



HAL
open science

Thérapies par rayonnements appliquées au cas du glioblastome : intérêt du suivi par spectroscopie et imagerie de diffusion par résonance magnétique : vers une thérapie bimodale

Magali Toussaint

► To cite this version:

Magali Toussaint. Thérapies par rayonnements appliquées au cas du glioblastome : intérêt du suivi par spectroscopie et imagerie de diffusion par résonance magnétique : vers une thérapie bimodale. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0188 . tel-01527558v1

HAL Id: tel-01527558

<https://theses.hal.science/tel-01527558v1>

Submitted on 24 May 2017 (v1), last revised 20 Mar 2017 (v2)

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

Thérapies par rayonnements appliquées au cas du glioblastome : Intérêt du suivi par spectroscopie et imagerie de diffusion par résonance magnétique Vers une thérapie bimodale

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 15 novembre 2016

pour l'obtention du

Doctorat de l'Université de Lorraine

(Mention : "Sciences de la Vie et de la Santé")

par

Magali Toussaint

Composition du jury

<i>Président :</i>	Jacques Felblinger, PUPH, IADI	Vandœuvre-les-Nancy
<i>Rapporteurs :</i>	Florence Gazeau, DR CNRS, MSC	Paris 7
	Patricia Vicendo, DR CNRS, IMRCP	Toulouse 3
<i>Examineurs :</i>	François Lux, MCU HDR, ILM	Lyon 1
	Muriel Barberi-Heyob, PU, CRAN	Vandœuvre-les-Nancy
	Sophie Pinel, MCU, CRAN	Vandœuvre-les-Nancy

Mis en page avec la classe thesul.

Remerciements

Avant toutes choses, je souhaiterais commencer par remercier les membres du jury qui me font l'honneur de participer à l'examen de mes travaux.

Merci donc à Jacques Felblinger, Professeur de l'Université de Lorraine, pour avoir accepté de présider mon jury.

Ma reconnaissance va également à Florence Gazeau, Directeur de Recherche CNRS à Paris 7, ainsi qu'à Patricia Vicendo, Directeur de Recherche CNRS à Toulouse 3, pour l'intérêt tout particulier qu'elles ont su porter à mes travaux de thèse ainsi que pour leurs remarques et conseils des plus éclairés.

Je remercie François Lux, Maître de conférences de l'Université Claude Bernard 1, pour avoir accepté de juger ce travail, mais également pour son aide toujours bienvenue lors des différents rebondissements expérimentaux.

Je remercie Muriel Barberi-Heyob, Professeur de l'Université de Lorraine, pour la qualité de son encadrement, et son soutien depuis mes premiers pas dans le monde de la recherche. Pour vos qualités humaines et la confiance que vous m'avez accordée je vous remercie également.

Je remercie Sophie Pinel, Maître de conférences de l'Université de Lorraine, pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et ses points de vues éclairés et éclairants qui m'ont permis d'avancer.

Je tiens également à remercier l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales, en la personne de Nathalie et Gérard Mouttet, ainsi que Geneviève Bourg-Heckly, christine Vever-Bizet, Walter Blondel et Marine Amouroux, sans qui cette thèse n'aurait pas pu être financée.

Un merci au carré pour Chonchon et Carole Courrier pour le super boulot qu'elles abattent, et pour rendre les choses plus simples même quand c'est compliqué !

Ce travail a été le fruit de nombreuses collaborations, qui sans l'implication de chacun n'aurait pas pu aboutir.

Ainsi donc merci à tous ceux qui m'ont, de près ou de loin, aidée lors de ces quatre années de travail : les chimistes du LRGP, du LCPM, de l'ILM, la plateforme d'imagerie de Lille, les "informaticiens" et les biologistes du CRAN...la liste est longue et j'espère que je n'oublierai personne !

Céline, Philippe, Eloïse, Aymeric, Albert, merci beaucoup pour tout ce que vous m'avez appris à faire en photophysique, et à prendre en compte les problématiques physico-chimiques de la PDT. Pour toutes les synthèses et les greffages pas toujours évident...et pour votre réelle disponibilité et facilité de communication, même si on ne vient pas des mêmes formations, merci. Un grand merci à toi aussi, Rima, qui à pris le temps de m'aider dans mes manip alors que tu étais vraiment préoccupée à ce moment là (quelque chose comme une thèse à rédiger !).

Florent, Nico : je dirais que le mieux est l'ennemi du bien. Grâce à vous, votre sereinitude et votre soutien, j'ai vraiment apprécié ces 4 mois à Lille (eh oui, en tout j'ai squatté 4 mois). Merci aussi à l'équipe de Régis Bordet, surtout Maud, pour leur accueil toujours chaleureux.

Alicia, Valérie, ce fut un plaisir d'apprendre et de travailler avec vous. Dominique, Monsieur Plénat, merci pour votre aide précieuse, et pour toutes les discussions agréables que nous avons partagé.

Flora, je dirais carrément que tu as toute ma gratitude ! Tu as permis que cette dernière année se passe bien. Ça a été un vrai plaisir de travailler en binôme ! Je te souhaite le meilleur pour la suite !

Et puis, aux amatrices de milk shake-comté-saucisson, aux amatrices de grande littérature (Troie, le loup Mongol...), aux amatrices de risques (celles qui ne se rendent pas compte qu'elles en prennent et celles qui en prennent sans s'en rendre compte. Oui, je t'assure et tu n'as pas peur !), à ceux qui aiment jouer à la belette, à mes chouettes homologues, je vous remercie de vous avoir bien aimé. Voilà.

Pis il y'a ceux qui vous soutiennent absolument tous les jours (et c'est pas facile tous les jours) depuis trèèèè longtemps, ou moins longtemps (mais va falloir continuer, c'est Paul qui l'a dit), je vous dis rien, parce que vous savez.

Sommaire

Liste des tableaux	ix
--------------------	----

Préambule & Objectifs	xi
-----------------------	----

Partie I Introduction générale	1
--------------------------------	---

Chapitre 1

Généralités sur les tumeurs primitives du système nerveux central

1.1 Classification	3
1.2 Épidémiologie	6
1.3 Gliomagenèse	7
1.4 Statut immunologique des glioblastomes	10
1.5 Prise en charge thérapeutique	15

Chapitre 2

Place de la thérapie photodynamique dans la prise en charge des tumeurs cérébrales de haut grade

2.1 Principe de la thérapie photodynamique	23
2.2 Effets biologiques photo-induits	27
2.2.1 Effets directs	27
2.2.2 Effets indirects	29
2.3 Paramètres clés impliqués dans la réaction photodynamique	32
2.3.1 Le photosensibilisateur	32

2.3.2	Comment les nanoparticules peuvent résoudre les limitations et la résistance à la thérapie photodynamique. (Chapitre dans <i>Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer 2014</i>)	34
2.3.3	Dosimétrie de la lumière	50
2.3.4	Consommation de l'oxygène	50
2.3.5	Propagation de la lumière en milieu biologique	51
2.4	Applications de la thérapie photodynamique en neuro-oncologie	53
2.4.1	Généralités techniques	53
2.4.2	La résection guidée par fluorescence	55
2.4.3	La thérapie photodynamique interstitielle	56
2.4.4	La thérapie photodynamique dans les essais cliniques	59

Chapitre 3

Utilisation de l'imagerie par résonance magnétique dans la prise en charge du glioblastome

3.1	Techniques d'imagerie non invasive	63
3.2	Principe de l'imagerie par résonance magnétique	64
3.3	Applications cliniques de l'imagerie par résonance magnétique dans les tumeurs cérébrales	68
3.4	Approches d'imagerie par résonance magnétique complémentaires actuelles . . .	68
3.4.1	Spectroscopie par Résonance Magnétique	68
3.4.2	Imagerie de Diffusion par Résonance Magnétique	72
3.4.3	Carte paramétrique de T2*	76

Partie II Intérêt du suivi longitudinal par IRM spectroscopique & de diffusion de la thérapie photodynamique interstitielle

Chapitre 1

Introduction

1.1	Contexte	81
1.2	Choix des nanoparticules	82

Chapitre 2
Méthodologie de traitement des données d'imagerie

Chapitre 3
Suivi par spectroscopie et diffusion par résonance magnétique pour prédire la réponse au traitement (*Theranostics 2016*)

Chapitre 4
Conclusion

Partie III Vers une thérapie bimodale

131

Chapitre 1
Une nouvelle stratégie pour la thérapie photodynamique des tumeurs profondes

- 1.1 Solutions actuelles à la limitation de la pénétration de la lumière en thérapie photodynamique 133
- 1.2 Radiothérapie et thérapie photodynamique (PDTX) 136
 - 1.2.1 Interactions rayonnement-matière 137
 - 1.2.2 Nanoparticules métalliques pour améliorer la radiothérapie (*Theranostics 2015*) 138
 - 1.2.3 Nanoparticules scintillantes pour la PDTX 157
 - 1.2.4 Complémentarité d'action entre la radiothérapie et la PDT 160

Chapitre 2
Matériel et Méthodes

- 2.1 Caractérisation photophysique des nanoparticules terbium-porphyrine 163
 - 2.1.1 Caractéristiques générales des nanoparticules 163
 - 2.1.2 Caractérisation photophysique et physico-chimique des nanoparticules 164
- 2.2 Culture cellulaire 165
- 2.3 Mesure de Cytotoxicité 166
- 2.4 Mesure de l'incorporation cellulaire 166
- 2.5 Capacité clonogénique 167
- 2.6 Détection des espèces réactives de l'oxygène 170

Chapitre 3

Résultats

3.1	Propriétés photophysiques du nano-objet	171
3.2	Cytotoxicité des nanoparticules	175
3.3	Incorporation cellulaire des nanoparticules	176
3.4	Formation d'espèces réactives de l'oxygène	179
3.5	Interaction rayonnement-nanoparticule-photosensibilisateur	180
3.5.1	Irradiation à une forte énergie (6 MV)	181
3.5.2	Irradiation à une faible énergie (160 keV)	182

Chapitre 4

Discussion

Partie IV	Conclusion et perspectives	189
	Bibliographie	193

Table des figures

1	Types cellulaires composant le SNC	5
2	Localisation des glioblastomes	6
3	Gliomagenèse des glioblastomes de novo et secondaire	8
4	Anatomie du SNC	11
5	Interactions entre les cellules de la BHE	12
6	Observation de la perméabilité des vaisseaux tumoraux.	13
7	Rôle pro ou anti-tumoral des macrophages en fonction du micro-environnement . . .	14
8	Mécanisme d'échappement au système immunitaire	15
9	Délimitation des volumes cibles en radiothérapie conformationnelle	18
10	Principe de la thérapie photodynamique	25
11	Réactions de photo-oxydations induites en PDT	26
12	Schéma simplifié des voies de signalisation de l'apoptose	28
13	Schéma simplifié des mécanismes de destruction tumorale associés à la PDT	30
14	Représentation schématique des différents modes d'interaction lumière-tissus en réflexion et en transmission (absorption, diffusion, fluorescence)	52
15	Fenêtre thérapeutique de pénétration de la lumière	53
16	Différentes applications du principe de réaction photodynamique en clinique	53
17	Illustration de la PDT intracavitaire	54
18	Dispositif de PDD fixé au microscope chirurgical	55
19	Dispositif de l'ancre crânienne	59
20	TDM et T2 FLAIR d'une même lésion	64
21	Principe physique de l'IRM	64
22	Relaxation de l'aimantation en IRM	66
23	Formation de l'image en IRM	67
24	Spectre de SRM du tissu cérébral sain chez le rat	69
25	Spectres de SRM du tissu cérébral sain et du tissu tumoral chez le rat	70
26	Principe schématique de la séquence de diffusion	73
27	Imagerie de diffusion	74
28	Phénomène microscopique à l'origine de la visualisation en imagerie de diffusion de l'œdème vasogénique et cytotoxique	74
29	Chronogramme de l'étude expérimentale de suivi par IRM de la réponse tumorale à la iPDT	86
30	Méthodologie d'analyse des images de diffusion	87
31	Méthodologie d'analyse des images pondérées en T2*	88
32	Méthodologie d'analyse des spectres de SRM	89

33	Schéma explicatif des mécanismes d'absorption bi-photonique et d' <i>up-conversion</i> . . .	134
34	Schéma explicatif de l'excitation par rayon X <i>via</i> des nanoparticules scintillantes . . .	136
35	Région de prédominance des 3 principales interactions des rayonnements X avec la matière	138
36	Schéma des interactions entre un rayonnement X et la matière en fonction de son énergie	139
37	Principe du mécanisme de conversion de l'énergie dans un scintillateur	157
38	Chevauchement des spectres d'émission d'un scintillateur à base de terbium, et d'absorption de photosensibilisateurs (Rose bengale et MTCP)	160
39	Déroulement du protocole d'essai clonogénique	168
40	Illustration du protocole d'irradiation à 6 MV	169
41	Schémas simplifiés des nanoparticules et photosensibilisateur utilisés	171
42	Analyse comparative des propriétés photophysiques et physico-chimiques des nanoparticules de Tb@P1 et de ses composants	173
43	Transfert d'énergie entre le Tb et la P1	175
44	Cytotoxicité à l'obscurité des nanoparticules Tb, Tb@P1 et P1 seule.	176
45	Incorporation cellulaire de la nanoparticule Tb@P1 à différentes concentration	177
46	Mécanisme d'incorporation cellulaire de la nanoparticule Tb@P1	177
47	Photos de microscopie électronique à transmission de l'incorporation cellulaire de nanoparticule AGuIX-Photosensibilisateur	178
48	Incorporation cellulaire de la nanoparticule Tb@P1 et Tb	178
49	Production d'espèces réactives de l'oxygène	179
50	Modèle linéaire quadratique	180
51	Courbes de survie et paramètres du modèle LQ après une irradiation à 6 MV	181
52	Courbes de survie et paramètres du modèle LQ après une irradiation à 160 keV . . .	182
53	Courbes de survie et paramètres du modèle LQ après une irradiation à 160 keV . . .	184

Liste des tableaux

1	Classification des tumeurs cérébrales selon l'O.M.S.	4
2	Recensement national des tumeurs primitives du système nerveux central d'après la FBTDB	7
3	Répartition des gènes fréquemment mutés à travers les 4 sous-types de GBM	9
4	Critères RANO (<i>Response Assessment in Neurooncology</i>)	16
5	Liste des principaux photosensibilisateurs avec une AMM	33
6	Résumé des études cliniques portant sur la résection guidée par fluorescence	60
7	Tableau récapitulatif des paramètres principaux utilisés dans cinq études portant sur le suivi par imagerie de diffusion de la réponse à la PDT	76
8	Résumé non exhaustif des principaux travaux menés sur l'utilisation de nanoparticules excitables en X pour la PDT	159

Préambule & Objectifs

Les glioblastomes (GBM) sont des tumeurs de haut grade du système nerveux central de mauvais pronostic, touchant 2000 nouveaux cas par an en France. La prise en charge thérapeutique de ces tumeurs est délicate du fait de leur localisation dans un organe hautement fragile, et de la capacité des cellules tumorales à infiltrer le parenchyme, d'où la nécessité d'utiliser des approches capables de détruire les cellules tumorales en préservant les fonctions du tissu cérébral sain adjacent. Malgré une première ligne de traitement comprenant une chirurgie, une radiochimiothérapie concomittante, suivie d'une chimiothérapie adjuvante, les récives sont quasiment systématiques et la médiane de survie n'excède pas 15 mois.

La chirurgie ne permet pas une exérèse totale des cellules tumorales du fait de leur présence dans des zones fonctionnelles à risque. L'action de la radiothérapie, après chirurgie, doit donc permettre d'éradiquer les cellules tumorales restantes. Cependant, dans 80-90% des cas, la reprise de croissance a lieu dans le lit tumoral ou à quelques millimètres voire centimètres des marges de résection, au sein même du volume cible de la radiothérapie. Il est donc difficile d'allier radicalité du traitement et préservation de la balance onco-fonctionnelle. Ce constat met en avant le grand besoin de stratégies complémentaires pour améliorer le contrôle local de la tumeur et offrir de meilleures chances de survie sans récive tout en assurant une bonne qualité de vie au patient.

Dans ce contexte, la thérapie photodynamique (PDT) s'affiche comme une stratégie complémentaire intéressante car elle présente un mode d'action local et relativement sélectif des cellules tumorales. Elle pourrait donc permettre d'améliorer l'efficacité de traitement dans la zone adjacente à la masse tumorale réséquée.

Le mode d'action de la PDT repose sur l'utilisation d'une molécule photosensible capable d'absorber des photons non-ionisants à une longueur d'onde appropriée, lui permettant ensuite de réagir avec son environnement, surtout l'oxygène moléculaire, entraînant des réactions d'oxydation photo-induites et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). La sélectivité de la PDT repose principalement sur l'incorporation préférentielle du photosensibilisateur par les cellules tumorales, et la genèse des réactions photodynamiques uniquement en présence de photons, limitant l'atteinte des cellules n'ayant pas incorporé le photosensibilisateur ou n'étant pas exposées à la lumière.

Les recherches de notre groupe se sont donc inscrites dans ce contexte, et ont d'abord porté sur la mise au point d'une nanoparticule multifonctionnelle innovante visant à améliorer la sélectivité du photosensibilisateur pour le tissu tumoral : ces nanoplateformes améliorent les propriétés pharmacocinétiques du photosensibilisateur et permettent de visualiser sa biodistribution au sein du tissu cérébral par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Les nanoplateformes sélectionnées sont des AGuIX® de 2 nm de diamètre en moyenne, composées d'une matrice de silice et d'atomes de gadolinium pour le rehaussement de signal en IRM. Ces nanoparticules ont été conjuguées à une molécule photosensibilisante pour la PDT. Après injection par voie intraveineuse chez le rat, ces nanoparticules s'accumulent dès les premières minutes au niveau du tissu tumoral par effet EPR (*Enhanced Permeability Retention*), permettant une visualisation immédiate de la zone à traiter. Elles ont démontré également leur potentiel à favoriser l'excrétion rénale et diminuer la rétention hépatosplénique du photosensibilisateur.

Ces nano-objets multifonctionnels ont ensuite été utilisés pour réaliser le traitement par iPDT (PDT interstitielle), après injection par voie intraveineuse chez le rat *nude* porteur de xéno greffe orthotopique représentative d'un GBM humain résistant (lignée U87). Cette modalité de PDT permet d'appliquer directement la fibre lumineuse, au sein du volume tumoral. Une aide par imagerie non invasive permet d'en vérifier le placement. La faisabilité de la iPDT guidée par IRM a été validée et publiée par l'équipe, notamment dans le cadre de la thèse d'université de Denise Bechet.

Mon travail de thèse a consisté dans une première partie à caractériser l'efficacité de traitement, et les effets photo-induits sur la réponse tumorale. Pour cela, j'ai réalisé une étude longitudinale par IRM de la réponse tumorale au traitement. Cette approche composée de plusieurs séquences IRM, a permis de caractériser la tumeur au niveau i) morphologique, par mesure du volume sur des images pondérées en T2, ii) de la densité cellulaire grâce à l'imagerie de diffusion, iii) au niveau inflammatoire et métabolique, grâce aux informations fournies par l'imagerie de diffusion et la Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM). Les observations faites par IRM ont été validées par des analyses en immunohistochimie.

Etant donné le caractère peu pénétrant de la lumière visible dans les tissus, des verrous persistent quant à l'utilisation de la PDT sur des tumeurs solides profondes. C'est la raison pour laquelle, dans la seconde partie de mon travail de thèse, j'ai abordé le concept d'effet photodynamique induit par une excitation utilisant des rayons X ionisants (PDTX). Ce concept couple d'une part, l'intérêt thérapeutique des rayons X utilisés en radiothérapie à celui d'autre part, de la PDT en s'affranchissant de la faible pénétration des rayons non-ionisants.

Pour cette approche très innovante, notre équipe interdisciplinaire s'est consacrée à l'élaboration d'un nano-objet couplant les propriétés nécessaires à la réalisation de la PDTX. Nous proposons une stratégie de radiothérapie dynamique avec des nanoparticules hybrides de terbium conjuguées à une porphyrine, qui après excitation par photons X, génèrent simultanément un effet radiosensibilisant et une activité photodynamique, autorisant ainsi une approche thérapeutique bimodale.

La conception de la nanoparticule luminescente a été optimisée en collaboration avec l'institut Lumière Matière (Pr. Olivier Tillement, Dr. François Lux, UMR CNRS 5306 à l'Université Claude Bernard, Lyon).

Mon travail a consisté à valider l'approche de la PDTX *in vitro* sur des cellules U87 de GBM en caractérisant au niveau photophysique le nano-objet pour faire la preuve de concept du transfert d'énergie lanthanide-photosensibilisateur. J'ai ensuite caractérisé les réactions de photo-oxydation induites par l'irradiation en X, afin d'évaluer et de caractériser l'effet photodynamique ajouté.

Première partie

Introduction générale

1

Généralités sur les tumeurs primitives du système nerveux central

Sommaire

1.1 Classification	3
1.2 Épidémiologie	6
1.3 Gliomagenèse	7
1.4 Statut immunologique des glioblastomes	10
1.5 Prise en charge thérapeutique	15

1.1 Classification

La classification des tumeurs du système nerveux central (SNC) a été établie par l'O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé) en 1979 et mise à jour en 2016 (Tableau 1). Elle sert de standard dans le monde entier pour caractériser les différents types de tumeurs du SNC que ce soit en clinique ou en recherche. Cela permet notamment d'uniformiser les bases de données, les recherches ainsi que les traitements proposés [1]. Elle prend en compte des observations histologiques, diagnostiques, génétiques, épidémiologiques, les symptômes et signes cliniques.

Cette classification repose sur le type cellulaire physiologique prédominant dont la tumeur dérive. En effet, le SNC est composé de neurones (les cellules chargées de réceptionner, intégrer et transmettre l'information) et d'un tissu de soutien composé de cellules gliales. Ce tissu sert à maintenir, nourrir et épurer l'environnement neuronal. La glie est divisée en macroglie et microglie. La première est constituée d'astrocytes, d'oligodendrocytes et des cellules épendymaires. Les astrocytes ont un aspect étoilé, ramifié et assurent les contacts intercellulaires notamment avec les vaisseaux sanguins et font partie de la barrière hémato-encéphalique. Les oligodendrocytes produisent la gaine de myéline des axones. Les cellules épendymaires font partie des ventricules dont elles tapissent la paroi. Elles permettent de faire circuler le liquide céphalorachidien grâce à des cils mobiles et assurent les échanges entre le système nerveux et l'extérieur. La microglie est composée de macrophages résidents, elle assure les fonctions immunitaires (Figure 1).

TABLE 1 – La classification O.M.S. des tumeurs du SNC présente les tumeurs en fonction de leur origine histopathologique et de leur grade. Les grades se déclinent de I à IV, I et II désignant les tumeurs de bas grade à prolifération lente plus ou moins circonscrites, les grades III et IV désignant les tumeurs de haut grade à croissance rapide caractérisées par l'apparition de foyers anaplasiques plus ou moins développés. Les GBM sont des tumeurs de grade IV, appartenant aux tumeurs d'origine neuroépithéliale de type astrocytaire. Elles présentent souvent des foyers de nécrose et une forte prolifération vasculaire. Tiré de [2].

Tumeurs neuroépithéliales		Grade de malignité
Tumeurs astrocytaires		
	<i>Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire</i>	Grade I
	<i>Astrocytome pilocytique</i>	Grade I
	Astrocytome pilocytique, variant pilomyxoïde	Grade II
	<i>Astrocytome diffus</i>	Grade II
	Fibrillaire Protoplasmique Gémistocytique	
	<i>Astrocytome anaplasique</i>	Grade III
	<i>Xanthoastrocytome pléiomorphe</i>	Grade II
	<i>Glioblastome</i>	Grade IV
	Glioblastome à cellules géantes Gliosarcome	Grade IV
	<i>Gliomatose</i>	
Tumeurs oligodendrogiales		
	<i>Oligodendrogliome</i>	Grade II
	<i>Oligodendrogliome anaplasique</i>	Grade III
Tumeurs oligoastrocytaires		
	<i>Oligoastrocytome</i>	Grade II
	<i>Oligoastrocytome anaplasique</i>	Grade III
Tumeurs des plexus choroïdes		
Tumeurs neuronales et glioneuronales		
Autres tumeurs neuroépithéliales		
Tumeurs de la région pinéale		
Tumeurs embryonnaires		

Les tumeurs neuroépithéliales sont classées en fonction du type cellulaire dont elles sont issues (astrocytomes, oligodendrogliomes, oligoastrocytomes. . .) de leur grade de malignité (de I à IV) qui dépendent de cinq critères histologiques : densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération vasculaire et nécrose.

Récemment, des changements ont été apportés à la classification O.M.S. des tumeurs du SNC [2]. En plus de l'histologie, des paramètres moléculaires sont maintenant pris en compte. Les GBM sont dorénavant sous-divisés en 3 catégories d'après l'expression de leur IDH (Isocitrate Deshydrogénase), un gène du métabolisme : le profil IDH-*wildtype* (90% des cas) correspond à la définition clinique des GBM *de novo*, le profil IDH-mutant correspond aux GBM secondaires avec un âge de survenue plus précoce et une histoire clinique longue et enfin ceux dont l'évaluation du statut IDH n'a pas pu être réalisée. La mutation d'IDH semble être un marqueur de bon pronostic post-radiothérapie et chimiothérapie, avec des médianes de survie globale plus élevées que le groupe IDH-*wildtype* (31 mois vs 15 mois).

D'autres systèmes de classification peuvent-être utilisés en complément du premier tel que celui proposé par l'hôpital Saint-Anne qui prend en compte les données d'imagerie corrélées à celles d'his-

topathologie et de clinique pour classer les gliomes [3] [4]. En revanche, dans cette classification, le terme GBM est plus restrictif. Ne sont concernés que les GBM astrocytaires de haut grade, sans différenciation oligodendrogliale, présentant une composante solide et infiltrante ainsi qu'un phénotype angiogénique. En imagerie, le tissu tumoral se traduit par une prise de contraste en anneau. L'infiltration des cellules tumorales isolées s'accompagne d'un œdème "péritumoral" présentant un aspect typique dit en "doigt de gant".

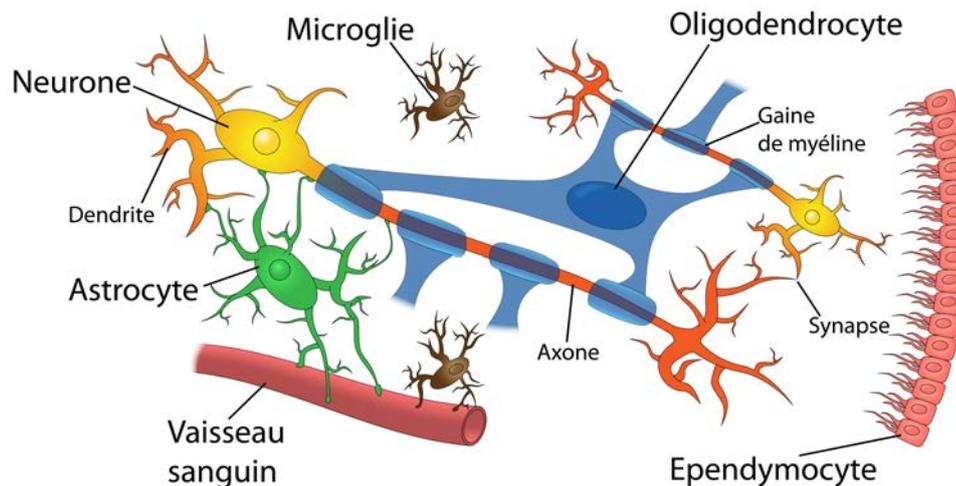


FIGURE 1 – Types cellulaires composant le SNC. Le SNC est composé de trois grands types de cellules : les neurones, les cellules de la microglie et de la macroglie. Les neurones présentent un corps cellulaire et des prolongements de type axonal et dendritiques permettant de recevoir, traiter et transmettre l'information sous forme d'influx nerveux. La macroglie constitue le tissu de soutien du SNC, elle assure le lien avec la vascularisation et remplit des fonctions de nutrition et d'épuration pour maintenir l'homéostasie du SNC. Elle est composée d'astrocytes, des cellules d'aspect étoilé et très ramifié jouant un rôle de support, de protection, de nutrition des neurones, d'évacuation des déchets métaboliques, d'oligodendrocytes qui ont pour rôle d'élaborer la myéline entourant les axones et d'ependymocytes qui tapissent les cavités des ventricules régulant les échanges entre le liquide céphalorachidien et le parenchyme cérébral. La microglie, quant à elle, est composée de macrophages résidents et assure les fonctions immunitaires du SNC. A l'état physiologique la microglie ramifiée est considérée comme inactive, sa population est maintenue par recrutement de monocytes circulants. En cas d'agression, la microglie s'active, les macrophages résidents sortent de leur quiescence et prolifèrent pour défendre le SNC.

Enfin, la topographie des tumeurs cérébrales peut également être ajoutée à la classification précédente car elle apporte un éclairage supplémentaire sur le diagnostic et le pronostic tumoral (Figure 2). La localisation d'une tumeur est définie d'après son épicode. D'après Duffau *et al.* les GBM *de novo* apparaissent dans 54% des cas dans des zones fonctionnelles et dans 46% des cas dans des zones considérées comme non fonctionnelles. Ils touchent surtout le lobe frontal et temporal [5]. Les noyaux gris centraux sont préférentiellement touchés par des tumeurs malignes qui s'avèrent dans la moitié des cas être des GBM.

Selon leur localisation, les GBM induisent un déficit neurologique, une hypertension intracrânienne et des attaques (crise d'épilepsie ou autre) chez certains patients. Ces symptômes permettent un diagnostic clinique, mais dans le cas où les GBM touchent des zones non fonctionnelles, le diagnostic est plus tardif [5].

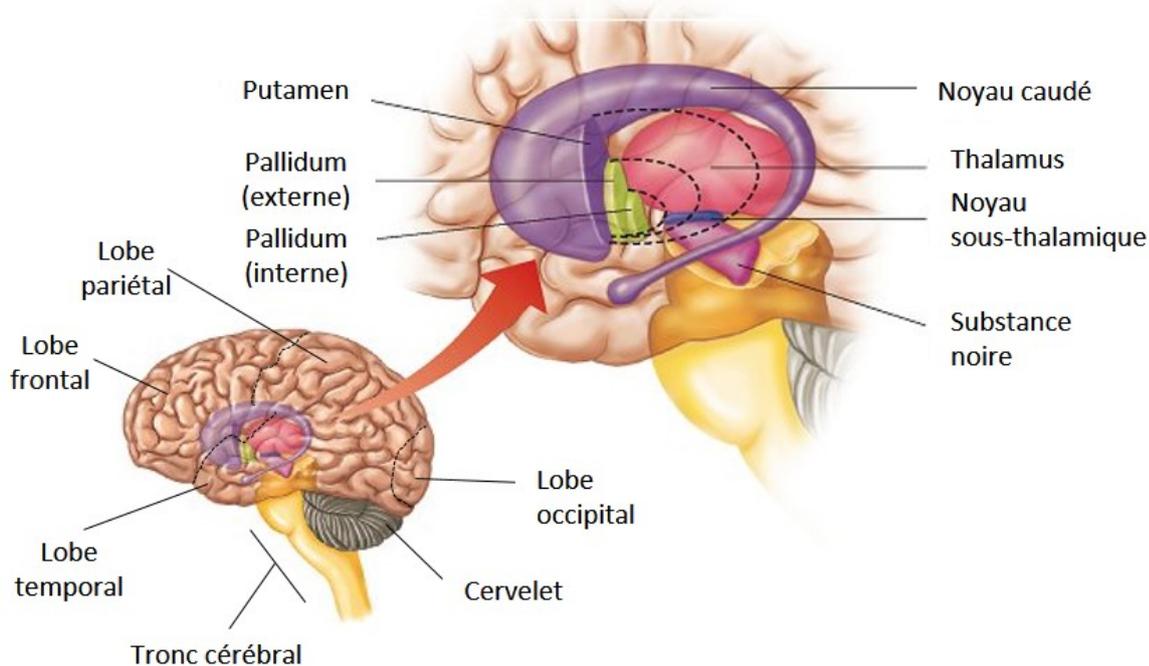


FIGURE 2 – Localisation des GBM. Les GBM se développent surtout dans l'espace sus-tentorial du SNC *i.e.* les hémisphères cérébraux et le thalamus et concernent très peu l'espace sous-tentorial *i.e.* le cervelet et le tronc cérébral. Tiré de [6].

1.2 Épidémiologie

L'incidence globale des tumeurs cérébrales bénignes et malignes est estimée à 18/100 000 personnes/an et autour de 7/100 000 personnes/an pour les tumeurs malignes [7]. Le GBM, la forme la plus répandue de tumeurs cérébrales malignes, représente 1 à 2% des cancers chez l'adulte. Son incidence continue à augmenter, due en particulier au vieillissement de la population et au diagnostic de plus en plus efficace [8]. En effet, près de la moitié des patients porteurs de GBM sont âgés de plus de 65 ans [9].

En France, le dernier recensement national histologique des tumeurs primitives du SNC, utilisant les données provenant de la "French Brain Tumor Database", a recensé sur la période 2004-2009, 43 929 cas nouvellement diagnostiqués et histologiquement confirmés [10]. Cette étude a montré la répartition des tumeurs primitives du SNC en fonction de leur histologie (Tableau 2).

TABLE 2 – Recensement national des tumeurs primitives du système nerveux central d’après la FBTDB (French Brain Tumor DataBase).

Type tumoral		% cas
Tumeurs primitives du système nerveux central (période 2004-2009)		
	Gliomes	42,4
	Tumeurs neuroépithéliales autres	4,4
	Méningiomes	32,3
	Tumeur des nerfs intracrâniens et intrarachidiens	9,2
	Lymphomes	3,4
	Autres	8,3

Les GBM constituent 22% des tumeurs primitives du SNC nouvellement diagnostiquées, soit 52% des gliomes nouvellement diagnostiqués. Il semblerait que les hommes soient plus touchés que les femmes (59% vs 41%) et l’âge médian de survenue est de 63 ans soit 7 ans plus tard que pour l’ensemble des tumeurs primitives. Cette étude permet surtout de comptabiliser le nombre de cas opérables ou non, avec 70% de cas opérables (scindés en 63% de résection et 37% de biopsie seulement) et 30% de cas non opérables. L’existence de ce type de base de données est primordial pour faire évoluer la prise en charge des GBM. Par exemple, cette base de données a notamment permis de confirmer l’intérêt de l’association temozolomide/radiothérapie. Elle vise aussi à améliorer la prise en charge, par exemple le raccourcissement du délai entre chirurgie et radiothérapie. En dépit des progrès réalisés en imagerie, en neurochirurgie ainsi que dans les nouvelles approches thérapeutiques, le pronostic des patients atteints de tumeurs cérébrales primitives reste très péjoratif : dans le cas des formes les plus graves, la survie médiane n’excède pas 15 mois et moins de 5,1% des patients restent en vie 5 ans après le diagnostic [11].

1.3 Gliomagenèse

La gliomagenèse fait intervenir des altérations moléculaires telles que des amplifications, des mutations, des réarrangements ou des délétions chromosomiques. Ces altérations touchent différents proto-oncogènes (EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*), MDM2 (*Murine Double Minute 2*)) et gènes suppresseurs de tumeur (P16, P53, Rb (Retinoblastome), PTEN). La connaissance de ces altérations permet de mieux comprendre le développement tumoral et peut présenter un intérêt pronostique lors de la prise en charge du patient. Furnari *et al.*, ont décrit l’évolution des GBM d’après des critères génétiques, pathobiologiques et cliniques proposant un schéma d’évolution en fonction du caractère primaire ou secondaire du GBM [12]. Les GBM *de novo* ou primaires surviennent en moyenne plus tardivement que les GBM secondaires dérivant de l’évolution d’un gliome de bas grade vers le haut grade. L’évolution d’un GBM secondaire n’emprunte pas les mêmes voies génétiques qu’un GBM *de novo* (Figure 3).

Indépendamment de l’origine du GBM, la perte d’hétérozygotie du chromosome 10 est l’altération génétique la plus fréquemment observée, elle survient dans 60 à 80% des cas. D’autres altérations sont plus spécifiques des GBM *de novo* comme l’amplification de l’EGFR dans environ 40% des cas, altération de mauvais pronostic.

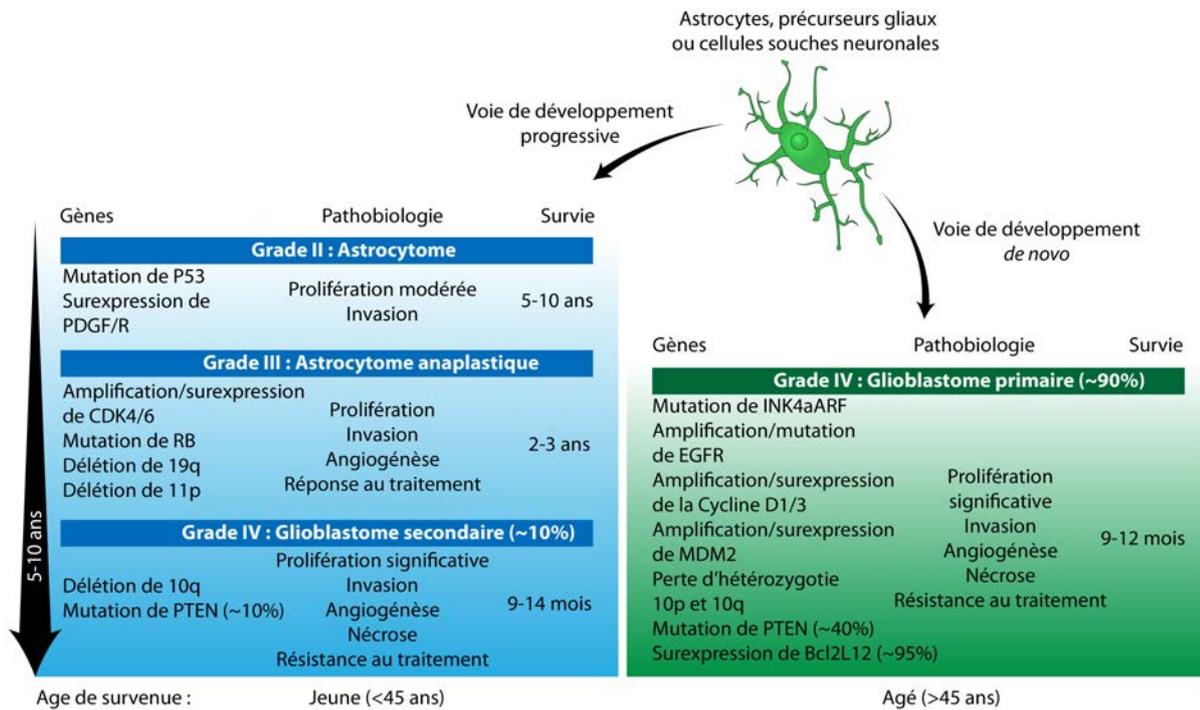


FIGURE 3 – Gliomagenèse des glioblastomes *de novo* et secondaire. Ce schéma de synthèse présente les aberrations chromosomiques et génétiques impliquées dans les différents stades d'évolution des GBM ainsi que la survie et les pathobiologies associées. Les glioblastomes sont d'origine astrocytaire et deux voies mènent à leur formation : une voie progressive où l'évolution lente d'un gliome de bas grade mène à la formation d'un GBM secondaire et, une voie de développement rapide menant à la formation directe d'un GBM primaire.

Les GBM primaires représentent la majorité des cas (90%) et surviennent majoritairement entre 45 et 70 ans. Ces GBM présentent un pronostic sombre et un profil génique plus complexe que les GBM secondaires comme l'amplification ou la surexpression de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) et MDM2 et 4 *Murine double Minute 2 et 4*) un régulateur négatif de TP53 altérant plusieurs voies de signalisation et menant à une importante prolifération, angiogénèse, invasion par exemple.

Les GBM secondaires apparaissent chez des personnes plus jeunes et présentent des caractéristiques génétiques différentes. L'inactivation de TP53 est impliquée dès les premiers stades d'évolution tumorale, et empêche la régulation normale du cycle cellulaire. La protéine TP53 est une protéine nucléaire bloquant en G1 le cycle cellulaire et permettant la réparation de l'ADN ou provoquant la mort de la cellule par apoptose en cas de dégâts irréparables. Au cours de l'évolution du grade II au grade IV, d'autres acteurs du cycle cellulaire sont touchés : les CDK4/6, RB menant à un profil de plus en plus agressif de la tumeur.

Les voies de signalisation impliquées dans le développement des GBM primaire et secondaire sont différentes, mais présentent en commun une mutation de PTEN et une altération sur le chromosome 10q. Tiré de [12].

Kyristis *et al.*, présentent les prédispositions héréditaires accroissant le risque de développer un gliome. Ce sont généralement des gènes impliqués dans les processus d'apoptose et de la réparation de l'ADN qui sont touchés (*X-Ray Cross Complementary gene*, *Mismatch Repair gene*). Les mutations somatiques qui s'ensuivent touchent des gènes de la régulation du cycle cellulaire, impliqués dans

l'angiogenèse et l'invasion [13].

Récemment Verhaak *et al.*, ont identifié quatre sous-types moléculaires de GBM d'après leur signature génique [14]. Cette étude s'inscrit dans le réseau de recherche *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) mis en place pour générer une base de données des anomalies génomiques menant à la tumorigenèse. Deux cents GBM et 2 tissus normaux de patients ont été analysés. Plus de 12 000 gènes ont été analysés par puces à ADN pour chaque échantillon, et après un filtrage des données, 1740 gènes ont été retenus comme pertinents pour la formation de classes moléculaires. Chaque sous-classe était composée d'environ 200 gènes mais seuls ceux qui corrélaient le mieux avec leur classe ont été identifiés comme signature génique du sous-type moléculaire.

