-63.
135. Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." Nature 438(7068): 685-9.

136. Kulshreshtha, R., M. Ferracin, S. E. Wojcik, R. Garzon, H. Alder, F. J. Agosto-Perez, R. Davuluri, C. G. Liu, C. M. Croce, M. Negrini, G. A. Calin and M. Ivan (2007). "A microRNA signature of hypoxia." Mol Cell Biol 27(5): 1859-67.
137. Kurreck, J., E. Wyszko, C. Gillen and V. A. Erdmann (2002). "Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids." Nucleic Acids Res 30(9): 1911-8.
138. Lacoeyille, F., E. Garcion, J. P. Benoit and A. Lamprecht (2007). "Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs." J Nanosci Nanotechnol 7(12): 4612-7.
139. Lages, E., A. Guttin, M. El Atifi, C. Ramus, H. Ipas, I. Dupre, D. Rolland, C. Salon, C. Godfraind, F. Defraipont, M. Dhobb, L. Pelletier, D. Wion, E. Gay, F. Berger and J. P. Issartel (2011). "MicroRNA and Target Protein Patterns Reveal Physiopathological Features of Glioma Subtypes." PLoS One 6(5): e20600.
140. Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science 294(5543): 853-8.
141. Lai, A., A. Tran, P. L. Nghiemphu, W. B. Pope, O. E. Solis, M. Selch, E. Filka, W. H. Yong, P. S. Mischel, L. M. Liau, S. Phuphanich, K. Black, S. Peak, R. M. Green, C. E. Spier, T. Kolevska, J. Polikoff, L. Fehrenbacher, R. Elashoff and T. Cloughesy (2011). "Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme." J Clin Oncol 29(2): 142-8.
142. Lam, J. K., W. Liang and H. K. Chan (2012). "Pulmonary delivery of therapeutic siRNA." Adv Drug Deliv Rev 64(1): 1-15.
143. Lathia, J. D., J. Gallagher, J. M. Heddleston, J. Wang, C. E. Eyler, J. Macswords, Q. Wu, A. Vasanji, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2010). "Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells." Cell Stem Cell 6(5): 421-32.
144. Lathia, J. D., M. Li, P. Sathyan, H. J., Z. P., G. J., W. Q., C. C.T., N. U., H. A., M. S. and J. N. Rich (2012). "Cell-cell communication informs cancer stem cell maintenance and signaling in glioblastoma." Neuro Oncol 14(Suppl 6): vi142-vi152.
145. Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." Science 294(5543): 862-4.
146. Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell 75(5): 843-54.

147. Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek and V. N. Kim (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo J 23(20): 4051-60.
148. Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature 425(6956): 415-9.
149. Lee, Y. S. and A. Dutta (2009). "MicroRNAs in cancer." Annu Rev Pathol 4: 199-227.
150. Lewis, B. P., C. B. Burge and D. P. Bartel (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell 120(1): 15-20.
151. Li, C., Y. Feng, G. Coukos and L. Zhang (2009). "Therapeutic microRNA strategies in human cancer." Aaps J 11(4): 747-57.
152. Li, W. B., K. Tang, W. Zhang, W. Yan, G. You, S. W. Li, L. Zhang, Y. J. Huang and T. Jiang (2013). "Relationship between magnetic resonance imaging and molecular pathology in patients with glioblastoma multiforme." Chin Med J (Engl) 124(17): 2589-92.
153. Li, Z., S. Bao, Q. Wu, H. Wang, C. Eyler, S. Sathornsumetee, Q. Shi, Y. Cao, J. Lathia, R. E. McLendon, A. B. Hjelmeland and J. N. Rich (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." Cancer Cell 15(6): 501-13.
154. Liang, Z., J. Ahn, D. Guo, J. R. Votaw and H. Shim (2012). "MicroRNA-302 replacement therapy sensitizes breast cancer cells to ionizing radiation." Pharm Res 30(4): 1008-16.
155. Liu, G., X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I. R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K. L. Black and J. S. Yu (2006). "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma." Mol Cancer 5: 67.
156. Liu, J., M. A. Valencia-Sanchez, G. J. Hannon and R. Parker (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." Nat Cell Biol 7(7): 719-23.
157. Lopez-Barneo, J., R. Pardal and P. Ortega-Saenz (2001). "Cellular mechanism of oxygen sensing." Annu Rev Physiol 63: 259-87.