Plusieurs amplifications et délétions homo- ou hémi-zygote, ainsi que plusieurs mutations de gènes corrélaient de manière significative avec chaque sous-type de GBM (Tableau 3).

TABLE 3 – Répartition des gènes fréquemment mutés à travers les quatre sous-types de GBM. Tiré de [14].

gène	Proneural (n=37)	Neural (n=19)	Classique (n=22)	Mesenchymal	Nombre total de mutation
TP53	20 (54%)	4 (21%)	0 (0%)	12 (32%)	36
PTEN	6 (16%)	4 (21%)	5 (23%)	12 (32%)	27
NF1	2 (5%)	3 (16%)	1 (5%)	14 (37%)	20
EGFR	6 (16%)	5 (26%)	7 (32%)	2 (5%)	20
IDH1	11 (30%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	12
PI3KR1	7 (19%)	2 (11%)	1 (5%)	0 (0%)	10
RB1	1 (3%)	1 (5%)	0 (0%)	5 (13%)	7
ERBB2	2 (5%)	3 (16%)	1 (5%)	1 (3%)	7
EGFRvIII	1 (3%)	0 (0%)	5 (23%)	1 (3%)	7
PI3KCA	3 (8%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (3%)	6
PDGFRA	4 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4

Les appellations des sous-types découlent de l'origine des gènes qui en font la signature, proneural, neural, mesenchymal et classique et sont définis ci-dessous :

- Le sous-type proneural présente une amplification de PDGFRA (*Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*) et 11 des 12 mutations d'IDH-1 (*Isocitrate Dehydrogenase 1*). Ce sous-groupe exprime hautement des gènes oligodendrocytiques et pas astrocytiques. Une inhibition de P21 et donc une augmentation de la prolifération est aussi observée fréquemment. La mutation de PI3K (*PhosphoInositide 3 Kinase*) apparaît fréquemment lorsque PDGFRA n'est pas amplifié. Ce groupe se compose surtout de GBM secondaires et proviendrait d'une cellule souche ou d'un progéniteur neural.
- Le sous-type neural exprime des marqueurs neuronaux de cellules différenciées comme NEFL (*Neurofilament light polypeptide*). Ce sous-groupe présente des signatures oligodendrocytique, astrocytique et neurale.
- Le sous-type classique présente dans 100% des cas une amplification du locus 7p11.2 (codant pour le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*)) accompagnée d'une délétion au locus 10q23 (codant pour la protéine PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog mutated in multiple advanced cancers 1*)). Cette fréquence d'amplification du récepteur à l'EGF est rare dans les autres sous-types. Une délétion homozygote fréquente de p16 et p14 (fonction de contrôle négatif dans le cycle cellulaire) est associée à 94% des amplifications d'EGFR. En revanche, la mutation de TP53 est peu marquée dans ce sous-type. Ce groupe présente une signature astrocytique.
- Le sous-type mésenchymal présente une délétion du gène NF1 prédominante ainsi qu'une délétion du gène PTEN. Ce sous-type présente une inflammation et une nécrose plus marquées certainement due à l'expression importante des gènes de la famille du TNF (*Tumor Necrosis Factor*) et de NFκB (*Nuclear Factor κB*). Sa signature est astrogliale.

On retient que, bien que l'altération de l'EGFR soit courante dans les GBM, le sous-type "classique" affiche une prépondérance de cette amplification et une absence de mutation de TP53 pourtant présente dans les trois autres sous-types notamment le proneural (Tableau 3). Il semblerait que les thérapies agressives entraînent une bonne réponse pour le sous-type classique et peu de bénéfices pour le sous-type proneural. A terme, cette classification moléculaire pourrait permettre d'établir un modèle pronostic de réponse au traitement afin d'adapter le traitement au patient.

1.4 Statut immunologique des glioblastomes

Les GBM affectent un organe fragile régit par des mécanismes de défense adaptés à sa situation. Le SNC jouit d'un environnement immunologique privilégié permettant de limiter au maximum les entrées de pathogènes. Les principales caractéristiques en sont : un isolement physique relatif apporté par la présence d'une barrière hémato-encéphalique (BHE), un drainage lymphatique non conventionnel, et une immunosuppression constitutive limitant l'apparition de réactions inflammatoires non contrôlées.

La première protection du SNC provient de la boîte crânienne, enveloppe rigide protégeant des chocs. Trois membranes appelées méninges et composées de la dure-mère enveloppe fibreuse et résistante, l'arachnoïde réseau dans lequel circule du liquide céphalorachidien et la pie-mère qui épouse la forme du SNC et comporte la vascularisation, permettent, à elles trois, une séparation physique entre l'os

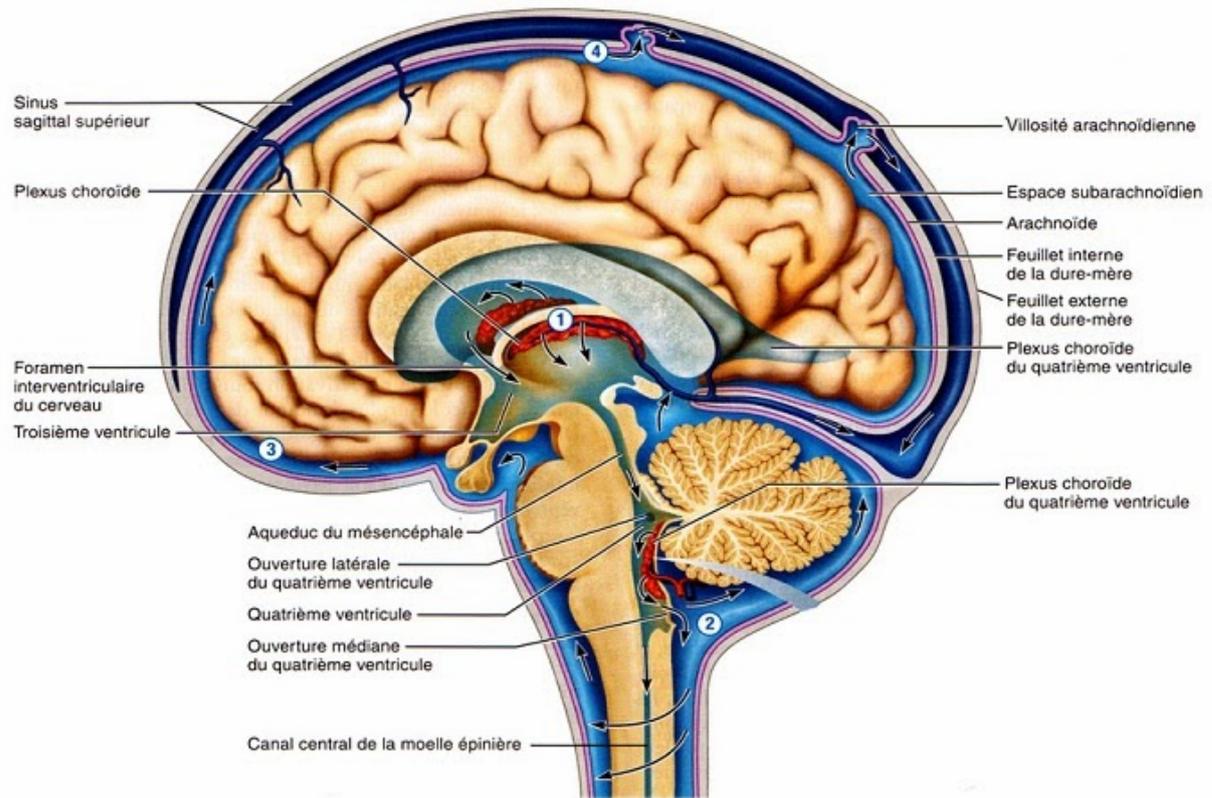


FIGURE 4 – Anatomie du SNC. Le SNC est englobé par la boîte crânienne. Collée à l'os, la première méninge : la dure-mère fibreuse, épaisse et résistante. Le sinus sagittal supérieur passe dans cette première membrane et draine le sang du cerveau vers le coeur. L'archnoïde est une membrane plus fine sous laquelle se situe l'espace sous-arachnoïdien dans lequel circule le LCR (Liquide Céphalo-Rachidien) (n°3). Le LCR est produit par les plexus choroïde des ventricules (n°1 et 2) et provient de la filtration du sang, puis est resorbé au niveau des villosités arachnoïdiennes (n°4). Le LCR a un rôle homéostatique en maintenant un environnement physico-chimique stable après filtration au niveau des épendymocytes, un rôle mécanique d'amortissement des chocs et permet la circulation de diverses molécules comme les médiateurs de l'immunité. La vascularisation au niveau des plexus choroïdes est plus fenestrées que dans le reste du SNC afin de permettre l'extravasation des cellules de l'immunité si besoin mais de ce fait représente aussi une voie d'entrée aux éléments indésirables. Tiré de [15].

et le SNC lui-même (Figure 4).

La seconde protection est assurée par la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE, comme son nom l'indique, est une barrière physiologique entre la vascularisation et le parenchyme cérébral. Des jonctions serrées maintiennent les cellules endothéliales de la paroi vasculaire entre-elles pour assurer l'étanchéité de la barrière [16]. Des systèmes de transporteurs d'efflux (comme la glycoprotéine-P de la super famille des transporteurs ABC, ABC signifiant *ATP Binding Cassette*) sont également mis en place pour l'efflux de molécules toxiques au sein du SNC. Le passage de certaines molécules nécessaires au SNC est assuré par des transporteurs et des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules endothéliales. L'induction, le maintien et la fonctionnalité de la BHE sont

modulés par l'interaction étroite de l'endothélium avec les pieds astrocytaires, les péricytes et les cellules de la microglie (Figure 5). Les astrocytes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie cérébrale, la modulation de la perméabilité de l'endothélium, la nutrition des neurones et jouent le rôle de médiateur entre le système vasculaire amenant des éléments de l'extérieur et le SNC. Les péricytes sont impliqués dans la régulation du flux sanguin, également dans l'homéostasie et dans l'angiogenèse [17].

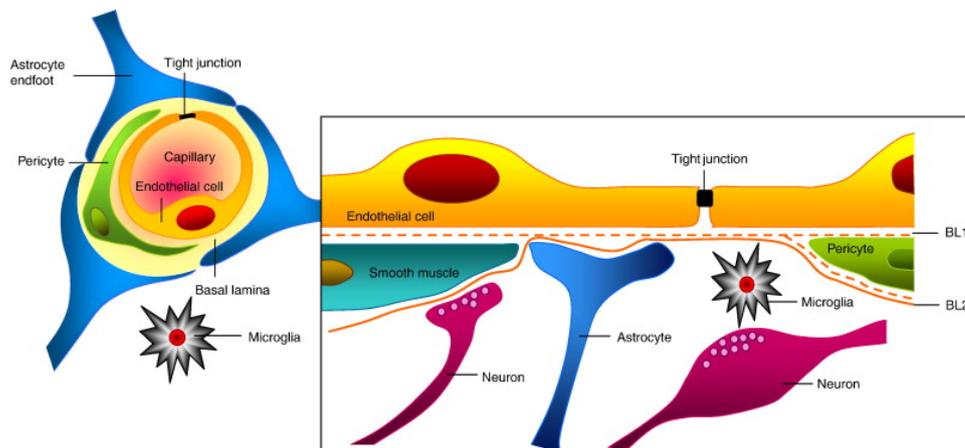


FIGURE 5 – Interaction entre les cellules de la BHE. Le capillaire est composé de cellules endothéliales connectées entre elles par des jonctions serrées constituées principalement par les protéines occludine et claudine. Les cellules endothéliales reposent sur la lame basale. Les pieds astrocytaires et les péricytes sont en interaction étroite avec les cellules endothéliales. Tiré de [16].

Le système immunitaire du SNC est assuré par la microglie qui fonctionne différemment du système immunitaire dans le reste de l'organisme. Le SNC étant confiné dans la boîte crânienne, toute réaction inflammatoire induisant la formation d'œdème risquerait d'augmenter la pression intracrânienne, menant à une perte de cellules saines au niveau tissulaire et à des symptômes tels que céphalées, vomissements, déficit neurologique à l'échelle du patient. C'est pourquoi, le SNC possède un statut immunitaire particulier permettant de limiter et contrôler les réponses immunitaires lors d'agressions notamment par un état immunosuppresseur constitutif, une absence de cellules présentatrices d'antigène et le maintien d'un état quiescent des macrophages résidents dans un parenchyme cérébral sain.

Les GBM présentent donc des caractéristiques spécifiques qui rendent leur traitement difficile. Tout d'abord, la présence de la BHE qui oppose une barrière physique à l'entrée de médicaments, et ensuite l'environnement immunitaire privilégié qui ne permet pas de réponse immunitaire forte.

Les GBM en proliférant rapidement altèrent la BHE pour lui faire prendre le nom de barrière hémato-tumorale (BHT). En effet, lorsqu'une tumeur atteint une taille critique de 2-3 mm de diamètre, la diffusion passive des molécules, des vaisseaux vers les cellules tumorales n'est plus satisfaisante pour permettre un apport suffisant en oxygène, nutriments jusqu'au centre tumoral et un export des déchets métaboliques. Une des voies empruntées par les cellules en souffrance consiste à surexprimer de nouveaux facteurs dont le chef de file le plus important est le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) afin de recruter des vaisseaux préexistants. Ce déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques stimule l'angiogenèse et, est appelé *switch* angiogénique. Secondairement à celui-

ci, la tumeur induit une angiogénèse qui permet une croissance exponentielle de la zone tumorale. Cependant, les vaisseaux néo-angiogéniques se développent anarchiquement et présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles qui leur sont propres (Figure 6).

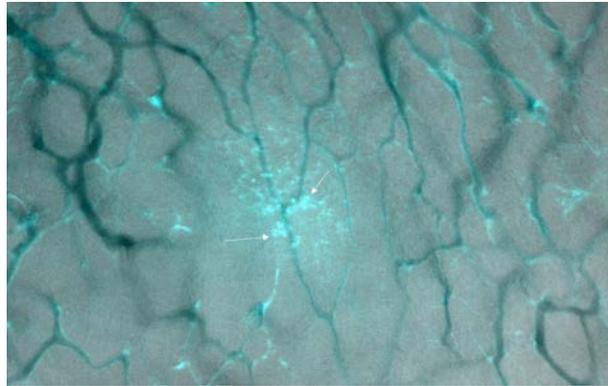


FIGURE 6 – Observation en microscopie intravitale de fuites vasculaires sur un modèle murin porteur de GBM humain après injection intraveineuse d'une molécule fluorescente (Dextran 70kDa). La fluorescence diffuse (flèche blanche) dans l'espace extra-vasculaire atteste de la perméabilité des vaisseaux tumoraux. Tiré de [18].

Schlageter *et al.* ont étudié cette organisation microvasculaire par microscopie électronique sur un modèle de tumeur cérébrale murine (RG-2) où les capillaires tumoraux présentaient des espaces inter-endothéliaux bien que la membrane basale soit continue. Cette BHT présentait des fenestrations hétérogènes allant de 12 nm à 80 nm selon les vaisseaux observés permettant le passage de molécules inférieures à ces tailles [19]. Il a d'ailleurs été démontré par marquage immunofluorescent que les GBM humains sous-exprimaient la claudine-3 bien qu'ils expriment d'autres protéines impliquées dans les jonctions serrées comme la claudine-5 ou l'occludine. Cependant, la perte de la claudine-3 coïncide avec une perte de l'intégrité de la BHE [20]. On *et al.* ont caractérisé de manière dynamique l'altération de la BHE par la croissance d'une métastase pulmonaire chez la souris Balb/c. L'apparition de fuites dans le parenchyme cérébral, évaluée par la prise de contraste anormale en IRM du parenchyme cérébral, a montré que la perméabilité de la BHE s'installait lors de la progression finale de la tumeur, soit dans ce modèle, 12 jours après greffe tumorale (correspondant à un volume tumoral de 10 mm³) [21]. Néanmoins, la glycoprotéine-P (P-gp) de la famille des transporteurs ABC, participant aux phénomènes de multi-résistance aux agents chimiothérapeutiques, était toujours effective au niveau des cellules endothéliales et donc toujours capable d'effluer les agents de chimiothérapie.

Dans la plupart des tumeurs, cette mise en place anarchique de la vascularisation avec des vaisseaux tortueux, fenestrés qui fuient, combinée à un faible drainage lymphatique participent à l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) [22]. La dysfonction de ces vaisseaux permet une rétention de principes actifs, bien plus importante au niveau tumoral que dans d'autres tissus (effet intéressant à exploiter au niveau clinique), mais est également à l'origine de la formation de zones hypoxiques au sein de la tumeur, zones qui se révèlent plus résistantes aux thérapies, notamment la radiothérapie et la chimiothérapie [23].

L'apport de la réponse immunitaire dans le contrôle des GBM reste difficile à comprendre. En effet, il a été démontré que selon le micro-environnement, une cellule pouvait prendre des fonctionnalités totalement opposées, rendant difficile leur catégorisation en tant qu'agent pro- ou anti-tumoral.

Les macrophages résidants dans le SNC peuvent prendre un profil M1 ou M2 *i.e.* anti- ou pro-tumoral respectivement comme le détaille la figure 7 [24].

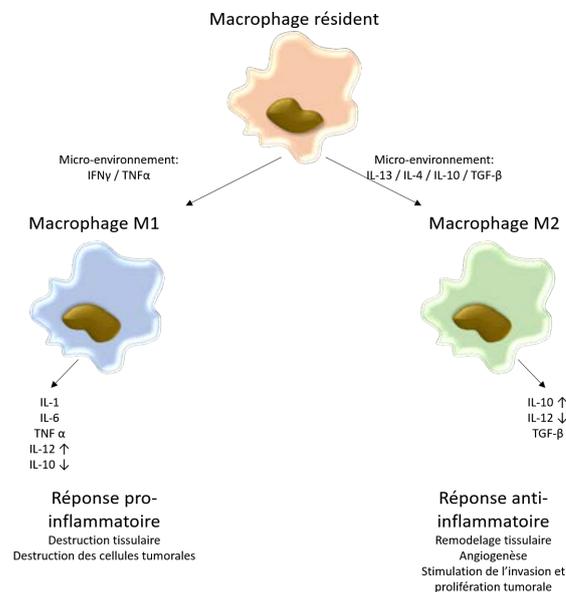


FIGURE 7 – Selon les cytokines relarguées dans l’environnement tumoral, les macrophages infiltrants peuvent prendre un phénotype pro- ou anti-tumoral (respectivement M2 et M1). Les cellules tumorales en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires, peuvent échapper aux macrophages, et même les utiliser à leur avantage. Adapté de [24].

Il est connu que les tumeurs en général cherchent à échapper à la reconnaissance par le système immunitaire et pour cela, induisent un environnement immunosuppresseur [25]. Dans le cas des GBM, le mécanisme principal repose sur la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme l’IL-10 (Interleukine-10) et le TGF β (*Transforming Growth Factor β*) qui vont réguler négativement l’activité des lymphocytes effecteurs de la réponse immunitaire (CD4+ et CD8+) leur permettant d’échapper à la lyse par les lymphocytes T CD8+ (Figure 8) [26] [27]. El Andaloussi *et al.* ont d’ailleurs détecté par PCR en temps réel sur 10 patients atteints de GBM une augmentation de la population de lymphocytes régulateurs par comparaison à un tissu cérébral sain, confirmant leur implication dans l’échappement tumoral au système immunitaire [28].

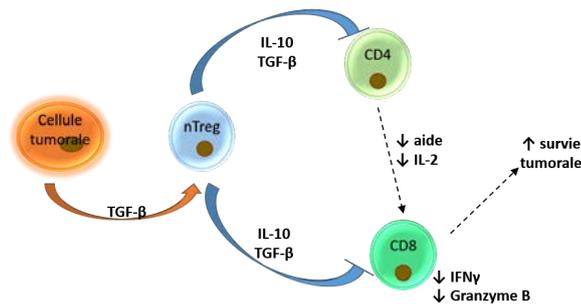


FIGURE 8 – Les cellules tumorales de GBM sécrètent des cytokines immunosuppressives qui activent (flèche orange) les lymphocytes régulateurs nTreg (Régulation négative de la réponse immunitaire). Les nTreg sécrètent également des cytokines immunosuppressives pour inhiber (flèche bleue) l'activité des lymphocytes effecteurs de la réponse immunitaire, les CD4+ qui ont rôle de stimulation des lymphocytes cytotoxiques CD8+, et les Lymphocytes CD8+ eux-mêmes. D'autres mécanismes d'inhibition existent mais ne sont pas décrits ici. Adapté de [26].

1.5 Prise en charge thérapeutique

Les GBM sont des tumeurs particulièrement agressives, hautement invasives et résistantes aux thérapies dites conventionnelles comme la radiothérapie et la chimiothérapie [29]. Les symptômes des tumeurs cérébrales varient selon leur grade, leur taille, et la localisation de la tumeur. L'imagerie permet de contrôler ces paramètres et donc, joue un rôle prépondérant dans l'orientation du diagnostic, pour guider les gestes chirurgicaux, planifier le traitement et suivre l'évolution tumorale (détails dans le chapitre III). Le pronostic et les modalités de prise en charge thérapeutique des GBM dépendent à la fois de l'état général du patient (âge, indice de Karnofsky, co-morbidités associées), du grade de la tumeur et de l'imagerie qui conditionnent l'opérabilité théorique. Le traitement standard des tumeurs cérébrales de haut grade inclut l'exérèse chirurgicale, la radiothérapie et la chimiothérapie.

La prise en charge du patient regroupe une équipe pluridisciplinaire de médecins et de soignants de différentes spécialités : neurochirurgien, neurologue, neuro-oncologue, neuroradiologue, radiothérapeute, neuro-pathologiste, psychiatre et psychologue, infirmier, assistant social ...

La décision du choix du traitement se prend collégialement et comprend généralement un traitement symptomatique et un traitement étiologique [30].

Le traitement symptomatique a pour but de limiter les symptômes induits par la croissance tumorale. En général, il repose sur une corticothérapie efficace dans la levée du syndrome compressif (*i.e.* un meilleur drainage de l'œdème et diminution de la perméabilité capillaire) et utile dans la prévention des nausées. Un traitement antiépileptique est systématiquement indiqué en période péri-opératoire sinon en cas de crise. Une prévention des complications thrombo-emboliques et digestives ainsi que des séances de kinésithérapie sont mises en place [30].

Le traitement étiologique a pour but d'améliorer la survie en termes de durée et de qualité de vie. Il dépendra du grade tumoral, de la taille et la localisation (zone fonctionnelle ou non), et de la fragilité du patient traduite par ses données cliniques : âge, score sur l'échelle de Karnofsky, co-morbidités associées.

Critères d'évaluation de la réponse au traitement. Actuellement en neuro-oncologie, l'évo-

lution globale de la réponse au traitement est évaluée par IRM grâce aux critères RANO (*Response Assessment in Neurooncology*) qui extrapole un volume 3D à partir d'une mesure 2D [31]. Les critères d'évaluation de la réponse au traitement sont déterminés d'après des séquences IRM anatomiques réalisées en T1 avant et après injection d'un produit de contraste (Gadolinium), T2/FLAIR.

La réponse au traitement peut-être (Figure 4) :

TABLE 4 – Critères RANO (*Response Assessment in Neurooncology*) permettant l'évaluation radiologique de la réponse tumorale des GBM aux différents traitements.

Critères RANO	Réponse complète	Réponse partielle	Maladie stable	Progression
Prise de contraste en T1	non	Diminution de plus de 50%	Diminution de moins de 50% ou augmentation de plus de 25%	Augmentation de plus de 25%
T2/FLAIR	Stable ou en baisse	Stable ou en baisse	Stable ou en baisse	Stable ou en baisse
Apparition de nouvelles lésions	non	non	non	non
Prise de stéroïdes	non	Stable ou en baisse	Stable ou en baisse	Pas pris en compte
Statut clinique	Stable ou en hausse	Stable ou en hausse	Stable ou en hausse	altéré
Nombre de critères à remplir pour avoir une réponse	5	5	5	5

- Réponse complète : disparition de toute prise de contraste sur deux IRM consécutives à un mois d'intervalle. Arrêt des corticoïdes. État neurologique stable ou s'améliorant.
- Réponse partielle : diminution supérieure ou égale à 50% du produit des diamètres de la prise de contraste sur deux IRM consécutives à un mois d'intervalle. Corticoïdes stables ou en diminution. État neurologique stable ou s'améliorant.
- Progression : augmentation supérieure ou égale à 25% du produit des diamètres de la prise de contraste et/ou apparition de nouvelles lésions ou aggravation neurologique ou corticoïdes en augmentation.
- Stabilité : toutes les autres situations.

Les critères actuels de suivi de réponse au traitement : RANO, RECIST (*Response Evaluation Criteria In Solid Tumor*), Mc Donald, ne prennent en compte que quelques paramètres comme le diamètre de la lésion, ou la prise de contraste pour évaluer l'évolution de la réponse. Ces outils sont limités pour évaluer avec fiabilité et rapidité la réponse au traitement, et nécessitent de nouveaux critères d'évaluation plus adaptés pour déterminer de manière précoce et robuste l'efficacité du traitement. Les techniques d'imageries non-invasives (TEP (Tomographie par émission de positons), SRM (Spectroscopie par Résonance Magnétique),...) sont très prometteuses et pourraient fournir de nouveaux indicateurs.

La chirurgie lorsqu'elle est possible, constitue le traitement de première intention. Elle consiste en une biopsie en cas de non-opérabilité pour établir un diagnostic anatomopathologique, sinon, en une résection chirurgicale qui permet, entre autre, de lever le syndrome compressif, diminuer la corticothérapie et améliorer les fonctions neurologiques. Les critères d'opérabilité dépendent des données cliniques du patient et de la localisation tumorale. La qualité de la résection influe directement sur la survie des patients et doit donc être la plus large possible [32] [33]. Cependant, les GBM sont des tumeurs très agressives qui présentent une masse tumorale prenant le contraste en IRM et une composante diffuse au-delà même de la prise de contraste. Dans ce cadre, l'exérèse des GBM est toujours partielle, et concerne la partie prenant le rehaussement de contraste en IRM, la partie infiltrante n'étant pas visible. Une exérèse est considérée comme totale lorsque aucune prise de contraste résiduelle n'est observée dans les 48 à 72 heures suivant l'opération [34]. Pour maximiser l'extension de la résection sans toutefois causer de lésions fonctionnelles des aides techniques sont proposées. La neuronavigation est de plus en plus exploitée. Plusieurs techniques de cartographie peropératoire sont utilisées aujourd'hui telles que l'IRM peropératoire, les ultrasons et la chirurgie guidée par fluorescence pour étendre toujours plus la résection tumorale sans risque en conservant la balance onco-fonctionnelle [35]. Duffau *et al.*, ont présenté la possibilité de faire de la cartographie anatomique en fusionnant l'IRM avec l'imagerie scanner, ou bien, fonctionnelle en fusionnant l'imagerie anatomique avec l'imagerie par TEP, SRM ou de tenseur de diffusion [36]. L'enjeu de ces cartographies et d'être le plus fidèle possible de l'architecture cérébrale en temps réel pendant l'opération afin de limiter toute atteinte d'une zone fonctionnelle. L'utilisation au bloc de la neuronavigation d'après examen IRM pré-opératoire et guidée en temps réel par échographie permet de limiter les erreurs de localisation dues à la rétraction du tissu lors de la chirurgie, à l'effet de masse, à la gravité, à l'étendue de la résection et aux fuites de LCR. Une étude clinique a mis en exergue que la chirurgie des gliomes guidée par imagerie multimodale fusionnant IRM conventionnelle/TEP-MET (L-méthyl¹¹C-Méthionine) permettait de retirer une plus large masse tumorale dans la zone résecable que la neuronavigation conventionnelle par amélioration de la détection des cellules cancéreuses [37].

La résection guidée par fluorescence ou FGR (*Fluorescence Guided Resection*) est une technique qui permet d'identifier spécifiquement par fluorescence les cellules tumorales améliorant le contraste entre tissu sain et tissu tumoral, ce qui permet un geste chirurgical plus large et plus sûr (voir sec-

tion 2.4.2 pour plus de détails). L'essai clinique de référence sur cette technique mené par le groupe *ALA-Glioma Study Group* en 2006, a démontré l'impact positif de la FGR, donc d'une résection plus complète, sur la survie sans progression à six mois [38].

Si l'état du patient le permet, la chirurgie est complétée par une radiochimiothérapie suivie d'une chimiothérapie adjuvante afin de traiter la partie tumorale diffuse.

La radiothérapie externe conformationnelle est le traitement post-opératoire standard des GBM qui améliore la survie médiane de plus de 4 mois, soit 10-12 mois de survie globale [30]. Le volume tumoral cible à irradier est délimité d'après les examens radiologiques. La partie tumorale prenant le contraste est définie comme le volume cible tumoral macroscopique (*Gross Tumor Volume*, GTV), mais celui-ci sous-estime toujours la réelle extension tumorale. Un second volume cible dit anatomoclinique (*Clinical Target Volume*, CTV) est donc défini pour tenir compte de la présence de cellules cancéreuses au-delà du rehaussement de signal détecté par IRM. Le CTV peut-être fixé de manière géométrique, correspondant à une inclusion automatique d'une marge de 2-3 cm autour de la zone de prise de contraste. Cette option est simple mais peut sous-estimer le volume de dissémination de cellules tumorales dans le tissu adjacent, ou alors au cas contraire, inclure dans le volume à irradier des organes à risque qu'il ne faut surtout pas toucher (ici des zones fonctionnelles du cerveau). La seconde option est anatomique, et inclut dans le CTV les zones d'œdème qui facilitent l'infiltration tumorale dans les structures limitrophes. Finalement, un volume cible prévisionnel (*Planning Target Volume*, PTV) tenant compte de l'incertitude de repositionnement entre chaque séance de radiothérapie et le mouvement interne de l'organe est calculé (Figure 9).

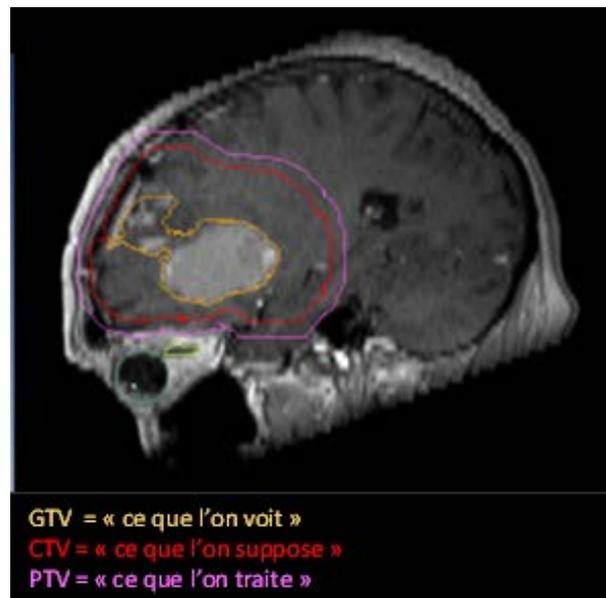


FIGURE 9 – Délimitation des volumes cibles en radiothérapie conformationnelle. Le GTV représente la partie tumorale visible par examen radiologique, le CTV prend en compte les extensions microscopiques tumorales d'après les connaissances cliniques sur la pathologie et le PTV représente une dernière marge de sécurité prenant en considération l'incertitude liée au repositionnement du patient lors des séances successives et aux mouvements internes.

Le tissu sain devant être préservé, il est crucial que la détermination du volume cible épargne les structures à risque adjacentes à la tumeur comme le corps calleux ou les faisceaux de fibres blanches [39]. Tout comme pour la chirurgie, les différentes modalités d'imagerie par IRM notamment l'imagerie de tenseur de diffusion permet de les localiser afin de planifier le volume cible à irradier.

Si le volume cible est relativement faible et les organes à risque peu exposés, le patient pourra recevoir d'emblée 54/60 Gy répartis sur 6 cycles de 5 jours à raison d'une fraction de 1,8/2 Gy par jour. Dans le cas d'une récurrence, ou pour les patients de plus de 70 ans ou fragilisés, le programme d'irradiation est à adapter au cas par cas. Roa *et al.* ont démontré la non infériorité d'un régime hypofractionné (40 Gy en 15 fractions sur 3 semaines) par rapport à un régime standard pour des patients âgés de plus de 60 ans avec un indice de Karnofsky >50 [40]. Dans tous les cas, la mauvaise tolérance du tissu cérébral sain empêche l'utilisation de plus fortes doses susceptibles d'être curatives.

La curiethérapie ou brachythérapie stéréotaxique est généralement administrée dans le cas de récurrence de gliome de haut grade [30]. Elle consiste en l'insertion interstitielle de sources radioactives scellées directement dans le tissu tumoral ou dans la cavité d'exérèse. Cette méthode permet de délivrer de manière très ciblée une dose radioactive au tissu tumoral en minimisant les dégâts au tissu sain. L'IRM avec produit de contraste permet de définir le volume cible et la géométrie d'implantation des sources radioactives afin que le volume cible (*i.e.* la tumeur visible) et une marge de 0,5 à 1 cm reçoivent une isodose de référence de 50 Gy qui correspond à 70% de la dose de base. Les sources utilisées sont généralement des fils d'iridium 192, des grains d'iode 125 ou des minitubes de césium 137. Actuellement des études visant à confirmer que cette approche est une bonne stratégie pour les gliomes récurrents sont en cours. Schwartz *et al.*, ont conclu à la faisabilité et à la sécurité de cette intervention même pour des patients ayant déjà reçus des rayons externes [41].

La radiochimiothérapie fait partie du traitement standard des GBM. L'utilisation concomitante de la radiothérapie et de la chimiothérapie compte sur i) une coopération spatiale entre l'effet local de la radiothérapie et systémique de la chimiothérapie afin de toucher toutes les cellules tumorales résiduelles, ii) sur une mise en jeu de mécanismes de destruction différents afin de limiter les voies de résistance cellulaire et iii) un effet anti-tumoral additif pour améliorer l'efficacité de traitement sans majorer la toxicité. Son utilisation dans des conditions idéales (*i.e.* des délais plus courts entre chirurgie et radiothérapie) a amélioré la médiane de survie à 15 mois [42]. Cependant, en routine clinique, ce chiffre n'est pas toujours atteint. Le protocole standard de traitement décrit par Stupp *et al.* propose une radiothérapie conventionnelle fractionnée en 2 Gy/jour pendant 5 jours par semaine, sur 6 semaines pour une dose totale de 60 Gy plus une prise journalière de temozolomide 75 mg/m² 7 jours par semaine pendant toute la durée du protocole d'irradiation, suivi de 6 cycles de thérapie adjuvante allant de 150 à 200 mg/m² par cycle de 5 jours pendant 28 jours.

La chimiothérapie adjuvante est également utilisée mais son efficacité reste limitée. La capacité des agents cytotoxiques à passer la BHT est toujours sujette à caution. Elle peut être proposée en traitement initial en tant que chimiothérapie adjuvante ou lors de récurrence. En cas de récurrence, si le patient n'a pas déjà reçu de nitroso-urée, les molécules de cette famille peuvent-être prescrites ainsi que le carboplatine, la procarbazine ou le temozolomide. L'augmentation de la médiane de survie reste modeste, entre 5-6 mois à partir du traitement de la récurrence.

Malgré une chirurgie de plus en plus large, l'utilisation de la radiothérapie et l'insertion du temozolomide (Temodal®) dans les lignes de traitement standard, la survie médiane des patients atteints de GBM n'a pas beaucoup évolué. De nouvelles avancées dans le traitement de ces tumeurs

sont absolument nécessaires. De par leur profil génétique très hétérogène et le développement rapide de résistance au traitement, les GBM sont très difficiles à traiter et le développement de nouvelles thérapies prenant en compte la pathogenèse des GBM pourraient aider à adapter et personnaliser le traitement à chaque profil moléculaire de tumeur.

Les thérapies ciblées se présentent dans leur ensemble, comme une nouvelle stratégie de traitement s'appuyant sur les connaissances moléculaires des dérégulations des voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse, la prolifération, et l'apoptose. Ces approches visent à être plus spécifiques de la tumeur et donc moins toxiques, afin de proposer des traitements avec un meilleur rapport bénéfice/risque.

Les molécules de ciblage peuvent concerner des récepteurs surexprimés dans les GBM comme EGFR, PDGFR afin de bloquer les voies de transduction de signal qui en découlent, ou un effecteur en aval (Ras/Raf ou *Rat Sarcoma* et *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*, MAPK ou *Mitogen Activated Protein Kinase*, mTOR ou *Mammalian Target Of Rapamycin*).

Beaucoup de molécules inhibitrices ont été développées en ciblant différents points clés des voies de transduction de signal mais peu sont allées jusqu'à la phase III clinique. Citons tout de même l'EGFR qui a permis de proposer de nombreuses molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase comme l'Erlotinib ou le Gefitinib, mais dont les résultats des essais de phase II n'ont pas montré d'amélioration de la survie globale [43] [44].

IDH-1 dont l'état muté semble être un marqueur de meilleur pronostic des patients, fait en ce moment l'objet d'un ciblage par deux molécules inhibitrices AG881 et AG120 (NCT02481154, NCT02073994) testées en essais cliniques de phase I. Les premiers résultats permettent de démontrer une absence de cytotoxicité pour l'agent AG120, ceux à suivre sont attendus avec impatience [45].

Les GBM étant des tumeurs hautement angiogéniques l'utilisation de molécules anti-angiogéniques semblent être une stratégie très prometteuse qui a pour but de "normaliser" les vaisseaux et d'améliorer la distribution des agents chimiothérapeutiques et de l'oxygène afin d'augmenter l'effet des thérapies conventionnelles. Aux vues des résultats des essais cliniques de phase III menés sur l'efficacité des anti-angiogéniques, cette stratégie semble n'avoir aucun effet sur la survie globale [46] [47].

Citons par exemple le Bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF ; il a été testé seul et en combinaison avec des molécules de chimiothérapie. Deux essais cliniques de phase III contrôlés et randomisés en double aveugle, AVAGlio et RTOG0825 ont été réalisés sur des GBM nouvellement diagnostiqués et n'ont pas montré de bénéfices dans la survie globale, bien qu'une prolongation significative de la survie sans progression (PFS) de 4,4 mois ait été enregistrée dans l'essai AVAGlio [46] [47].

Un essai multicentrique de phase II (Glarius) combinant le bevacizumab à l'irinotecan, un inhibiteur de la topoisomérase-1, n'a pas montré de bénéfice en matière de survie globale par rapport au traitement standard *i.e.* radiochimiothérapie concomitante de temozolomide (17,3 mois vs 16,6 mois), bien que comme pour l'essai AVAGlio une augmentation de la PFS ait été observée (9,7 mois vs 5,9 mois) [48].

Cependant, la complexité des interactions entre les voies de signalisation ainsi que leur redondance limite l'efficacité de molécules inhibitrices appliquées en monothérapie. La combinaison de plusieurs molécules ciblantes associées au traitement standard pourrait présenter plus de chance de réussite. De plus, les effets induits par les thérapies anti-angiogéniques sont difficilement éva-

luables par les critères radiologiques d'usage qui sont principalement des critères morphologiques et ne sont pas forcément adaptés pour évaluer une réponse anti-angiogénique. Des recherches au niveau préclinique visent à définir et trouver de nouveaux marqueurs radiologiques fiables permettant de réellement évaluer l'efficacité de ces traitements [49].

Un autre point important concerne la sélection d'une population jugée éligible à un traitement donné. En effet, une étude rétrospective menée sur les résultats d'AVAGlio suggère que les GBM de sous-type proneural répondraient mieux au traitement que le sous-type mésenchymal.

Bien que de nombreux essais cliniques de phase III aient été menés sur pléthores de molécules ciblantes, peu de progrès dans le traitement des GBM ont été réalisés. Les thérapies anti-angiogéniques les plus prometteuses ont pour l'instant échoué à améliorer la survie globale.

D'autres concepts sont à l'essai et présentent des perspectives plus encourageantes comme l'immunothérapie dont un essai de phase II (bientôt en phase III) sur un composé ICT-107 a montré une augmentation de la survie globale de 23,1 mois vs 13,7 mois chez les non-répondeurs [50].

D'autres modalités thérapeutiques émergent dans le traitement des GBM. Le concept de TTF ou *Tumor Treating Fields* tire partie des propriétés électro-magnétiques des cellules en appliquant un champ électrique alternatif de faible intensité qui interfère avec la formation des microtubules lors de la métaphase, et engendre une ségrégation anormale de l'ADN dans les cellules filles ainsi qu'une déstabilisation de la membrane plasmique menant à la mort de la cellule lors de la mitose. En pratique, le dispositif est constitué d'électrodes de surface fixées sur le crâne du patient et d'un boîtier portable, permettant au patient d'être exposé 18 à 20 heures par jour au TTF. Pour l'instant, un essai clinique de phase III randomisé mené sur des GBM nouvellement diagnostiqués a montré une prolongation de la PFS (7,1 mois vs 4,0 mois) et de la survie globale (19,6 mois vs 16,6 mois) comparées à un traitement standard [51].

La PDT, quant à elle, s'inscrit également dans les thérapies de contrôle local de la croissance tumorale. Elle présente un fort attrait dans la prise en charge des GBM car elle peut être utilisée en complément d'autres modalités thérapeutiques sans toxicité additionnelle importante [29]. La PDT présente un rayon d'action localisé, ce qui permet de ne pas alourdir les contraintes imposées par les autres thérapies comme la chirurgie ou la radio/chimiothérapie et de limiter les dégâts au tissu sain. Elle présente également le net avantage d'un mode d'action multiple ciblant directement les cellules tumorales ou leur vascularisation et immunostimulant par le déclenchement d'une réponse immunitaire et inflammatoire, elle joue un rôle dans le contrôle à long terme de la croissance tumorale. Tout comme les thérapies précédentes, son rôle est d'améliorer l'efficacité des traitements standard et diminuer la toxicité induite. Son principe de fonctionnement, sa place en clinique, ses avantages et limitations sont présentés dans le chapitre suivant.

2

Place de la thérapie photodynamique dans la prise en charge des tumeurs cérébrales de haut grade

Sommaire

2.1 Principe de la thérapie photodynamique	23
2.2 Effets biologiques photo-induits	27
2.2.1 Effets directs	27
2.2.2 Effets indirects	29
2.3 Paramètres clés impliqués dans la réaction photodynamique	32
2.3.1 Le photosensibilisateur	32
2.3.2 Comment les nanoparticules peuvent résoudre les limitations et la résistance à la thérapie photodynamique. (Chapitre dans <i>Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer 2014</i>)	34
2.3.3 Dosimétrie de la lumière	50
2.3.4 Consommation de l'oxygène	50
2.3.5 Propagation de la lumière en milieu biologique	51
2.4 Applications de la thérapie photodynamique en neuro-oncologie	53
2.4.1 Généralités techniques	53
2.4.2 La résection guidée par fluorescence	55
2.4.3 La thérapie photodynamique interstitielle	56
2.4.4 La thérapie photodynamique dans les essais cliniques	59

2.1 Principe de la thérapie photodynamique

Le principe de la thérapie photodynamique (PDT) repose sur la capacité d'une molécule photo-activable ou photosensibilisateur à absorber des photons émis à une longueur d'onde appropriée et à transférer cette énergie à un accepteur. Le photosensibilisateur, qui ne doit pas être cytotoxique à l'obscurité, est activé par une source lumineuse non-ionisante, émettant des photons à une longueur d'onde spécifique de son spectre d'absorption. En présence d'oxygène moléculaire (3O_2), le photosensibilisateur excité lui transmet son énergie, générant des espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel

que l'oxygène singulet (1O_2), menant à la destruction des cellules cibles par des réactions de photo-oxydations [52].

La PDT est communément divisée en 3 phases (Figure 10) :

1. **La phase d'administration et de distribution du photosensibilisateur.** L'administration peut avoir lieu sous forme topique pour les tumeurs superficielles (c'est le cas en dermatologie), ou par voie intraveineuse (la plupart du temps), *per os* ou intratumorale pour les tumeurs plus profondes. L'intervalle de temps nécessaire à l'accumulation optimale du photosensibilisateur dans le tissu cible dépendra grandement des caractéristiques de ce tissu, du mode d'administration mais aussi des propriétés pharmacocinétiques de la molécule. En effet, lors d'une administration par voie intraveineuse, le photosensibilisateur entre rapidement en interaction avec les protéines plasmatiques, peut s'y lier (lipoprotéines, albumine) et être transporté dans les tissus. Sa rétention au niveau tumoral est favorisée par les propriétés physiopathologiques de la tumeur (effet EPR, pH acide, récepteur au LDL...) et peut même être améliorée par l'utilisation de molécules ciblant spécifiquement les cellules tumorales *via* des ligands ou des anticorps. Ce délai entre l'administration du photosensibilisateur et son activation par irradiation non-ionisante s'appelle l'**intervalle drogue-lumière** (IDL).
2. **La phase d'irradiation.** Elle a lieu après l'IDL et son application dépend du type de tumeur ciblée et du type de photosensibilisateur utilisé. Aujourd'hui, le dispositif lumineux utilisé est généralement constitué d'une diode LASER comme source lumineuse et d'une fibre optique agrémentée d'un diffuseur comme système de distribution de la lumière *in situ*. Différentes géométries de diffuseurs peuvent-être choisies selon l'emplacement de la tumeur : ballon rond pour une cavité post-exérèse, fibre plane pour une irradiation interstitielle, tissu lumineux pour une irradiation superficielle. Les conditions d'irradiation sont réglées selon deux paramètres : l'irradiance et la fluence. Ils décrivent respectivement le débit auquel la lumière est appliquée (W/cm^2) et la quantité totale de photons apportés au cours du traitement (J/cm^2). Ces valeurs ne sont pas fixes, et doivent faire l'objet d'une adaptation en fonction de l'organe visé et du photosensibilisateur utilisé. Il a été démontré que la réponse biologique est fortement corrélée à l'énergie absorbée par unité de masse de tissu. Ils doivent donc être optimisés avec le plus grand soin [53].
3. **La phase cytotoxique.** Suite à l'excitation du photosensibilisateur par la lumière, des ERO sont formées et génèrent des dégâts oxydatifs létaux ou sublétaux dans leur environnement proche. La génération d'ERO provoque une destruction directe des cellules tumorales, mais également une destruction indirecte par altération de la vascularisation et induction d'une réponse inflammatoire et immunitaire qui potentialise l'effet direct de la thérapie. Au niveau moléculaire, l'activation du photosensibilisateur par la lumière mène au passage de son état fondamental à son état excité, qui a une courte durée de vie. Celui-ci peut ensuite se désactiver par phénomène radiatif (émission de fluorescence) ou non radiatif, mais il peut également passer, par croisement intersystème, à son état triplet excité qui a une longue durée de vie. Cet état triplet excité permet des interactions avec les éléments de son milieu notamment l'oxygène moléculaire. Ces réactions de photo-oxydation de type I et II mènent à la destruction de la cellule par différentes voies (apoptose, nécrose, autophagie) comme expliqué dans la figure 11. Les réactions de type II, au cours desquelles le photosensibilisateur réagit avec l'oxygène moléculaire du milieu pour former de l'oxygène singulet, ont été décrites comme prédominantes dans le processus photodynamique. L^1O_2 est fortement réactif, présente une durée de vie de

≈ 50 ns et une distance de diffusion de ≈ 25 nm et peut réagir avec nombre de substrats cellulaires tels que les acides aminés, les nucléosides et les lipides insaturés [54] [55].

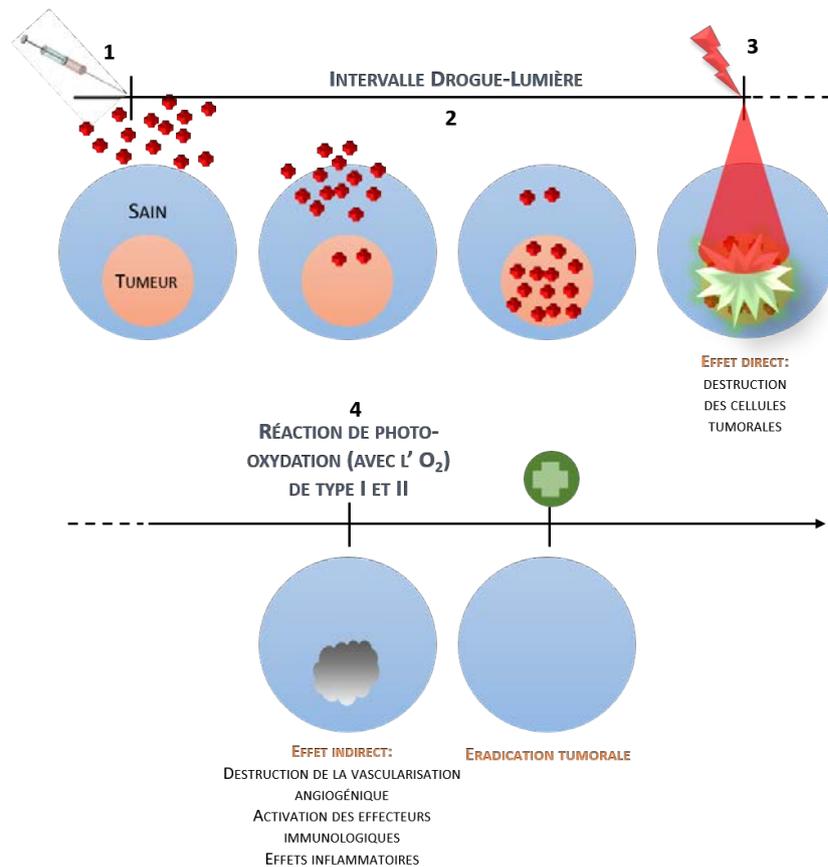


FIGURE 10 – Principe de la thérapie photodynamique. **1.** Le photosensibilisateur est administré généralement par voie intraveineuse au patient. **2.** Une fois dans la circulation sanguine, le photosensibilisateur se distribue dans l'organisme. Pour une accumulation optimale au niveau tumoral, un certain délai, appelé IDL (Intervalle Drogue-Lumière), est respecté entre la phase d'administration du photosensibilisateur et la phase d'irradiation de la tumeur. **3.** Une fois le photosensibilisateur accumulé au niveau tumoral, la tumeur est irradiée par une lumière non-ionisante à une longueur d'onde spécifique du spectre d'absorption du photosensibilisateur. L'absorption de la lumière par le photosensibilisateur l'excite menant à des réactions de photo-oxydations. **4.** Ces réactions entre l'oxygène moléculaire du milieu et le photosensibilisateur entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène cytotoxiques pour la cellule. Des effets directs *i.e.* la destruction des cellules tumorales ou indirects *i.e.* la destruction des cellules endothéliales de la vascularisation tumorale, ainsi que l'activation du système immunitaire sont déclenchés et mènent à la destruction de la zone tumorale.

La PDT se présente donc comme un traitement locorégional avec une toxicité systémique réduite comparée à la radiothérapie et la chimiothérapie. En effet, l'utilisation d'un faisceau lumineux non-ionisant de moindre énergie est inoffensif en lui-même et n'est pas mutagène contrairement aux rayons X. La nécessité de l'interaction entre les photons du faisceau lumineux et le photosensibilisateur pour engendrer une réaction cytotoxique localise les effets induits dans les zones réunissant ces deux paramètres. De plus, les ERO générées ont une durée de vie courte et diffusent peu, et ne seront donc actives que sur leur site de production.

Cependant, l'administration d'un photosensibilisateur peut entraîner une photosensibilisation à la peau et l'exposition au soleil est déconseillée dans les jours suivant le traitement. Au niveau préclinique, des recherches sont menées pour concevoir de nouvelles molécules avec une meilleure sélectivité pour le tissu tumoral, limitant cet effet indésirable (abordé dans la section 2.3.1).

Comme nous l'avons dit, la PDT active également la réponse immunitaire qui potentialise l'effet thérapeutique et joue un rôle essentiel dans le contrôle à long terme de la réponse au traitement [56] [57]. Cependant, la réponse immunitaire aigüe peut entraîner des réactions inflammatoires fortes qui, dans le cas du traitement des GBM, doivent être contrôlées. Les aspects biologiques de la réponse à la PDT font l'objet du point suivant.

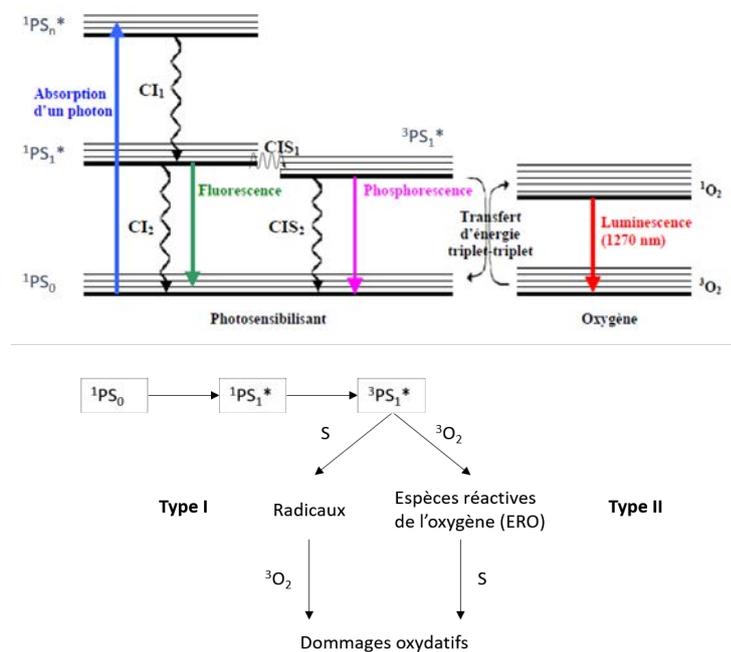


FIGURE 11 – L'absorption d'un photon entraîne le passage du photosensibilisateur de son état fondamental 1PS_0 à son état excité $^1PS_1^*$, $^1PS_n^*$, qui retourne à son état électronique excité de plus bas niveau $^1PS_1^*$ par relaxation vibrationnelle (conversion interne, CI). Le photosensibilisateur peut retourner à son état fondamental en émettant de la fluorescence, ou par CI. Il peut également se produire un retournement de spin qui mène à l'état triplet excité $^3PS_1^*$ (Croisement Inter-Systèmes, CIS). Le passage d'un état triplet à un état singulet est une transition interdite qui empêche le photosensibilisateur, une fois son état $^3PS_1^*$ atteint, de se désexciter rapidement. Ceci a pour conséquence une durée de vie longue de l'état $^3PS_1^*$ (1 μ s à 1 s vs 1 ns pour l'état $^1PS_1^*$) qui lui permet d'interagir avec les substrats (S) de son milieu. Les réactions de type II correspondent à un transfert d'énergie vers l' 3O_2 entraînant la formation d' 1O_2 . Les réactions de type I correspondent à un transfert d'électrons ou d'atomes hydrogène entre le photosensibilisateur à l'état triplet excité et le substrat cellulaire (S), entraînant la formation de chaînes d'auto-oxydation ou d'ions radicaux (principalement l'anion radical superoxyde, le radical hydroxyle, le peroxyde d'hydrogène).

2.2 Effets biologiques photo-induits

La PDT peut induire une régression tumorale par l'action combinée de divers mécanismes : un effet direct de destruction des cellules tumorales, et des effets indirects, associant destruction des vaisseaux tumoraux (et régression consécutive de la tumeur par asphyxie) à une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte. La prépondérance de l'un ou l'autre de ces effets va dépendre du type de tumeur, du photosensibilisateur (*e.g.* caractéristiques pharmacocinétiques, localisation intratissulaire et intracellulaire) et des conditions de PDT utilisées [58].

2.2.1 Effets directs

Les effets directs de la PDT sont les effets du traitement sur les cellules tumorales ayant incorporé le photosensibilisateur. Les dommages aux substrats cellulaires causés par les ERO ont pour conséquence l'altération des fonctions des organites cellulaires et des systèmes endomembranaires. Les dommages se traduisent par deux effets principaux : la mort par nécrose et par apoptose. L'orientation vers l'un ou l'autre type de mort cellulaire dépend de la lignée tumorale, mais aussi de la localisation intracellulaire du photosensibilisateur et des doses de lumière et de photosensibilisateur utilisées.

La mort par nécrose se traduit par une perte d'intégrité membranaire après dégradation oxydative des lipides membranaires. Une entrée massive d'eau et d'électrolytes dans la cellule s'ensuit, puis la cellule libère son contenu cellulaire dans le milieu environnant, générant une réaction inflammatoire.

Dans un contexte de PDT, la présence anormale du contenu cellulaire (espèces toxiques, ERO en forte concentration...) dans l'espace extracellulaire conduit à un effet létal de proche en proche sur les cellules voisines par peroxydation des lipides membranaires [59]. D'avis général, l'orientation vers une mort par nécrose est favorisée par l'utilisation de fortes fluences ou des concentrations élevées en photosensibilisateur [60]. Nagata *et al.* ont montré sur une lignée de mélanome malin humain qu'une augmentation de la fluence privilégiait la mort par nécrose [61]. Kessel *et al.* observent le même phénomène sur une lignée de leucémie murine cette fois-ci en augmentant la concentration en photosensibilisateur [62]. Ils suggèrent qu'avec l'augmentation de la concentration en photosensibilisateur, celui-ci se distribue différemment dans la cellule, notamment à la membrane plasmique, facilitant la perte d'intégrité membranaire et donc la mort par nécrose. L'effet des fortes doses de lumière est moins clair ; il est possible qu'elles inactivent des effecteurs impliqués dans la cascade de l'apoptose, inhibant cette voie et favorisant la nécrose [63].

La mort par apoptose est une mort initiée par des signaux intra- et extracellulaires (*e.g.* libération de cytochrome c par la mitochondrie et activation des récepteurs de mort par le TNF α), qui conduisent à des cascades d'événements tels que la diminution du potentiel membranaire de la mitochondrie et le relargage dans le cytoplasme du cytochrome c, puis l'activation de caspases effectrices (*e.g.* caspase-3). Celles-ci induisent l'autodestruction de la cellule par clivage des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire. Le noyau se condense, la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases. La membrane plasmique bourgeonne et forme des corps apoptotiques qui renferment une partie du cytoplasme de la cellule. Ces corps apoptotiques sont ensuite éliminés par phagocytose. Au cours de ce processus le contenu cellulaire n'est donc jamais libéré dans le milieu évitant toute réaction inflammatoire.

Plusieurs études *in vitro* ont montré sur différentes lignées cellulaires que la PDT médiée par 5-ALA (acide 5-aminolévulinique) ou Pc4 (phtalocyanine 4) diminuait l'expression des transcrits de la pro-

téine Bcl-2 (*B-Cell Lymphoma 2*) et augmentait celle de Bax, respectivement des protéines anti- et pro-apoptotiques de la grande famille Bcl-2 [64] [65]. Ce déséquilibre dans la balance Bax/Bcl-2 en faveur d'une mort par apoptose est également observé *in vitro* dans la lignée U87, où la PDT-5-ALA engendre également une sous-expression de NF- κ B, un relarguage du cytochrome c et de l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) [66] (Figure 12).

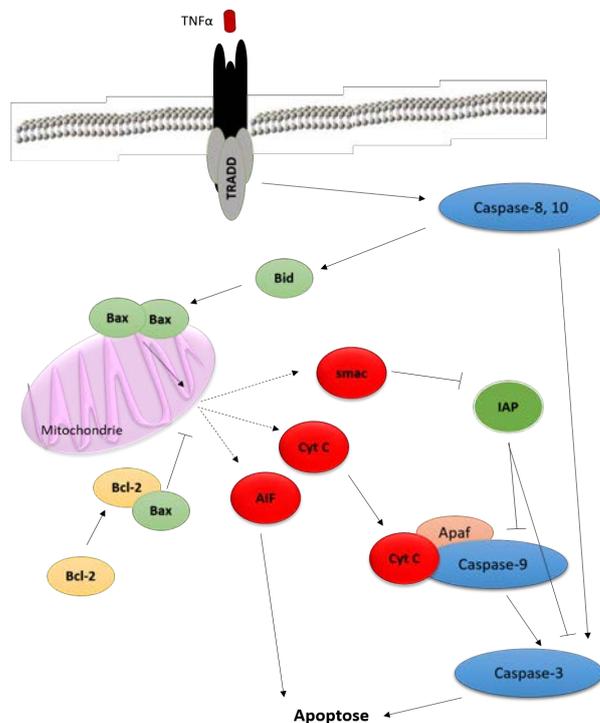


FIGURE 12 – Schéma simplifié des voies de signalisation de l'apoptose. En cas de stimulus pro-apoptique induit par les ERO produites par la PDT, ou induit par la fixation du TNF α sur son récepteur, la cascade d'activation de l'apoptose se déclenche en relarguant le cytochrome c et l'AIF dans le cytosol, activant les pro-caspases, puis les caspases effectrices menant à l'apoptose de la cellule.

Un troisième mécanisme de mort, l'autophagie peut-être activé par la PDT. L'autophagie est un mécanisme catabolique impliqué dans l'homéostasie cellulaire qui maintient une balance entre la synthèse, la dégradation, et le recyclage des métabolites cellulaires. Le processus consiste en la formation d'un autophagososome : une vésicule à double membrane qui enrobe le contenu cellulaire nécessitant d'être dégradé et qui ensuite fusionne avec le lysosome pour former un autophagolysosome digérant son contenu [67]. Ce processus permet de recycler le contenu cellulaire, et s'apparente à une source d'énergie pour la cellule. Ce processus peut également conduire à la mort de la cellule par cannibalisme.

Le rôle de l'autophagie dans un contexte tumoral peut se révéler pro-tumoral en servant de source d'énergie et en bloquant les voies de l'apoptose dans les cellules tumorales, ou anti-tumoral en induisant la mort cellulaire [68].

L'effet de l'autophagie dans le cadre de la PDT reste difficile à appréhender. Buytaert *et al.*, ont montré sur des cellules de carcinome utérin humain invalidées pour les gènes Bax et Bak (afin que les cellules soient déficientes pour l'apoptose) qu'après une PDT médiée par Pc-4, l'autophagie se révélait

comme voie prédominante de mort cellulaire [69]. Des cellules compétentes pour entrer en apoptose ont également montré la formation d'autophagolysosome après PDT médiée par la Pc-4 [70]. La revue de plusieurs travaux sur le sujet indique que sur différentes lignées cellulaires et différents photosensibilisateurs, la PDT induit directement de l'autophagie, mais que celle-ci aurait un rôle pro-tumoral dans les lignées cellulaires compétentes pour entrer en apoptose, leur permettant ainsi de recycler les organelles endommagées, et inversement un rôle anti-tumoral pour les lignées cellulaires incapables d'initier l'apoptose en promouvant la nécrose [71].

2.2.2 Effets indirects

Les effets indirects de la PDT sont les effets de la thérapie sur le micro-environnement tumoral. Ils sont divisés en deux grandes catégories : les effets vasculaires et les effets immunitaires (Figure 13).

La prépondérance de l'**effet vasculaire** lors de la PDT dépend des paramètres de traitement choisis comme la dose de photosensibilisateur administrée, l'IDL et la dose de lumière.

Les effets vasculaires peuvent être déclenchés par deux événements initiateurs : des dommages directs aux cellules endothéliales (1) ou un déséquilibre de la balance vaso-constricteur/dilatateur (2).

1. Le photosensibilisateur lorsqu'il est administré par voie intraveineuse, peut être capté par les cellules endothéliales et incorporé. Lors de l'irradiation, l'altération des cellules endothéliales entraîne un collapsus vasculaire et peut provoquer une hypoxie tumorale persistante et sévère [73]. La vasoconstriction des vaisseaux tumoraux induit la libération de macromolécules (tel que le thromboxane) qui provoque l'adhésion de leucocytes, l'activation plaquettaire et la formation de *thrombi* [74]. L'exposition de la membrane basale induit également l'adhésion des neutrophiles polynucléaires et des globules rouges, ce qui contribue à réduire le diamètre luminal participant à la thrombose et à une stase vasculaire [75] [76]. Ces événements initiateurs de l'effet antivasculaire (dommages aux cellules endothéliales et vasoconstriction) conduisent à une destruction tumorale secondaire [77] [78].
2. Il a été montré que certains photosensibilisateurs hydrosolubles tels que WST11, n'induisent pas de dommages directs aux cellules endothéliales, mais conduisent à une occlusion vasculaire. Ces photosensibilisateurs ont tendance à rester localisés dans le plasma, sans diffuser dans les tissus, ni s'incorporer dans les cellules endothéliales. La nature des ERO formées dépend de leur environnement, et les dérivés de bactériochlorophylle comme le WST11 génèrent principalement des espèces radicalaires (radicaux hydroxyles, anions superoxydes, et peut-être également peroxydes d'hydrogène) dans les milieux aqueux [79]. Celles-ci interagiraient rapidement avec les radicaux de monoxyde d'azote (NO) du micro-environnement tumoral. Le NO est un facteur vasodilatateur, anticoagulant, permettant d'éviter la thrombose des vaisseaux tumoraux. Son oxydation par les ERO rompt alors l'équilibre préexistant au sein des vaisseaux tumoraux entre facteurs pro- et anticoagulants. Parallèlement, les produits générés (principalement le peroxyde nitrique, ONO₂) induisent l'apoptose des cellules endothéliales et la formation de caillots sanguins conduisant à l'occlusion vasculaire [79]. La privation des cellules tumorales en oxygène et nutriments, associée à une deuxième vague de radicaux, conduit à une nécrose puis à une réponse tumorale complète.

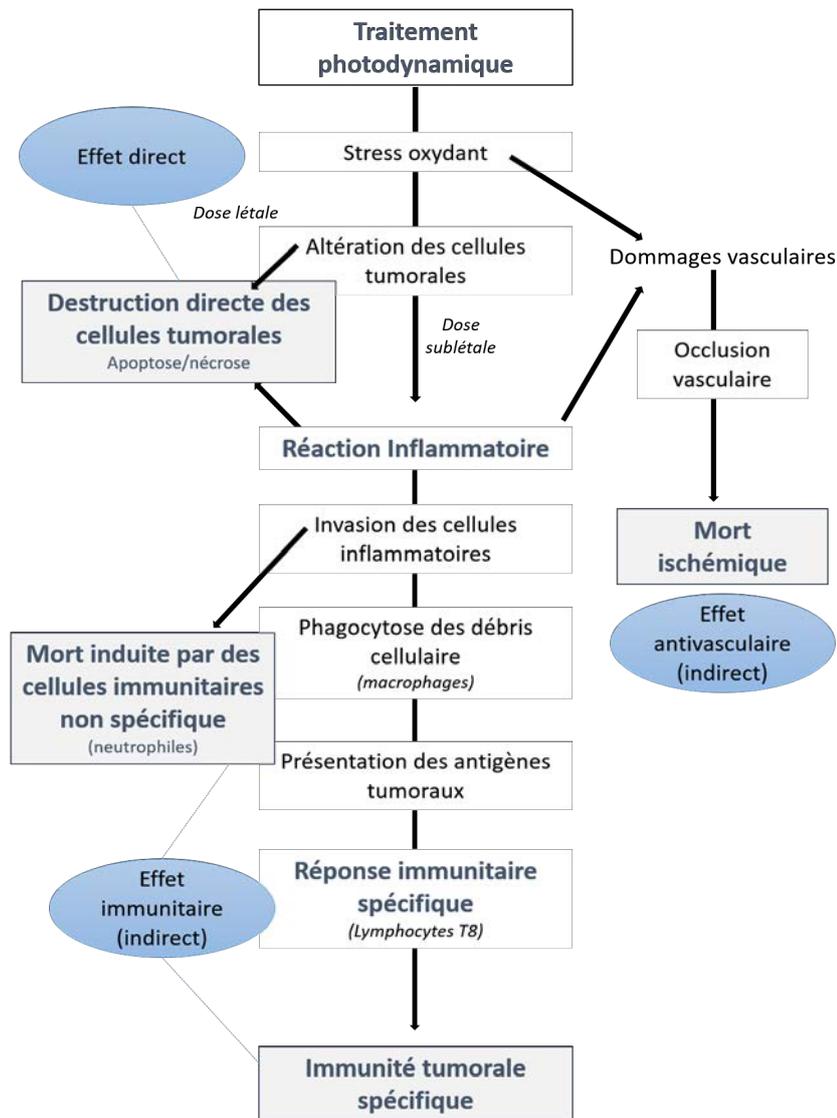


FIGURE 13 – Schéma simplifié des mécanismes de destruction tumorale associés à la PDT. L'activation de la molécule photo-activable par l'émission d'une longueur d'onde excitatrice entraîne un échange d'énergie avec les molécules environnantes notamment l'O₂ menant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Ces ERO très cytotoxiques mènent i) soit à la destruction directe des cellules tumorales, ii) soit à celle des cellules endothéliales néovasculaires et à l'asphyxie de la tumeur, iii) soit en dose sublétale à la stimulation des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation. L'inflammation souvent observée après PDT semble résulter de l'expression de deux facteurs de transcription, NFκB (*nuclear factor kappa B*) et AP1 (*activator protein 1*), qui interviennent dans l'activation transcriptionnelle de gènes codant des cytokines, entraînant une augmentation des taux circulants d'IL-1β, IL-6, MIP (*macrophage inflammatory protein*)-1 et -2 et G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*). Cette induction de l'inflammation peut soit résulter en la destruction des cellules tumorales par des cellules immunitaires non spécifiques, soit induire une réponse immunitaire spécifique [72]. Adapté de [57].

De nombreuses études montrent le rôle prépondérant de l'effet antivasculaire dans l'éradication de la tumeur par PDT [80] [81]. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour potentialiser l'effet antivasculaire de la PDT (VTP pour *Vascular Targeted Photodynamic therapy*), soit en agissant sur le protocole de traitement, soit en utilisant des photosensibilisateurs avec un mode d'action vasculaire. L'optimisation du protocole peut porter sur :

- la diminution de l'IDL. Suite à l'injection intraveineuse du photosensibilisateur, celui-ci se localise initialement au niveau du compartiment vasculaire et peut ensuite diffuser dans les cellules tumorales. Par conséquent, une irradiation à un IDL court aura tendance à favoriser l'effet antivasculaire de la PDT. L'IDL favorisant l'effet antivasculaire peut varier de quelques minutes à quelques heures en fonction des propriétés pharmacocinétiques du photosensibilisateur.
- L'irradiance appliquée. Le choix de l'irradiance (reflétant le débit auquel la lumière est appliquée) semble également être un paramètre important pour l'observation d'un effet antivasculaire, mais son rôle est moins clair que celui de l'IDL. Une étude réalisée sur des muscles de rats sains sensibilisés avec de l'ALA (200 mg/kg) et irradiés à 30, 105 ou 178 mW/cm² montre une diminution du diamètre des veinules et des artères après initiation du traitement aux deux plus fortes irradiances [82]. L'intensité de la vasoconstriction et l'incapacité des vaisseaux à se dilater à nouveau étaient proportionnelles à l'irradiance appliquée. Une forte irradiance favoriserait donc l'effet antivasculaire, mais d'autres études montrent une corrélation inverse où une faible irradiance induit des dommages vasculaires plus importants [83].
- La conception de nouveaux photosensibilisateurs ou nano-objets fonctionnalisés vecteurs de molécules photo-activables ciblant les cellules endothéliales, permet aussi de potentialiser cet effet vasculaire.

Au sein de l'équipe, Bechet *et al.* ont d'ailleurs caractérisé cet effet lors d'une PDT médiée par une chlorine (chlorine 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl) conjuguée à un peptide d'adressage (ATWLPPR) spécifique du récepteur transmembranaire NRP-1 (Neuropiline-1) surexprimé au niveau des cellules endothéliales de phénotype angiogénique, dans le but de favoriser l'effet antivasculaire. Les résultats ont montré que, post-PDT, la présence du photosensibilisateur dans les cellules endothéliales entraînait des modifications fonctionnelles et non morphologiques. Un effet thrombogénique apparaissant dès deux heures post-PDT, a été caractérisé par l'apparition de stases vasculaires et de *thrombi* intraluminaux, ainsi qu'une diminution du flux sanguin de plus de 50% de sa valeur originale. L'initiation de la cascade de coagulation par les réactions photo-induites provenait de l'induction de l'expression du facteur tissulaire corrélée à une diminution de l'expression du fibrinogène consommé au cours de la coagulation. Deux jours post-PDT, une augmentation transitoire du diamètre tumoral accompagnée d'une augmentation de l'expression protéique du TNF α et de l'IL-6 (cytokines pro-inflammatoires) a permis de conclure que la thrombose induite par le traitement était liée à une diminution du flux sanguin et une réponse inflammatoire aiguë. Ces effets antivasculaires ont montré une efficacité thérapeutique statistiquement significative avec 30% de réponse tumorale complète, 45 jours post-traitement (non observé pour le photosensibilisateur seul) [77]. Cet aspect de la potentialisation de l'effet PDT est développé dans la section 2.3.2.

L'effet immunitaire et inflammatoire peut découler de l'altération de l'endothélium, ainsi que de la mort des cellules tumorales par apoptose et/ou nécrose. La perturbation du mur vasculaire engendre des zones nécrotiques dans le tissu avoisinant, entraînant une libération d'agrégateurs plaquettaires, de thromboxane et de cytokines pro-inflammatoires qui recrutent les neutrophiles au

niveau des tissus lésés [84].

L'inflammation souvent observée après PDT semble résulter de l'expression de deux facteurs de transcription, NF κ B et AP1 (*activator protein 1*), qui interviennent dans l'activation transcriptionnelle de gènes codant pour des cytokines, des chimiokines et/ou des molécules d'adhésion [85] [86] [87]. La PDT peut notamment induire une augmentation des taux circulants de IL-1 β , IL-6, IL-10, MIP (*Macrophage Inflammatory Protein*)-1 et 2 et de G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), responsables du recrutement et de l'activation des macrophages et des neutrophiles [88] [72] [89].

L'invasion par les neutrophiles est suivie de l'arrivée des monocytes et macrophages qui peuvent tenir le rôle de cellules présentatrices d'antigène. Les antigènes présentés par ces cellules sont reconnus par des lymphocytes T, ce qui mène à la destruction des cellules tumorales. Les réponses inflammatoire et immunitaire engendrées semblent jouer un rôle dans le contrôle à long terme de la zone traitée. En effet, Korbelik *et al.* ont montré sur un modèle murin porteur d'un sarcome que la déplétion ou l'inactivation de la population myéloïde (macrophages et neutrophiles) ainsi que lymphoïde (lymphocyte T4 et T8) résultait en une baisse marquée du nombre de guérison, bien que n'affectant pas la tumeur à court terme. C'est la déplétion en neutrophiles qui engendrait la réduction la plus importante de l'effet curatif (70%), démontrant l'importante contribution des neutrophiles à l'efficacité du traitement [56].

Li *et al.*, ont montré chez la souris immunocompétente porteuse de GBM, une augmentation du taux de TNF α et IFN γ (Interferon γ) post-PDT, suivie d'une infiltration des cellules immunitaires et d'une activation des lymphocytes T contrairement aux animaux immunodéficients. La survie des animaux immunocompétents était améliorée, démontrant l'importance de la réponse inflammatoire/immunitaire dans le contrôle à long terme de la croissance tumorale [90].

2.3 Paramètres clés impliqués dans la réaction photodynamique

Bien que la PDT soit une stratégie de traitement très attrayante, son développement à grande échelle rencontre des verrous technologiques à différents niveaux.

En effet, son efficacité dépend de plusieurs points : i) l'oxygénation des tissus, ii) la localisation du photosensibilisateur et sa concentration, iii) la fluence (quantité totale de photons apportés au cours du traitement) et iv) l'irradiance (le débit auquel cette lumière est appliquée).

Les principaux efforts sont ciblés sur l'amélioration des qualités du photosensibilisateur, afin de le rendre plus sélectif des cellules tumorales, et sur l'équipement pour améliorer la dosimétrie de la lumière afin de planifier une dose de lumière homogène et suffisante au niveau du tissu cible.

2.3.1 Le photosensibilisateur

Le photosensibilisateur pour être efficace en clinique doit présenter une sélectivité pour le tissu tumoral, peu de toxicité systémique et une bonne clairance tout en gardant évidemment ses capacités photodynamiques. Les principaux photosensibilisateurs utilisés en cliniques sont présentés dans le tableau 5.

TABLE 5 – Liste des principaux photosensibilisateurs avec une AMM. Tiré de [91].

	Classe	Molécule	Marque	Indication	Longueur d'onde d'activation (nm)
1^{ère} génération	Hématoporphyrine	HpD	Photofrin	Poumon,	630
		Porfimère sodique	Photogem	œsophage, vessie, utérus, estomac	
2^{ème} génération	Précurseur de la protoporphyrine	5-ALA	Levulan	K.A, carcinome basocellulaire, tête et cou, diagnostic de gliome	635
		5-ALA-hexylester	Hexvix Cysview	Diagnostic des tumeurs de la vessie	375-400
		5-ALA-methylester	Metvixia	K.A, maladie de Bowen, Carcinome basocellulaire	635
		5-ALA-benzylester	Benzvix	Gastrointestinal	635
	Chlorine	Taloporphine	Aptocine	Prostate, tête et cou, poumons,	664
		Chlorine-e6	Laserphyrine	tumeurs solides	
	Phtalocyanine	Phtalocyanine d'aluminium	Photosens	Dégénérescence maculaire lié à l'âge, cancers divers	675
Porphycène	9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β-methoxyethyl)-porphycène	ATMPn	Psoriasis, cancer de la peau	610-650	
3^{ème} génération	Benzoporphyrine/liposome	Verteoporfine	Visudyne	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	689-693
	Chlorine/liposome	mTHPC Témoporfine	Foscan	Prostate, tête et cou, pancréas, tumeurs solides	652

HpD: dérivés de l'hématoporphyrine; m-THPC : méso-tétra hydroxyphénylchlorine; BPD-MA : dérivé monoacide à chaîne A de la Benzoporphyrine; 5-ALA : acide 5-aminolévulinique ; K.A. : kératose actinique.

Les photosensibilisateurs de première génération sont des photosensibilisateurs à base de porphyrines développés dans les années 70. Le Photofrin® (porfimère sodique) est le premier photosensibilisateur utilisé en clinique. Il est toujours utilisé aujourd'hui mais présente tout de même un manque de sélectivité pour la tumeur, une mauvaise biodistribution qui se manifeste par une photosensibilisation de la peau excessive (Tableau 5).

Les photosensibilisateurs de seconde génération sont composés de molécules dérivées de la famille des porphyrines (chlorine, phtalocyanines...) modifiées ou non par des métaux (aluminium, zinc...) mais aussi de molécules non-porphyriniques telles que les xanthènes, les cyanines, les curcuminoïdes et d'autres. En Europe, c'est principalement une molécule de chlorine connue sous le nom de Foscan® qui est utilisée en clinique (Tableau 5).

Les photosensibilisateurs de seconde génération ont une plus grande pureté, un meilleur rendement

quantique en oxygène singulet et une élimination plus rapide que les photosensibilisateurs de première génération, cependant une accumulation résiduelle à la peau est toujours observée.

Les photosensibilisateurs de troisième génération visent à améliorer la sélectivité du photosensibilisateur pour la tumeur pour améliorer l'efficacité de traitement. Leur élaboration est réalisée à partir de photosensibilisateurs de seconde génération conjugués à une molécule d'adressage comme un anticorps, un peptide, un conjugué antisens, spécifique d'une cible tumorale ou en améliorant son système de transport *via* une encapsulation ou un greffage sur une nanoparticule, pour limiter la reconnaissance réticulo-histiocytaire de l'objet et sa rétention hépatosplénique [92].

Les photosensibilisateurs de quatrième génération sont en fait des nanoparticules multifonctionnelles qui permettent de coupler plusieurs fonctions : diagnostic, ciblage, traitement, dans un seul nano-objet dit theranostic. La recherche travaille sur l'élaboration de telles nanoplateformes qui sont généralement constituées d'une matrice portant un agent de contraste d'imagerie, une molécule de ciblage pour être sélectif de la tumeur, et un photosensibilisateur pour réaliser le traitement. Cette modalité permettrait de cibler, visualiser par IRM et traiter la tumeur en PDT.

2.3.2 Comment les nanoparticules peuvent résoudre les limitations et la résistance à la thérapie photodynamique. (Chapitre dans *Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer 2014*)

Le chapitre de livre suivant, décrit les différentes stratégies reposant sur l'utilisation de nanoparticules permettant de surmonter les limitations actuelles imposées par la nature des photosensibilisateurs. Les nanoparticules ont été développées en tant que vecteur de principes actifs pour améliorer leur biodistribution, leur ciblage et leur efficacité.

Les nanoparticules peuvent être de différents types, biodégradables (polymère) ou non (céramique, métallique). Le greffage du photosensibilisateur peut être covalent ou non, encapsulé ou en surface. La surface des édifices est personnalisable par l'ajout de fonctions de ciblage, ou de furtivité (capacité à ne pas être opsonisé puis capté par le système réticulo-histiocytaire). Le choix de conception du nano-objet dépend de l'objectif à atteindre [92].

Certaines nanoparticules permettent d'améliorer le manque de pénétration de la lumière visible, habituellement utilisée pour activer le photosensibilisateur, en jouant le rôle de système d'activation entre une source d'excitation ayant une meilleure pénétration dans les tissus biologiques, et le photosensibilisateur.

Elles peuvent également améliorer les propriétés de biodistribution et de sélectivité des photosensibilisateurs en présentant des propriétés physico-chimiques favorables à la distribution et rétention du principe actif dans la tumeur, notamment grâce à la possibilité de modifier leur surface par des ligands d'adressage spécifiques de l'environnement tumoral.

L'efficacité de la réaction photodynamique peut aussi être améliorée par la vectorisation du photosensibilisateur, dont l'encapsulation contrôlée permet d'optimiser les propriétés photophysiques du photosensibilisateur en milieu biologique et donc son rendement de production en oxygène singulet.

Chapter 9

How Nanoparticles Can Solve Resistance and Limitation in PDT Efficiency

Magali Toussaint, Muriel Barberi-Heyob, Sophie Pinel and Céline Frochot

Abstract PDT efficiency photosensitizers can be improved by different ways: development of targeted photosensitizers that also present rapid clearance from normal tissues, photosensitizers that own better photophysical properties (such as absorption in the red to use light that can better penetrate tissue, limited photobleaching), photosensitizers whose pharmacokinetics matched to the application, improve light equipments and the selective delivery of the activating light. In this chapter, our aim is to address how nanoparticles could be one of the solutions to improve PDT efficiency and to bypass the *phenomena* of resistance and limitations to PDT. We will describe how the use of nanoparticles can be positive for activation system, biodistribution properties, tumor selectivity by selecting judicious molecular and cellular targets.