158. Louis, D. N., H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer and P. Kleihues (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol 114(2): 97-109.
159. Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg and U. Kutay (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science 303(5654): 95-8.
160. Maeda, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori (2000). "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review." J Control Release 65(1-2): 271-84.
161. Mallanna, S. K. and A. Rizzino (2010). "Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells." Dev Biol 344(1): 16-25.
162. Mallet, W. G. and F. R. Maxfield (2000). "Endocytosis." Adv Nephrol Necker Hosp 30: 109-25.
163. Malzkorn, B., M. Wolter, F. Liesenberg, M. Grzendowski, K. Stuhler, H. E. Meyer and G. Reifenberger (2010). "Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas." Brain Pathol 20(3): 539-50.
164. Martin-Duverneuil, N., R. Guillemin and J. Chiras (2008). "[Imaging of gliomas]." Cancer Radiother 12(6-7): 669-75.
165. Matsumura, Y. and H. Maeda (1986). "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs." Cancer Res 46(12 Pt 1): 6387-92.
166. Maw, M. A., D. Corbeil, J. Koch, A. Hellwig, J. C. Wilson-Wheeler, R. J. Bridges, G. Kumaramanickavel, S. John, D. Nancarrow, K. Roper, A. Weigmann, W. B. Huttner and M. J. Denton (2000). "A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration." Hum Mol Genet 9(1): 27-34.
167. McCord, A. M., M. Jamal, E. S. Williams, K. Camphausen and P. J. Tofilon (2009). "CD133+ glioblastoma stem-like cells are radiosensitive with a defective DNA damage response compared with established cell lines." Clin Cancer Res 15(16): 5145-53.
168. Medina, P. P., M. Nolde and F. J. Slack (2010). "OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma." Nature 467(7311): 86-90.

169. Medina, R., S. K. Zaidi, C. G. Liu, J. L. Stein, A. J. van Wijnen, C. M. Croce and G. S. Stein (2008). "MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival." Cancer Res 68(8): 2773-80.
170. Meijer, T. W., J. H. Kaanders, P. N. Span and J. Bussink (2012). "Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy." Clin Cancer Res 18(20): 5585-94.
171. Meister, G., M. Landthaler, Y. Dorsett and T. Tuschl (2004). "Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing." Rna 10(3): 544-50.
172. Mellinghoff, I. K., M. Y. Wang, I. Vivanco, D. A. Haas-Kogan, S. Zhu, E. Q. Dia, K. V. Lu, K. Yoshimoto, J. H. Huang, D. J. Chute, B. L. Riggs, S. Horvath, L. M. Liau, W. K. Cavenee, P. N. Rao, R. Beroukhi, T. C. Peck, J. C. Lee, W. R. Sellers, D. Stokoe, M. Prados, T. F. Cloughesy, C. L. Sawyers and P. S. Mischel (2005). "Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors." N Engl J Med 353(19): 2012-24.
173. Menei, P., P. Metellus, E. Parot-Schinkel, H. Loiseau, L. Capelle, G. Jacquet and J. Guyotat (2010). "Biodegradable carmustine wafers (Gliadel) alone or in combination with chemoradiotherapy: the French experience." Ann Surg Oncol 17(7): 1740-6.
174. Michael, M. Z., O. C. SM, N. G. van Holst Pellekaan, G. P. Young and R. J. James (2003). "Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia." Mol Cancer Res 1(12): 882-91.
175. Miraglia, S., W. Godfrey, A. H. Yin, K. Atkins, R. Warnke, J. T. Holden, R. A. Bray, E. K. Waller and D. W. Buck (1997). "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning." Blood 90(12): 5013-21.
176. Moffat, B. A., G. R. Reddy, P. McConville, D. E. Hall, T. L. Chenevert, R. R. Kopelman, M. Philbert, R. Weissleder, A. Rehemtulla and B. D. Ross (2003). "A novel polyacrylamide magnetic nanoparticle contrast agent for molecular imaging using MRI." Mol Imaging 2(4): 324-32.
177. Montet, X., K. Montet-Abou, F. Reynolds, R. Weissleder and L. Josephson (2006). "Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells." Neoplasia 8(3): 214-22.
178. Mott, J. L., S. Kobayashi, S. F. Bronk and G. J. Gores (2007). "mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis." Oncogene 26(42): 6133-40.