Keywords Cellular targeting · Nanoparticle · Photodynamic therapy resistance · Photosensitizer delivery

M. Barberi-Heyob (✉) · M. Toussaint · S. Pinel
CRAN UMR 7039, CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, France
e-mail: muriel.barberi@univ-lorraine.fr

M. Toussaint · M. Barberi-Heyob · S. Pinel
CRAN UMR 7039, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

M. Barberi-Heyob · C. Frochot
GDR 3049 “Médicaments Photoactivables—Photochimiothérapie (PHOTOMED)”,
Nancy, France

C. Frochot
LRGP UMR 7274, CNRS, Nancy, France

C. Frochot
LRGP UMR 7274, Université de Lorraine, Nancy, France

© Springer International Publishing Switzerland 2015
V. Rapozzi, G. Jori (eds.), *Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer*,
Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics 5, DOI 10.1007/978-3-319-12730-9_9

197

Abbreviations

5-ALA	5-aminolevulinic acid
AIPc	Aluminium pthalocyanine
AuNP	Gold nanoparticle
BDSA	9,10-bis (4'-(4''-aminostyryl)styryl)anthracene
DOTA	1,4,7,10-tetraazacycloDOdecane-Tetraacetic Acid
DPBF	1,3-DiPhenilisoBenzoFuran
DTPA	Diethylene Triamine Pentaacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor
FDA	Food Drug Administration
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
HPPH	2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl PyroPheophorbide-a
Hy	Hypericin
ICG	IndoCyanine Green
LDL	Low Density Lipoprotein
MB	Methylene Blue
MRI	Magnetic Resonance Imaging
<i>m</i> THPC	<i>m</i> -TetraHydroxyPhenylChlorin
MTT	bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium
NRP-1	NeuRoPilin-1
PAA	PolyAcrylAmide
Pc4	Phtalocyanine
PDT	Photo Dynamic Therapy
PEBBLE	Photonic Explorer for Bianalysis with Biologically Localized Embedding
PEG	PolyEthylene Glycol
PEGDMA	Poly(Ethylene Glycol) Di MethAcrylate
PEG-PCL	Poly (Ethylene Glycol)-block-PyreoPheophorbide a
PUNPS	Photon Up-Converting Nanoparticles
RGD	ArginylGlycylAspartic acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SLN	Solid Lipid Nanoparticle
SLPDT	Self-Lighting PDT
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-Methyl 4-Pyridino)Porphyrin tetra(p-toluensulfonate)
TPA	Two Photon Absorption
UCNP	UpConversion NanoPlatform
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VTP	Vascular Targeted Photodynamic therapy

Introduction

Photodynamic Therapy (PDT) was the first drug-device combination approved by the US Food and Drug Administration (FDA) almost two decades ago, but even so remains underutilized clinically. In principle, PDT is a simple adaptation of chemotherapy that consists of three essential components: photosensitizer, light, and oxygen. Each of these parameters may cause problems of resistance to treatment. Researchers continue to study ways to improve the effectiveness of PDT in different fields. For example, clinical trials and research studies are under way to evaluate the use of PDT for cancers of the brain, skin, prostate, cervix, and peritoneal cavity (the space in the abdomen that contains the intestines, stomach, and liver). Other research is focused on the development of photosensitizers that are more powerful, especially more specifically targeted to cancer cells, and that can be activated by light that can better penetrate tissue and treat deep or large tumors. Researchers are also investigating ways to improve equipment and the selective delivery of the activating light.

The selectivity of PDT is indeed achieved by an increased photosensitizer accumulation within the tumor as compared to normal tissues and by the fact that illumination is limited to a specified location. Several possible mechanisms of selective photosensitizer retention within tumors include greater proliferative rates of neoplastic cells, a lack of or poor lymphatic drainage, high expression of LDL receptors on tumor cells (many photosensitizers bind to LDL), low pH (which facilitates cellular uptake), increased vascular permeability, and/or tumor infiltration by macrophages that are efficient traps for hydrophobic photosensitizers. Therefore, selectivity is derived from both the ability of a useful photosensitizer to localize in neoplastic lesions and the precise delivery of light to the treated sites. General guidelines were suggested for the properties desired for an ideal photosensitizer such as high absorption for maximum photons penetration in the tissue; stability against rapid photobleaching in order to retain efficacy during treatment or, alternatively, pharmacokinetics matched to the application (*e.g.* rapid clearance for vascular targeting); selective uptake in target tissues/tissue structures and relatively rapid clearance from normal tissues, minimizing phototoxic side effects (ideally, measured in hours and days, not weeks). The tissue or vascular half-life should be amenable to the clinical application.

Considering these guidelines, what are the main limitations of *in vivo* PDT? Resistant cell lines have been studied by several investigators. This has been achieved by looking at either the PDT susceptibility of cells resistant to various other treatment modalities or at the nature of PDT-induced *in vitro* resistance. The use of various cell lines, photosensitizers, irradiation protocols, and light/dark applications has made it difficult to reach general conclusions. Finally, the information and reflexion available regarding PDT-induced *in vivo* resistance is somewhat more limited.

In this chapter, our aim will be to address how nanoparticles could be one of the solutions to bypass the *phenomena* of resistance and limitations to PDT by improving the activation system, biodistribution properties, tumor selectivity and by selecting judicious molecular and cellular targets (Fig. 9.1).

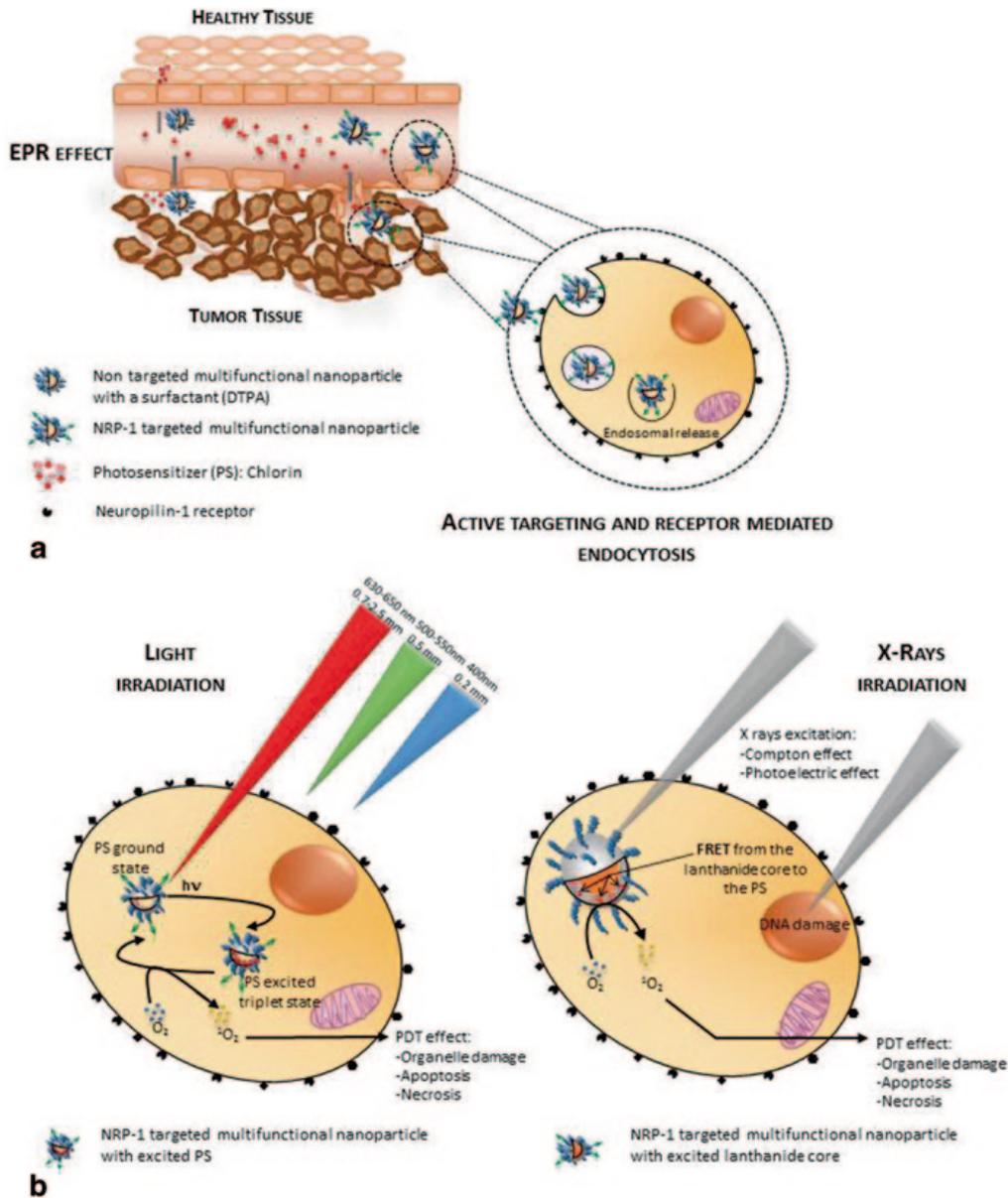


Fig. 9.1 *a Left.* EPR effect-mediated infiltration of PS alone and non targeted nanoparticle in the interstitial cell space of healthy and tumor cells. *Right.* Active targeting-mediated receptor endocytosis of NRP-1 targeted nanoparticle in tumor cells and neoangiogenic cells overexpressing NRP-1 receptor. *b Left.* Light irradiation activates the PS into nanoparticles, the PS changes from a ground state to an excited triplet state. An energy transfer to O_2 or an oxidoreduction reaction with cell substrate leads to the formation of ROS and PDT effects. *Right.* Thanks to X rays excitation of the lanthanide core and FRET to the PS, classical PDT effects are triggered

Improvement of Activation System by Using Nanoparticles with Specific Photophysical Properties

PDT is a non or minimally invasive treatment therapy relying on the ability of a photosensitizer to generate, upon activation with light, free radicals or singlet oxygen. Usually, laser light with an optical fiber with an adapted light diffuser are used to irradiate the tumor tissue. Compared to radiotherapy by ionizing radiation, the light irradiation used in PDT is less energetic, harmless and non-mutagenic. When activated by light irradiation, the photosensitizer interacts with molecular oxygen to produce a cytotoxic, short-lived species. PDT has already shown great promise to improve treatment options for cancer patients. Unfortunately, only near infrared light in the range of 700–1100 nm can penetrate deeper into the tissue because most tissue chromophores, absorb weakly in the near infrared window and most available photosensitizers have absorption bands at wavelengths shorter than 700 nm. Thus, one of the most relevant remaining limitations and resistance of PDT effect is the limited light penetration of tissues. Two-photon absorption (TPA)-induced excitation of the photosensitizer appears as a promising approach for increasing light penetration by using two photons of lesser energy (higher wavelength) to produce an excitation that would normally be produced by the absorption of a single photon of higher energy (lower wavelength). TPA-induced excitation of molecules is one of the promising approaches to increase light penetration as it avoids wasteful tissue absorption or scattering and allows a deeper penetration of light into the tissue. It is a nonlinear process involving the absorption of two photons whose combined energy is sufficient to induce a molecular transition to an excited electronic state. In this aim, various compounds and molecules with increased TPA cross-sections have been suggested. Various molecules with relatively large TPA cross-sections have been designed mainly in a nanopatform design; Gao et al. described the elaboration of 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl 4-pyridino)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate) (TMPyP), encapsulated in a polyacrylamide-based nanoparticles. Infrared two-photon nanopatform phototoxicity was demonstrated *in vitro* by modulating the time exposure to light [1]. Kim et al. also described the synthesis of organically modified silica nanoparticles co-encapsulating pyropheophorbide and an excess amount of 9,10-bis(4'-(4"-aminostyryl)styryl)anthracene (BDSA), a highly two-photon active molecule as a donor [2]. Pyropheophorbide absorption in nanoparticles had significant overlap with the fluorescence of BDSA aggregates which enabled an efficient energy transfer through FRET (Förster Resonance Energy Transfer) mechanisms. After indirect two-photon excitation (850 nm), the authors demonstrated that the energy of the near-infra red light was efficiently up-converted by BDSA aggregates to excite HPPH followed by $^1\text{O}_2$ formation, leading to drastic changes of the cell morphology [2]

Another approach has been published by Zhang et al. [3] describing a new concept based on photon up-converting nanoparticles (PUNPs). Up-conversion, in which excitation light at a longer wavelength produces emission at a shorter wavelength is very promising since with PUNPs, it becomes possible to excite the

photosensitizers in the near infra-red. The PUNPs used are the most efficient photon-up converting phosphors.

Once irradiated by X-rays, the scintillator core can emit a visible light and activates a photosensitizer that generates singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) for tumor destruction. Such nanoparticles combine both PDT (high and reactive oxygen species (ROS) generation) and enhanced radiation therapy (high-Z core). Some nanoparticles are based on quantum dots ($Z \approx 40$) and FRET energy transfer to the photosensitizer. In this context, the nanoparticles containing elements with high atomic number Z are capable to intensify the production of secondary electrons suitable for enhancing radiation therapy. Besides their high Z , gadolinium-based nanoparticles offer an innovative approach due to their capacity to act as powerful contrast agents in Magnetic Resonance Imaging (MRI). We should also mention the potential of using nanoparticles for self-lighting PDT (SLPDT) using X-rays as an activation system. The advantages of SLPDT compared to PDT alone are: (i) light delivery is not necessary; (ii) radiotherapy and PDT are combined and activated by a single source, leading to a simple and less expensive system than PDT alone or both therapies used simultaneously; and (iii) similar therapeutic results can be achieved using lower radiation doses. This will allow a reduction of radiation dose, since even when the X-ray source will be off, the PDT will still be active. This approach provides a simple, convenient and inexpensive *in vivo* light source for PDT. Chen and Zhang designed a new PDT agent system combining radiation and PDT, in which scintillation luminescent nanoparticles are attached to the photosensitizers [4]. Upon exposure to ionizing radiation such as X-rays (with no limit in tissue penetration), scintillation luminescence will emit from the nanoparticles and activate a photoactivatable agent. Very recently, we published our results concerning the X-ray excitation of a Tb_2O_3 nanoparticle coated with a polysiloxane layer in which it is covalently linked to a porphyrin [5]. We proved that it is possible to produce singlet oxygen so the PDT effect is achieved after X-ray excitation of the nanoparticles' core. The proposed nanohybrid system could be a good candidate for photodynamic effects in deep tissue. Cooper et al. [6] demonstrated an energy transfer between chlorin e6 and cerium fluoride and cerium doped lanthanum fluoride nanoparticles through steady-state and time-resolved photoluminescence spectroscopy. The authors claim that the next step will be the excitation of these nanoparticles by ionizing irradiation.

Improvement of Biodistribution Properties

Most photosensitizers used in clinic or in preclinical development are hydrophobic and tend to aggregate in an aqueous environment, while the monomer state is required to maintain their photophysical, chemical, and biological properties for efficient PDT [7]. This limits their delivery and photosensitizing efficiency. Additionally, an insufficient affinity of most photosensitizers to tumor sites also results in some damage to the normal tissue following PDT [8]. In order to circumvent these issues, drug delivery systems for photosensitizers are required to achieve selective

delivery to tumor sites. During the continuous search for improving the efficacy and safety of PDT, nanoparticles with high loading capacity and flexibility to accommodate photosensitizers with variable physicochemical properties came into focus. The design of an efficient photosensitizer delivery system requires the knowledge of the drug physicochemical properties, its specific intended therapeutic application and the characteristics of interaction of the delivery system with the biological structures. One of the most important drug properties to consider is the payload. The use of unreasonably high quantities of the carrier can lead to problems of carrier toxicity, metabolism, elimination, or/and biodegradability. Additional properties such as stability, solubility, size, molecular weight, and charge are also important, as they govern the means to entrap the photosensitizer into a delivery system.

There are several general advantages of using delivery systems for cancer therapy: they can carry a large payload of photosensitizer molecules and protect them from degradation and increase drug water solubility. For example, a 110 nm liposome can contain at about 10,000 *m*THPC molecules [9]. The improvement of pharmacokinetics and biodistribution parameters compared to a free drug is a particular strength using a drug delivery system such as liposomes [10]. Generally, the drug clearance decreases, the volume of distribution decreases, and the area under the time *versus* concentration curve increases. For large delivery systems (50–200 nm), the size of the carrier confines it mainly to the blood compartment. Surface modifications such as PEGylation, may dramatically change the circulation time. The main advantage of using nanoparticles is that they can be decorated with appropriate ligands that will modulate the circulation time. Different ligands can be used but the most commonly used is polyethylene glycol (PEG). Derivatization by PEG chains limits the uptake by phagocytes in the liver and in the spleen and limits opsonization. Nevertheless, the positive effect of PEG could be limited if the nanoparticle own charges by itself. Length and ending groups of the PEG polymers have an influence on the biodistribution. Indeed, Faure et al. studied four different PEG coupled to gadolinium oxide nanoparticles embedded in a fluorescence polysiloxane shell, PEG250-COOH, PEG2000-COOH, PEG2000-NH₂ and PEG2000-OCH₃. Biodistributions were totally different and even if PEG250-COOH is the shortest hydrophilic polymer of the series, it confers the ability to circulate freely in the blood pool. DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-tetraacetic acid) and DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) are also interesting ligands since they can (1) facilitate the dispersion of the nanoparticles into the biological media (2) provide chemical functions allowing further functionalization [11], and (3) also chelate gadolinium allowing the elaboration of nanoparticles for theranostic [12].

Changes in the biodistribution generally occur through a tumor-specific mechanism known as the enhanced permeability and retention (EPR) effect [13] of the tumor vasculature, also called passive targeting. Alternatively, active targeting may be applied with a particular using drug nanoparticles functionalization with molecular conjugates (*e.g.* conjugation of antibodies, aptamers, peptides, folic acid or transferrin to the nanoparticles surface [14] to focus drug delivery to specific sites of action. Either of the mechanisms is intended to increase the drug concentration at the desired site of action, reduce systemic drug levels and toxicity [15].

Alternatively, active targeting may be applied with particular delivery systems, using functionalization with molecular conjugates in order to restrict the photosensitizer delivery to specific sites of action. The selective targeted delivery of photosensitizers to diseased cells is one of the major limitations in PDT and is still a challenge to take up. Targeted therapy is a new promising therapeutic strategy, created to overcome growing problems of contemporary medicine, such as drug toxicity and resistance. An emerging modality of this approach is targeted PDT with the main aim of improving delivery of photosensitizer to cancer tissue and at the same time enhancing selectivity and efficiency [16]. A study by Hahn et al. in 2006 demonstrated that differences in selectivity of photofrin[®] for normal and tumor tissues are weak, leading to a narrow therapeutic window [17]. Moriwaki et al. reported that Photofrin[®] caused long skin photosensitivity after photofrin-PDT (*about 5 weeks*), underlining the importance of a discriminatory approach between healthy and tumor cells. In consequence, selectivity for malignant cells needs to be improved and a proposed solution is to address the photoactivatable agent by a specific ligand. Many ligands were suggested for targeting neoplastic cells. They can be coupled covalently to the photosensitizer by itself, or coupled to the nanoparticles. In this case, the advantage is that it is possible to play on the number of ligands to improve the selectivity, as well as having at the same time the EPR effect due to the nanoparticles by themselves [18]. Recently, [19] we showed that there is a relationship between the number of targeting units and the affinity. Comparing the affinity for neuropilin-1 of three kinds of nanohybrid nanoparticles with 4, 10 or 100 peptides, we proved that the best affinity was obtained for four peptides with a decrease of affinity with the increase of peptides. Moreover, the presence of four peptide moieties leads to a positive cooperatively in binding to the targeted receptor.

Master *et al.* worked on a PEG-PCL (Poly (Ethylene Glycol)-block-Poly (ϵ -CaproLactone) methyl ether, a biodegradable nanoparticle, which carries Phtalocyanine-4 (Pc4) for head and neck treatment. The nanoparticle is functionalized with a peptide GE11 specific from the epidermal growth factor (EGF) receptor. The authors related a significant uptake and selectivity from functionalized nanoparticles in an SCC-15 head and neck cell line, which overexpressed the EGF receptor [20]. Gary-Bobo et al. reported the improvement of galactose functionalized mesoporous silica nanoparticles carrying fluorescein uptake by colorectal cancer cells. Confocal microscopy shows an improvement of uptake and a new localization in the lysosome and the endosome. The internalization of mesoporous silica nanoparticles binding galactose is mediated by the receptor while endocytosis of mesoporous silica nanoparticles alone is passive. This endocytic mechanism can explain the new localization [21]. Gamal-Eldeen et al. present data on the *in vivo* efficacy of ICG-PEBBLE-anti EGFR (*Photonic Explorer for Bioanalysis with Biologically Localized Embedding*), which is a nanocarrier made with silica, entrapping Indocyanine Green, and links to the anti-EGFR antibody [22]. *In vivo*, a better inhibition of VEGF and activation of caspase-3 were found for ICG-PEBBLE-anti EGFR compared to ICG-PEBBLE, but no other differences were detected. The targeting of nanoplateform brings selectivity, but also it modified some other mechanisms like the internalization mechanism, the localization and has an incidence on the death

pathway. In 2005, our team demonstrated, for the first time, the interest of using folic acid as a targeting unit [23]. Since then, many studies revealed the real potential of folic acid coupled to nanoparticles. For example, Teng et al. used folic acid for targeting HeLa cells which are overexpressed by the folic acid receptor. With confocal microscopy, HeLa cells show high red fluorescence emitted by Protoporphyrin IX (PpIX), unlike A 549 cells (low folate receptor expression). Cellular uptake followed with a spectrophotometer has elaborated the result. It shows a greater uptake with silica nanocarrier bound to folic acid, than the PpIX free. All these few examples show different strategies that afford to target specifically malignant cells and, thus, limiting side effects. But studies such are made *in vitro* and these results remain to be confirmed *in vivo* [24].

The use of nanoparticles could also improve cell localization of either mechanisms that were intended to increase the drug concentration at the desired site of action, reducing systemic drug levels, potential resistance mechanisms and allowing for lower effective drug dose. Baek et al. present the improvement of sulfonated aluminium phthalocyanine (AlPcs) by a polyethylenimine (PEI) nanoparticle. Uptake in HeLa cells is 87 times higher for PEI-AlPcs than free AlPcs. This phenomenon can be explained by the difference in chemical properties of the nanoobject and the photosensitizer alone. AlPcs is hydrophilic because of the sulfonated group and negatively charged, that allows repulsion between it and the cell membrane surface. The following of intracellular localization shows that nanoparticles travel to the endosome [25]. According to the functionalization and chemical composition of the nanoobject, the mechanism of internalization is different. For example, Malatesta et al. [26] showed the intracellular fate of chitosan-FITC nanoparticle. Chitosan nanoparticles are inside invaginations in the plasma membrane, suggesting early endocytosis. This internalization mechanism with the plasma membrane is initiated by the interaction between polycation of chitosan nanoparticle and negative charge of the cell membrane.

The Chitosan nanoparticle undergoes passive endocytosis and goes in the perinuclear cytoplasmic region, while silica nanocarrier bearing folic acid is internalized by active endocytosis mediated by the receptor [24, 27]. Zhou et al. developed also a nanocarrier made in chitosan which carries a targeting peptide RGD. The use of a ligand/receptor system leads to endocytosis mediated by the receptor and a cytosolic localization. Unfortunately, no more information on the intracellular fate is available in these studies [27].

Improvement of Photodynamic Efficiency

Hydrophobicity of photosensitizers, which concerns most of them, causes their aggregation in aqueous media and reduces their photodynamic activity. Encapsulation in a nanocarrier can overcome this issue. Nevertheless, the number of photosensitizers encapsulated or grafted into nanoparticles should be controlled. Indeed, we showed in the case of a chlorin covalently linked to hybrid nanoparticles in different

amounts that the photophysical properties of the chlorin depend on the concentration of the photosensitizers. If the payload is too high, we can observe a decrease in the fluorescence and singlet oxygen quantum yields due to partial quenching linked to FRET and dimers formation [28]. Muehlmann et al. used a water dispersible nanoparticle (Poly methyl vinyl ether co maleic anhydride) to carry an hydrophobic aluminium chloride phthalocyanine (AlPc) [29]. One hour after incubation with the nanoparticles, MCF-7 cells internalize 73.9% more than the healthy cells MCF-10A. This phenomenon can be explained by the higher endocytic activity of cancerous cells. Generation of oxygen species was found to be better with the nanoparticles (60%) than with free AlPc (5%) in aqueous solution. This could be explained by the capacity of nanoparticles to disaggregate AlPc and render them soluble so they became more effective in aqueous media.

Lima et al. elaborated hypericin-loaded solid nanoparticles to tend to decrease aggregation of hypericin to obtain a better photodynamic efficiency. They authors proved that (i) encapsulation of Hypericin (Hy) increases solubility of Hy, certainly due to a decrease of dimer-monomer formation (ii) encapsulated Hy-SLN was less sensitive to photodegradation than free Hy, and (iii) photoactivity of hypericin evaluated by using two chemical probes DPBF (1, 3-Diphenylisobenzofuran) and uric acid is higher when it is encapsulated in the solid nanoparticles due, in all probability, to the decrease of aggregation [30]. Zhao et al. [31] studied the photostability of phthalocyanine (Pc4) encapsulated in a silica nanoparticle. Encapsulation of Pc4 reduced and delayed the photobleaching and, thus, protected its photodynamic effectiveness. As expected, these characteristics have a repercussion on ROS production, which is higher for Pc4 entrapped in silica nanoparticles than for free Pc4, concluding that the use of nanoobject is very promising to overcome limitation emanating from the photosensitizer.

ROS production results also from photophysical capacity of the photosensitizer. We have seen that nanocarrier can overcome aggregation of the photosensitizer and then improve its solubility and photostability. Yoon et al. presented a study on improving ROS production by utilization of nanoobjects. Methylene Blue (MB) is embedded in polyacrylamide (PAA) nanoparticle with a cross-linker in poly(ethylene glycol) dimethacrylate (PEGDMA). The structure of PAA nanoparticle presents a pore, small enough to prevent the embedded MB from reduction into the photoinactive form "leuko MB" due to an isomerization reaction catalyzed by bioenzymes, and large enough to allow $^1\text{O}_2$ circulation [32]. The PEGDMA-PAA structure protected MB from aggregation and dimerization thanks to PEGDMA linkers, which keep the same distance between the MB molecules [32]. Yoon et al. assumed that these improvements presumably originate from a reduced amount of a longer cross-linker, which increases the distances between MB, resulting in reduction of self-quenching while also providing a larger pore size, which allows a better oxygen permeation and lower collision probability between the produced ROS [32]. Benito et al. described a study on gold nanoparticles (AuNP) embedding 5-aminolevulinic acid (5-ALA) and their impact on endogenous ROS production, cell viability and death mechanisms involved [33]. Comparison of free 5-ALA and AuNP-5-ALA shows an increase of 21% of ROS fluorescence. This increase in ROS production is

correlated with a reduction of cell viability between free 5-ALA and 5-ALA-AuNP of around 62 and 37 % for MTT assay, and crystal violet assay respectively. Moreover, early and late apoptosis were studied. The presence of 5-ALA-AuNP on HeLa cells vs. free 5-ALA increases more than 6 fold the late apoptosis.

Select Vascular Effects

Destruction of the vasculature may indirectly bypass the phenomena of resistance by leading to tumor eradication, following deprivation of life-sustaining nutrients and oxygen. The vascular effect of PDT is thought to play a major role in the destruction of some tumors [34]. Hence, tumor vasculature is a potential target of PDT damage. Generally, anti neovascular strategies present many advantages as they do not target tumor cells themselves but endothelial cells forming tumor vessels; these latter are genetically more stable than tumor cells and less likely to develop resistance. Moreover, endothelial cells involved in tumor angiogenesis describe a different phenotype than endothelial cells from normal vessels that could be suggested in PDT targeting strategies to the tumor endothelium [35]. The first example of the use of a nanoparticle involved in vascular targeted PDT (VTP) strategies was reported by Harrell and Kopelman [36, 37] who synthesized a multifunctional platform capable of diagnosis with an MRI contrast enhancer and with a photosensitizer, as well as the integrin targeting RGD peptide for specific neovessels targeting [38, 39]. The authors synthesized polyacrylamide nanoparticles containing both the photosensitizer photofrin[®] and MRI contrast enhancing agents with a surface coating of both PEG and RGD peptide. This assembly enhances the controllable particle residence time owing to the presence of PEG and the recognition of the tumor neovasculature. *In vitro* experiments confirmed the production of ¹O₂ at levels believed to be sufficient to cause cell death. *In vivo*, the MRI contrast agent was useful to monitor changes in tumor diffusion, tumor growth and tumor load. Application of photofrin-containing nanoparticles followed by irradiation of the photosensitizer produced massive regional necrosis, whereas the tumor cells continued to grow in the control sample [38, 40]. Applying a similar principle, Reddy et al. developed another polyacrylamide nanoparticle encapsulating photofrin and imaging agents (fluorescent dye or iron oxide), with an F3 peptide targeting the surface located vasculature [41]. F3 is a 31-amino acid sequence that can accumulate on the cell surface and then translocate to the nucleus of cells of the human breast cancer line MDA-MB-435 both *in vitro* and in xenograft studies that the nanoparticles were internalized into the nucleus. *In vivo* studies demonstrated that the contrast enhancement was increased in both the magnitude and the duration when targeted nanoparticles were injected in comparison with that of controls that were non-specifically targeted. Sixty days after treatment, 40 % of animals treated with F3 targeted photofrin[®] nanoparticles were found to be tumor free. Diffusion MRI allowed to evaluate changes in tumor diffusion properties [38]. Several publications of the same team have demonstrated the interest of the use of this targeting peptide coupled to nanoparticles of iron oxide

[42–44]. The peptide F3 was also grafted to PAA nanoparticles conjugated with methylene blue [42–44].

Receptors specifically located on angiogenic endothelial cells, such as receptors to vascular endothelial growth factor (VEGF), can also be used as molecular targets. For 10 years, we developed photosensitizers and nanoparticles coupled with peptides that target vascular endothelial growth factor receptors or co-receptors. Non-biodegradable nanoparticles seemed to be very promising careers satisfying all the requirements for an ideal targeted PDT [45–46]. We described the design and photophysical characteristics of multifunctional nanoparticles consisting of a surface localized tumor vasculature targeting heptapeptide (ATWLPPR) specific for neuropilin-1 (NRP-1) [47–48], and encapsulated PDT (chlorin) and imaging agents (gadolinium oxide for RMI). As a proof of concept, nanoparticles functionalized with ~4.2 peptides were elaborated and proved to bind to recombinant NRP-1 protein and conferred photosensitivity to cells overexpressing this receptor [19]. Because no MRI signal could be detected, we elaborated new smaller nanoparticles and proved that by decreased the size of the silica shell, it was then possible to detect an MRI signal, as well as keeping the PDT effect and the selectivity of the nanoparticles [11, 49].

Zhou et al. worked on the RGD peptide which is a specific ligand for $\alpha_3\beta_3$ integrins. This integrin plays a role in the establishment of angiogenesis, and binds extracellular matrix proteins with the exposed RGD tripeptide sequence. The tripeptide is bound to an upconversion nanoplateform (UCNP) which is carried pyreopheophorbide a (Ppa), structure is called UCNP-Ppa-RGD. By fluorescence, they showed that a strong fluorescence is observed in U87 (overexpressing $\alpha_3\beta_3$) incubated with UCNP-Ppa-RGD, and a low fluorescence in U87 incubated with UCNP. In contrast, in MCF-7 (low $\alpha_3\beta_3$ expression) a low level of fluorescence is observed with both UCNP. This experiment showed that by addressing the nanoplateforms, one can improve their internalization in specific cells (which overexpress the target) [27].

No Conflict Statement “No potential conflicts of interest were disclosed.”

Acknowledgments This work was supported by the research fonds of the French Ligue Nationale contre le cancer.

References

1. Gao D, Agayan R, Xu H, Philibert M, Kopelman R. Nanoparticles for two-photon photodynamic therapy in living cells. *Nano Lett.* 2006;6:2383–6.
2. Kim S, Ohulchanskyy TH, Pudavar HE, Pandey RK, Prasad PN. Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy. *J Am Chem Soc.* 2007;129:2669–75.
3. Zhang P, Steelant W, Kumar M, Scholfield M. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J Am Chem Soc.* 2007;129:4526–7.

4. Chen W, Zhang J. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6:1159–66.
5. Bulin AL, Truillet C, Chouikrat R, Lux F, Frochot C, Amans D, Ledoux G, Tillement O, Perriat P, Barberi-Heyob M, Dujardin C. X-ray-induced singlet oxygen activation with nanoscintillator-coupled porphyrins. *J Phys Chem*. 2013;117:21583–9.
6. Cooper DR, Kadinov K, Tyagi P, Hill CK, Bradforth SE, Nadeau JL. Photoluminescence of cerium fluoride and cerium-doped lanthanum fluoride nanoparticles and investigation of energy transfer to photosensitizer molecules. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16:12441–53.
7. Konan YN, Gurny R, Allémann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2002;66:89–103.
8. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol*. 2004;5:497–508.
9. Kachatkou D, Sasnouski S, Zorin V, Zorina T, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Unusual photoinduced response of mTHPC liposomal formulation (Foslip). *Photochem Photobiol*. 2009;85:719–24.
10. Vasey PA, Kaye SB, Morrison R, Twelves C, Wilson P, Duncan R, Thomson AH, Murray LS, Hilditchand TE, Murray T, Burtles S, Fraier D, Frigerio E, Cassidy J. Phase I clinical and pharmacokinetic study of PK1 [N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide copolymer doxorubicin]: first member of a new class of chemotherapeutic agents—drug-polymer conjugates. *Clin Cancer Res*. 1999;5:83–94.
11. Benachour H, Sève A, Bastogne T, Frochot C, Vanderesse R, Jasniewski J, Miladi I, Billotey C, Tillement O, Lux F, Barberi-Heyob M. Multifunctional Peptide-conjugated hybrid silica nanoparticles for photodynamic therapy and MRI. *Theranostics*. 2012;2:889–904.
12. Faure AC, Dufort S, Jossierand V, Perriat P, Coll JL, Roux S, Tillement O. Control of the in vivo biodistribution of hybrid nanoparticles with different poly(ethylene glycol) coatings. *Small*. 2009;5:2565–75.
13. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*. 2000;65:271–84.
14. Torchilin VP. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAPS J*. 2007;9:128–47.
15. Wang J, Sui M, Fan W. Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*. 2010;11:129–41.
16. Pernot M, Frochot C, Vanderesse R, Barberi-Heyob M. Targeting strategies in photodynamic therapy for cancer treatment. In: Hamblin MR, Huang Y, editors. *Handbook of photomedicine*. CRC press, 2013.
17. Hahn S, Putt ME, Metz J, Shin DB, Rickter E, Menon C, Smith D, Glatstein E, Fraker DL, Busch TM. Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12:5464–70.
18. Moriwaki SI, Misawa J, Yoshinari Y, Yamada I, Takigawa M, Tokura Y. Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (PhotofrinTM). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2001;17:241–3.
19. Couleaud P, Bechet D, Vanderesse R, Barberi-Heyob M, Faure AC, Roux S, Tillement O, Porhel S, Guillemin F, Frochot C. Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine*. 2011;6:995–1009.
20. Master A, Malamas, Solanki R, Clausen DM, Eiseman JL, Gupta AS. A cell-targeted photodynamic nanomedicine strategy for head and neck cancers. *Mol Pharm*. 2013;10:1988–97.
21. Gary-Bobo M, Hocine O, Brevet D, Maynadier M, Raehm L, Richeter S, Charasson V, Looock B, Morère A, Maillard P, Garcia M, Durand JO. Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. *Int J Pharm*. 2012;423:509–15.
22. Gamal-Eldeen AM, El-Daly SM, Borai IH, Wafay HA, Abdel-Ghaffar AR. Photodynamic therapeutic effect of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles and their anti-EGFR-conjugate in skin cancer in CD1 mice. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013;10:446–59.

23. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemain F, Müller JF, Barberi-Heyob M. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem*. 2005;13:2799–808.
24. Teng IT, Chang YJ, Wang LS, Lu HY, Wu LC, Yang CM, Chiu CC, Yang CH, Hsu SL, Ho JA. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials*. 2013;34:7462–70.
25. Baek S, Na K. A nano complex of hydrophilic phthalocyanine and polyethylenimine for improved cellular internalization efficiency and phototoxicity. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2013;101:493–500.
26. Malatesta M, Pellicciari C, Cisterna B, Costanzo M, Galimberti V, Biggiogera M, Zancanaro C. Tracing nanoparticles and photosensitizing molecules at transmission electron microscopy by diaminobenzidine photo-oxidation. *Micron*. 2014;59:44–51.
27. Zhou A, Wei Y, Wu B, Chen Q, Xing D. Pyropheophorbide A and c(RGDyK) comodified chitosan-wrapped upconversion nanoparticle for targeted near-infrared photodynamic therapy. *Mol Pharma*. 2012;9:1580–9.
28. Sève A, Couleaud P, Lux F, Tillement O, Arnoux P, André JC, Frochot C. Long-distance energy transfer photosensitizers arising in hybrid nanoparticles leading to fluorescence emission and singlet oxygen luminescence quenching. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11:803–11.
29. Muehlmann LA, Ma BC, Longo JPF, de Fátima Menezes M, Santos A, Azevedo RB. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1199–213.
30. Lima AM, Pizzol CD, Monteiro FB, Creczynski-Pasa TB, Andrade GP, Ribeiro AO, Perussi JR. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: phototoxicity and photodynamic efficiency. *J Photochem Photobiol B*. 2013;125:146–54.
31. Zhao B, Yin JJ, Bilski PJ, Chignell CF, Roberts JE, He YY. Enhanced photodynamic efficacy towards melanoma cells by encapsulation of Pc4 in silica nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;241:163–72.
32. Yoon HK, Lou X, Chen YC, Lee KYE, Yoon E, Kopelman R. Nanophotosensitizers engineered to generate a tunable mix of reactive oxygen species, for optimizing photodynamic therapy, using a microfluidic device. *Chem Mater*. 2014;26:1592–600.
33. Benito M, Martin V, Blanco MD, Teijon JM, Gomez C. Cooperative effect of 5-aminolevulinic acid and gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. *J Pharm Sci*. 2013;102:2760–9.
34. Madar-Balakirski N, Tempel-Brami C, Kalchenko V, Brenner O, Varon D, Scherz A, Salomon Y. Permanent occlusion of feeding arteries and draining veins in solid mouse tumors by vascular targeted photodynamic therapy (vtp) with Tookad. *Plos One*. 2010;5:e10282.
35. Ran S, Thorpe PE. Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002;54:1479–84.
36. Harrell J, Kopelman R. Biocompatible probes measure intracellular activity. *Biophotonics Int*. 2001;7:22–4.
37. Kopelman R, Koo YEL, Philbert M, Moffat BA, Reddy GR, McConville P, Hall DE, Chenevert TL, Bhojani MS, Buck SM, Rehemtulla A, Ross BD. Multifunctional nanoparticle platforms for in vivo MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *J Magn Magn Mat*. 2005;293:404–10.
38. Koo YEL, Fan W, Hah H, Xu H, Orringer D, Ross B, Rehemtulla A, Philbert MA, Kopelman R. Photonic explorers based on multifunctional nanoplatforms for biosensing and photodynamic therapy. *Appl Opt*. 2007;46:1924–30.
39. Ross B, Rehemtulla A, Koo YEL, Reddy R, Kim G, Behrend C, Buck S, Schneider RJ, Philbert MA, Weissleder R, Kopelman R. Nanobiophotonics and biomedical applications (photonic and magnetic nanopexplorers for Biomedical use: from subcellular imaging to cancer diagnostics and Therapy, vol. 5331, Cartwright AN, Éd., Proceedings of SPIE, 2004.

40. Xu H, Aylott J, Kopelman R, Miller T, Philbert M. A real-time ratiometric method for the determination of molecular oxygen inside living cells using sol-gel-based spherical optical nanosensors with applications to rat C6 glioma. *Anal Chem.* 2001;73:4124–33.
41. Reddy GR, Bhojani MS, McConville P, Moody J, Moffat BA, Hall DE, Kim G, Koo YEL, Croft MJ, Sugai JV, Johnson TD, Philbert MA, Kopelman R, Rehemtulla A, Ross BD. Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin Cancer Res.* 2006;12:6677–86.
42. Moffat BA, Chenevert TL, Meyer CR, Mckeever PE, Hall DE, Hoff BA, Johnson TD, Rehemtulla A, Ross BD. The functional diffusion map: an imaging biomarker for the early prediction of cancer treatment outcome. *Neoplasia.* 2006;8:259–67.
43. Qin M, Hah HJ, Kim G, Nie G, Lee YEK, Kopelman R. Methylene blue covalently loaded polyacrylamide nanoparticles for enhanced tumor-targeted photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 2011;10:832–41.
44. Hah HJ, Kim G, Lee YEK, Orringer DA, Sagher O, Philbert MA, Kopelman R. Methylene blue-conjugated hydrogel nanoparticles and tumor-cell targeted photodynamic therapy. *Macromol Biosci.* 2011;10:90–9.
45. Bechet D, Couleaud P, Frochet C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.* 2008;26:612–21.
46. Bechet D, Tirand L, Faivre B, Plénat F, Bonnet C, Bastogne T, Frochet C, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release. *Pharm Res.* 2010;27:468–79.
47. Thomas N, Bechet D, Becuwe P, Tirand L, Vanderesse R, Frochet C, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo. *J Photochem Photobiol B.* 2009;96:101–8.
48. Tirand L, Frochet C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release.* 2006;111:153–64.
49. Benachour H, Bastogne T, Toussaint M, Chemli Y, Sève A, Frochet C, Lux F, Tillement O, Vanderesse R, Barberi-Heyob M. Real-time monitoring of photocytotoxicity in nanoparticles-based photodynamic therapy: a model-based approach. *Plos One.* 2012;7: e48617.