179. Moulton, H. M., M. H. Nelson, S. A. Hatlevig, M. T. Reddy and P. L. Iversen (2004). "Cellular uptake of antisense morpholino oligomers conjugated to arginine-rich peptides." Bioconjug Chem 15(2): 290-9.
180. Muller, R. H. and C. M. Keck (2004). "Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs--a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles." J Biotechnol 113(1-3): 151-70.
181. Nagel, R., C. le Sage, B. Diosdado, M. van der Waal, J. A. Oude Vrielink, A. Bolijn, G. A. Meijer and R. Agami (2008). "Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer." Cancer Res 68(14): 5795-802.
182. Nakamura, M., Y. Yonekawa, P. Kleihues and H. Ohgaki (2001). "Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas." Lab Invest 81(1): 77-82.
183. Nana-Sinkam, S. P. and C. M. Croce (2013). "Clinical applications for microRNAs in cancer." Clin Pharmacol Ther 93(1): 98-104.
184. Nel, A. E., L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E. M. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova and M. Thompson (2009). "Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface." Nat Mater 8(7): 543-57.
185. Nicoloso, M. S., R. Spizzo, M. Shimizu, S. Rossi and G. A. Calin (2009). "MicroRNAs--the micro steering wheel of tumour metastases." Nat Rev Cancer 9(4): 293-302.
186. Nikiforova, M. N., M. Gandhi, L. Kelly and Y. E. Nikiforov (2011). "MicroRNA dysregulation in human thyroid cells following exposure to ionizing radiation." Thyroid 21(3): 261-6.
187. Nolo, R., C. M. Morrison, C. Tao, X. Zhang and G. Halder (2006). "The bantam microRNA is a target of the hippo tumor-suppressor pathway." Curr Biol 16(19): 1895-904.
188. Novakova, J., O. Slaby, R. Vyzula and J. Michalek (2009). "MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis." Biochem Biophys Res Commun 386(1): 1-5.
189. O'Donnell, K. A., E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang and J. T. Mendell (2005). "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression." Nature 435(7043): 839-43.
190. Ohgaki, H. and P. Kleihues (2005). "Epidemiology and etiology of gliomas." Acta Neuropathol 109(1): 93-108.

191. Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." Am J Pathol 170(5): 1445-53.
192. Oka, N., A. Soeda, A. Inagaki, M. Onodera, H. Maruyama, A. Hara, T. Kunisada, H. Mori and T. Iwama (2007). "VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells." Biochem Biophys Res Commun 360(3): 553-9.
193. Orlandi, P. A. and P. H. Fishman (1998). "Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains." J Cell Biol 141(4): 905-15.
194. Paillard, A., F. Hindre, C. Vignes-Colombeix, J. P. Benoit and E. Garcion (2010). "The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability." Biomaterials 31(29): 7542-54.
195. Palcic, B., J. W. Brosing and L. D. Skarsgard (1982). "Survival measurements at low doses: oxygen enhancement ratio." Br J Cancer 46(6): 980-4.
196. Pallini, R., L. Ricci-Vitiani, G. L. Banna, M. Signore, D. Lombardi, M. Todaro, G. Stassi, M. Martini, G. Maira, L. M. Larocca and R. De Maria (2008). "Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme." Clin Cancer Res 14(24): 8205-12.
197. Pang, J. C., W. K. Kwok, Z. Chen and H. K. Ng (2009). "Oncogenic role of microRNAs in brain tumors." Acta Neuropathol 117(6): 599-611.
198. Paranjape, T., F. J. Slack and J. B. Weidhaas (2009). "MicroRNAs: tools for cancer diagnostics." Gut 58(11): 1546-54.
199. Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature 408(6808): 86-9.
200. Peer, D., J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit and R. Langer (2007). "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy." Nat Nanotechnol 2(12): 751-60.
201. Perkins, D. O., C. D. Jeffries, L. F. Jarskog, J. M. Thomson, K. Woods, M. A. Newman, J. S. Parker, J. Jin and S. M. Hammond (2007). "microRNA expression in the prefrontal

- cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder." Genome Biol 8(2): R27.
202. Perrier, T., P. Saulnier, F. Fouchet, N. Lautram and J. P. Benoit (2010). "Post-insertion into Lipid NanoCapsules (LNCs): From experimental aspects to mechanisms." Int J Pharm 396(1-2): 204-9.
203. Petit, S., E. Garcion, J. P. Benoit and P. Menei (2008). "[Local chemotherapy of malignant glioma: from syringe injections to nanotechnology]." Rev Neurol (Paris) 164(6-7): 547-53.
204. Piccirillo, S. G., B. A. Reynolds, N. Zanetti, G. Lamorte, E. Binda, G. Broggi, H. Brem, A. Olivi, F. Dimeco and A. L. Vescovi (2006). "Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells." Nature 444(7120): 761-5.
205. Pistollato, F., S. Abbadi, E. Rampazzo, L. Persano, A. Della Puppa, C. Frasson, E. Sarto, R. Scienza, D. D'Avella and G. Basso (2010). "Intratumoral hypoxic gradient drives stem cells distribution and MGMT expression in glioblastoma." Stem Cells 28(5): 851-62.
206. Pistollato, F., H. L. Chen, B. R. Rood, H. Z. Zhang, D. D'Avella, L. Denaro, M. Gardiman, G. te Kronnie, P. H. Schwartz, E. Favaro, S. Indraccolo, G. Basso and D. M. Panchision (2009). "Hypoxia and HIF1alpha repress the differentiative effects of BMPs in high-grade glioma." Stem Cells 27(1): 7-17.
207. Platet, N., S. Y. Liu, M. E. Atifi, L. Oliver, F. M. Vallette, F. Berger and D. Wion (2007). "Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures." Cancer Lett 258(2): 286-90.
208. Potten, C. S. and M. Loeffler (1990). "Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt." Development 110(4): 1001-20.
209. Raouane, M., D. Desmaele, G. Urbinati, L. Massaad-Massade and P. Couvreur (2012). "Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery." Bioconjug Chem.
210. Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz and G. Ruvkun (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature 403(6772): 901-6.