2.3.3 Dosimétrie de la lumière

Toutes les thérapies nécessitent une estimation, même approximative, de la dose de lumière délivrée, de façon à maximiser le rapport bénéfice/risque pour le patient. Dans le cas de la PDT, il existe une complexité accrue, du fait de la génération *in situ* des ERO. Par ailleurs, lors de l'initiation du traitement, il existe une hétérogénéité spatiale dans la tumeur du photosensibilisateur et de l'oxygène (différents degrés de vascularisation), ainsi que de la lumière (hétérogénéité des propriétés optiques des tissus). Outre ces variations spatiales, il existe également des variations temporelles des différents facteurs durant le traitement. Les ERO générées peuvent détruire le photosensibilisateur (photoblanchiment), induire des variations des propriétés optiques du tissu, la concentration en oxygène peut varier au cours de la PDT. L'absence de dosimétrie précise en PDT représente actuellement le principal frein à son essor, et la détermination d'une méthode fiable de dosimétrie constitue une voie de recherche primordiale. La formule suivante fournit une expression simplifiée de la dose photodynamique, en se basant sur la dose d'oxygène singulet générée :

$$D_{PDT} \approx [PS] \times \varphi \times t \times \varepsilon \times [{}^3O_2] \times \Phi_{\Delta}$$

Où :

D_{PDT} : la dose photodynamique,

$[PS]$: la concentration de photosensibilisateur présente dans les tissus (mol/l),

φ : l'irradiance lumineuse (W/cm^2),

t : le temps d'irradiation (s),

ε : le coefficient d'extinction molaire du photosensibilisateur à la longueur d'onde d'irradiation (mol/l/cm),

$[{}^3O_2]$: la concentration d' O_2 présente dans les tissus (mol/l),

Φ_{Δ} : le rendement quantique en oxygène singulet du photosensibilisateur.

Cependant, seule une fraction de cette dose sert effectivement à oxyder des sites intracellulaires critiques et la dose photodynamique nécessaire pour aboutir à l'effet thérapeutique recherché peut varier selon le type tumoral. Par ailleurs, cette formule ne tient pas compte des variations des différents facteurs induites par le traitement. L'expérimentateur ne peut, quant à lui, agir directement que sur quelques paramètres, tels que :

- la dose de photosensibilisateur administrée, dont dépendra la dose effective de molécules photo-activables dans le tissu tumoral,
- l'IDL, qui selon sa durée agit sur la localisation préférentielle du photosensibilisateur,
- la fluence lumineuse, en J/cm^2 , liée à la quantité totale de lumière apportée au cours du traitement
- et l'irradiance lumineuse, en W/cm^2 , qui correspond au débit de lumière appliquée.

2.3.4 Consommation de l'oxygène

L'efficacité du traitement dépend de l'approvisionnement en oxygène durant toute la durée de l'irradiation. La consommation de l'oxygène durant le traitement est fortement dépendante des doses de lumière utilisées. Une irradiance trop élevée pourrait entraîner des réactions photodynamiques trop rapides, et un épuisement prématuré des réserves d'oxygène. De plus, comme nous l'avons vu dans la section 2.2.2, l'irradiance et la fluence ont un effet sur la réponse vasculaire, et l'induction d'un collapsus trop précoce des vaisseaux risquerait de limiter la réaction photodynamique. Une des

solutions envisagées pour limiter la consommation trop rapide d'oxygène, et le risque de collapsus avant la fin de l'irradiation est le fractionnement de la dose de lumière.

Théoriquement le fractionnement de la dose de lumière améliore l'efficacité du traitement en assurant une oxygénation continue du tissu durant toute l'illumination par l'utilisation d'intervalles *On/Off* laissant le temps au tissu de se réoxygéner entre chaque période d'illumination [93]. Il est difficile de définir l'apport du fractionnement de la dose dans l'efficacité de la PDT car les résultats des études sont assez disparates. La raison en est que les schémas de fractionnement ne sont pas standardisés et souvent peu rationnels. De plus, ils sont testés pour des photosensibilisateurs, des tumeurs et des irradiances différentes [94] [95] [96] [97].

Mathews *et al.* ont mis en exergue sur un modèle de sphéroïdes de gliomes qu'un schéma d'irradiation unique était moins efficace sur l'inhibition de croissance qu'un schéma réitéré quatre fois. Cependant, ces schémas de réitérations comprenaient également la réitération de la dose de photosensibilisateur, paramètre limitant en clinique en raison des risques de toxicité hépatique [98].

Dans le cadre des tumeurs cérébrales, seul le groupe de Sam Eljamel a présenté des résultats en clinique comparant un traitement standard (chirurgie, radiothérapie) au standard additionné d'une FGR et d'une PDT réitérée post-chirurgie [99] [100]. L'étude portait sur 27 patients recevant, 48 heures avant la chirurgie, une dose unique de Photofrin®, puis 3 heures avant la chirurgie une dose de 5-ALA pour la FGR. La cavité de résection était ensuite remplie avec un ballon diffusant positionné à demeure. La PDT était ensuite réalisée au lit du patient 5 jours de suite. Ce schéma d'irradiation a permis d'améliorer la survie moyenne de 6,15 mois à 13,2 mois.

Toutes ces études permettent tout de même d'établir trois paramètres essentiels pour choisir un schéma d'irradiation optimal :

- La première dose de lumière doit être suffisamment faible pour ne pas endommager de manière irréversible les vaisseaux.
- La distribution du photosensibilisateur doit être adaptée à l'effet escompté.
- Dans le cas d'un fractionnement à visée antivasculaire, l'IDL et la physico-chimie du photosensibilisateur doivent être réfléchies en conséquence.

2.3.5 Propagation de la lumière en milieu biologique

La PDT fait appel à un rayonnement non-ionisant dans les longueurs d'onde du visible. Ce type de rayonnement est très vite atténué par la matière qu'il rencontre. De plus, l'énergie du faisceau est d'autant plus diminuée que l'on s'éloigne de la source lumineuse. Il est donc difficile de traiter des lésions profondes et volumineuses. C'est pourquoi, il est important de comprendre et définir la propagation de la lumière dans le milieu à traiter afin d'optimiser le placement des fibres de traitement pour couvrir de manière homogène toute la zone à irradier.

La propagation de la lumière dépend des propriétés optiques des tissus. Lorsqu'une source lumineuse interagit avec un tissu biologique, deux phénomènes apparaissent : l'absorption et la diffusion. Cette interaction est fortement dépendante de la longueur d'onde et, suivant sa valeur, l'onde lumineuse se propagera plus ou moins profondément à l'intérieur des tissus (Figure 14).

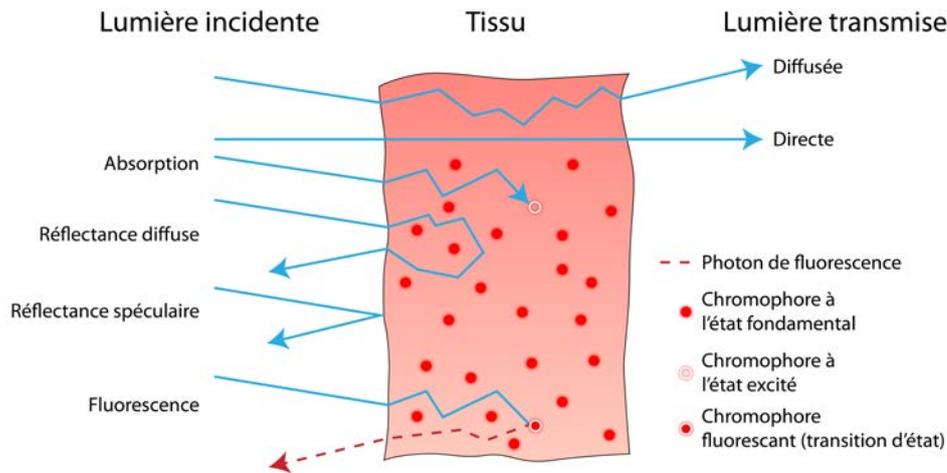


FIGURE 14 – Un rayonnement incident interagit de plusieurs manières avec les organites et chromophores des tissus ; si il ne subit qu'un changement de direction on parle de diffusion simple, si les changements sont nombreux on parle de diffusion multiple. Le rayon incident peut aussi être réfléchi par le tissu (réflectance spéculaire qui dépend de l'angle incident, ou diffuse qui n'en dépend pas). Le photon incident peut aussi exciter un chromophore qui transforme l'énergie incidente par absorption.

Les propriétés optiques d'un tissu sont caractérisées par le coefficient de diffusion μ_s , le facteur d'anisotropie g et le coefficient d'absorption μ_a . Dans un tissu, l'absorption est due à la présence de chromophores endogènes (ou exogènes). Ils atténuent l'onde électromagnétique qui se propage dans le milieu, en absorbant une partie de son énergie et la transforment principalement en chaleur.

L'absorption de la lumière par les tissus biologiques est due à trois molécules principales : l'eau, l'hémoglobine et la mélanine qui absorbent énormément les longueurs d'onde du visible entre 300 et 600 nm. Elles absorbent cependant un peu moins la lumière entre 600 et 1200 nm, *i.e.* dans le rouge et le proche infrarouge. Cette gamme est appelée fenêtre thérapeutique, car à ces longueurs d'onde, la lumière pénètre le tissu plus profondément (sur quelques millimètres) (Figure 15).

La pénétration de la lumière est cependant limitée par le processus de diffusion qui est le mécanisme optique dominant. La diffusion de la lumière se produit lorsqu'une onde électromagnétique rencontre une particule d'indice de réfraction différent de celui du milieu environnant. Ainsi, la diffusion et l'absorption dans un tissu contribuent au processus d'atténuation de l'onde électromagnétique. Le facteur d'anisotropie, g , est le dernier paramètre caractérisant un milieu. Il définit l'anisotropie de la diffusion. Pour une diffusion parfaitement isotrope (donc un milieu totalement homogène) $g = 0$. Si g est positif alors le système diffusera principalement vers l'avant et s'il est négatif vers l'arrière. Dans les tissus biologiques ce facteur varie entre 0,30 et 0,99 donc traduit une diffusion vers l'avant. Les tissus biologiques sont des milieux complexes, très hétérogènes et fortement diffusants. C'est pourquoi leur régime de diffusion est dit multiple ; la lumière diffusée par une particule est diffusée au moins une fois par une autre particule ce qui complique la modélisation de la diffusion. A ces observations s'ajoute dans notre cas, la présence de chromophores exogènes : les nanoparticules (contenant du gadolinium et de la porphyrine) dont l'influence sur la propagation de la lumière n'est pas connue et doit être déterminée empiriquement.

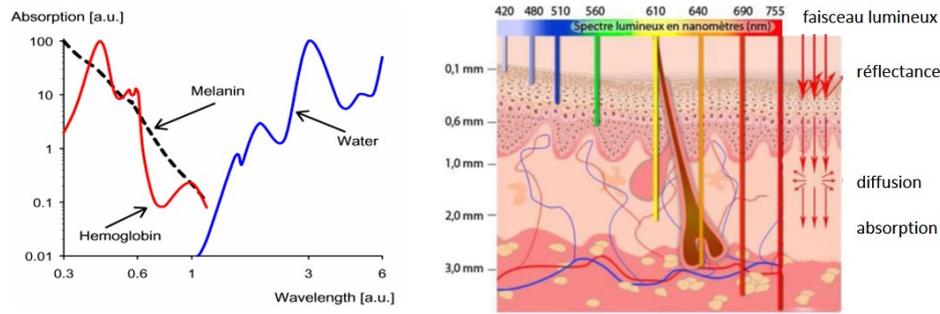


FIGURE 15 – Pénétration de la lumière dans les tissus. **A gauche** : Spectres d’absorption des principales molécules biologiques (eau, mélanine, oxyhémoglobine). La seule fenêtre de relative transparence dans les milieux biologiques se situe entre 0,7 et 1,1 μm). **A droite** : Profondeur de pénétration de la lumière dans un tissu en fonction de sa longueur d’onde (en nm). La lumière visible ne pénètre pas à plus de 3-5 mm de profondeur dans les tissus à cause des phénomènes optiques de réflectance, diffusion, absorption. Par ailleurs, son énergie diminue avec la distance. Tiré de [101].

2.4 Applications de la thérapie photodynamique en neuro-oncologie

La neuro-oncologie pose des problématiques et des défis très spécifiques inhérents à la localisation intracérébrale des tumeurs. En particulier, il s’agit de rechercher l’équilibre optimal de la balance onco-fonctionnelle pour chaque patient, c’est-à-dire trouver le meilleur compromis entre destruction des cellules tumorales et préservation des zones cérébrales fonctionnelles (vision, langage, motricité, etc. . .). Pour améliorer le pronostic des tumeurs cérébrales primitives ou secondaires, la priorité est d’atteindre un meilleur contrôle locorégional. Par exemple, dans les gliomes, malgré un traitement bien conduit, plus de 80% des patients développent une récurrence tumorale à proximité immédiate de la cavité de résection, au niveau du volume cible de la radiothérapie post-opératoire. Ce constat met ainsi en exergue la nécessité d’augmenter l’efficacité locorégionale des stratégies thérapeutiques.

2.4.1 Généralités techniques

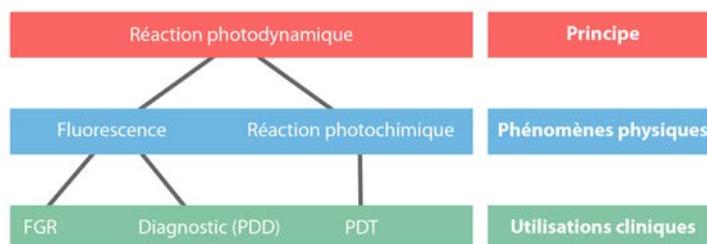


FIGURE 16 – Différentes applications du principe de réaction photodynamique en clinique.

La PDT est un stratégie thérapeutique qui s’appuie sur les propriétés photophysiques des photosensibilisateurs. Or, celles-ci sont assez larges et permettent de décliner le principe de la PDT pour différentes applications (Figure 16).

Évidemment, la PDT est utilisée pour ses capacités à générer des ERO dans le but de détruire sélectivement les cellules ayant incorporé le photosensibilisateur. Ses modalités d'utilisation sont déclinées en fonction de la localisation de la cible du traitement.

Le dispositif lumineux utilisé dépendra alors du photosensibilisateur choisi mais aussi de la localisation de la tumeur. Entre 400 et 900 nm, la pénétration de la lumière dans le tissu varie en fonction de la longueur d'onde, et augmente avec elle. Pour des tumeurs profondes, il est donc préférable d'utiliser des longueurs d'onde dans le rouge voire le proche infrarouge (700-1100 nm). Le dispositif d'irradiation doit également permettre de déposer une dose de lumière thérapeutique en tout point de la zone à traiter. Or, celle-ci est différente d'un cas à l'autre. Pour atteindre une distribution homogène optimale dans la zone de traitement, il est possible d'adapter la géométrie du diffuseur et éviter de créer des zones de sous- et surexpositions. Par exemple, lorsque la PDT est réalisée en peropératoire sur la cavité de résection, un diffuseur cylindrique constitué d'un ballon gonflable, rempli d'intralipides pour assurer une diffusion homogène de la lumière, est utilisé pour s'adapter au mieux aux parois et irradier les berges (Figure 17) [102].

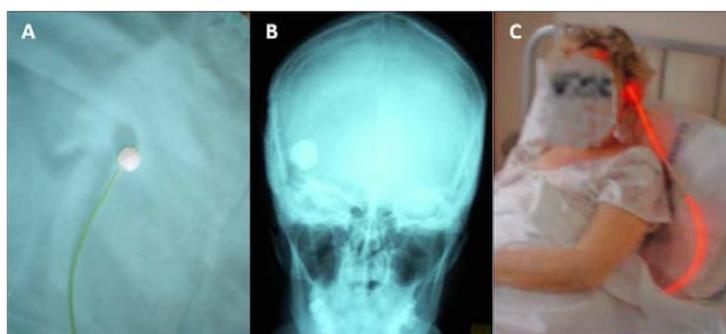


FIGURE 17 – Illustration de la PDT intracavitaire. A. Diffuseur équipé d'un ballon gonflable rempli de liquide intralipidique. B. Radiographie du ballon *in situ*. C. Réalisation du traitement de PDT réitérée au lit du patient. Tiré de [103].

L'apport de la lumière peut également être réalisé de manière interstitielle, *i.e.* en insérant la fibre optique de traitement directement dans le tissu, afin de limiter les pertes d'énergie causées par le trajet des photons de la fibre jusqu'à la destination cible, optimisant ainsi la dose photodynamique pour générer un effet photodynamique dans la lésion. Cette modalité d'irradiation particulière, appelée iPDT, nécessite une assistance par un logiciel de planification de traitement basé sur l'imagerie. Celui-ci permet de définir la localisation, la forme et le volume tumoral à irradier pour déterminer le nombre et le placement stéréotaxique des fibres de traitement afin de délivrer une dose de lumière homogène et suffisante dans tout le volume cible [104].

Le principe de la PDT peut être détourné afin d'être utilisé en diagnostic ou *PhotoDynamic Diagnosis*. Cette modalité tire partie de la capacité du photosensibilisateur à émettre de la fluorescence lors de son excitation par une longueur d'onde adaptée à son spectre d'absorption et sa rétention préférentielle dans les cellules tumorales pour une meilleure détection du tissu tumoral vs le tissu sain (cf. Figure 11). Une technologie de PDD (*PhotoDynamic Diagnosis*) a été développée pour permettre son utilisation sur la plupart des microscopes neurochirurgicaux [105]. Le dispositif consiste en l'application de deux filtres : un filtre permettant d'envoyer de la lumière bleue à 375-440 nm (capable d'exciter la plupart des photosensibilisateurs) lors de l'illumination du champ chirurgical et un second filtre permettant la visualisation de la fluorescence émise dans le rouge ≈ 635 nm faisant

apparaître le tissu sain en bleu et le tissu tumoral en rouge. Grâce à cette technologie aidant le chirurgien à mieux discriminer le tissu tumoral du tissu sain, la PDD est ensuite suivie d'une résection guidée par fluorescence (FGR) dont les apports en clinique sont détaillés dans la section suivante.

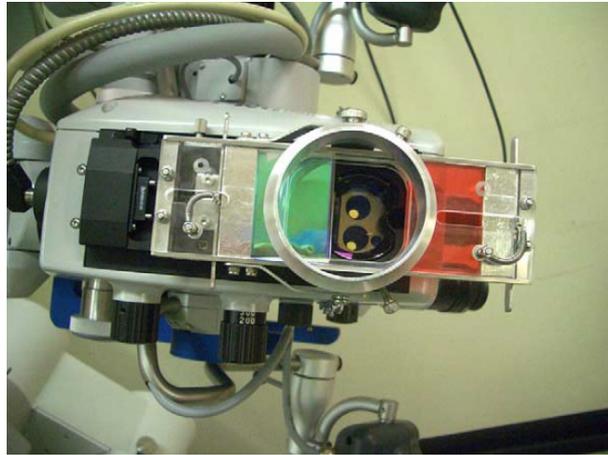


FIGURE 18 – Dispositif de PDD fixé au microscope chirurgical. Le système est composé d'un filtre d'excitation éclairant le champ opératoire d'une lumière bleue, et d'un second filtre permettant la visualisation de la fluorescence à 635 nm. Tiré de [106].

2.4.2 La résection guidée par fluorescence

Mc Girt *et al.* ont montré que l'extension de la zone de résection avait un impact bénéfique sur la survie des patients indépendamment du grade, de l'âge, du degré d'invalidité [33]. Cependant, le caractère invasif des GBM rend difficile la visualisation de ses marges, et complique la distinction entre tissu sain et tissu tumoral. C'est pourquoi, l'utilisation de la FGR pour améliorer la visualisation de l'étendue de la zone tumorale en temps réel est aujourd'hui utilisée en clinique et fait toujours l'objet d'un développement.

Actuellement, l'agent le plus utilisé pour réaliser la FGR est un précurseur de la protoporphyrine IX (qui est un agent photosensibilisant), le 5-ALA qui ne fluoresce pas par lui-même. Son incorporation dans les cellules saines n'engendre pas d'accumulation de protoporphyrine IX car celle-ci n'est qu'un intermédiaire dans la voie de synthèse de l'hème qui en est le produit final. En revanche, son incorporation dans les cellules tumorales dont la voie de synthèse de l'hème est modifiée, et mène à la synthèse puis à l'accumulation de protoporphyrine IX fluorescente.

En 2006, un essai clinique de phase III multicentrique randomisé et contrôlé sur 270 patients atteints de gliomes malins a montré que le groupe recevant en plus du traitement standard, une FGR après injection de 5-ALA présentait un meilleur taux de résection complète, *i.e.* de tumeurs ne prenant plus le contraste sur l'IRM post-opératoire, comparé au groupe contrôle (65% vs 36%). La médiane de survie sans progression était également améliorée comparée au groupe contrôle (5,1 mois vs 3,6 mois) bien que cela ne se répercute pas sur la survie globale, les courbes de survie se rejoignant à 15 mois [38]. L'étude n'a mis en évidence aucun problème de toxicité. Les enzymes hépatiques présentaient une légère augmentation de leur niveau 24 heures après administration du 5-ALA, les fonctions neurologiques étant modifiées dans les premières 48 heures puis similaires au

fonctionnement basal 7 jours et 6 mois post-traitement.

Le rapport de la HAS (Haute Autorité de Santé) sur l'utilisation du Gliolan® (5-ALA) a mis en évidence que la valeur prédictive positive de la fluorescence tissulaire était de 84,8%, mais qu'en revanche 2/3 des biopsies non fluorescentes contenaient des cellules tumorales, signant là, la limitation de détection de la technique. L'étude randomisée et ouverte de phase III indique que le bénéfice de la FGR réside dans l'amélioration de la visualisation des tumeurs, qui se traduit par un nombre plus élevé de patient sans tumeur résiduelle post-chirurgie et une survie sans progression à 6 mois améliorée, mais qui ne se répercute pas sur la survie globale. La HAS conclut que dans le cadre des gliomes malins, où la qualité de l'exérèse est cruciale car permet d'améliorer le temps de survie de 2 à 3,5 mois, "le gliolan a sa place en tant qu'aide technique à la visualisation de la tumeur en cours d'intervention" [107].

En pratiquant une exérèse la plus complète possible par FGR, les thérapies complémentaires suivant la chirurgie ont plus de chance de toucher et détruire les cellules tumorales restantes en limitant les effets indésirables dus à une réponse cytotoxique de masse (qui engendrerait une inflammation délétère pour le tissu sain). La FGR peut ensuite être suivie d'une PDT intracavitaire qui consiste en l'administration de Photofrin® et en l'insertion d'un ballon diffusant de la lumière rouge dans la cavité de résection afin de stériliser les berges tumorales [103] [108]. Ces études n'ont pas dépassé la phase II, mais montrent des résultats intéressants, notamment lorsque les patients reçoivent une FGR, une PDT intracavitaire suivie d'une IORT (*IntraOperative Radiation Therapy*) qui améliorent la médiane de survie de 11,2 mois à 18,2 mois [108].

2.4.3 La thérapie photodynamique interstitielle

La question de la place de la iPDT dans le traitement des GBM se pose depuis 1990 [109]. La iPDT était d'abord destinée aux tumeurs récurrentes non résécables. Elle n'a fait l'objet jusqu'à aujourd'hui que de petites études cliniques de cas ou de petites cohortes de patients (une dizaine) afin d'en vérifier d'abord la faisabilité et la sécurité [110] [111] [112].

Une des premières études réalisée sur une petite cohorte de 7 patients atteints de gliomes malins récurrents ou de métastases de mélanome, montrait qu'après une iPDT médiée par Photofrin®, seuls deux patients sur 7 présentaient un délai "élevé" avant récurrence *i.e.* 15 mois. Les récurrences apparaissaient en bordure de la zone de nécrose induite par la iPDT, bien que d'après les prélèvements de tissus, la tumeur et la zone adjacente à la tumeur présentaient une concentration suffisante de photosensibilisateur. L'hypothèse avancée était que la dose de lumière apportée à la zone cérébrale adjacente à la tumeur était insuffisante pour générer une photosensibilisation et une destruction des cellules tumorales y résidant [113]. Cette étude a donc fait apparaître le besoin évident de mieux contrôler la distribution du photosensibilisateur dans le tissu, et la capacité à fournir une dose de lumière suffisante dans toute la zone à traiter pour atteindre une efficacité de traitement optimale. L'optimisation de la iPDT passe donc par la capacité à adapter la dose de lumière à chaque cas de figure *i.e.* localisation, volume, forme de la lésion en s'aidant de l'imagerie multimodale (anatomique et fonctionnelle) pour localiser les foyers tumoraux à traiter. Origiano *et al.* ont étudié l'impact de la distribution de la dose de lumière sur l'efficacité de la iPDT en mettant au point un protocole de planification de traitement assisté par ordinateur basé sur des images en 3D reconstruites, fournissant des données de volumes tumoraux reproductibles et une précision stéréotaxique pour le placement des fibres de traitement [104]. Les variables de traitement étaient l'étendue de la zone de traitement (seulement intracavitaire, intracavitaire et interstitielle, intracavitaire et interstitielle avec plusieurs fibres de traitement) et le nombre de fibres de traitement placées en interstitiel. Les résultats ont

montré que : les échecs de traitement survenaient en dehors de la zone d'irradiation, l'augmentation du volume d'irradiation par l'implantation de plusieurs fibres était sans danger, et pour atteindre une efficacité de traitement optimale, la personnalisation de la géométrie et du volume de la dose de lumière était essentielle.

De nouvelles considérations sont à prendre en compte lorsque plusieurs fibres sont utilisées pour apporter une dose suffisante et homogène de lumière dans le volume à traiter. Le risque de sous- ou surexposition des zones à l'intersection des fibres, ainsi que d'augmentation de la température dans la zone de traitement doivent être pris en compte. Beck *et al.* ont conduit une étude sur la faisabilité et les risques liés à l'utilisation de la iPDT médiée par 5-ALA sur 10 patients atteints de gliomes malins récurrents de petites tailles [112].

Une simulation de Monte Carlo a établi la propagation de la lumière et de la chaleur théorique dans le tissu d'après les propriétés optiques du tissu sain infiltré par les cellules tumorales. L'utilisation d'un logiciel modifié de planification de traitement 3D a permis de définir le volume de traitement et le positionnement des fibres de traitement (précision de 2 mm) en complémentarité avec les informations fournies par la simulation de Monte Carlo. Le schéma d'irradiation développé sur la base de ce modèle a montré qu'un espacement de 9 mm entre les différentes fibres était suffisant pour ne pas atteindre une température critique de 42°C et délivrer une dose de lumière suffisante en tout point de la zone de traitement. Aucune morbidité peropératoire ni de formation d'œdème n'ont été observées, marquant la faisabilité et la sécurité de la iPDT combinée à un logiciel de planification de traitement [112].

L'impact de la distribution du photosensibilisateur dans le tissu traité a également été exploré [111] [114]. Sur une petite cohorte de 5 patients, l'équipe de Johansson *et al.* a réalisé des mesures de fluorescence juste avant et après iPDT médiée par le 5-ALA, puis a déterminé par extraction chimique sur des biopsies la quantité de photosensibilisateur présente dans le tissu. Les résultats ont montré que les tumeurs qui affichaient une forte fluorescence corrélée à un niveau élevé de protoporphyrine IX (entre 1,4 et 3 μM) ne présentaient pas de progression entre 29 et 36 mois, alors que les tumeurs affichant une faible fluorescence et également un faible niveau de protoporphyrine IX (entre 0 et 0,6 μM) continuaient à progresser jusqu'au décès des patients (3 et 9 mois). Les tumeurs ayant un faible niveau de protoporphyrine IX présentaient une nécrose centrale étendue ou avaient déjà reçu de nombreuses lignes de traitement intensives ayant potentiellement altéré leur capacité à synthétiser la protoporphyrine IX [111]. Pour que la iPDT fonctionne, une concentration minimale de protoporphyrine IX doit être atteinte dans le tissu tumoral en combinaison avec une dose de lumière suffisante pour l'activer tout au long de la réaction photodynamique.

Peu d'études précliniques ont été menées sur la iPDT notamment parce que l'application d'un tel protocole sur le petit animal est un challenge technique [115] [116] [117].

En effet, l'intérêt d'un modèle animal est de reproduire du mieux possible les caractéristiques environnementales, histologiques et topographiques des tumeurs étudiées. Il est donc important de travailler sur un modèle tumoral orthotopique et non pas ectopique pour bénéficier d'un micro-environnement cérébral. L'obtention d'une tumeur greffée en intracérébral nécessite la maîtrise de la stéréotaxie, une technique neurochirurgicale faisant appel à un dispositif de repère orthogonal permettant d'après les coordonnées d'une structure du cerveau de l'atteindre de manière très précise. Cette technique est donc plus difficile à maîtriser que la greffe sous-cutanée et largement plus chronophage.

L'utilisation d'un modèle de tumeur cérébrale orthotopique rend *de facto* la tumeur plus difficile d'accès et augmente la difficulté quant à la réalisation de la iPDT sur petit animal. En effet, lors de la iPDT, il est nécessaire de pouvoir planifier et visualiser le placement de la fibre de traitement au

sein de la tumeur. En clinique, l'objectivation du bon placement des fibres se fait d'après l'imagerie du scanner en utilisant des fibres radiomarquées (fibre munie à son extrémité diffusante d'un petit anneau métallique détectable au scanner). Celles-ci sont maintenues grâce à un cadre stéréotaxique conçu pour maintenir plusieurs cathéters. La plupart du temps les fibres optiques sont munies d'un diffuseur cylindrique ou sphérique pour une meilleure diffusion de la lumière, ce qui augmente le diamètre de la fibre.

La transposition de la iPDT de la clinique au préclinique nécessite la miniaturisation de tout le dispositif ce qui soulève plusieurs défis. D'abord, la miniaturisation des diffuseurs cylindrique et sphérique n'atteint pas des tailles suffisamment fines pour être insérés dans le cerveau d'un rat sans créer de lésions irréversibles. Il faut donc adapter le type de diffuseur et le diamètre de la fibre au modèle. L'ajout d'un embout métallique pour visualiser la fibre par scanner augmente le diamètre de la fibre et risque d'endommager le tissu cérébral.

Ensuite, il semble également compliqué de placer plusieurs fibres de traitement chez le rat afin d'adapter la géométrie de la dose de lumière à celle de la tumeur.

Les travaux de doctorat de Denise Bechet au sein du laboratoire ont porté en partie sur la mise en place d'un modèle murin permettant de réaliser un traitement interstitiel stéréotaxique guidé par imagerie non invasive. Une fibre souple d'un diamètre externe de seulement 300 μm a été conçue pour l'irradiation. Le guidage de son placement a été réalisé en IRM. Les images IRM prises avant traitement permettaient de mesurer la longueur de fibre à insérer pour atteindre la tumeur, et une seconde IRM après insertion permettait de valider le bon positionnement de la fibre. Cependant, la iPDT nécessite de ré-inciser le scalp et de repercer la boîte crânienne aux coordonnées de la tumeur, manipulation délicate. Un dispositif innovant ayant fait l'objet d'un brevet (WO 2012176050 A1), et portant le nom de "ancrage crânienne compatible pour l'imagerie par résonance magnétique et visualisable en tomographie à rayons X pour l'implantation stéréotaxique chronique ou non chez le petit animal", a permis d'améliorer ce dernier point. Le dispositif est constitué d'une partie plane, vissée dans les os temporaux et l'os frontal du crâne, et d'une canule marquant l'entrée du trou de trépan par lequel les cellules tumorales sont injectées. La canule fixe les coordonnées stéréotaxiques antéro-postérieures et latérales du point d'injection et maintient une ouverture qui est ensuite utilisée pour insérer la fibre de traitement le jour de la iPDT (Figure 19). Un obturateur bouche cette canule lorsqu'elle n'est pas utilisée. Il est possible, dans le cas d'une iPDT réitérée, de laisser une fibre à demeure maintenue par l'ancrage crânienne.

L'utilisation de cette technologie a permis de valider le concept de iPDT guidée par IRM en utilisant des nanoplateformes multifonctionnelles pour la VTP [117]. Pour ce faire, des nanoparticules multifonctionnelles, composées d'un agent de contraste, un photosensibilisateur et un peptide de ciblage, injectées par voie intraveineuse chez le rat, permettaient de visualiser la tumeur par IRM.

L'ancrage crânienne IRM-compatible fixée à demeure sur le crâne de l'animal permettait de guider la fibre de traitement jusqu'à la tumeur, et une IRM de contrôle d'en valider le bon positionnement. Cette étude a fait la preuve de concept du guidage par IRM de la iPDT puis du suivi par IRM de l'évolution tumorale post-iPDT [117].

La grande limitation de ce type de traitement pour des tumeurs solides volumineuses reste la diffusion de la lumière au sein du tissu tumoral et la capacité à planifier la dose de lumière spatialement et temporellement afin de ne pas toucher les tissus sains avoisinants [53] [118].

Pour que la PDT devienne un traitement de référence plusieurs points restent à valider : un outil de dosimétrie fiable et en temps réel, la capacité d'adapter la dose de lumière en fonction du



FIGURE 19 – Dispositif de l'ancre crânienne. **A.** Ancre crânienne (WO 2012176050 A1). **B.** Guidage de l'injection des cellules tumorales par l'ancre, lors de la greffe orthotopique. **C.** Guidage de la fibre optique de traitement lors de la iPDT guidée par IRM.

type tumoral (volume, localisation, extension) et un photosensibilisateur très sélectif du tissu tumoral [119] [120] [121]. Un essai clinique en cours porte d'ailleurs sur l'élucidation des conditions optimales d'utilisation du Photofrin® dans des gliomes récurrents, *i.e.* la dose maximale tolérée, la neurotoxicité évaluées par la survie sans progression à 6 mois (NCT01966809 conduit par H. Whelan).

La recherche sur des plannings de traitement adaptés à la PDT est surtout développée dans le cadre de la iPDT appliquée aux tumeurs de la prostate [122] [123].

2.4.4 La thérapie photodynamique dans les essais cliniques

L'application de la PDT en neuro-oncologie s'adresse principalement aux tumeurs cérébrales de haut grade en raison de leurs caractéristiques très agressives : croissance rapide, tumeur diffuse, résistance aux traitements standards et récurrences quasi systématiques qui ne laissent entrevoir qu'une médiane de survie de 15 mois au mieux. Il est communément acquis que le pronostic du patient est lié à la qualité de l'exérèse, qui doit être la plus large possible sans toucher les zones éloquentes. Il dépendrait également du meilleur contrôle local à proximité des berges d'exérèse de la tumeur pour limiter les récurrences qui apparaissent dans plus de 80% des cas dans le volume d'irradiation de la radiothérapie.

La PDT est un traitement local, sélectif, qui a le potentiel, contrairement à la radiothérapie et à la chirurgie de traiter des zones d'infiltration en épargnant les cellules non tumorales, et de ce fait de causer moins de dégâts iatrogènes.

Il est donc important d'évaluer à l'aide d'essais cliniques l'efficacité et la précision du contrôle tumoral de la PDT en tant que thérapie complémentaire (Tableau 6).

Les résultats en clinique sont encourageants mais sont en grande majorité des séries de cas, et manquent de validation en phase III. Actuellement trois essais cliniques de phase III sur des gliomes malins nouvellement diagnostiqués sont répertoriés : un essai prospectif multicentrique randomisé et contrôlé portant sur l'amélioration de la résection chirurgicale par la technique de FGR médiée par 5-ALA [38], un essai prospectif monocentrique randomisé et contrôlé portant sur l'apport de la FGR (*Fluorescence Guided Resection*) médiée par 5-ALA complétée par une PDT réitérée médiée par Photofrin® [100] et un essai prospectif multicentrique randomisé portant sur l'apport d'une PDT adjuvante médiée par Photofrin® après chirurgie [130].

Les résultats de ces études montrent un apport de la résection guidée par fluorescence marqué par une augmentation de la survie sans progression à 6 mois pour le groupe recevant la FGR comparée

TABLE 6 – Tableau récapitulant une sélection d'études cliniques utilisant la PDT et la résection guidée par fluorescence pour les tumeurs cérébrales. Tiré de [124].

Etude	Approche	Patients (GBM)	PS	Fluence (J/cm ²)	Survie médiane (mois)		PFS
					primaire	récurrent	
Akimoto et al. 2012	peropératoire	10	sodium de Talaporfine	27	26	9	3
Muragaki et al. 2013	peropératoire	13	sodium de Talaporfine	27	24,8		
Stylli et al. 2005	peropératoire	78	Dérivés de l'hémato-porphyrine	70-240	14,3	13,5	
Rosenthal et al. 2001	Ballon d'intralipides en peropératoire	16	Porphyrine borée	25-100	5	11	
Schmidt et al. 2004	Ballon d'intralipides en peropératoire	5	Photofrin	100		18	6
Stummer et al. 2006	FGR	115	5-ALA	N/A	13,5		3,6
Beck et al. 2007	Interstitielle	10	5-ALA	N/A	15,2	15	5,1
Eljamel et al. 2008	Ballon ou fibre en FGR+ Répétitive post-opératoire	27	5-ALA-FGR Photofrin-PDT	100	12,2		8,6
Lyons et al. 2012	FGR+ Répétitive post-opératoire+ IORT	73	5-ALA-FGR Photofrin-PDT	100	ST+PDT : 9,2 ST+PDT+IO RT: 18,2		
Muller et al. 2006	Ballon et fibre en Peropératoire	49	photofrin	58	7,6	6,7	

PS : Photosensibilisateur ; PFS : *Progression Free Survival*; 5-ALA : Acide 5 aminolévulinique ; Photofrin : Porfimère Sodique ; FGR : *Fluorescence Guided-Resection* ; IORT : *IntraOperative Radiation Therapy* ; N/A : Non Attribué; ST : Standard.

au groupe contrôle (41,0% vs 21,1%) sans augmentation d'effets indésirables graves dans les 7 jours suivant la résection [38].

L'apport de la FGR couplée à la PDT réitérée conduit à une augmentation de la moyenne de la survie sans progression comparée au groupe contrôle (respectivement 8,6 mois vs 4,8 mois) ainsi qu'une augmentation de la survie globale (respectivement 13 mois vs 6 mois) [100].

L'utilisation de la PDT intracavitaire médiée par Photofrin® a montré quant à elle, une amélioration de la médiane de survie de 11 mois vs 8 mois pour le traitement standard seul [131] [130].

Les résultats de ces études sont donc encourageants. Plusieurs points limitent l'analyse de ces études. Le type histologique des tumeurs des patients participants aux études sont très variables et les lignes de traitement adoptées aussi, ajoutant de la variabilité dans la réponse à la PDT et pouvant masquer un effet de celle-ci. Pour certaines études, le nombre de patients inclus reste faible obligeant à manier les conclusions avec précaution. Enfin, la variabilité dans le type de photosensibilisateur uti-

lisé, les doses de lumière appliquées rendent difficile la comparaison entre plusieurs études cliniques.

Les essais cliniques en cours sont des essais de phase I ou II, portant sur de nouveaux challenges, à savoir l'efficacité de la PDT sur des tumeurs récidivantes et dans un cadre pédiatrique.

Un essai de phase I vise à définir la dose maximale tolérée de porfimère sodique sur des tumeurs malignes récurrentes pédiatriques (NCT01682746), et un essai de phase II conduit par la même équipe évalue l'efficacité de la PDT médiée par porfimère sodique sur des tumeurs malignes récurrentes chez l'adulte d'après la RFS (*Relapse Free Survival*) à 6 mois (NCT01966809).

Une étude récente, sur un essai clinique de phase II utilisant la PDT médiée par la talaporfine (chlorine mono-L-aspartyle) en peropératoire afin d'améliorer le contrôle de la partie invasive de tumeurs cérébrales malignes a montré des résultats très prometteurs. Treize patients atteints de GBM ont affiché une survie sans progression de 12 mois et une survie sans progression sur le site irradié par la PDT de 20 mois. La survie globale était de 24,8 mois [126] [132]. Cette étude a été réalisée sur une petite cohorte de patients, et mérite un essai clinique de phase III à plus grande échelle.

Les données de ces différents essais sont assez éparses, et il est difficile d'évaluer le rôle en tant que thérapie adjuvante de la PDT bien qu'elle semble montrer dans l'ensemble une amélioration de la survie sans progression.

3

Utilisation de l'imagerie par résonance magnétique dans la prise en charge du glioblastome

Sommaire

3.1	Techniques d'imagerie non invasive	63
3.2	Principe de l'imagerie par résonance magnétique	64
3.3	Applications cliniques de l'imagerie par résonance magnétique dans les tumeurs cérébrales	68
3.4	Approches d'imagerie par résonance magnétique complémentaires actuelles	68
3.4.1	Spectroscopie par Résonance Magnétique	68
3.4.2	Imagerie de Diffusion par Résonance Magnétique	72
3.4.3	Carte paramétrique de T2*	76

3.1 Techniques d'imagerie non invasive

Lors d'une suspicion de tumeur cérébrale, le patient consulte pour des symptômes qui donnent lieu à un examen d'imagerie médicale. Communément, un examen par tomodensitométrie (TDM) puis par IRM avec et sans produit de contraste sont proposés.

La TDM utilise les propriétés d'atténuation des rayons X en fonction de la densité des tissus traversés. Elle permet principalement de mettre en évidence des changements de densité anormaux au sein d'un tissu, dus à une calcification ou à un effet de masse induit par la tumeur. Avec l'utilisation d'un produit de contraste, des ruptures de la barrière hémato-encéphalique peuvent être révélées. Bien que la TDM présente des avantages non négligeables comme la rapidité d'acquisition des images, et son faible coût par rapport à l'IRM, elle ne se présente pas comme un outil diagnostique suffisamment sensible dans le cas des tumeurs cérébrales, et l'IRM lui est préférable bien que plus lourde à mettre en place (Figure 20). Dans tous les cas, une confirmation histologique est indispensable pour préciser le diagnostic.