211. Roger, E., F. Lagarce, E. Garcion and J. P. Benoit (2009). "Lipid nanocarriers improve paclitaxel transport throughout human intestinal epithelial cells by using vesicle-mediated transcytosis." J Control Release 140(2): 174-81.
212. Roush, S. and F. J. Slack (2008). "The let-7 family of microRNAs." Trends Cell Biol 18(10): 505-16.
213. Ruberti, F., C. Barbato and C. Cogoni (2012). "Targeting microRNAs in neurons: tools and perspectives." Exp Neurol 235(2): 419-26.
214. Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J. M. Friedman, J. C. Chuang, G. A. Coetzee and P. A. Jones (2006). "Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells." Cancer Cell 9(6): 435-43.
215. Salim, H., N. S. Akbar, D. Zong, A. H. Vaculova, R. Lewensohn, A. Moshfegh, K. Viktorsson and B. Zhivotovsky (2012). "miRNA-214 modulates radiotherapy response of non-small cell lung cancer cells through regulation of p38MAPK, apoptosis and senescence." Br J Cancer 107(8): 1361-73.
216. Sallustio, F., G. Serino, V. Costantino, C. Curci, S. N. Cox, G. De Palma and F. P. Schena (2013). "miR-1915 and miR-1225-5p regulate the expression of CD133, PAX2 and TLR2 in adult renal progenitor cells." PLoS One 8(7): e68296.
217. Schofield, C. J. and P. J. Ratcliffe (2004). "Oxygen sensing by HIF hydroxylases." Nat Rev Mol Cell Biol 5(5): 343-54.
218. Schulte, A., H. S. Gunther, H. S. Phillips, D. Kemming, T. Martens, S. Kharbanda, R. H. Soriano, Z. Modrusan, S. Zapf, M. Westphal and K. Lamszus (2011). "A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target." Glia 59(4): 590-602.
219. Sethupathy, P., B. Corda and A. G. Hatzigeorgiou (2006). "TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets." Rna 12(2): 192-7.
220. Shapira, A., Y. D. Livney, H. J. Broxterman and Y. G. Assaraf (2011). "Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance." Drug Resist Updat.
221. Shervington, A. and C. Lu (2008). "Expression of multidrug resistance genes in normal and cancer stem cells." Cancer Invest 26(5): 535-42.

222. Shi, L., J. Chen, J. Yang, T. Pan, S. Zhang and Z. Wang (2010). "MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity." Brain Res 1352: 255-64.
223. Shi, L., Z. Cheng, J. Zhang, R. Li, P. Zhao, Z. Fu and Y. You (2008). "hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells." Brain Res 1236: 185-93.
224. Shin, S., H. J. Cha, E. M. Lee, J. H. Jung, S. J. Lee, I. C. Park, Y. W. Jin and S. An (2009). "MicroRNAs are significantly influenced by p53 and radiation in HCT116 human colon carcinoma cells." Int J Oncol 34(6): 1645-52.
225. Shin, S., H. J. Cha, E. M. Lee, S. J. Lee, S. K. Seo, H. O. Jin, I. C. Park, Y. W. Jin and S. An (2009). "Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells." Int J Oncol 35(1): 81-6.
226. Shmelkov, S. V., R. St Clair, D. Lyden and S. Rafii (2005). "AC133/CD133/Prominin-1." Int J Biochem Cell Biol 37(4): 715-9.
227. Si, M. L., S. Zhu, H. Wu, Z. Lu, F. Wu and Y. Y. Mo (2007). "miR-21-mediated tumor growth." Oncogene 26(19): 2799-803.
228. Silber, J., C. D. James and J. G. Hodgson (2009). "microRNAs in gliomas: small regulators of a big problem." Neuromolecular Med 11(3): 208-22.
229. Silber, J., D. A. Lim, C. Petritsch, A. I. Persson, A. K. Maunakea, M. Yu, S. R. Vandenberg, D. G. Ginzinger, C. D. James, J. F. Costello, G. Bergers, W. A. Weiss, A. Alvarez-Buylla and J. G. Hodgson (2008). "miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells." BMC Med 6: 14.
230. Simone, N. L., B. P. Soule, D. Ly, A. D. Saleh, J. E. Savage, W. Degraff, J. Cook, C. C. Harris, D. Gius and J. B. Mitchell (2009). "Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression." PLoS One 4(7): e6377.
231. Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire and P. B. Dirks (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." Cancer Res 63(18): 5821-8.
232. Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, Jr., B. S. Carter, A. M. Krichevsky and X. O. Breakefield (2008). "Glioblastoma

- microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." Nat Cell Biol 10(12): 1470-6.
233. Soeda, A., M. Park, D. Lee, A. Mintz, A. Androutsellis-Theotokis, R. D. McKay, J. Engh, T. Iwama, T. Kunisada, A. B. Kassam, I. F. Pollack and D. M. Park (2009). "Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha." Oncogene 28(45): 3949-59.
 234. Sotillo, E. and A. Thomas-Tikhonenko (2011). "Shielding the messenger (RNA): microRNA-based anticancer therapies." Pharmacol Ther 131(1): 18-32.
 235. Stenvang, J. and S. Kauppinen (2008). "MicroRNAs as targets for antisense-based therapeutics." Expert Opin Biol Ther 8(1): 59-81.
 236. Storm, G., M. T. ten Kate, P. K. Working and I. A. Bakker-Woudenberg (1998). "Doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes: effects on bacterial blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system." Clin Cancer Res 4(1): 111-5.
 237. Stupp, R. and M. E. Hegi (2007). "Targeting brain-tumor stem cells." Nat Biotechnol 25(2): 193-4.
 238. Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer and R. O. Mirimanoff (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." N Engl J Med 352(10): 987-96.
 239. Taieb, N., M. Maresca, X. J. Guo, N. Garay, J. Fantini and N. Yahi (2009). "The first extracellular domain of the tumour stem cell marker CD133 contains an antigenic ganglioside-binding motif." Cancer Lett 278(2): 164-73.
 240. Tarahovsky, Y. S., R. Koyanova and R. C. MacDonald (2004). "DNA release from lipoplexes by anionic lipids: correlation with lipid mesomorphism, interfacial curvature, and membrane fusion." Biophys J 87(2): 1054-64.
 241. Torchilin, V. (2009). "Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers." Eur J Pharm Biopharm 71(3): 431-44.
 242. Vanpouille-Box, C., F. Lacoëuille, C. Belloche, N. Lepareur, L. Lemaire, J. J. LeJeune, J. P. Benoit, P. Menei, O. F. Couturier, E. Garcion and F. Hindre (2011). "Tumor

- eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules." *Biomaterials* 32(28): 6781-90.
243. Vanpouille-Box, C., F. Lacoeyille, J. Roux, C. Aube, E. Garcion, N. Lepareur, F. Oberti, F. Bouchet, N. Noiret, E. Garin, J. P. Benoit, O. Couturier and F. Hindre (2011). "Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model." *PLoS One* 6(3): e16926.
244. Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris and C. M. Croce (2006). "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(7): 2257-61.
245. Voorhoeve, P. M., C. le Sage, M. Schrier, A. J. Gillis, H. Stoop, R. Nagel, Y. P. Liu, J. van Duijse, J. Drost, A. Griekspoor, E. Zlotorynski, N. Yabuta, G. De Vita, H. Nojima, L. H. Looijenga and R. Agami (2006). "A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors." *Cell* 124(6): 1169-81.
246. Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, J. E. Herndon, 2nd, J. Marcello, D. A. Reardon, J. A. Quinn, J. N. Rich, S. Sathornsumetee, S. Gururangan, J. Sampson, M. Wagner, L. Bailey, D. D. Bigner, A. H. Friedman and H. S. Friedman (2007). "Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme." *J Clin Oncol* 25(30): 4722-9.
247. Wagner-Ecker, M., C. Schwager, U. Wirkner, A. Abdollahi and P. E. Huber (2011). "MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells." *Radiat Oncol* 5: 25.
248. Wang, P., J. Zhang, L. Zhang, Z. Zhu, J. Fan, L. Chen, L. Zhuang, J. Luo, H. Chen, L. Liu, Z. Chen and Z. Meng (2013). "MicroRNA 23b Regulates Autophagy Associated With Radioresistance of Pancreatic Cancer Cells." *Gastroenterology*.
249. Wang, X. C., L. Q. Du, L. L. Tian, H. L. Wu, X. Y. Jiang, H. Zhang, D. G. Li, Y. Y. Wang, H. Y. Wu, Y. She, Q. F. Liu, F. Y. Fan and A. M. Meng (2011). "Expression and function of miRNA in postoperative radiotherapy sensitive and resistant patients of non-small cell lung cancer." *Lung Cancer* 72(1): 92-9.
250. Wang, Y. and C. G. Lee (2009). "MicroRNA and cancer--focus on apoptosis." *J Cell Mol Med* 13(1): 12-23.