L'IRM présente une bien meilleure résolution que la TDM pour les tissus mous, et donc un seuil de détection plus élevé, offrant des informations de meilleure qualité. Un second avantage concerne l'absence d'utilisation de rayonnements ionisants, préservant le patient d'irradiations trop fréquentes lors du suivi de l'évolution de la maladie.

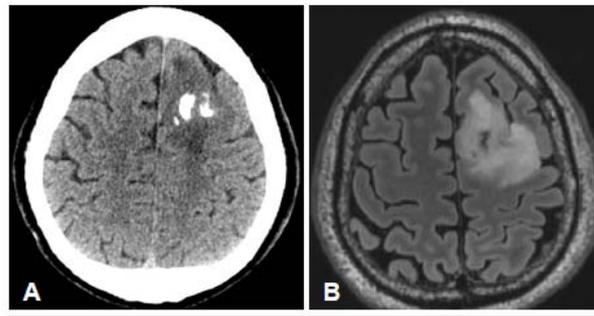


FIGURE 20 – Imagerie axiale d'un patient atteint d'un oligoastrocytome de grade II par TDM et IRM (T2 FLAIR). Calcifications de la lésion visibles en TDM et le volume tumoral visible en T2 FLAIR. Tiré de [133].

3.2 Principe de l'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est une technique d'exploration non invasive couramment utilisée en clinique et en recherche. Elle est utilisée pour imager le corps entier, et plus spécifiquement le système nerveux central, musculo-squelettique, cardiovasculaire et abdominal. Les avancées faites sans cesse dans le domaine de l'imagerie permettent de connaître la composition (graisse, eau, sang...), la structure, la fonctionnalité et le métabolisme du tissu observé.

La formation de l'image en IRM repose sur les propriétés électromagnétiques des noyaux des atomes. Certains noyaux comme le noyau d'hydrogène (^1H) présente une rotation de spin ou moment magnétique ($\vec{\mu}$) élevé lui conférant des propriétés électromagnétiques (Figure 21.A). Peu d'atomes ont cette capacité. Le carbone 13 (^{13}C), le sodium 23 (^{23}Na) et le phosphore 31 (^{31}P) en font partie et sont également détectables par IRM. L'hydrogène de l'eau représentant 2/3 des atomes de l'organisme, c'est logiquement que l'IRM s'est développée autour de sa détection (Figure 21).

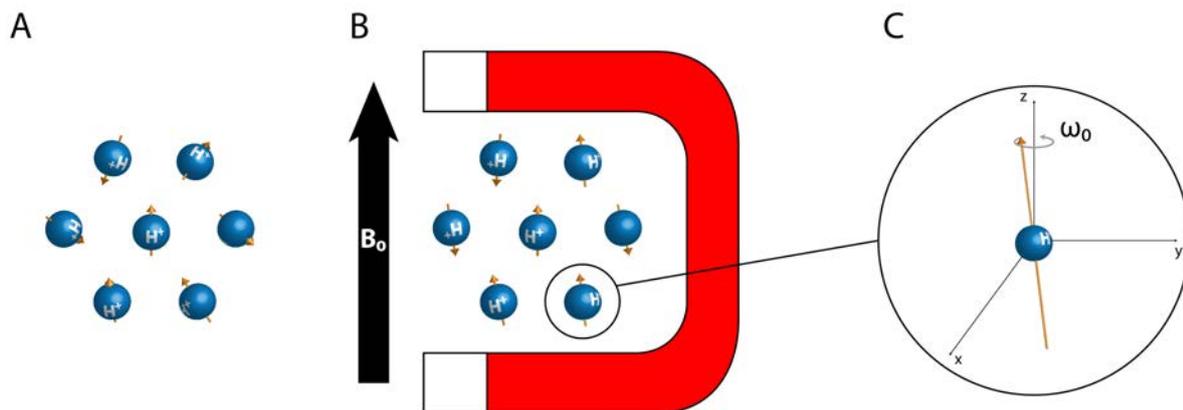


FIGURE 21 – Principe physique de l'IRM. A. Moment magnétique ou spin du noyau de l'atome d'hydrogène (^1H). B. Orientation des spins du ^1H soumis à un fort champ magnétique en deux populations : parallèle et anti-parallèle avec une légère prépondérance de la première. C. Chaque spin décrit un mouvement de rotation autour de \vec{B}_0 appelé mouvement de précession (ou fréquence de Larmor ω_0) qui dépend des caractéristiques propres du proton et de la force de \vec{B}_0 .

Soumis à un fort champ magnétique \vec{B}_0 , les noyaux d' ^1H s'orientent de manière parallèle ou anti-parallèle à ce champ (Figure 21.A et B). La première nécessite moins d'énergie que la seconde engendrant une différence de répartition des spins des protons en faveur de l'état parallèle. De cette petite inégalité de répartition, naît le signal de résonance magnétique nucléaire visible à l'échelle tissulaire.

Pour enregistrer un signal, il faut perturber cet état d'équilibre en l'excitant par une interaction entre une onde radiofréquence (RF) et les spins en précession. Chaque spin décrit un mouvement de rotation autour de \vec{B}_0 appelé mouvement de précession (ou fréquence de Larmor ω_0) qui dépend des caractéristiques propre du proton et de la force de \vec{B}_0 (Figure 21.C). L'excitation du système par une onde RF à la même fréquence de résonance que les spins des protons d' ^1H apporte de l'énergie, que le système devra restituer à la fin de la phase d'excitation : c'est la phase de relaxation. Lors de la phase d'excitation les spins qui précessaient autour de \vec{B}_0 basculent perpendiculairement à \vec{B}_0 , grâce à l'envoi d'une onde RF à 90° , et tendent ensuite à revenir à leur état d'origine par deux phénomènes de relaxation magnétique : la relaxation longitudinale où l'aimantation cherche à revenir vers son énergie d'origine (population parallèle et anti-parallèle) et une relaxation transversale où les protons se déphasent (*i.e.* ne précessent plus exactement à la même vitesse) (Figure 22).

Deux types d'aimantation tissulaire sont observés :

- la repousse longitudinale (dans l'axe de \vec{B}_0) caractérisée par le paramètre T1. Le T1 correspond au temps de repousse pour que l'aimantation longitudinale revienne à 63% de sa valeur finale (Figure 22.D). Le T1 dépend des interactions spin-réseau (tendance des spins à s'orienter parallèlement à \vec{B}_0) et donc de la mobilité des protons d'hydrogène du tissu. Un tissu constitué de petites molécules possédant un degré de liberté élevé (comme le liquide céphalorachidien) présentera un T1 long (apparaissant en hyposignal, noir) alors qu'un tissu constitué de molécules de haut poids moléculaire, donc avec un degré de liberté plus faible (comme la graisse) et cédant plus facilement leur énergie, sera court (apparaissant en hypersignal, blanc). Les valeurs de T1 sont donc proportionnelles à la force du champ principal (Figure 22.D).
- la repousse transversale caractérisée par le paramètre T2. Le T2 correspond au temps nécessaire pour que l'aimantation transversale atteigne 37% de sa valeur initiale (Figure 22.D). La relaxation transversale est due au déphasage ou perte de cohérence de phase des spins. Appelé également relaxation spin-spin, ce phénomène est la conséquence des inhomogénéités de champs d'origine moléculaire, induites par les protons eux-mêmes, mais aussi les inhomogénéités de champ propre à \vec{B}_0 . Des séquences dites en écho de spin conçues pour limiter la contribution des inhomogénéités de champ dues à \vec{B}_0 permettent de pondérer les images en T2. L'eau présentant un T2 plus long que la graisse, apparaîtra en hypersignal sur une séquence pondérée en T2, tandis que la graisse apparaîtra en hyposignal. Les séquences pondérées en T2* qui ne s'affranchissent pas du déphasage des spins sont plus sensibles à la présence de substances induisant des perturbations du champ magnétique comme le fer et permettent de détecter leur présence. .

Il est à noter que l'aimantation longitudinale tissulaire est proportionnelle à la concentration de proton dans le tissu. Une image peut donc être pondérée en densité de proton (ρ). Plus la concentration de protons sera élevée, plus le signal sera fort.

Une image peut donc être pondérée en T1 ou en T2 selon les paramètres d'acquisition choisis (TR et TE). Ces pondérations sont à l'origine du contraste en niveau de gris que l'on observe. Selon la pondération, une même structure peut apparaître successivement en hypersignal (signal intense apparaissant plutôt blanc) puis en hyposignal (signal faible apparaissant plutôt noir).

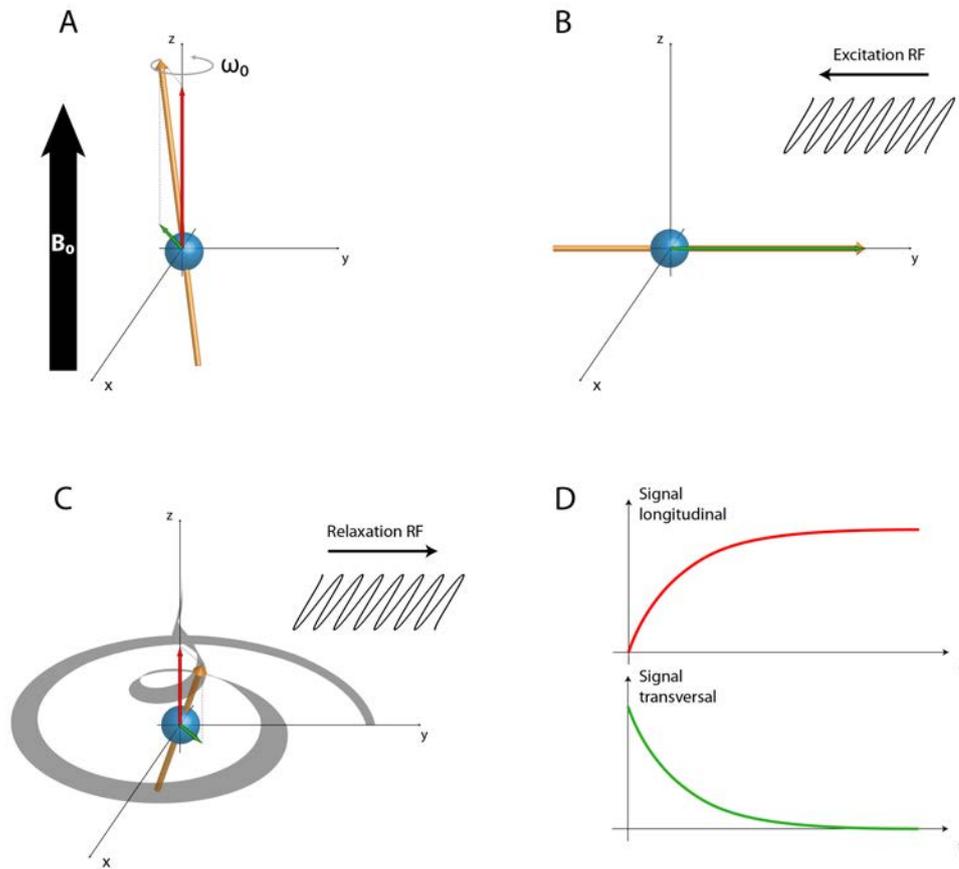


FIGURE 22 – **A.** Le moment magnétique d'un spin est constitué de deux composantes : l'aimantation longitudinale parallèle à \vec{B}_0 et dont l'intensité maximale correspond à l'état de repos ; l'aimantation transversale perpendiculaire au champ principal \vec{B}_0 dont la valeur est très faible devant \vec{B}_0 . L'aimantation transversale est maximale lorsque le système est déséquilibré par l'envoi d'une onde RF perpendiculaire à \vec{B}_0 . **B.** Lors de l'excitation par une onde RF à 90° dans un plan perpendiculaire à \vec{B}_0 , l'aimantation bascule, la composante longitudinale disparaît et la composante transversale apparaît pour atteindre son intensité maximale. **C.** Dès que le système n'est plus excité par l'onde RF, l'aimantation transversale décroît et l'aimantation longitudinale retourne à sa valeur maximale. **D.** Chacun de ces phénomènes présente sa dynamique propre dont les paramètres respectifs sont le T2 et le T1. Ils permettent selon le temps d'écho (TE : temps entre l'impulsion RF et l'acquisition du signal) et le temps de répétition (TR : temps entre deux impulsions RF) choisis de pondérer l'image en T2 ou en T1 pour faire ressortir les structures voulues.

Lors de la relaxation, la composante transversale décrit une spirale à l'origine du signal de précession libre (*Free Induction Decay* ou FID) qui décroît régulièrement du fait de la relaxation (Figure 22). Ce signal est un signal électrique mesurable. Le signal FID est ensuite numérisé et décodé dans le plan de Fourier pour former l'image.

La numérisation du signal implique la discrétisation de l'espace, *i.e.* que l'image finale est découpée en sous unité : le pixel. Chaque pixel présente une valeur d'intensité unique qui est le reflet de la mesure physique effectuée. En IRM cette grandeur physique représente l'intensité d'aimantation macroscopique des protons de 1H dans chaque partie de l'espace (Figure 23).

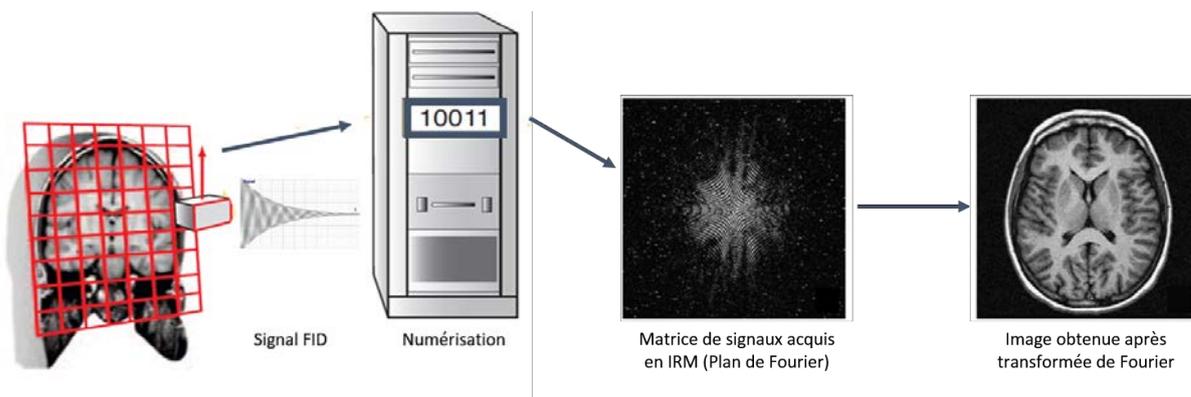


FIGURE 23 – Schéma représentant les étapes de la formation de l'image en IRM. Le signal analogique FID provenant de chaque pixel de l'image est discrétisé, puis les signaux sont utilisés pour remplir l'espace k du plan de Fourier. Après transformation de Fourier l'image est reconstruite. Adapté de [134].

Le signal IRM est particulier. Il dépend de plusieurs paramètres instrumentaux, de plusieurs grandeurs physiques et des mouvements micro- et macroscopiques. L'interprétation des images doit donc toujours tenir compte des conditions d'acquisitions, ce qui ne permet pas toujours la comparaison des images d'une étude à l'autre.

L'interprétation du signal dépend du type de pondération utilisée. Chaque tissu peut être caractérisé par son signal en T1 ou en T2. De manière non exhaustive, voici les structures qui donnent des signaux reconnaissables :

1. Les séquences pondérées en T1 font ressortir en hypersignal les substances à T1 court comme les lipides (d'origine physiologique ou pathologique), les protéines (kystes et mucocètes).
2. Les séquences pondérées en T2 font ressortir en hypersignal les substances à T2 long comme l'eau libre (liquide céphalorachidien, urine, épanchements) l'eau interstitielle (œdème), le sang stagnant (rate, corps érectiles).
3. L'utilisation de produits de contraste pour améliorer le contraste *i.e.* la sensibilité et la spécificité de la séquence, modifie le signal émis pour révéler les structures l'ayant absorbé. Les produits de contraste les plus utilisés sont des agents paramagnétiques à base de gadolinium, un lanthanide qui a la capacité de raccourcir le T1 du tissu environnant. La prise de contraste d'une lésion après injection de gadolinium permet de statuer sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, dans le cas des pathologies cérébrales.
4. Enfin, certaines structures présentent peu de signal en IRM, quelle que soit la pondération : poumons (absence de protons dans l'air), les tissus solides (os cortical, émail), les tissus riches en collagène (tendons, ligaments, fibrose), le gadolinium concentré, le fer concentré, les hématomes (en phase aiguë 1-3 jours et chronique >14 jours).

Les séquences IRM se déclinent de plus en plus et aujourd'hui ; on parle en plus de l'IRM anatomique (séquence pondérée en T1 et T2), d'IRM de perfusion, de diffusion, spectroscopique... qui permettent de caractériser des phénomènes biologiques de manière non invasive. Cependant, ces séquences sont toujours en voies d'évaluation approfondies pour être utilisées en clinique de manière routinière et standardisée.

3.3 Applications cliniques de l'imagerie par résonance magnétique dans les tumeurs cérébrales

L'IRM à plusieurs vocations : le diagnostic, l'aide au traitement (guidage et planification) et le suivi de la réponse au traitement.

Le diagnostic. Pour l'instant il est impossible de se passer de l'histologie pour établir le grade d'une tumeur. L'exploration pré-opératoire se caractérise par un examen IRM conventionnel composé de séquences pondérées en T2 FLAIR et T1 avec et sans injection de produit de contraste. Cet examen a pour vocation de visualiser la tumeur (lésions multifocales, infiltrantes, œdémateuses) et son état histologique : nécrose, hémorragie donnant des indices sur son agressivité et son grade. La recherche actuelle se concentre sur la possibilité de grader les tumeurs cérébrales et de distinguer les sous-types moléculaires grâce à l'imagerie uniquement [135] [136] [137] [138].

L'aide au traitement. La neuronavigation afin d'assister l'acte chirurgical repose sur la fusion de différents types d'imagerie non invasives (IRM, PET). La neuronavigation s'appuie en général sur l'imagerie anatomique, et au cours de l'opération, l'échographie permet de se repérer en temps réel. Pour améliorer la neuronavigation d'autres séquences peuvent être ajoutées [34]. Une IRM fonctionnelle permet de localiser la tumeur par rapport aux aires éloquentes du cerveau à éviter, une IRM de diffusion (DTI ou tenseur de diffusion) permet de repérer les faisceaux de fibres à proximité de la lésion. Dans le cas d'une biopsie, une SRM multi-voxel réalisée sur la tumeur et sa périphérie peut permettre d'évaluer les zones tumorales les plus actives et agressives pour guider la biopsie, mais cela reste assez rare [139].

Suivi de la réponse au traitement. L'IRM conventionnelle échoue à prédire précocement l'efficacité d'un traitement [31]. Les critères RANO et RECIST ne permettent pas de distinguer avant 12 semaines si une radiochimiothérapie concomitante a fonctionné ou pas [140] [141]. Le patient doit donc attendre 12 précieuses semaines, avant de savoir si son traitement est efficace et donc maintenu ou modifié. Ce délai d'attente nuit à l'efficacité d'un second traitement si celui-ci s'avère nécessaire. Plusieurs techniques avancées sont actuellement évaluées mais aucune n'a prouvé sa valeur pronostique pour l'instant.

3.4 Approches d'imagerie par résonance magnétique complémentaires actuelles

3.4.1 Spectroscopie par Résonance Magnétique

Principe de la spectroscopie par résonance magnétique

La SRM contrairement à l'IRM fournit une information spectrale et non spatiale (anatomique). Chaque composante du spectre représente la résonance des protons d'hydrogène qui varie légèrement en fonction des macromolécules avec lesquelles ils interagissent. Cette variation aussi infime soit elle, s'avère suffisante pour différencier les métabolites par leur fréquence de précession. Chaque fréquence de précession est fixe pour une macromolécule donnée permettant de les identifier sur un spectre. Les variations de fréquence étant très faibles, elles sont exprimées en partie par million (ppm).

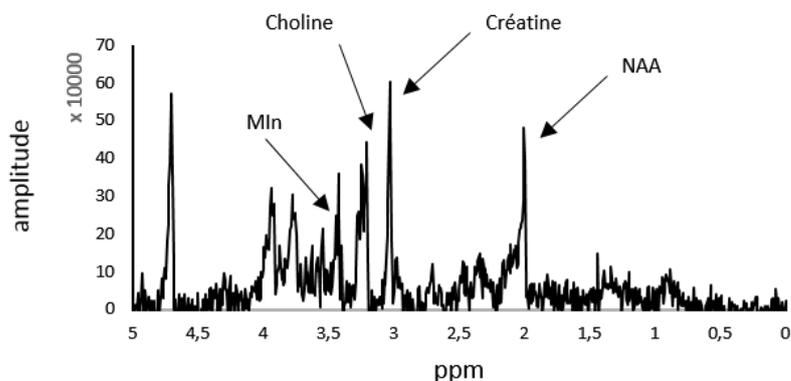


FIGURE 24 – Exemple de spectre par SRM analysant un voxel situé dans le striatum. Chaque pic correspond à un métabolite : Eau - 4,7 ; Myo-inositol - 3,55 ; Choline - 3,22 ; Créatine - 3,03 ; N-acétylaspartate - 2,02 ; Lipides/lactate - 1,33 et Lipides - 0,9 ppm. Acquisition réalisée sur une IRM 7 teslas (Bruker, Biospec 70/20 USR, Ettlingen Allemagne), séquence PRESS-1H (TR/TE : 2500/20 ms, NEX : 512).

L'enregistrement des signaux émis par ces différentes macromolécules prend la forme d'un spectre d'où le nom de SRM (Figure 24). Les macromolécules sont en concentration très faible devant la quantité d'eau contenue dans le tissu, il est donc nécessaire lors de l'acquisition d'un spectre de supprimer le signal de l'eau, afin d'améliorer le rapport signal sur bruit.

Comme pour l'IRM, plusieurs noyaux d'atomes sont détectables mais c'est surtout la SRM du proton de l'hydrogène qui est utilisée en clinique, les autres atomes (^{31}P ou ^{13}C par exemple) nécessitant parfois des installations particulières et plus coûteuses. Les limites de la SRM sont sa faible sensibilité, et le manque d'étalon interne qui permettrait la quantification absolue et non pas relative des métabolites. Aujourd'hui, les niveaux de métabolites sont souvent exprimés relativement à la valeur d'un métabolite de référence stable, mais cette manière de traiter les données engendre de la perte d'information et augmente les erreurs de mesure. Du fait de la faible sensibilité de la SRM, il est nécessaire de travailler sur des voxels assez large pour obtenir un bon rapport signal sur bruit, ou augmenter le temps d'acquisition mais la durée des séquences est une contrainte non négligeable en clinique.

La SRM peut être utilisée en monovoxel ou en multivoxel. Le multivoxel permet de réaliser des cartes paramétriques du métabolisme cérébral ou d'une région cérébrale. Le monovoxel permet de comparer une zone saine à une zone pathologique. Le multivoxel est très attrayant, notamment pour le guidage de la biopsie d'après l'activité métabolique d'une région hétérogène, mais il souffre d'un manque de sensibilité spatiale et peut fournir des informations erronées quand à la localisation des métabolites détectés.

Plusieurs métabolites d'intérêt sont suivis en pratique neuro-oncologique :

- N-acétylaspartate (NAA) total
- Choline (Cho)totale
- Créatine (Cr)totale
- Lactate/Lipides (Lac+Lip) total
- Myo-Inositol (MIn)

Leur concentration est en général assez stable dans le tissu cérébral et leur modification reflète un état métabolique pathologique (Figure 25).

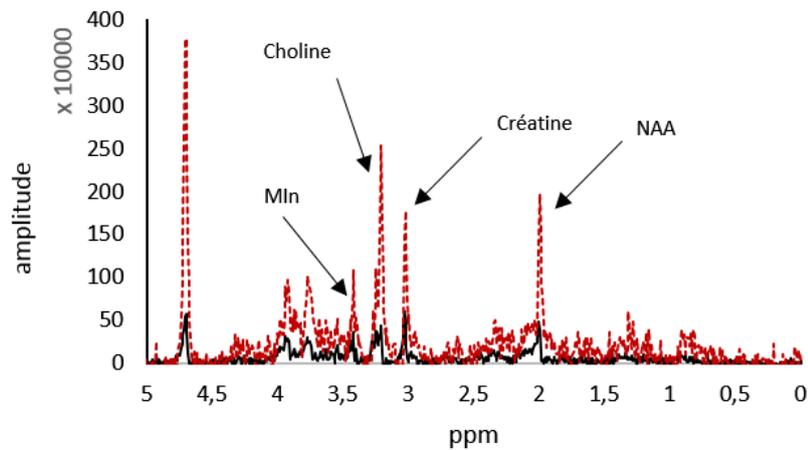


FIGURE 25 – Exemple de spectres par SRM analysant un voxel situé dans le striatum controlatéral (ligne noire) et un voxel situé dans la tumeur (ligne pointillée rouge). Chaque pic correspond à un métabolite : Eau - 4,7m ; Myo-inositol - 3,55 ; Choline - 3,22 ; Créatine - 3,03 ; N-acétylaspartate - 2,02 ; Lipides/lactate - 1,33 et Lipides - 0,9 ppm. Acquisition réalisée sur une IRM 7 teslas (Bruker, Biospec 70/20 USR, Ettlingen Allemagne), séquence PRESS-1H (TR/TE : 2500/20 ms, NEX : 512).

N-AcétylAspartate. Son pic principal est détecté à 2,02 ppm. Le NAA est utilisé comme marqueur de la densité et de la viabilité neuronale. C'est un acide aminé, synthétisé et stocké par les neurones, qui peut aussi être trouvé en quantité moindre dans les oligodendrocytes immatures et les cellules progénitrices des astrocytes. C'est un des métabolites qui présente le pic le plus important sur le spectre de résonance magnétique. Le NAA total (qui est composé de NAA et NAAGlutamate : un neurotransmetteur) est impliqué dans le métabolisme énergétique mitochondrial des neurones, l'osmorégulation et la signalisation axones-glie. Sa diminution indique donc une souffrance neuronale observée lors de la destruction neuronale par une lésion volumineuse, par un infarctus, par démence... Le suivi du NAA est donc très utile en clinique notamment comme outil diagnostique potentiel. Il a d'ailleurs été mis en évidence qu'un niveau de NAA élevé dans les gliomes était un facteur de bon pronostic [142]. Une relation entre le niveau de NAA et l'agressivité tumorale, induisant une destruction neuronale accrue permettrait de l'utiliser comme marqueur diagnostique du grade. De plus, son absence au sein des métastases et des tumeurs non neuronales permet également de discriminer ces différentes lésions. Cependant, la précision de ce marqueur n'est pas suffisante à elle seule et ne permet pas, par exemple, de différencier avec certitude les grades III et IV de tumeurs cérébrales.

Choline. Son pic principal est détecté à 3,22 ppm. La choline est utilisée comme marqueur de la densité et de l'intégrité membranaire. Seule la forme soluble de la choline est détectée par SRM (*i.e.* forme non liée à des macromolécules de la membrane) comme la choline libre, la phosphocholine et la glycérophosphocholine. Ce métabolite n'est pas spécifique à un type cellulaire, et présente un des signaux les plus importants avec celui du NAA. La phosphocholine, un précurseur de la synthèse membranaire, est associée au risque tumoral car une haute expression de la choline kinase est requise pour la croissance des cellules tumorales [143]. Le *pool* de choline libre entretient le cycle de synthèse/dégradation des phospholipides de la membrane. Un fort *turn-over* entraîne une augmentation de la concentration en choline libre et, est associé avec une augmentation de la densité cellulaire. Au contraire, le niveau de choline diminue dans les lésions ischémiques ou dans celles détruisant les faisceaux de fibres blanches car ces lésions détruisent les cellules. Habituellement le

niveau de choline est plus élevé dans les gliomes comparé à la même zone du côté controlatéral. Shimizu *et al.* montrent une forte corrélation entre l'indice KI67 (indice immunohistologique du taux de prolifération cellulaire) de tumeurs homogènes et l'expression de la choline [144]. Cependant, pour des tumeurs d'aspect hétérogène à l'IRM, cette relation n'est pas démontrée, elle n'est donc pas forcément valable pour des GBM d'aspect généralement hétérogène.

Créatine. Son pic principal est détecté à 3,03 ppm. La créatine est un marqueur du "métabolisme énergétique" mais elle est surtout utilisée comme référence pour rationaliser l'expression des autres métabolites. La créatine totale (qui comprend la créatine et la phosphocréatine) est synthétisée par le foie et les reins, puis transportée par la circulation sanguine jusqu'au cerveau. Son niveau peut être très variable d'un individu à un autre, influencé par des pathologies externes comme une insuffisance rénale. Une diminution de son niveau d'expression est cependant souvent observé dans les gliomes de haut grade en raison de leur fort besoin énergétique. De ce fait, lorsque cela est possible, les métabolites sont exprimés par rapport à la concentration en eau du voxel controlatéral dont le niveau est plus stable [145] [146].

Lactate et Lipides. Leur pic principal se chevauche et, est détecté à 1,31 ppm. Un pic à 0,9 ppm est spécifique des lipides libres. Le lactate est un marqueur du métabolisme anaérobie (étant donné que la prolifération des cellules tumorales génère des milieux hypoxiques (glycolyse, etc.)) et les lipides un marqueur de la destruction tissulaire. Dans un cadre non pathologique, ces métabolites sont rarement détectés, et n'apparaissent sur le spectre qu'en cas de situation anormale. Une augmentation du lactate est aussi bien observée dans les régions ischémiques ou de cytopathie mitochondriale, et le pic de lipides dans les tumeurs prolifératives et les abcès cérébraux ou dans les altérations des gaines de myéline. Le lactate et les lipides vont souvent de pairs, du fait qu'une zone ischémisée finit par mener à la destruction cellulaire et donc à une augmentation des lipides libres.

Myo-inositol. Son pic principal est détecté à 3,56 ppm. C'est un marqueur de l'activité des cellules gliales. C'est un sucre simple présent dans la glie uniquement et qui semble impliqué dans les processus d'osmorégulation. L'augmentation de myo-inositol est observée dans des cas d'activation gliale en cas de tumeurs gliales ou lors d'une gliose réactionnelle. Il semble que son niveau soit corrélé au grade tumoral [137].

Utilisation clinique de la spectroscopie par résonance magnétique

De nombreuses études présentent d'abord la SRM comme un outil diagnostique permettant d'abord de différencier les différents types de lésions : abcès, métastases, tumeurs...puis d'évaluer le grade histopathologique des tumeurs gliales. Si cela fonctionne relativement bien pour les grade I, II voire III, il n'en va pas de même pour les grade IV qui ont des comportements très variables et sont souvent confondus avec les grades III.

Sa seconde utilisation consiste à l'assistance de l'acte chirurgical, par le guidage de la biopsie. En effet, dans les tumeurs hétérogènes, la biopsie peut être faite dans une zone non représentative du grade le plus avancé de la lésion. Mais selon les études, il semble que la différence de diagnostic entre une biopsie stéréotaxique guidée par IRM et le bilan post-chirurgie varie entre 3 et 49% [147]. La SRM pourrait permettre d'identifier des zones d'infiltrations non visibles en IRM conventionnelle.

Cette information pourrait être très utile lors de la neuronavigation pendant une chirurgie.

La troisième utilisation concerne le potentiel pronostic des grands métabolites marqueurs du métabolisme tumoral. Caroline *et al.* présentent une revue de l'utilisation de la SRM pour prédire précocement l'effet de la radiochimiothérapie afin de distinguer plus rapidement les zones de pseudoprogression de récurrence ou de nécrose [148]. Nakajima *et al.* utilisent le ratio Lac/Cho pour différencier les groupes présentant des récurrences tumorales proches des berges de traitement de ceux présentant des zones nécrotiques. Le ratio Lac/Cho permet de différencier les lésions récurrentes des lésions nécrotiques de manière significative ($p < 0,01$ pour un Lac/Cho de respectivement $0,63 \pm 0,25$ vs $2,35 \pm 1,81$), alors qu'au même temps d'examen, l'IRM anatomique ne le permet pas [149]. Les ratios Cho/NAA et Cho/Cr sont régulièrement utilisés pour faire le suivi post-traitement des tumeurs cérébrales [150] [149]. Une diminution des ratio Cho/NAA ainsi que Cho/Cr marque les zones de radionécrose alors qu'une augmentation marque la récurrence (mauvais pronostic) [150] [151].

3.4.2 Imagerie de Diffusion par Résonance Magnétique

L'imagerie de diffusion permet de mesurer la mobilité microscopique de l'eau et de renseigner de manière indirecte sur la cellularité d'un tissu. Sa première application clinique a d'abord concerné la caractérisation des accidents cardiovasculaires ischémiques, puis elle a ensuite été développée pour la différenciation des masses tumorales vs kystiques, les abcès, les hémorragies et les zones de démyélinisation [152] [153].

Le phénomène de diffusion des molécules d'eau est à l'origine de cette séquence. Ce phénomène appelé mouvement Brownien décrit le déplacement aléatoire de molécules dans un liquide dû à l'agitation thermique et aux chocs entre molécules. Tant qu'aucun obstacle n'est rencontré, cette diffusion est libre et ne dépend que du coefficient de diffusion du milieu. Le déplacement des molécules dans un milieu isotrope se fait de manière équiprobable dans toutes les directions. En revanche, dans un milieu anisotrope comme le tissu cérébral, où des ultra structures comme les faisceaux de fibres myélinisées imposent des déplacements dans une direction préférentielle, la mobilité des molécules d'eau subit des restrictions.

Les séquences de diffusion tirent parti de ce phénomène. Ces séquences sont sensibles aux déplacements aléatoires des molécules d'eau. Une molécule en mouvement entraîne une chute de signal sur toutes les séquences IRM, mais est en général trop faible pour être perçue. De manière simplifiée, la séquence de diffusion a pour but d'accentuer la différence de signal émis par une molécule en mouvement par rapport à une fixe afin de les différencier (Figure 26). Après la phase d'excitation (envoi de l'onde RF, 90°) un gradient de champ magnétique (gradient de phase) est imposé afin que chaque spin ait une fréquence de résonance différente en fonction de sa position sur le gradient. De la force et du temps d'application du gradient de champ imposé dépend la pondération en diffusion de l'image. Ce facteur est appelé b . Les spins de 1H sont inversés par une seconde onde RF (180°) dite de rephasage. Le même gradient de champ magnétique est appliqué à nouveau avec pour conséquence un rephasage "parfait" des spins immobiles, et une accentuation du déphasage pour les spins mobiles qui étaient en mouvement lors de l'impulsion de rephasage. Ils n'ont donc pas repris leur phase (ou direction) d'origine à la fin de la séquence aboutissant à une perte de signal dans les zones de diffusion plus libre. Sur l'image de diffusion, le liquide céphalorachidien où les protons d' 1H de l'eau se déplacent sans contrainte apparaîtra donc en hyposignal et les zones d'hypercellularité en hypersignal, les spins y étant quasi immobiles.

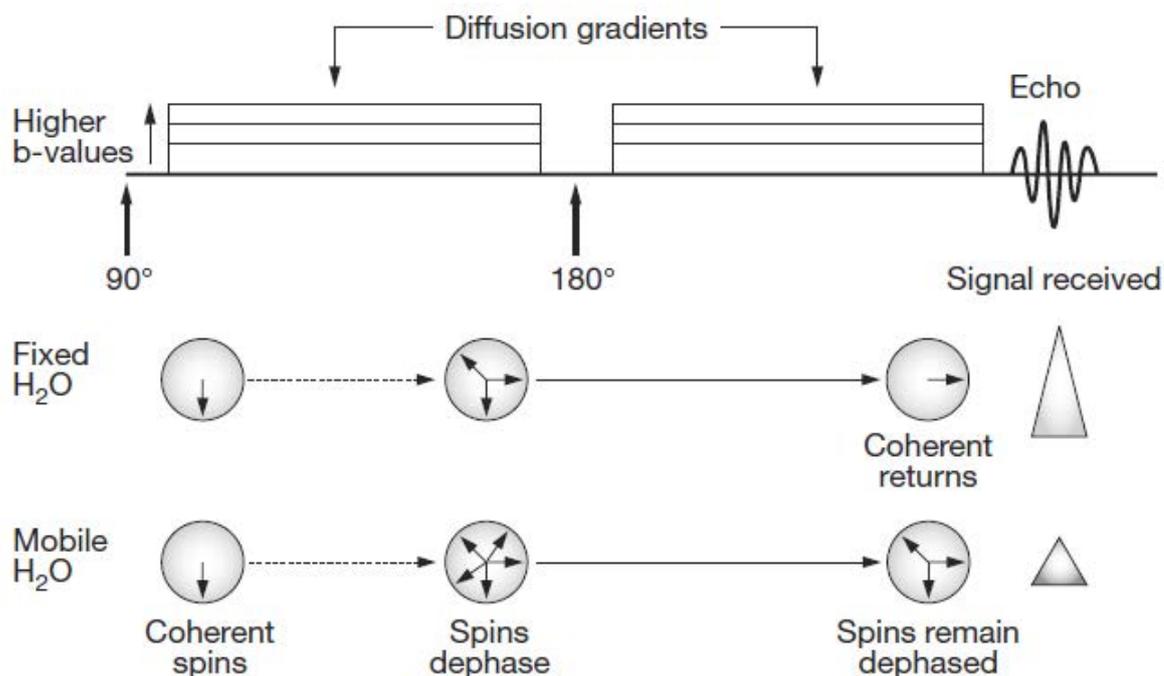


FIGURE 26 – La séquence de diffusion comporte deux gradients de diffusion appliqués de part et d’autres d’une impulsion de refocalisation à 180°. Plus le gradient appliqué est fort (b élevé) plus la pondération en diffusion est importante. Les molécules présentant peu de mouvements lors de l’application du premier gradient sont rephasées lors de l’application du second gradient et aucune perte de signal n’est enregistrée. Les molécules très mobiles ayant bougé pendant l’application du premier gradient ne seront pas rephasées par le second gradient résultant en une perte de signal. Tiré de [154].

La mesure de ce mouvement de diffusion des molécules d’eau s’exprime à travers le coefficient de diffusion apparent (ADC) en mm^2/s . On l’appelle coefficient apparent car dans un milieu biologique, il tient compte de plusieurs phénomènes : la diffusion libre, la diffusion restreinte par les membranes cellulaires semi-perméables, mais également tous les mouvements incohérents au sein du voxel. Pour s’affranchir de la pondération T2 inhérente à toute séquence de diffusion, l’ADC est exprimé de la manière suivante :

$$ADC = -\frac{1}{b} \log\left(\frac{S_1}{S_0}\right)$$

où :

b est le facteur de gradient de champ magnétique qui détermine l’atténuation de signal due à la diffusion,

S_1 est l’intensité de signal de l’image pondérée en diffusion (b),

S_0 est l’intensité de signal de l’image pondérée en T2 (b_0).

Grâce à cette formule, à chaque pixel de l’image correspond un coefficient de diffusion apparent qui caractérise la mobilité des molécules d’eau (faible ou élevée). Une carte paramétrique d’ADC est reconstruite à partir des images de diffusion et permet de visualiser les zones de diffusion libre

des zones de diffusion restreinte. Le contraste d'une carte ADC est inversé par rapport à l'image de diffusion (Figure 27).

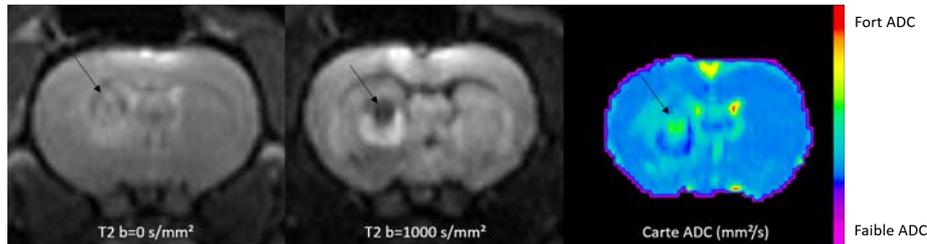


FIGURE 27 – Exemple d'images de diffusion issues de la partie expérimentale de cette thèse. Lors d'une acquisition pondérée en diffusion, une image de référence est acquise avec un $b=0 \text{ s/mm}^2$, puis au moins une image pondérée en diffusion ($b=1000 \text{ s/mm}^2$) est également acquise permettant de construire la carte paramétrique d'ADC d'après $ADC = -\left(\frac{1}{b}\right) \log\left(\frac{S_1}{S_0}\right)$. Sur l'image pondérée en diffusion, le liquide céphalorachidien où la mobilité des molécules est très peu contrainte, présente une chute de signal. Il est en hypersignal sur la carte ADC. Les flèches noires pointent la tumeur après traitement. L'imagerie de diffusion permet de mettre en avant la composante liquidienne de la tumeur induite par le traitement.