251. Wei, F., Y. Liu, Y. Guo, A. Xiang, G. Wang, X. Xue and Z. Lu (2013). "miR-99b-targeted mTOR induction contributes to irradiation resistance in pancreatic cancer." Mol Cancer 12(1): 81.
252. Weigmann, A., D. Corbeil, A. Hellwig and W. B. Huttner (1997). "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A 94(23): 12425-30.
253. Weiler, J., J. Hunziker and J. Hall (2006). "Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease?" Gene Ther 13(6): 496-502.
254. Wenger, R. H., D. P. Stiehl and G. Camenisch (2005). "Integration of oxygen signaling at the consensus HRE." Sci STKE 2005(306): re12.
255. Westphal, M., Z. Ram, V. Riddle, D. Hilt and E. Bortey (2006). "Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial." Acta Neurochir (Wien) 148(3): 269-75; discussion 275.
256. Wienholds, E., M. J. Koudijs, F. J. van Eeden, E. Cuppen and R. H. Plasterk (2003). "The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development." Nat Genet 35(3): 217-8.
257. Wolburg, H. and A. Lippoldt (2002). "Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation." Vascul Pharmacol 38(6): 323-37.
258. Wu, B. L., L. Y. Xu, Z. P. Du, L. D. Liao, H. F. Zhang, Q. Huang, G. Q. Fang and E. M. Li (2010). "MiRNA profile in esophageal squamous cell carcinoma: downregulation of miR-143 and miR-145." World J Gastroenterol 17(1): 79-88.
259. Wu, Q., R. Guo, M. Lin, B. Zhou and Y. Wang (2011). "MicroRNA-200a inhibits CD133/1+ ovarian cancer stem cells migration and invasion by targeting E-cadherin repressor ZEB2." Gynecol Oncol 122(1): 149-54.
260. Wu, Y., M. Crawford, Y. Mao, R. J. Lee, I. C. Davis, T. S. Elton, L. J. Lee and S. P. Nana-Sinkam (2013). "Therapeutic Delivery of MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer." Mol Ther Nucleic Acids 2: e84.
261. Wurdinger, T. and B. A. Tannous (2009). "Glioma angiogenesis: Towards novel RNA therapeutics." Cell Adh Migr 3(2): 230-5.

262. Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R. M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G. A. Calin, C. G. Liu, C. M. Croce and C. C. Harris (2006). "Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis." Cancer Cell 9(3): 189-98.
263. Yang, C., Y. Yang, N. Gupta, X. Liu, A. He, L. Liu, J. Zuo, Y. Chang and F. Fang (2007). "Pentaspine membrane glycoprotein, prominin-1, is involved in glucose metabolism and cytoskeleton alteration." Biochemistry (Mosc) 72(8): 854-62.
264. Yang, L., L. M. DeBusk, K. Fukuda, B. Fingleton, B. Green-Jarvis, Y. Shyr, L. M. Matrisian, D. P. Carbone and P. C. Lin (2004). "Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis." Cancer Cell 6(4): 409-21.
265. Yang, Z., Y. Chen, C. Lillo, J. Chien, Z. Yu, M. Michaelides, M. Klein, K. A. Howes, Y. Li, Y. Kaminoh, H. Chen, C. Zhao, Y. T. Al-Sheikh, G. Karan, D. Corbeil, P. Escher, S. Kamaya, C. Li, S. Johnson, J. M. Frederick, Y. Zhao, C. Wang, D. J. Cameron, W. B. Huttner, D. F. Schorderet, F. L. Munier, A. T. Moore, D. G. Birch, W. Baehr, D. M. Hunt, D. S. Williams and K. Zhang (2008). "Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice." J Clin Invest 118(8): 2908-16.
266. Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." Blood 90(12): 5002-12.
267. Yokosawa, M., Y. Sonoda, S. Sugiyama, R. Saito, Y. Yamashita, M. Nishihara, T. Satoh, T. Kumabe, M. Yokoyama and T. Tominaga (2010). "Convection-enhanced delivery of a synthetic retinoid Am80, loaded into polymeric micelles, prolongs the survival of rats bearing intracranial glioblastoma xenografts." Tohoku J Exp Med 221(4): 257-64.
268. Yu, F., H. Yao, P. Zhu, X. Zhang, Q. Pan, C. Gong, Y. Huang, X. Hu, F. Su, J. Lieberman and E. Song (2007). "let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells." Cell 131(6): 1109-23.
269. Yuan, X., J. Curtin, Y. Xiong, G. Liu, S. Waschmann-Hogiu, D. L. Farkas, K. L. Black and J. S. Yu (2004). "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme." Oncogene 23(58): 9392-400.

270. Yung, W. K., A. P. Kyritsis, M. J. Gleason and V. A. Levin (1996). "Treatment of recurrent malignant gliomas with high-dose 13-cis-retinoic acid." Clin Cancer Res 2(12): 1931-5.
271. Zacchigna, S., H. Oh, M. Wilsch-Brauninger, E. Missol-Kolka, J. Jaszai, S. Jansen, N. Tanimoto, F. Tonagel, M. Seeliger, W. B. Huttner, D. Corbeil, M. Dewerchin, S. Vinckier, L. Moons and P. Carmeliet (2009). "Loss of the cholesterol-binding protein prominin-1/CD133 causes disk dysmorphogenesis and photoreceptor degeneration." J Neurosci 29(7): 2297-308.
272. Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb and T. A. Anderson (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." Dev Biol 302(1): 1-12.
273. Zhang, C. Z., J. X. Zhang, A. L. Zhang, Z. D. Shi, L. Han, Z. F. Jia, W. D. Yang, G. X. Wang, T. Jiang, Y. P. You, P. Y. Pu, J. Q. Cheng and C. S. Kang (2010). "MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma." Mol Cancer 9: 229.
274. Zhang, J., N. Luo, Y. Luo, Z. Peng, T. Zhang and S. Li (2012). "microRNA-150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through negative regulation of the transcription factor c-Myb." Int J Oncol 40(3): 747-56.
275. Zhang, L. and G. Coukos (2006). "MicroRNAs: a new insight into cancer genome." Cell Cycle 5(19): 2216-9.
276. Zhang, Y., L. X. Yan, Q. N. Wu, Z. M. Du, J. Chen, D. Z. Liao, M. Y. Huang, J. H. Hou, Q. L. Wu, M. S. Zeng, W. Huang, Y. X. Zeng and J. Y. Shao (2011). "miR-125b is Methylated and Functions as A Tumor Suppressor by Regulating the ETS1 proto-oncogene in Human Invasive Breast Cancer." Cancer Res.
277. Zhao, Y., E. Samal and D. Srivastava (2005). "Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis." Nature 436(7048): 214-20.
278. Zhong, H., A. M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza and J. W. Simons (1999). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases." Cancer Res 59(22): 5830-5.
279. Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature 408(6811): 433-9.

280. Zimmerman, A. L. and S. Wu (2010). "MicroRNAs, cancer and cancer stem cells." Cancer Lett 300(1): 10-9.

RÉSUMÉ

Le glioblastome est la tumeur maligne primaire du cerveau la plus courante et la plus agressive chez l'homme. Son traitement conventionnel est palliatif et l'apparition de récurrences est systématique. Dans le but de développer des thérapies innovantes basées sur le ciblage de nouvelles entités tumorales à l'aide de nanovecteur de médicaments, deux cibles ont été investiguées : le marqueur de radiorésistance AC133/1 et les onco-microARN. En utilisant des cellules de glioblastomes issues de patients, nous avons démontré que leur expansion *in vitro* à une pO_2 non-physiologique (21%) altère leur agressivité tumorale *in vivo* et l'expression originelle d'AC133/1, au contraire d'une pO_2 physiologique (3%) soulignant qu'AC133/1 est un marqueur précoce de non exposition à des pO_2 élevées. Nous identifions par ailleurs un rôle pour AC133/1 dans l'endocytose du récepteur de la transferrine et son partenariat avec le métabolisme du fer. Enfin nous avons développé et caractérisé des immunonanoparticules capables de véhiculer des chimiothérapies ou des radiopharmaceutiques vers cet épitope fonctionnel. Dans un second axe de recherche, en parallèle d'établir le miRnome humain en réponse à l'action d'une radiothérapie, des nanocapsules lipidiques biomimétiques présentant à leur surface des peptides de papillomavirus et capables de se complexer avec des acides nucléiques antagonistes de microARN ont été développées et évaluées, démontrant leur intérêt en synergie d'une radiothérapie. Collectivement et en amont d'expérimentations *in vivo* en cours, ces résultats soulignent la pertinence d'appliquer de nouvelles nanomédecines ciblées pour le contournement de la radiorésistance dans le glioblastome.

mots-clés : glioblastome, CD133, cellules cancéreuses de type souche, hypoxie, métabolisme du fer, transferrine, microARN, radiothérapies, locked nucleic acid, nanomédecine, nanoparticules, peptide, anticorps

ABSTRACT

Glioblastoma is the primary malignant tumour of the most common and most aggressive brain in humans. Its conventional treatment is only palliative and the appearance of recurrences is systematic. In order to develop innovative therapies based on targeting new tumour entities, two targets were investigated: the marker of radioresistance AC133/1 and onco-microRNAs. Using glioblastoma cells from patients, we demonstrated that their *in vitro* expansion to a non-physiological pO_2 (21%) impairs *in vivo* their tumour aggressiveness and original expression of AC133/1, unlike physiological pO_2 (3%) highlighting qu'AC133/1 is an early marker of non-exposure to high pO_2 . We also identify a role for AC133/1 in endocytosis of transferrin receptor and its partnership with iron metabolism. Finally we have developed and characterized immunonanoparticles able to convey chemotherapy or radiopharmaceuticals to this functional epitope. In parallel, in a second search axis, we establish the human miRnome in response to the action of radiation. Biomimetic lipid nanocapsules having on their surface and papillomavirus peptides capable of complexing with antagonists microRNAs have been developed and evaluated and have demonstrated their interest with synergy radiotherapy. Collectively and upstream of *in vivo* experiments in progress, these results underscore the relevance of applying novel targeted nanomedicine for circumvention of radioresistance in glioblastoma.

keywords : glioblastoma, CD133, stem-like cancer cells, hypoxia, iron metabolism, transferrin, microRNAs, radiotherapy, locked nucleic acid, nanomedicine, nanoparticles, peptide, antibody

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Audrey GRIVEAU
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **31 / 10 / 2013**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Thèse de Doctorat

Résumé

Le glioblastome est la tumeur maligne primaire du cerveau la plus courante et la plus agressive chez l'homme. Son traitement conventionnel est palliatif et l'apparition de récurrences est systématique. Dans le but de développer des thérapies innovantes basées sur le ciblage de nouvelles entités tumorales à l'aide de nanovecteur de médicaments, deux cibles ont été investiguées : le marqueur de radioresistance AC133/1 et les onco-microARN. En utilisant des cellules de glioblastomes issues de patients, nous avons démontré que leur expansion *in vitro* à une pO₂ non-physiologique (21%) altère leur agressivité tumorale *in vivo* et l'expression originelle d'AC133/1, au contraire d'une pO₂ physiologique (3%) soulignant qu'AC133/1 est un marqueur précoce de non exposition à des pO₂ élevées. Nous identifions par ailleurs un rôle pour AC133/1 dans l'endocytose du récepteur de la transferrine et son partenariat avec le métabolisme du fer. Enfin nous avons développé et caractérisé des immunonanoparticules capables de véhiculer des chimiothérapies ou des radiopharmaceutiques vers cet épitope fonctionnel. Dans un second axe de recherche, en parallèle d'établir le miRnome humain en réponse à l'action d'une radiothérapie, des nanocapsules lipidiques biomimétiques présentant à leur surface des peptides de papillomavirus et capables de se complexer avec des acides nucléiques antagonistes de microARN ont été développées et évaluées, démontrant leur intérêt en synergie d'une radiothérapie. Collectivement et en amont d'expérimentations *in vivo* en cours, ces résultats soulignent la pertinence d'appliquer de nouvelles nanomédecines ciblées pour le contournement de la radioresistance dans le glioblastome.

Mots clés

glioblastome, CD133, cellules cancéreuses de type souche, hypoxie, métabolisme du fer, transferrine, microARN, radiothérapies, locked nucleic acid, nanomédecine, nanoparticules, peptide, anticorps

Abstract

Glioblastoma is the primary malignant tumour of the most common and most aggressive brain in humans. Its conventional treatment is only palliative and the appearance of recurrences is systematic. In order to develop innovative therapies based on targeting new tumour entities, two targets were investigated: the marker of radioresistance AC133/1 and onco-microRNAs. Using glioblastoma cells from patients, we demonstrated that their *in vitro* expansion to a non-physiological pO₂ (21%) impairs *in vivo* their tumour aggressiveness and original expression of AC133/1, unlike physiological pO₂ (3%) highlighting that AC133/1 is an early marker of non- exposure to high pO₂. We also identify a role for AC133/1 in endocytosis of transferrin receptor and its partnership with iron metabolism. Finally we have developed and characterized immunonanoparticles able to convey chemotherapy or radiopharmaceuticals to this functional epitope. In parallel, in a second search axis, we establish the human miRnome in response to the action of radiation. Biomimetic lipid nanocapsules having on their surface and papillomavirus peptides capable of complexing with antagonists microRNAs have been developed and evaluated and have demonstrated their interest with synergy radiotherapy. Collectively and upstream of *in vivo* experiments in progress, these results underscore the relevance of applying novel targeted nanomedicine for circumvention of radioresistance in glioblastoma.

Key Words

glioblastoma, CD133, stem-like cancer cells, hypoxia, iron metabolism, transferrin, microRNAs, radiotherapy, locked nucleic acid, nanomedicine, nanoparticles, peptide, antibody