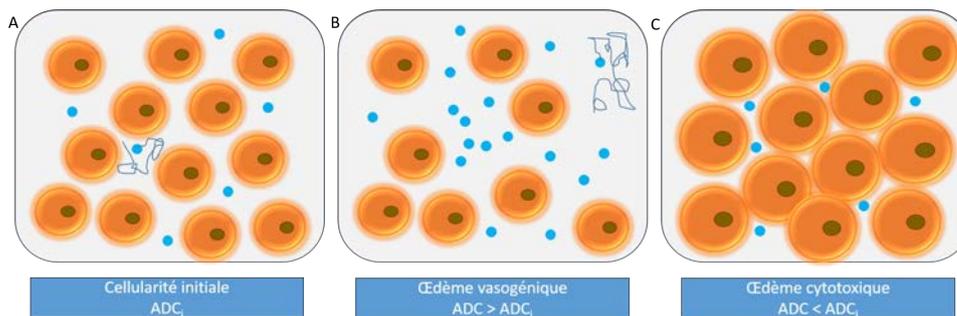


FIGURE 28 – Schéma des phénomènes microscopiques à l'origine de la visualisation en imagerie de diffusion de l'œdème vasogénique et cytotoxique. **A.** Zone cellulaire initiale présentant une cellularité i correspondant à un ADC_i . **B.** Cas d'un œdème vasogénique où une entrée importante d'eau dans le secteur interstitiel est observée après une perméabilisation de la BHE. Une augmentation de l'ADC peut également être observée dans le cas où des cellules sont détruites et leur contenu liquidien relargué dans l'espace interstitiel. **C.** Cas d'un œdème cytotoxique où une entrée d'eau intracellulaire due à un dysfonctionnement des pompes NaK/ATPase est observé. L'espace interstitiel se réduit, limitant la mobilité des molécules d'eau menant à une diminution de l'ADC.

Le signal mesuré sur une séquence d'imagerie de diffusion dépendant de la mobilité des molécules d'eau, l'information contenue dans la carte paramétrique de l'ADC permettra de discriminer plusieurs phénomènes biologiques capables de modifier cette mobilité (Figure 28.A). Une zone présentant une augmentation d'ADC est interprétée, soit comme une zone d'infiltration interstitielle d'eau ou œdème vasogénique due à une altération de la BHE, soit à une destruction cellulaire augmentant le contenu liquidien extracellulaire (Figure 28.B). Une diminution de l'ADC, quant à elle, est synonyme de diminution de l'espace interstitiel due, soit à une augmentation importante du nombre de cellules donc une prolifération intense, soit à une augmentation de la taille des cellules suite à

un œdème cytotoxique (Figure 28.C). L'interprétation de ces cartes va dépendre des informations fournies par les autres séquences IRM et du contexte clinique.

Une dernière notion à prendre en compte dans l'interprétation de l'ADC concerne la dimensionnalité des valeurs d'ADC mesurées. La mobilité des molécules d'eau a lieu dans toutes les directions de l'espace, et pour chaque pixel, c'est un coefficient moyen qui est calculé. Pour plus de précision sur le mouvement de la molécule d'eau, des calculs d'ADC dans 3 ou 6 directions de l'espace sont acquis et permettent de définir les directions préférentielles de déplacements. La plupart des études simplifie l'analyse des cartes paramétriques d'ADC en admettant une diffusion isotropique dans toutes les directions de l'espace [155] [156].

L'imagerie de diffusion est assez répandue en usage clinique bien qu'aucun consensus sur son utilisation n'ait abouti [157]. Pour l'instant, son usage concerne le diagnostic pour définir le grade tumoral et la cellularité, les atteintes post-opératoires, la formation d'œdèmes, et les atteintes aux faisceaux de fibres blanches (grâce à la capacité de l'imagerie de diffusion à montrer le déplacement préférentiel des molécules d'eau). [158].

En ce qui concerne le suivi de la réponse à la PDT, l'ADC a surtout été utilisé comme un indicateur précoce de la réponse au traitement de différents types de tumeurs sur des modèles précliniques *in vivo* (Tableau 7).

En clinique, la valeur de l'ADC au niveau diagnostic, pronostic et suivi du traitement fait aussi l'objet de recherches et d'améliorations [159] [160] [161]. Patterson *et al.* ont d'ailleurs publié une revue bibliographique de la littérature présentant d'après eux la validité de l'ADC pour différentes applications [154]. L'utilisation des valeurs d'ADC pré-thérapie comme valeur pronostic du résultat du traitement n'a pas encore fait ses preuves. En revanche, les études fournissant les résultats les plus solides concernaient deux thèmes principaux : la caractérisation de lésions d'après la cellularité du tissu et la prévision de l'issue clinique d'après les changements précoces d'ADC induits par le traitement.

L'avantage majeur de l'utilisation de l'ADC pour caractériser une lésion repose sur la reproductibilité des valeurs d'ADC d'un individu à l'autre et d'une étude à l'autre car la mesure de l'ADC est indépendante du champ magnétique et de l'opérateur. Les cartes ADC ne sont pas sensibles à l'âge du patient, l'extension de la tumeur ou sa localisation. De plus, aucun agent de contraste n'est requis et l'acquisition est rapide. L'inconvénient reste la moins bonne résolution comparée à d'autres séquences, mais cela peut parfois être corrigé mathématiquement [162].

TABLE 7 – Tableau récapitulatif des paramètres principaux utilisés dans 5 études portant sur le suivi par imagerie de diffusion de la réponse à la PDT

Etude	Modèle animal	Modèle tumoral	Traitement	Suivi IRM	Indicateur précoce de réponse à la PDT
Roth et al., 2004	Souris porteuses de greffe ectopique sous-cutané	Carcinome colorectal C26	5-ALA-PDT 200 mg/kg iv. IDL : 2-3 h 360 J/cm ²	IRM : 0,5 T T2 DWI	$\Delta R_b = \Delta R_{0f} - \Delta R_{0i}$ Changement dans l'indice de diffusion 1-2 jours post-PDT
Plaks et al., 2004	Souris <i>nude</i> porteuses de xenogreffe ectopique sous-cutané	Adéno-carcinome humain de prostate WISH-PC14	Tookad-PDT 10 mg/kg iv. IDL : 0 h 108 J/cm ²	IRM : 4,7 T Scout DWI	Augmentation ADC 48 h post-PDT: 699 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ à t_0 vs 1256 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ à t_{48}
Wang et al., 2010	Souris <i>nude</i> porteuses de xenogreffe ectopique sous-cutané	Adéno-carcinome humain de prostate CWR22	Phtalocyanine4-PDT 0,6 mg/kg iv. IDL : 48 h 150 J/cm ²	IRM : 9,4 T DWI	Augmentation de l'ADC 24 h post-PDT 511 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ à t_0 vs 754 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ à t_{24}

5-ALA: Acide 5 aminolévulinique; IDL: Intervalle drogue lumière; DWI: *Diffusion weighted Images*; iv: injection intraveineuse

3.4.3 Carte paramétrique de T2*

L'imagerie des hémorragies en IRM repose sur l'utilisation de séquences pondérées en T2 étoile (T2*). Pour rappel, pour chaque proton de l'eau, la relaxation transversale est différente selon son propre voisinage protonique, causant des déphasages irréversibles et différents pour chaque spin de proton en fonction de son micro-environnement magnétique (voir interaction spin-spin, section 3.2). Ce phénomène est à l'origine de la pondération des images en T2. Les inhomogénéités de champ magnétique, cette fois-ci à une échelle macroscopique (*i.e.* dépendante de la machine) rajoute un effet de déphasage des spins. Les séquences tenant compte de ce phénomène sont pondérées en T2*.

Les séquences pondérées en T2* sont sensibles aux artefacts causés par la présence de substances superparamagnétiques telles que le fer ou le calcium qui entraînent des déphasages de spin très importants et donc une perte de signal sur l'image.

Les cartes paramétriques de T2* sont obtenues grâce à l'acquisition de plusieurs images avec des TE de plus en plus élevés. La diminution du signal en fonction du TE suit une loi exponentielle selon la formule :

$$S(t) = S_0 \exp\left(\frac{-TE}{T2^*}\right)$$

Les séquences pondérées en T2* mettent en avant la présence de deoxyhémoglobine, méthémoglobine et d'hemosidérine (produit de dégradation de l'hémoglobine marquant la phase chronique d'une hémorragie). Les applications cliniques concernent donc la visualisation des hémorragies cérébrales, les malformations artério-veineuses, les hémorragies tumorales, les sidéroses superficielles (causées par l'inhalation de particules de fer), et les anciennes hémorragies intraventriculaires.

Deuxième partie

Intérêt du suivi longitudinal par IRM spectroscopique & de diffusion de la thérapie photodynamique interstitielle

1

Introduction

1.1 Contexte

Le développement de traitements anticancéreux exige des études précliniques *in vivo*. La validation d'un médicament ou d'une stratégie thérapeutique nécessite de définir son impact aux niveaux tissulaire, cellulaire et moléculaire. L'imagerie non invasive du petit animal, notamment l'IRM, s'est énormément développée dans ce contexte. Depuis les années 80, les appareils et les séquences utilisés ont connu un essor considérable, et les systèmes dédiés sont de plus en plus puissants avec de meilleures résolutions spatiale et temporelle et une sensibilité accrue. Ces améliorations techniques permettent aujourd'hui d'accéder rapidement à des données extrêmement précises avec différents niveaux d'informations : morphologiques, fonctionnels, moléculaires. Le grand avantage des techniques d'imageries non invasives réside dans la possibilité d'intégrer une composante temporelle dans la caractérisation d'une réponse biologique en suivant son évolution *in vivo* de manière dynamique (études longitudinales). L'apport de la nanomédecine et le fait de pouvoir proposer des nanomédicaments multifonctionnels, couplant agents de contraste à un principe actif anti-cancéreux, permet à l'imagerie non invasive d'apporter une aide précieuse dans la prise en charge des cancers, le suivi en temps réel de la biodistribution du médicament et la réponse thérapeutique post-traitement [117].

Dans le cadre de notre problématique ayant trait à la validation de l'utilisation de la iPDT, médiée par des nanoparticules multifonctionnelles, appliquée au GBM, l'IRM s'est présentée comme le "candidat" idéal pour caractériser et valider notre approche. L'objectif de cette partie expérimentale a été de caractériser différents niveaux (morphologique, cellulaire, métabolique) de la réponse tumorale post-iPDT, et de déterminer des indicateurs précoces d'efficacité afin de discriminer les individus répondeurs des non-répondeurs. Cette approche n'avait jamais été décrite dans la littérature.

Nous avons réalisé une étude *in vivo* sur un modèle orthotopique de xenogreffe de glioblastome humain (cellule U87) chez le rat *nude*. La quantité de cellules injectées a été optimisée afin d'obtenir des tumeurs d'environ 2 mm de diamètre au moment de l'initiation du traitement. La iPDT a été effectuée 10-11 jours après la greffe tumorale. Les conditions de traitement *i.e.* la concentration en porphyrine, l'énergie et la puissance lumineuse délivrée à la tumeur ont été optimisées d'après un plan d'expériences réalisé au laboratoire [163]. Ces conditions sont les suivantes : illumination à 652 nm pendant 8 min 40 (26 J) à 50 mW en sortie de fibre. L'IDL a, quant à lui, été déterminé d'après le suivi par IRM de la biodistribution des nanoparticules dans la tumeur. Les résultats montrent que, immédiatement après injection, les nanoparticules se situent spécifiquement

dans la tumeur, et que leur concentration reste élevée pendant plus d'une heure. L'IDL a donc été optimisé à une heure.

L'insertion de la fibre de traitement au sein de la tumeur a fait l'objet d'un dépôt de brevet (N° de brevet : 11 55596. 2011) dans la thèse précédente [164]. En effet, l'insertion stéréotaxique de la fibre de traitement, guidée par IRM au sein de la tumeur, a nécessité l'invention d'une ancre crânienne fixée à demeure sur le crâne du rat, et permettant de fixer les coordonnées latérale et dorso-ventrale de la tumeur. Une image IRM pondérée en densité de proton permet de déterminer la nouvelle coordonnée antéro-postérieure pour insérer l'extrémité de la fibre au sein de la tumeur. Une seconde acquisition permet de vérifier le bon positionnement de la fibre.

L'étude longitudinale par IRM a été effectuée avec une IRM 7 teslas dédiée au petit animal. Quatre séquences IRM ont été proposées et évaluées à chaque temps de suivi : une pondérée en T2, en T2*, diffusion, et une séquence de SRM. Six temps d'examens correspondant au pré-traitement, post-traitement et 1, 2, 3 et 7 jours post-traitement ont été enregistrés. L'étude longitudinale a été complétée par une étude en immunohistochimie incluant un marquage KI67 aux temps : pré-traitement, et 1 ou 2 jours post-traitement. Les différentes séquences IRM utilisées ont eu pour but de fournir des indications complémentaires sur la cellularité (imagerie de diffusion), le métabolisme (SRM), la morphologie (T2), les hémorragies (T2*) et interpréter les effets biologiques photo-induits post-iPDT.

1.2 Choix des nanoparticules

Pour justifier auprès des agences et organismes de santé (notamment la Haute Autorité de Santé HAS) les surcoûts associés à l'utilisation de nano-objets pour l'imagerie et/ou le traitement, il est indispensable que le service médical rendu (SMR) et l'amélioration du service médical rendu (ASMR) soient jugés suffisants, conditions qui pourraient être atteintes dans le domaine de la neuro-oncologie, compte tenu de l'issue systématiquement et rapidement fatale des tumeurs cérébrales primitives ou secondaires.

Les nanoparticules se présentent comme des agents de vectorisation performants permettant de tendre vers le photosensibilisateur idéal. En effet, l'encapsulation du photosensibilisateur dans une nanoparticule fonctionnalisable permet d'améliorer sa stabilité, sa solubilité, sa distribution, sa sélectivité, sa clairance et son efficacité photodynamique. De plus, la capacité de fonctionnalisation apporte de nouvelles possibilités pour la nanomédecine, telle que la capacité à réaliser l'imagerie (scanner, IRM) et la thérapie avec un seul agent sélectif de la tumeur.

Dans le cadre du GBM, le développement des nanomédicaments doit aussi tenir compte des contraintes imposées par le franchissement des barrières hémato-encéphalique et hémato-tumorale dans le cadre d'injection systémique.

C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec des nanoparticules multifonctionnelles capables de vectoriser le photosensibilisateur jusqu'au site de la tumeur au niveau intracérébral, sans accumulation indésirable au niveau hépatosplénique et présentant une excrétion rénale majoritaire. De plus, la nanoplateforme arbore la possibilité d'ajouter un agent d'imagerie pour suivre la bio-distribution de l'agent photosensibilisant et sélectionner le moment où l'accumulation est maximale pour traiter la tumeur.

Ces nanoparticules sont composées d'une matrice en polysiloxane sur laquelle sont greffés 7 à 10

atomes de gadolinium chelatés par du DOTA (acide 1,4,7,10-tétra-azacyclododécane - 1,4,7,10-tétra-acétique) afin d'en assurer la biocompatibilité. Un photosensibilisateur, la TPP (5-(4-carboxyphenyl succinimide ester)-10,15,20-triphénylporphyrine) est greffé covalamment à la surface de la matrice par la formation d'une liaison peptidique entre une fonction amine libre de la nanoparticule et une fonction carboxylique de la TPP. Leur diamètre hydrodynamique ne dépasse pas 15 nm.

Elles ont été conçues pour améliorer la furtivité du photosensibilisateur, donc limiter la reconnaissance par le système réticulo-histiocytaire. Elles ont permis d'améliorer la sélectivité passive pour la tumeur en s'accumulant rapidement et préférentiellement au niveau tumoral, immédiatement après injection intraveineuse [117]. Leur petite taille permet également une excrétion rénale rapide limitant une accumulation indésirée dans d'autres organes. De plus, la matrice de polysiloxane permet d'ajouter un peptide de ciblage afin d'adresser activement la nanoparticule à la tumeur [117].

La méthodologie de traitement des données d'imagerie est décrite dans le chapitre suivant, puis les résultats sont ensuite exposés sous forme d'un article accepté dans *Theranostics* (cf. chapitre 3). Enfin, une conclusion générale clôture cette première partie expérimentale.

2

Méthodologie de traitement des données d'imagerie

Ce travail *in vivo* résulte d'une collaboration fructueuse avec la plateforme d'imagerie du vivant de Lille.

Le chronogramme général de l'étude (de la réception des animaux à la fin du suivi longitudinal par imagerie) est présenté en figure 29. Les grandes étapes de chaque session de travail y sont décrites. Chacune a nécessité la greffe orthotopique des tumeurs cérébrales chez le rat *nude* à Nancy, puis leur envoi par transporteur agréé à la plateforme d'imagerie du vivant à Lille. J'ai durant mes nombreux séjours, réalisé la iPDT guidée par IRM (10-11 jours post-greffe), puis assisté le suivi IRM longitudinal de chaque rat ayant lieu pendant 3 jours consécutifs puis à 7 jours. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet Européen EuronanomedII, intitulé PhotoBRAIN, porté par le Pr. Muriel Barberi-Heyob (2015-17).

La séquence de diffusion a été réalisée sur une seule coupe tumorale choisie d'après les images anatomiques pondérées en T2. La coupe d'intérêt est celle sur laquelle la fibre de traitement apparait. L'analyse des données est ensuite décrite dans la figure 30.

La séquence pondérée en T2* utilisée pour observer les microhémorragies a également été acquise sur une seule coupe d'intérêt, la même que celle utilisée pour la séquence d'ADC. La méthodologie d'exploitation des données est détaillée dans la figure 31.

Enfin, les spectres de SRM ont été exploités avec un logiciel libre dédié à la SRM clinique et biomédicale : jMRUI (*java-Magnetic Resonance User Interface* [165] (Figure 32).

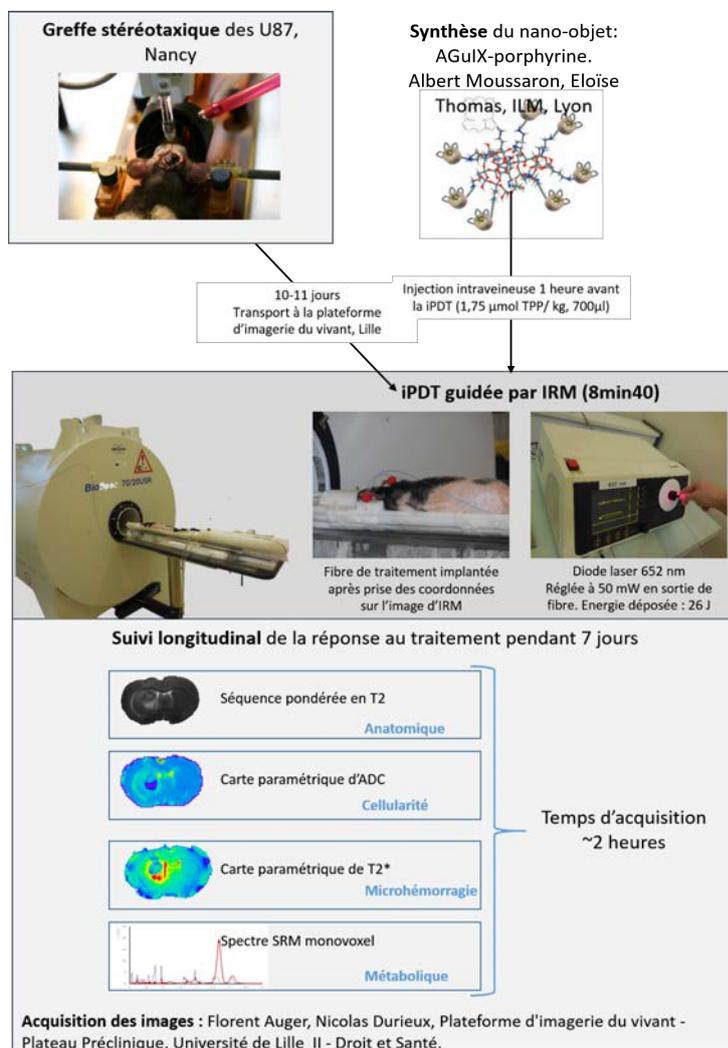


FIGURE 29 – Les greffes stéréotaxiques ont été réalisées à Nancy au sein de l’animalerie du CRAN. Une semaine après la greffe, les animaux sont envoyés à la plateforme d’imagerie du petit animal de l’Université Lille II - Droit Santé. La iPDT est réalisée 10 à 11 jours après la greffe lorsque les tumeurs mesurent environ 2 mm de diamètre. La iPDT est guidée par imagerie et son application nécessite l’injection intraveineuse des nanoparticules AGuIX couplées à la porphyrine, synthétisées à l’ILM-Université Lyon I, une heure avant l’illumination avec une diode laser Biolitec 652 nm et une fibre souple UltraSil de 372 µm de diamètre. L’étude longitudinale par IRM est composée de 4 séquences d’IRM : séquence pondérée en T2 donnant une information morphologique et permettant de mesurer le volume tumoral, une séquence de diffusion donnant une information sur la cellularité de la tumeur à travers l’ADC, une séquence pondérée en T2* permettant de visualiser les microhémorragies et une séquence de SRM fournissant des informations sur le métabolisme tumoral. Les sessions de suivi durent une semaine et ne peuvent pas comporter plus de 3 animaux à la fois.

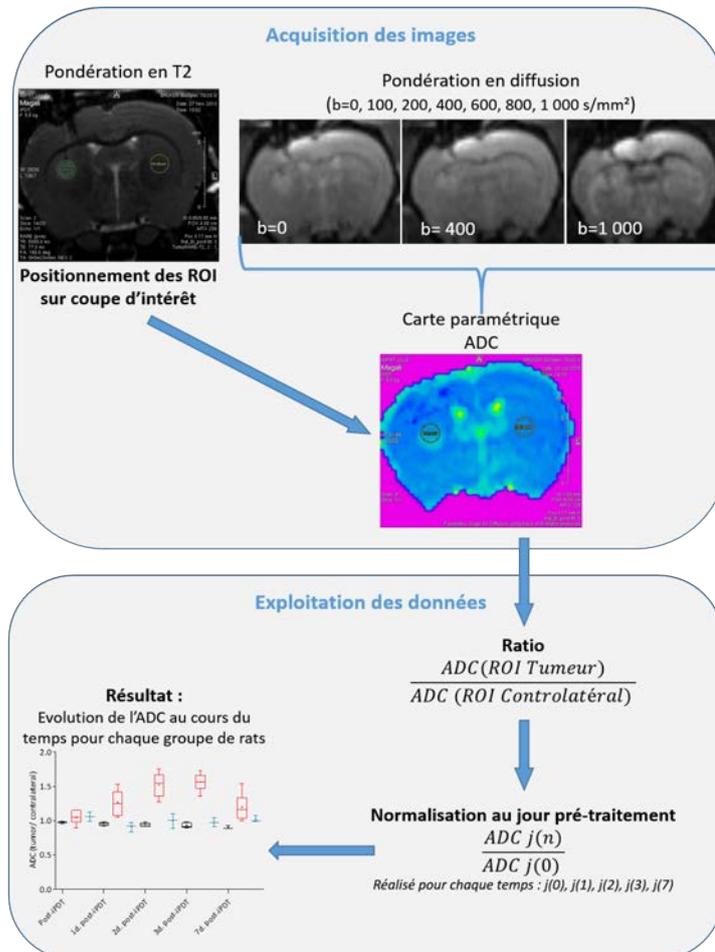


FIGURE 30 – Méthodologie d'analyse des images de diffusion. L'image anatomique pondérée en T2 permet de dessiner les ROI qui seront ensuite positionnées sur la carte paramétrique d'ADC. L'ADC moyen de chaque ROI (ROI de la tumeur et ROI du côté controlatéral) est calculé puis exprimé sous forme d'un ratio. Pour évaluer les variations d'ADC au cours du temps pour chaque temps d'étude (0, 1, 2, 3 et 7 jours post-traitement), le ratio est normalisé à celui du jour pré-traitement. Cette méthodologie est appliquée à chaque rat. Le résultat final présente les variations moyennes de ce ratio d'ADC pour chaque groupe : contrôle, répondeur, non-répondeur.

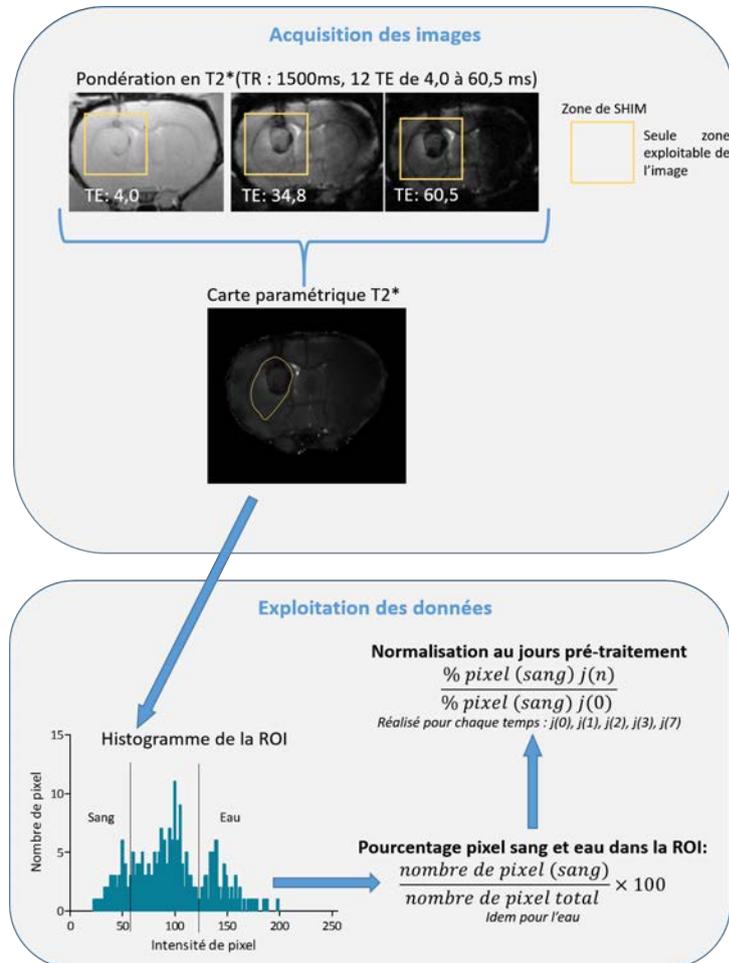


FIGURE 31 – Méthodologie d’analyse des images pondérées en T2*. Les images acquises en pondération T2* ont la particularité de ne pas être exploitables dans leur globalité. Les séquences en T2* étant très sensibles aux inhomogénéités de champ, il a été nécessaire avant toute acquisition d’homogénéiser au maximum le champ (*shim*), ce qui n’est possible que sur une zone réduite de l’image, ici la partie ipsilatérale du cerveau (côté tumoral). Une ROI englobant la tumeur et sa périphérie contenue dans la zone de *shim* a été dessinée sur la carte paramétrique T2*. L’histogramme de la zone a été exporté, l’intensité de chaque pixel est comprise entre 0 et 255, valeurs qui correspondent à un T2*. Un seuillage a été effectué faisant correspondre les valeurs en dessous de 65 à une composante sanguine et les valeurs supérieures à 125 à une composante majoritairement aqueuse. Le pourcentage de pixel associé à une microhémorragie ou à un œdème (présence d’eau) est calculé, puis normalisé au pourcentage du jour pré-traitement. Les résultats expriment ainsi les variations dans le temps du niveau d’hémorragie en fonction de l’état initial de la tumeur. Il en va de même pour le contenu en eau de la ROI.

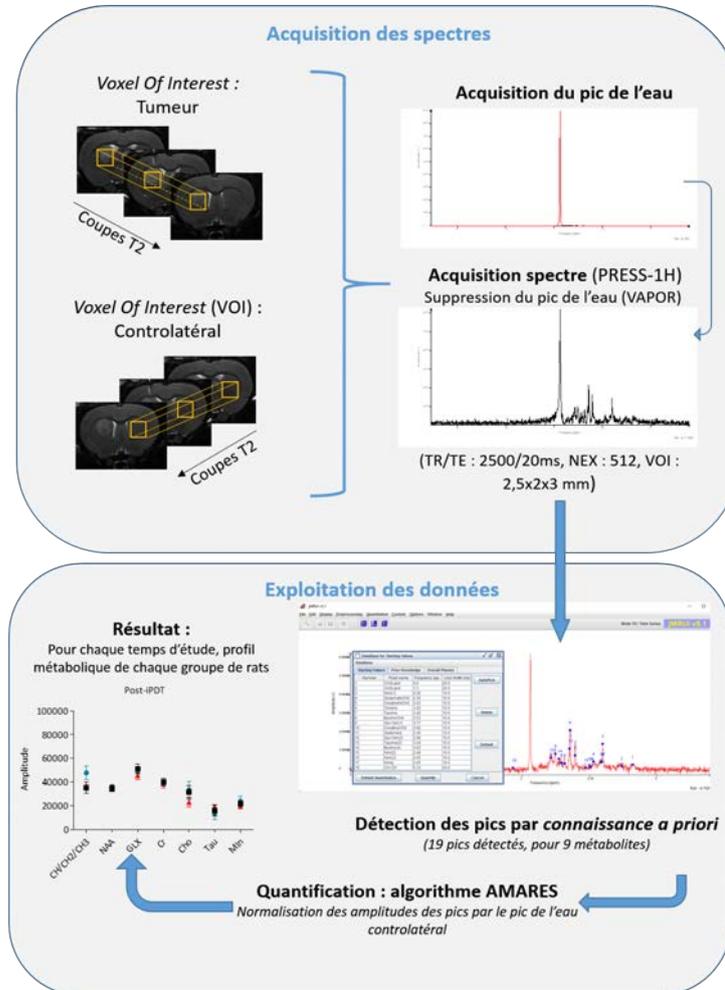


FIGURE 32 – Méthodologie d’analyse des spectres de SRM. Le VOI (Voxel d’Intérêt) a été placé sur les coupes anatomiques pondérées en T2 de manière à éviter les structures adjacentes à la tumeur (corps calleux, cortex, ventricules) ou au striatum controlatéral. La forme et la taille du voxel ne permettant pas de contourner uniquement la tumeur, une partie du voxel analysé contient du tissu "sain" entourant la tumeur. L’opération d’acquisition des spectres a été répétée une fois pour le voxel de la tumeur et une seconde pour le voxel du côté controlatéral. Le pic de l’eau a été acquis, puis l’acquisition réelle du spectre avec suppression du pic de l’eau a été réalisée. La quantité d’eau étant disproportionnée comparée aux autres métabolites, la suppression de son pic permet d’observer les pics des métabolites d’intérêt. Les spectres sont ensuite analysés avec le logiciel jMRUI [166] [167], et l’amplitude des pics de chaque métabolite normalisée à l’amplitude de l’eau du voxel controlatéral. Les variations d’amplitude des métabolites en fonction du temps sont ensuite exprimées pour chaque groupe de rat.

3

Suivi par spectroscopie et diffusion par résonance magnétique pour prédire la réponse au traitement (*Theranostics 2016*)

Malgré de récents progrès dans les approches thérapeutiques conventionnelles, les GBM récidivent localement dans plus de 80% des cas mettant en exergue la nécessité d'un traitement local plus agressif. La iPDT apparaît comme une approche très prometteuse et complémentaire aux thérapies conventionnelles. Dans le but de valider l'utilisation de la iPDT pour les GBM, des indicateurs précoces de l'efficacité de traitement et de l'évolution tumorale demeurent essentiels pour caractériser les effets photo-induits et rationaliser son utilisation notamment pour un traitement fractionné. Le suivi longitudinal de la réponse tumorale à la iPDT par IRM était composé d'une séquence pondérée en T2, en T2*, par imagerie de diffusion et spectroscopique (SRM). L'ensemble a fourni des informations sur la réponse tumorale à un niveau anatomique, cytoarchitectural, vasculaire et métabolique. L'imagerie de diffusion et la SRM permettent dès un jour post-iPDT de distinguer les animaux répondeurs des non-répondeurs grâce aux variations de l'ADC, et au niveau d'expression de la choline, du myo-inositol et des lipides. Il s'agit de la première étude, à notre connaissance, qui rend compte de l'effet de la iPDT sur des GBM en fournissant des indicateurs précoces non invasifs de l'efficacité du traitement.

PROTON MR SPECTROSCOPY AND DIFFUSION MR IMAGING MONITORING TO PREDICT TUMOR RESPONSE TO INTERSTITIAL PHOTODYNAMIC THERAPY FOR GLIOBLASTOMA

Magali Toussaint^{1,2}, Sophie Pinel^{1,2}, Florent Auger³, Nicolas Durieux³, Magalie Thomassin^{1,2}, Eloise Thomas⁶, Albert Moussaron⁶, Dominique Meng^{1,2}, François Plénat^{1,2}, Marine Amouroux^{1,2}, Thierry Bastogne^{1,2}, Céline Frochet^{4,5}, Olivier Tillement⁶, François Lux⁶, Muriel Barberi-Heyob^{1,2}

¹ CRAN UMR 7039, CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, France

² CRAN UMR 7039, Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ Plateforme d'imagerie du vivant - Plateau Préclinique, Université de Lille - Droit et Santé, Lille, France

⁴ LRGP UMR 7274, CNRS, Nancy, France

⁵ LRGP UMR 7274, Université de Lorraine, Nancy, France

⁶ ILM UMR 5306 CNRS, Claude Bernard-University, Lyon, France

Number of text pages, including references: 36

Number of figures: 7

Number of tables: 1

Number of references: 46

Number of words in Abstract: 199

Number of words in Introduction: 902

Number of words in Results & Discussion: 2655

Number of words in Materials & Methods: 2198

Total number of words including Figure legends: 6629

* *Corresponding author*: +33 (0)3 83 68 32 08 : muriel.barberi@univ-lorraine.fr; CRAN UMR 7039 CNRS, Département SBS, Faculté de Médecine - Bâtiment D, 1^{er} étage, 9 avenue de la Forêt de Haye, BP 184, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Acknowledgements: The authors would like to thank Jordane Jasniewski, Philippe Arnoux, and Jean-Baptiste Tylcz for their technical assistances. This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer, Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales, EURONANOMED II "PhotoBrain" project no. ANR-14-ENM2-0001-01.

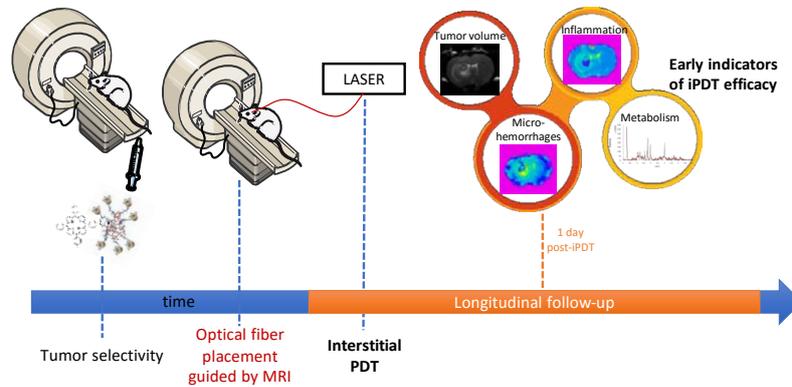
Abbreviations:

ADC: Apparent Diffusion Coefficient; AGuIX: Ultra-small gadolinium based particle; Ang-2: Angiopoietin-2; a.u.: arbitrary unit; BAT: Brain Adjacent Tumor; bFGF: basal Fibroblast Growth Factor; CH/CH₂/CH₃: Lipid(L)/ Lactate; Cho: Choline; Cr: Creatine; D₂O: Deuterium oxide; DGR: Diameter Growth Rate; DLS: Dynamic Light Scattering; DOTA: tetraazacyclo-Dodecane Tetra-acetic Acid; DWI: Diffusion Weighted Imaging; E: Edema; ECM: ExtraCellular Matrix; FGR: Fluorescence-Guided Resection; FLAIR: FLuid Attenuated Inversion Recovery; FLASH: Fast Low-Angle Shot; FOV: Field of View; GBM: Glioblastoma Multiforme; GLX: Glutamine+Glutamate; HBSS: Hank's Buffered Salt Solution; iPDT: interstitial PhotoDynamic Therapy; MIn: Myo Inositol; MRI: Magnetic Resonance Imaging; MMP-2/9: Matrix Metalloproteinase 2/9; ¹H-MRS: Magnetic Resonance Spectroscopy; NAA: N-acetyl-aspartate; NEX: acquisition number; PDD: PhotoDynamic Diagnosis; PDGF: Platelet Derived Growth Factor; PDT: PhotoDynamic Therapy; PET: Positron Emission Tomography; PRESS: Point-Resolved Spectroscopy Sequence; RARE: Rapid Acquisition with relaxation enhancement; ROI: Region Of Interest; ROS: Reactive Oxygen Species; SE-EPI: Spin Echo - Echo Planar Imaging; Tau: Taurine; TE: Echo Time; TR: Repetition time; TGD: Tumor Growth Delay; TPP-COOH: 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrine; VAPOR: VArIable Power Optimized Relaxation delays; Φ_f : fluorescence quantum yield; Φ_Δ : ¹O₂ quantum yield; T2*: T2 star; uPA: urokinase Plasminogen Activator; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; VOI : Voxel Of Interest.

Abstract

Despite recent progress in conventional therapeutic approaches, the vast majority of glioblastoma recur locally, indicating that a more aggressive local therapy is required. Interstitial photodynamic therapy (iPDT) appears as a very promising and complementary approach to conventional therapies. However, an optimal fractionation scheme for iPDT remains the indispensable requirement. To achieve that major goal, we suggested following iPDT tumor response by a non-invasive imaging monitoring. Nude rats bearing intracranial glioblastoma U87MG xenografts were treated by iPDT, just after intravenous injection of AGuIX® nanoparticles, encapsulating PDT and imaging agents. Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) allowed us an original longitudinal follow-up of post-treatment effects to discriminate early predictive markers. We successfully used conventional MRI, T2 star (T2*), Diffusion Weighted Imaging (DWI) and MRS to extract relevant profiles on tissue cytoarchitectural alterations, local vascular disruption and metabolic information on brain tumor biology, achieving earlier assessment of tumor response. From one day post-iPDT, DWI and MRS allowed us to identify promising markers such as the Apparent Diffusion Coefficient (ADC) values,

lipids, choline and myoInositol levels that led us to distinguish iPDT responders from non-responders. All these responses give us warning signs well before the tumor escapes and that the growth would be appreciated.



Keyword: Interstitial photodynamic therapy; Glioblastoma; *In Vivo* non-invasive imaging; Multifunctional nanoparticles; Image guided therapy; Therapy assessment.

Introduction

With a 5-years overall survival rate of about 2%, the medical management of patients with glioblastoma (GBM) requires major improvements [1]. Despite a heavy line of treatments composed of surgery, radiotherapy and chemotherapy unfortunately, a tumor recurrence is always reported [2]. Improvements for the follow-up of the patients will come from new therapeutic approaches as complementary line of treatment. In this context, photodynamic therapy (PDT) stands as an interesting complementary approach for recurrent GBM [3]. Briefly, PDT is a local therapy that uses non ionizing light from a LASER diode to activate a photoactivatable molecule called photosensitizer such as porphyrin or chlorin derivatives. Activation of this photosensitizer requires a suitable wavelength of the light to produce reactive oxygen species (ROS) and free radicals. We previously demonstrated that PDT stimulates the expression of several inflammatory mediators, including tumor necrosis factor- α , IL-6 [4]. Photodynamic therapy causes direct cytotoxicity to malignant cells and also indirect effects upon various non-malignant components of the tumor microenvironment. This action can lead to PDT-mediated

angiogenesis and inflammation, which are emerging as important determinants of PDT responsiveness [4] [5] [6]. In the case of iPDT, the light is fed directly into the tumor tissue, allowing a physical targeting. Unfortunately, biological effects are often limited by the photons propagation; indeed, light penetration through tissues depends on the tissue's specific optical properties [7].

A phase II clinical trial (NCT01966809) was suggested to use PDT for recurrent high grade gliomas in intraoperative to improve the quality of the resection by cleaning up the resection banks. PDT offers a localized treatment approach in which improvements in local control of GBM may result in significant improved survival [8] [9] [10]. However the limitation mainly relies on the difficulty to highlight very early the presence of residual neoplastic cells post-treatment. Indeed, improvements in the relapse detection might help the clinician to a better treatment planning. In the last decade, Magnetic Resonance Imaging (MRI) has become the method of choice for diagnosis, intraoperative guiding and also for the treatment follow-up [11]. The routine MRI sequences used in the clinical practices of GBM are T2/FLAIR and T1 pre- and post-gadolinium injection. Both are suggested for diagnostic, treatment planning and even for intraoperative navigation [12]. Nevertheless, these sequences separately used can lead to misinterpretation and delay in the establishment of the prognosis [13]. Advanced MRI techniques bestow much more relevant information on GBM development such as cellularity, invasiveness, mitotic activity, angiogenesis and necrosis, helping in the glioma grading before treatment and follow-up after treatment [11]. This is the reason why advanced MRI, such as Diffusion Weighted-Imaging (DWI), ¹H-Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) could be excellent tools to characterize and follow-up the tumor response to iPDT.

Bobek-Billewicz *et al.* suggested using DWI to discriminate radiation necrosis from tumor recurrence and to adapt the clinical management more quickly [14]. Indeed, before the resumption of tumor growth or a change in contrast enhancement, molecular changes occur into the tumor tissue and could be detected earlier with other MRI sequences than T1 (pre- and post-gadolinium injection) and T2/FLAIR. DWI remains a very promising MR sequence that allows analyzing water mobility and collates relevant information on tissue architecture at a microscopic level [15] [16] [17][Le-Bihan, D. Diffusion MRI: what water tells us about the brain EMBO Molecular Medicine, 2014, 6, 569-73; Kalpathy-Cramer, J.; Gerstner, E. R.; Emblem, K. E.; Andronesi, O. & Rosen, B. Advanced Magnetic Resonance

Imaging of the Physical Processes in Human Glioblastoma Cancer Res, 2014, 74, 4622-4637; Schaefer, P. W.; Grant, P. E. & Gonzalez, R. G. Diffusion weighted MR Imaging of the Brain Radiology, 2000, 217, 331-45]. Precious additional clinical studies on its utility and effectiveness as prognosis response in cancer treatment have previously concluded that DWI could be suggested as a biomarker, requiring to be tested in more appropriated clinical trials [18]. The T2* weighted imaging is sensitive to the presence of hemoglobin and water content appears hyperintense into the tumor tissue. Mabray *et al.* present this sequence as a tool to follow chronic micro bleeds induced by radiation therapy [19] [20].

Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) offers a wide range of potential prognostic factors, but is still under investigation mainly due to the complexity of the data evaluation. MRS provides important information on tumor metabolism, such as N-acetyl-aspartate (NAA), choline, or creatine levels [21] [22]. This sequence could become a standard and represents a valuable diagnostic tool for evaluation of metabolic changes in intracranial neoplasms after radio surgical treatment [23]. Several studies have already suggested metabolites ratio such as choline/NAA or choline/creatine as an early predictive value in the tumor response after surgery and radiotherapy [24] [25]. Despite the wealth of information gathered by these MRI sequences, the lack of consensus on the methodology makes their routine clinical practice still difficult and under debate.

To demonstrate the feasibility of the iPDT followed by MRI, our team evaluated the potential of AGuIX® multifunctional nanoparticle composed by the combination of MRI contrast agents and a photosensitizer for iPDT [26]. We demonstrated a positive contrast enhancement of the tumor tissue using T1-weighted imaging few minutes post-intravenous (i.v.) injection of these multifunctional nanoparticles. These nanoparticles provide interesting possibilities for new avenues to significantly improve iPDT. The positive contrast enhancement of the tumor tissue allowed us to optimize the optical fiber implantation. Moreover, a judicious choice of iPDT regimens could be suggested to promote iPDT efficiency and to consider a rationalized fractionated treatment. In this original preclinical paper our goal was to characterize by MRS, DWI and T2* the direct and indirect iPDT effects on an orthotopic human GBM model in *nude* rats and to elicit early predictive values of the treatment efficiency. For the first time, we demonstrated the ability of a longitudinal follow-up to characterize the tumor response by structural,

vascular and metabolic ways and unexpectedly, we clearly highlighted the ability to discriminate iPDT non-responding from responding animals.

Materials and Methods

Nanoparticles synthesis: AGuIX[®] nanoparticles were prepared in diethylene glycol (DEG) according to Le Duc *et al* [27]. AGuIX[®] nanoparticles (1500 μmol of Gd^{3+}) were dispersed in water at a pH of 7.4 (3 mL, $[\text{Gd}^{3+}] = 500 \text{ mM}$). After 1 hour, the suspension was heated at 40°C and DEG (12 mL) already heated at 40°C was added. A solution of 5-(4-carboxyphenyl succinimide ester)-10,15,20-triphenylporphyrin (113.4 mg, 150 μmol , 10 Gd^{3+} per TPP) in dimethyl sulfoxide (DMSO) (7.56 mL, $[\text{TPP}] = 15 \text{ mL/mL}$) was added drop by drop to the dispersion of nanoparticles under stirring. The mixture was stirred at 40°C for 12 hours in the dark.

Number of TPP per Gd quantification: Lyophilized nanoparticles were first dispersed in water for one hour at room temperature, $[\text{Gd}^{3+}] = 50 \text{ mM}$ and $\text{pH} = 7.4$. Then the solution was diluted in water to $[\text{Gd}^{3+}] = 0.5 \text{ mM}$ and absorbance measured at 520 nm, 555 nm, 590 nm and 650 nm (Q bands). The nanoparticles solution was diluted to $[\text{Gd}^{3+}] = 27 \mu\text{M}$ in water and absorbance measured at 420 nm (Soret band). The average result gives 14 Gd^{3+} per TPP.

Photophysical properties: Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtaboeuf, France) UV-visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermo stated cell compartment (25°C), using a 450 W Xenon lamp. Fluorescence quantum yields (Φ_f) were determined using a TPP solution as a fluorescence standard. For the direct determination of singlet oxygen quantum yield (Φ_Δ): excitation occurred with a Xe-arc, the light was separated in a SPEX 1680, 0.22 μm double monochromator. The detection at 1270 nm was done through a PTI S/N 1565 monochromator, and the emission was monitored by a liquid nitrogen-cooled Ge-detector model (EO-817L, North Coast Scientific Co).

Dynamic light scattering size and ζ -potential measurements: Direct measurements of the size distribution of the nanoparticles suspended in any medium were performed via Zetasizer NanoS DLS (Dynamic light scattering, laser He-Ne 633 nm) from Malvern Instrument. The ζ -potential of the nanoparticles was also performed *via* a Zetasizer NanoS. Prior to the experiment, the nanoparticles were diluted in an aqueous solution containing 0.01 M NaCl and adjusted to pH 7.4.

U87 Glioblastoma cell culture: U87 glioblastoma cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were maintained in monolayer culture (37°C, 5% CO₂, 95% O₂) in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAN biotech, GmbH, Aidenbach, Germany), 5% penicillin and streptomycin, 1.25% sodium pyruvate, 1% essential amino acid, 0.5% non-essential amino acid, 0.4% vitamins, 1% L-glutamine, L-serine, L-asparagine (Gibco, invitrogen, Saint Aubin, France).

Animals and stereotactic xenograft implantation: Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines. All experiments were performed in accordance with animal care guidelines (Directive 2010/63/EU) and carried out by competent and authorized persons (personal authorization number 54-89 issued by the Department of Veterinary Services) in a registered establishment (establishment number C-54-547-03 issued by the Department of Veterinary Services). Male athymic nude rats (Hsd:RH-Foxn1^{rnu}) were chosen for this study (Envigo, Gannat, France). The rats were used for tumor implantation at age of 8 weeks (180-220 g). During microsurgery (implantation or treatment protocol) and all acquisitions with microimaging, rats were anesthetized with a mixture of air and isoflurane concentrate (1.5-2% depending on the breathing) under sterile conditions. The rats were placed into a Kopf stereotactic frame (900M Kopf Instruments, Tujunga, CA). A midline incision was done and a burr hole was drilled 0.5 mm anterior and 2.7 mm lateral to the bregma. A skull anchor (Patent N° 11 55596) was fixed. $5 \cdot 10^4$ U87 cells were suspended in 5 μ L Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, 1X) and were injected in 4.4 mm into the brain parenchyma with a flow of 0.2 μ L/min using a 10 μ L Hamilton syringe. After injection, the scalp incision was sutured (Suture 6.0 filament) and the surface was antiseptically cleaned.

Nanoparticles preparation for in vivo studies: Nanoparticles were suspended in ultrapure water and NaCl 9% (20:80) to obtain an equivalent concentration of 2.5 mM TPP or 60 mM Gd. Each batch of nanoparticles was buffered in order to obtain an iso-osmolar solution and pH 7.4 and conserved at 5°C. Injected TPP amounted to 1.75 $\mu\text{mol/kg}$ as previously described [26]. The injection solution was prepared by dissolution in 9% NaCl to obtain an injection volume of 600 μL (e.g. 0.525 μmol of TPP or 12.7 μmol of Gd for a body weight of 300 g) and injected, following by 600 μL of 9% NaCl were injected during 1 min.

Interstitial Photodynamic Therapy: The treatment happens 10-12 days after the graft when the tumor reached approximately 2.5 ± 0.5 mm of diameter. The animal was maintained under volatile anesthesia (EZ-7000, WPI, Sarasota, USA) consisting in a mixture of 2% isoflurane (IsoFlo; Axience, Pantin, France) and air during MRI monitoring and treatment. The rats temperature was maintained at 37°C thanks to the heating bed. The blood oxygenation was monitored all along the longitudinal follow-up and did not go down 87%. One hour prior the irradiation, the nanoparticles preparation was injected by intravenous administration in the caudal vein. Then the treatment was performed at 50 mW in fiber output (UltraSil ULS 272; OFS, Norcross, USA), 26 J and 652 ± 1 nm with a laser diode (Biolitec, Jena, Germany). Sham rats received an injection of nanoparticles without photosensitizer one hour prior to iPDT.

MRI-guided iPDT and light delivery: Light delivery fiber was inserted through the skull anchor into the tumor tissue. The fiber tip (272 nm diameter, ULS 272, OFS, Norcross, U.S.A.) delivered the light (652 nm, 50 mw, 8 min 40 s, 26 J). A T1 weighted imaging in the coronal plane (TURBO-RARE, TR/TE : 400/9ms, NEX : 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) as a reference image before the injection of the nanoparticles, and a second T1 weighted MRI in the coronal plane to confirm the presence of nanoparticles and measure the coordinates for the fiber placement were performed. Then A density proton weighted image (TR/TE : 5000/33ms, NEX : 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) was performed before iPDT to control the positioning of the optical fiber inside the brain.

MRI acquisition protocol: The MR experiments were performed on a small animal 7 Teslas magnet (Bruker, Biospec 70/20 USR, Ettlingen Germany). A transmit body coil and a receive head coil were used for all acquisition except for the proton density weighted acquisition where just a transmit/receive body coil was used. The software Paravision 5.1 (Bruker, Ettlingen, Germany) was used to analyze the data. The MRI acquisition protocol was repeated at the eight times of the follow-up: the pre-treatment and post-treatment day (t=0), 1, 2, 3, 4 and 7 days post-treatment. The MRI acquisition protocol was composed by six images sequences and lasts 1h40: T2 weighted imaging (TURBO-Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement TR/TE : 5000/77ms, NEX : 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) in axial and coronal planes to visualize the tumor in hyperintense. Diffusion-Weighted Imaging (DWI) on the slice of interest (Spin Echo-Echo Planar Imaging, TR/TE : 3000/30ms, six b values (100, 200, 400, 600, 800 and 1000 s/mm²), FOV: 4x4 cm, matrix: 128x128, SI: 1mm) defined from the fiber positioning. Taking into account the exponential diffusion signal decay, six b values were selected for a better fitting of the exponential curve. This has all been possible as we were not constrained by the movements of the anaesthetized animals and the duration of the acquisition. An Apparent Diffusion Coefficient map was calculated from the SE-EPI acquisition. This sequence was used to observe the water diffusion of the tissue.

Multi Gradient Echo-T2* acquisition (TR: 1500ms, 12 TE: range from 4 to 60ms, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) was performed on the same slice of interest. A T2* relaxation map was calculated from the T2* acquisition. The Bruker t2vtr-fitting function (Paravision 5, Bruker) based on the equation below was applied to calculate T2* relaxation time as a function of signal intensity and TE values of each image:

$$y = A + C \exp(-t/T2^*)$$

With: A= absolute bias, C= signal intensity, T2*= spin-spin relaxation time All calculated T2* times were given in ms. ¹H-MR spectroscopy PRESS-1H (Point RESolved Spectroscopy) sequence (TR/TE : 2500/20ms, NEX : 512, VOI : 2.5x2x3mm) combined with a water suppression sequence VAPOR (VARIABLE Power Optimized Relaxation delays) are used for acquiring in single voxel spectroscopy one spectrum from a voxel placed on the tumor and another one on the contralateral side. Before MRS and T2* weighted images, a second order shim was performed.

MRI monitoring: The tumor response to the treatment was monitored by MRI from the pre-treatment to 20 days after the treatment. Each MRI session included an anatomical MRI, a diffusion MRI, a T2* MRI and a MRS. MRI sessions were performed just before the treatment, just after the treatment and 1, 2, 3, 7 and 10 days after the treatment. All sequences of one MRI session were carried out consecutively without moving the animal.

Images analysis: The volume of the tumors was achieved with a segmentation software ITK-SNAP 3.0.0 [28]. Mean ADC value of the tumor comes from a ROI which circled the whole tumor on the T2 weighted images and which is then, replaced on the ADC map. The ADC ratios were calculated by dividing the tumor ADC value by the contralateral ADC value. Each ratio was then normalized to the pretreatment ratio. The VOI for MRS was drawn on the T2 weighted images, and included the whole initial tumor volume ($7.2 \pm 3.1 \text{ mm}^3$) and also the brain adjacent to tumor. For the final stages, the whole tumor ($63.1 \pm 56.6 \text{ mm}^3$) was filling the VOI so that the voxel remains focused on tumor. Each brain tissue spectrum was analyzed using jMRUI software with a basis set of prior knowledge containing 17 peaks which correspond to 9 metabolites (Lipids/lactate (CH/CH₂/CH₃), N-Acetyl-Aspartate (NAA), glutamine, glutamate, glutamine-glutamate (GLX), creatine (Cr), choline (Cho), taurine, myo-inositol (MIn)) [29] [30]. The metabolites expression was determined using the water signal as a reference, and therefore all amplitudes were expressed semi quantitatively. AMARES algorithm is used for the quantitation [31]. The proportion of hemorrhage and the proportion of the water compartment came from T2* map. The ROIs have always the same size and enclosed the tumor and its periphery, in order to assess the micro hemorrhages and the water content changes, induced by iPDT, in and around the tumor. An arbitrary threshold was defined to quantify the hemorrhage or the water content. The proportion of hemorrhage or water content was respectively defined as the ratio of the number of pixels under or upper the threshold divided by the total number of pixels.

Light propagation Simulation: The simulation of photon propagation in the tumor volume and healthy tissues was made with Molecular Optical Simulation Environment (MOSE), a simulation platform for optical molecular imaging research co-developed by

Xidian University, Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, China and Virginia Tech–Wake Forest University School of Biomedical Engineering & Sciences, USA. The parameters of the simulation were a sphere of the corresponding diameter for the tumor, a cube of 4 mm side for the healthy brain, a flat cylindrical light source at 652 nm (**Figure 7c and d**). The characterization of optical coefficients in various biological tissues of different species exists in the literature. However, there are very few studies evaluating these coefficients *in vivo*, and let alone in presence of nanoparticles. We used a method developed by our group to estimate the *in vivo* optical parameters. The *in vivo* values of the optical coefficients (absorption and scattering μ_a and μ_s , respectively) of subcutaneous U87MG tumors grafted in nude mice with and without AGuIX® nanoparticles were estimated by solving the inverse problem using fast Monte Carlo simulation and experimental spatially resolved diffuse reflectance spectra [32].

Immunohistochemistry: The brains were kept in formol® (CARLO ERBA Reagents S.A.S, Val de Reuil, France) during 10 days. The tissue samples were dehydrated in successive ethanol baths from 70° to 100° to finish in toluene. They were conserved as 5 μ m thick slice in paraffine. Immunohistopathology was performed on deparaffined slices. The unmasking step was performed at 110°C/5min in citrate buffer. To detect tumor cellular proliferation, sections were incubated for one night at room temperature with the primary antibody (rabbit monoclonal antibody anti-Ki67, 1:200 dilution buffer; SP6, RM-9106-S0, S1, NeoMarkers, Labvision). After washing, the slides were incubated for 1 hour with the secondary goat polyclonal antibody anti-rat biotinylated IgG (1:400 dilution in PBS-Tween E0432, Dakocytomation, Denmark). The revelation of secondary biotinylated antibodies was performed with a streptavidin–horseradish peroxidase complex (1 h at room temperature, diluted 1:400 in PBS-Tween, Dakocytomation, Denmark) and the peroxidase substrate (5 min, Vector® NovoRed™ Substrate Kit for peroxidase, HistoGreen, Vector Laboratories, Paris). A hematoxylin counterstaining was performed to visualize the section by optical microscopy (Eclipse E600, Nikon France S.A, Champigny sur Marne, France). ImageJ was used to perform counting. KI67 index is the number of nuclei stained on the number of nuclei unstained, counting on 3 different images, x40 magnification.

In vivo PDT response variables: Following PDT, tumor volume was measured by segmentation on T2 weighted images. For the statistical analysis, we used an innovative approach developed by Bastogne *et al.* and based on the mixed-effect modeling of the tumor responses [33]. Its main advantage is to account for all the tumor kinetics and not only a specific end-point, which allows to significantly enhancing the statistical power of the tests. This method firstly required to define a parametric model of the kinetic response and secondly to determine the values of the model parameters with a maximum likelihood estimator. For the modeling step, originality was also to consider the equivalent diameter instead of the tumor volume. The diameter response generally showed a linear trend and therefore a simpler model [34] [35]. As previously described, an exponential-linear model structure was used:

$$x(t)=1-k_1T(1-e^{-t/T})+k_2(t-\tau)$$

where x is the tumor diameter (D), t is the time variable, k_1, T, k_2, τ are the model parameters to be estimated from the experimental data [33]. This model was implemented in the computational environment Matlab[®] with the toolbox Monolix[®]. Three groups of animals were deduced from this model, a non-treated group (control), a partially treated group (non-responder) and completely treated group (responder). The growth rate k_2 decreased of about 30% versus 57% for the non-responder and responder animals, respectively.

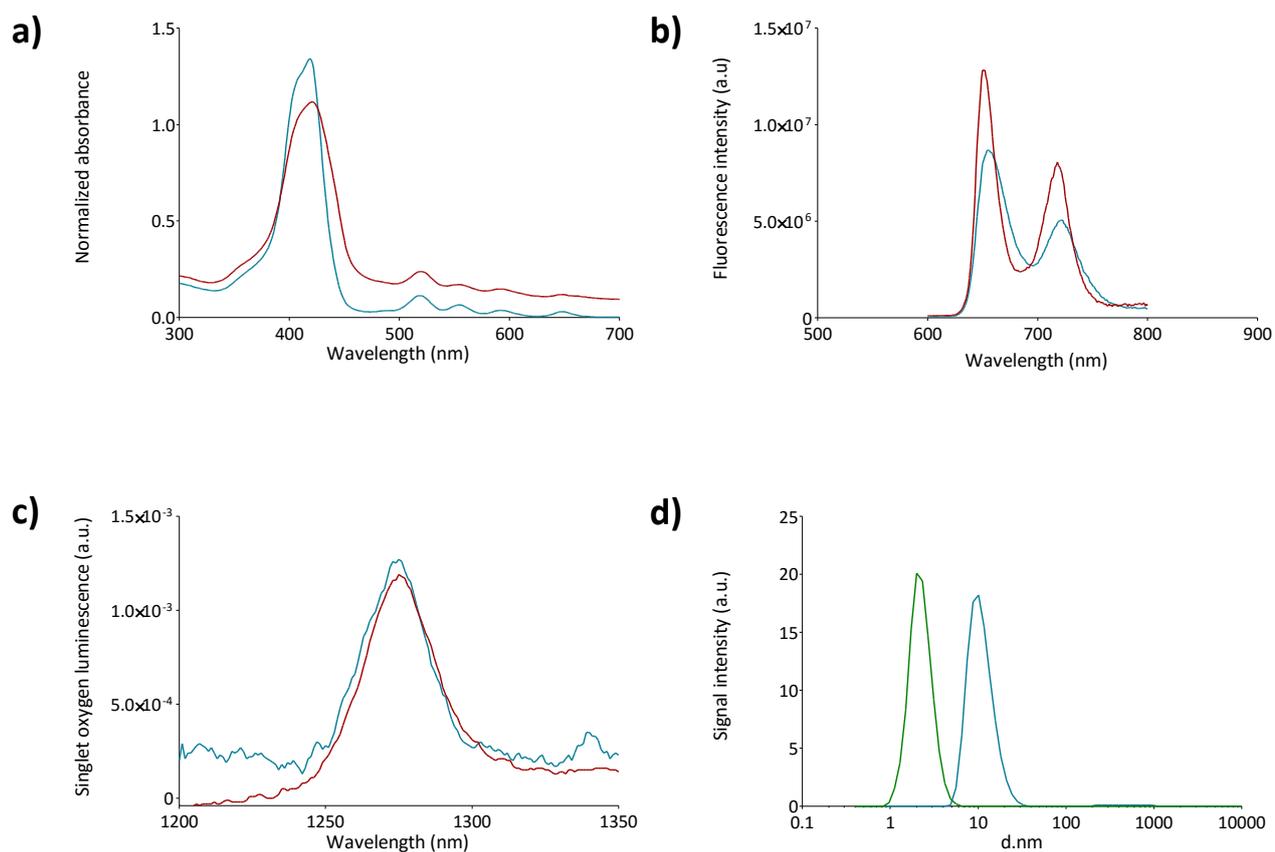
Statistical Analyses:

Data were presented as mean \pm standard deviation (SD). The GraphPad (Prism5.01, San Diego, USA) software was used to perform statistical tests. A non-parametric test Kruskal-Wallis with an additional Dunn's test were suggested to compare the three groups with $p < 0.05$. A log rank test was used for the Kaplan-Meier curves. A non-parametric statistical test, the Mann-Whitney U was also used with $p < 0.05$ or $p < 0.10$.

Results and Discussion

Nanoparticles characterizations

Figure 1 summarizes the chemical and photophysical characterizations of a 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-(triphenyl)porphyrin (TPP) grafted onto AGuIX[®] nanoparticles



e)

Compound	AGuIX	AGuIX-TPP	TPP
Singlet oxygen quantum yield (Φ_{Δ})	-	0.60±0.05	0.61±0.05
Fluorescence quantum yield (Φ_f)	-	0.08±0.05	0.11±0.05
Zeta potential (mV)	19.1±3.7	6.6±2.9	-
Hydrodynamic diameter (nm)	2.0±0.9	11.2±3.9	-

(-) Not measurable

Figure 1. Photophysical properties of the free photosensitizer (TPP in red, in toluene), and after its coupling to the AGuIX nanoparticles (AGuIX-TPP in blue, in D₂O). Absorption *spectra* (a), fluorescence emission *spectra* for the same absorbance ($\lambda_{exc} = 419$ nm) (b) and singlet oxygen emission *spectra* for the same absorbance after excitation at 419 nm (c). Size distribution determined by photon correlation spectroscopy of AGuIX[®] nanoparticles with (in blue) or without TPP (in green) (d). A table summarizing photophysical and chemical characteristics (e).

(AGuIX-TPP) compared to AGuIX[®] alone and TPP molecule. AgulX[®] are sub-5 nm nanoparticles made of a polysiloxane matrix surrounded by gadolinium chelates covalently grafted to the inorganic matrix. The grafting of the TPP was obtained by the formation of a peptide bond between free amino function in the nanoparticle and the NHS ester on the TPP. Fluorescence (**Figure 1a**), absorption (**Figure 1b**) and ¹O₂ luminescence spectra (**Figure 1c**) were assessed in toluene for free TPP and in D₂O for AGuIX-TPP. No significant changes in the quantum yields of fluorescence and ¹O₂ were observed between free TPP or grafted onto AGuIX[®] (**Figure 1e**). We demonstrated that the grafting of the TPP molecule on the AGuIX[®] did not modify its chemical and photophysical properties. Size distribution and zeta potential are given **Figure 1d**. The hydrodynamic diameters were 2.0±0.9 nm and 11.2±3.9 nm for AGuIX[®] and AGuIX-TPP, respectively (**Figure 1d**). The presence of TPP induces a decrease in the surface charge, as measured by zeta potential at pH 7.4. As previously demonstrated, the derivatization of the nanoparticles by tetra azacyclo dodecane tetra acetic acid (DOTA, an active chelator substance) rendered them water soluble in a wide pH range, including pH of biological fluid [26].

Tumor volume and apparent diffusion coefficient (ADC) post-iPDT

Using the same procedure than Bechet *et al.*, the tumor volume visualized by T1-weighted imaging after injection of AGuIX-TPP, was illuminated *via* an optical fiber placed stereotactically into the brain of each rat. To perform iPDT, the optical fiber position was confirmed by a coronal and sagittal proton density-weighted MRI acquisition (**Figure 2a and b**) [26] [36] [37]. The sham rats were represented as control group (*i.e.* rats exposed to light 1 hour post-i.v. injection with AGuIX nanoparticles without photosensitizer). Using AGuIX-TPP nanoparticles, iPDT induced a statistically significant efficiency compared to the control group (**Figure 2c**). GBM tumor cellularity was evaluated by T2-weighted MR images and DWI which provides information on water molecular diffusion. Theoretically, a high cellularity may impede free water diffusion resulting in a reduction of the ADC values [38]. We examined the usefulness of DWI post-iPDT through the evaluation of response patterns based on ADC changes. Unexpectedly, the ADC values based on the entire tumor volume data, did not demonstrate any statistically significant differences between the control and the treated groups (**Figure 2d**). Nevertheless, as soon as 1 day

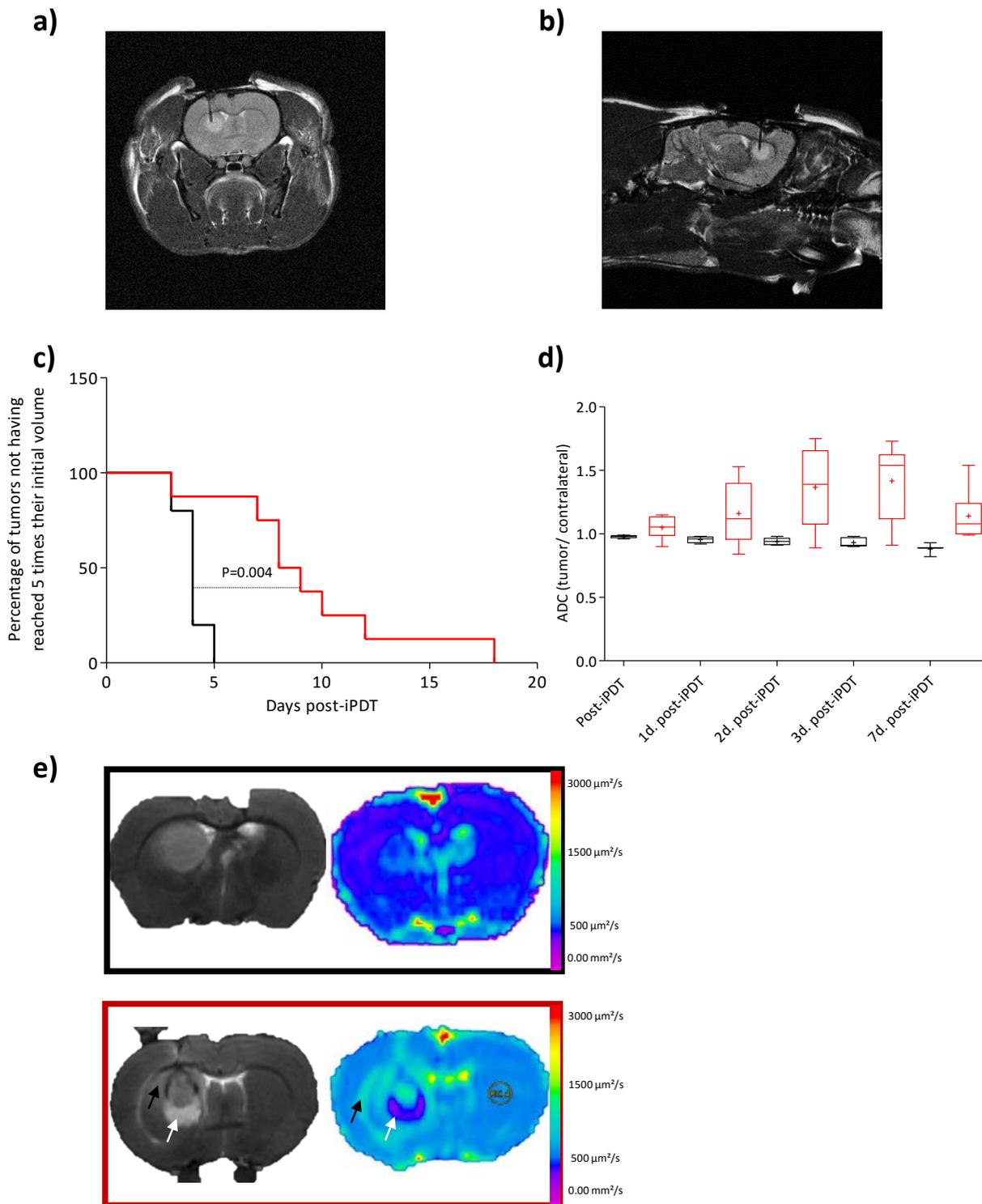


Figure 2. Proton-weighted images (TR/TE : 5000/33ms, NEX : 2, FOV: 4x4 cm, matrix : 256x256, SI: 1 mm) showing the fiber insertion in coronal (a) and sagittal (b) planes. Kaplan-Meier survival curves for control rat (black line) *versus* treated rats (red line) by iPDT (radiant power = 50 mW; radiant energy = 26 J) with AGuIX®-TPP nanoparticles with the endpoint when the tumor volume reached 5 times their initial volume. Statistical analysis was performed using the log-rank test $p=0.003$ (c). Using DWI (TR/TE : 3000/30ms, FOV: 4x4 cm, matrix : 128x128, SI : 1mm) , the post-iPDT evolution of the ADC values in the tumor ROI of the treated rats (red boxes) and control rats (black boxes) (d). T2 weighted images (TR/TE : 5000/77ms, NEX : 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) (left) and ADC map (right) of a representative control rat (black rectangle) and treated rat (red rectangle) 1 day post-iPDT (e). The arrows indicate a representative vasogenic (black arrow) and cytotoxic edema (white arrow) only for the treated group.

post-iPDT, the ADC maps illustrated clearly a difference in the cytoarchitecture of the tumor tissue compared to the control group (**Figure 2e**). Indeed, an inflammatory effect with vasogenic and cytotoxic *edema* was evidenced 1 day post-treatment for the treated group. The hyperintense area of the T2 weighted images matches with the hyposignal area of the ADC map which means a low water mobility, making a finding of cytotoxic *edema*. No induction of the inflammatory effect was evidenced for the control group meaning that the insertion of the optical fiber through the cortex into the tumor led to no disruptive effect and that AGuIX® nanoparticles without photosensitizer were inert material.

MR Imaging of cellularity, *edema* and micro-hemorrhages

Two commonly used characteristics of tumor growth are the tumor growth delay and the tumor volume. We previously suggested the equivalent diameter as a pertinent tumor growth statistic tool that can be used as response variable [33]. Originality was to consider this equivalent diameter (D) instead of the tumor volume. D is a new tumor diameter growth model characterizing early, late and steady-state treatment effects [7]. Indeed, tumor volume and tumor growth delay responses only give quantitative information about the tumor growth at an event point but provide no information about the global behavior of the tumor before or after this event. Using this dynamic model from the experimental data (for details see Experimental section and [33]), we can clearly identify two different profiles of iPDT response concerning the treated group (**Figure 3a**), also underlined using Kaplan-Meier survival curves (**Figure 3b**). Taking into account this discrepancy, we decided to integrate this consideration by comparing the data from MRI analysis between these two sub groups, the responder group (**Figure 3**, red) and the non-responder group (**Figure 3**, blue).

The ADC values of the tumor region of interest (ROI) demonstrated from one to three days post-iPDT firstly, statistically significant differences between the control and responder groups and secondly, statistically significant differences between both treated groups (*i.e.* responder vs. non-responder) (**Figure 3c**). These major results revealed a significantly higher frequency of high ADC values in the responder group, corresponding to a decreased cellularity into the tumor tissue due to the photodynamic effect. This efficiency was not observed in the non-responder group. Interestingly, seven days post-

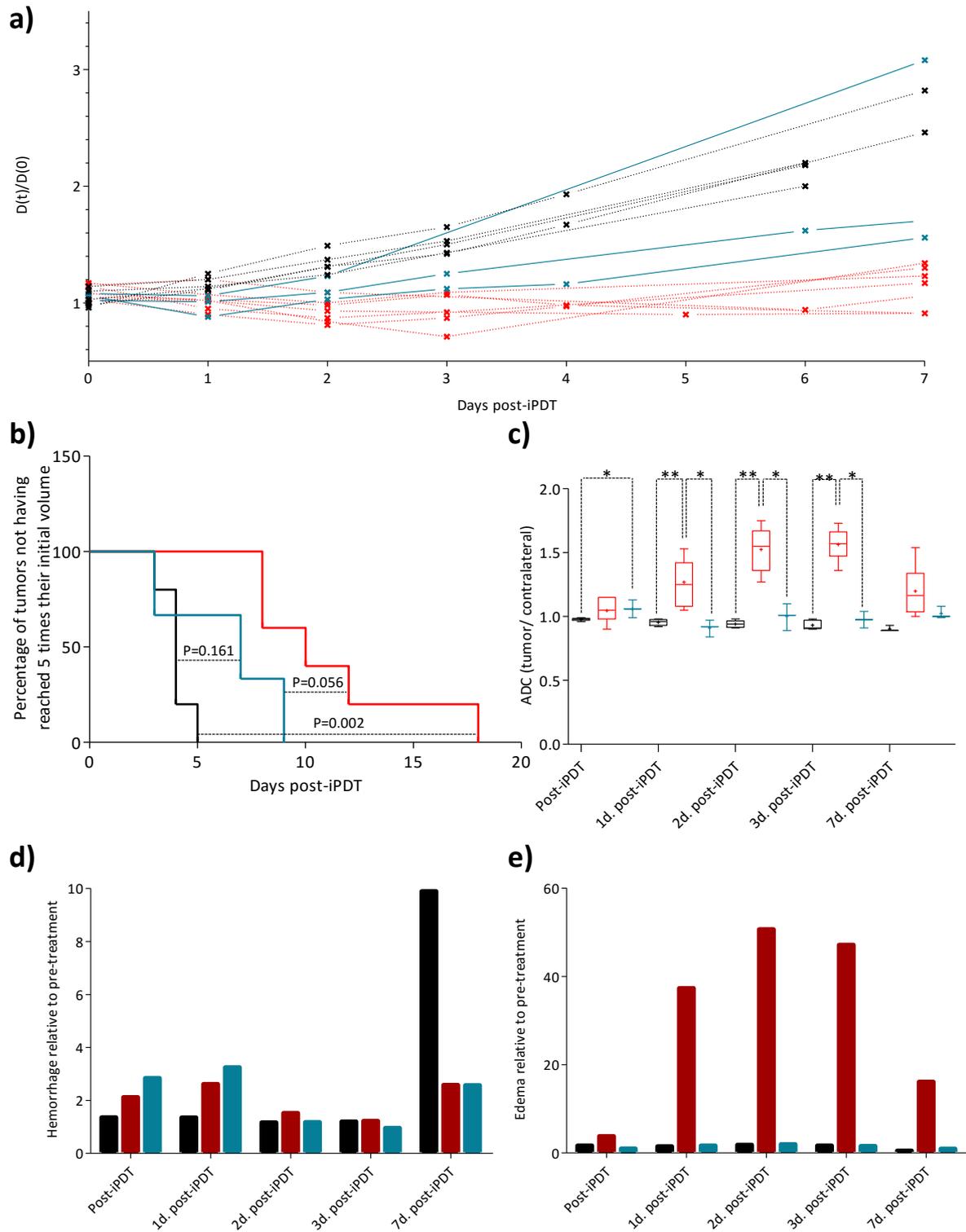


Figure 3: Relative growth kinetics with the theoretical diameter D . Identification of two sub groups in the treated group (for details see Experimental Section *In vivo PDT response variables*) (a). Kaplan-Meier survival curves of U87MG tumors for control (black line), responder (red line), and non-responder (blue line) groups, considering the percentage of tumors not having reached 5 times their initial volume at the end point. Significant difference between responder and control groups is found with a log rank test: $p=0.002$ (b). ADC values relative to the pre-treatment from the tumor ROI of responder group (red boxes) increase significantly compared to control group (black boxes) and non-responder group (blue boxes) (c). The relative rate of hemorrhage normalized to the pre-treatment values comes from T2* map values for the control (black), responder (red) and non-responder (blue) groups (d). The relative rate of edema normalized to the pre-treatment values for the same different groups (e).

iPDT those discrepancies disappeared, meaning that this treatment effect did not remain a discriminant event. Many studies described variations of ADC values related to changes induced by treatments such as radiotherapy [39]. Just after treatment, some studies reported a transient decrease of ADC values due to a vascular collapse and a cell swelling, arising from the reduction of extracellular space [40]. An extracellular edema and a cellular necrosis are events which coincide with an increase of the ADC values [41] [42] [43]. It is also perfectly well described that PDT induces membrane associated damages that occurs *via* protein cross linking and lipid peroxidation. This leads to alterations in membrane permeability with subsequent cellular swelling and lysis, a vascular shutdown and acute inflammatory/immune responses [44]. The early changes in ADC values of the responder group are in accordance with a necrosis process and a release of cell content in the extracellular space, leading to an inflammatory reaction and an increase in vessels permeability.

The major utility of T2* susceptibility sequence in brain tumor imaging is to provide information on radiation induced chronic micro-hemorrhages. Indeed, these sequences are very sensitive to blood products and may be very helpful to depict post-iPDT micro-hemorrhages. As described by [19] [20], susceptibility weighted imaging (SWI) could lead to an improved sensitivity to venous blood and hemorrhage compared to T2* sequence however only T2* weighted magnitude images can succeed to have quantitative T2* values, useful to discriminate states of tissues. For the non-responder group, micro-hemorrhages were observed immediately and 1-day post treatment and for the control group, a marked micro hemorrhagic process about 5-fold higher, appeared in later stage post treatment (**Figure 3d**). GBM is among the most vascularized of all solid tumors, and relies upon angiogenesis for growth and histological progression. A number of proangiogenic factors promote angiogenesis in GBM such as vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and angiopoietin-2 (Ang-2). For instance, overexpression of VEGF can degrade the capillary basement membranes of tumor vessels, causing them to become more permeable and leak plasma fluid and proteins from the intravascular compartment into the brain parenchyma. The extension of the micro-hemorrhages was differently localized between the responder and non-responder groups (**Figure 4a and b**). Non-responder rats described a major hemorrhage on the top of the tumor tissue area, corresponding to

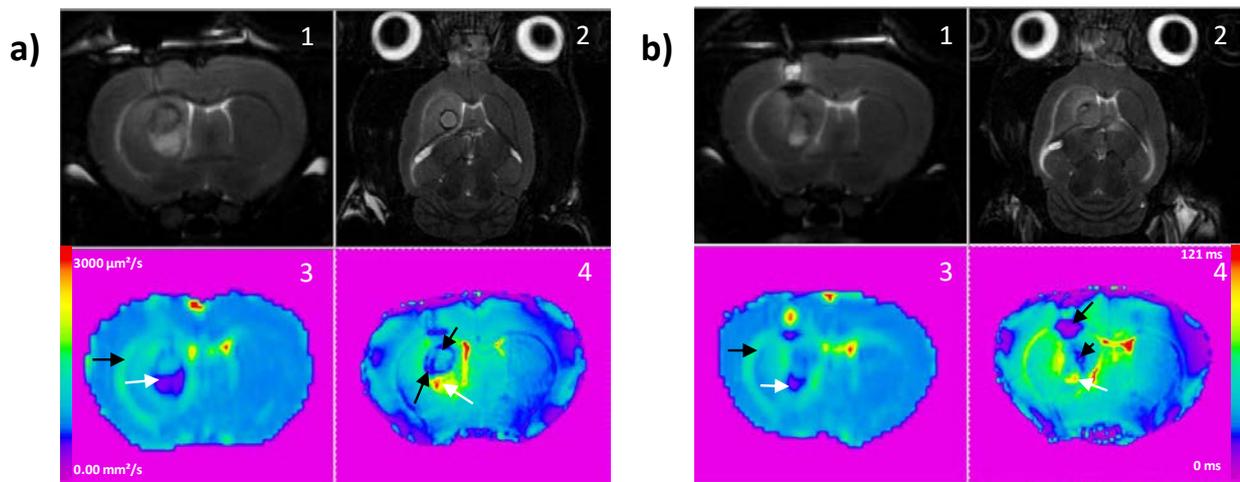


Figure 4: Board of T2 weighted images in coronal (1) and axial (2) planes (TR/TE : 5000/77ms, NEX : 2, FOV : 4x4 cm, matrix : 256x256, SI: 1 mm), ADC and T2* maps for a representative responder rat (a) and a non-responder rat (b). On ADC map (3), black arrows indicate vasogenic *edema* and white arrows cytotoxic *edema*. On T2* map (4), black arrows indicate micro-hemorrhage and white arrows cytotoxic *edema*.

the brain adjacent to tumor (BAT) and a minor one inside compared to responder rats which demonstrated a predominant micro-hemorrhage into the tumor rim.

It is now well established that complex interactions between cancer and stromal cells within the tumor microenvironment play major roles in cancer progression at both the primary and metastatic sites [45]. In GBM, the serine protease urokinase plasminogen activator (uPA), and matrix metalloproteases such as MMP-2/MMP-9 contribute to its invasive growth pattern. Indeed, the invasive growth of GBM relies strongly on the restructuring of the extracellular matrix (ECM). ECM restructuring typically involves three steps, adhesion, degradation and migration, and it is induced by the serine protease uPA and is carried out by plasmin and various MMPs. In the case of GBM, a prominent infiltration zone was created between the solid tumor and normal brain adjacent tissue, containing multiple tumor cell aggregates which could be potentially responsible for recurrent tumor growth. Thus, micro-hemorrhage into the BAT is thought to cause an initial early reversible opening of the brain blood barrier due to activation of MMPs, which is distinct from a delayed secondary opening caused by inflammatory response days later [46]. **Figure 3e** highlights the water content of the tumor tissue and the BAT. With no doubt, according to the DWI images a major inflammatory effect and vasogenic *edema* characterized the responder group.

Metabolic approach by MRS

With the recent advancement of MRS, biologically relevant intracellular metabolites can be detected. This non-invasive imaging with ¹H-MRS, led us to perform analysis of the metabolism of tumor tissue and contralateral hemisphere post-iPDT. This approach allows measurements of metabolites for specific atomic nuclei and their components, including choline-containing components (Cho), creatine (Cr), N-acetyl aspartate (NAA), lipid such as CH/CH₂/CH₃ levels, myo-inositol (MIn), glutamate plus glutamine (GLX), and taurine. For instance, Opstad *et al.* demonstrated that the measurement of taurine in gliomas *in vivo* by non-invasive MRS could be a useful technique for monitoring tumor apoptosis in clinical practice [47]. NAA is a predictor for neuronal integrity since decreased levels are usually observed after brain injury. The second most commonly observed MRS finding after brain tumors is the increased of Cho levels *via* cell membrane disruption and altered phospholipid metabolism, which are biomarkers for

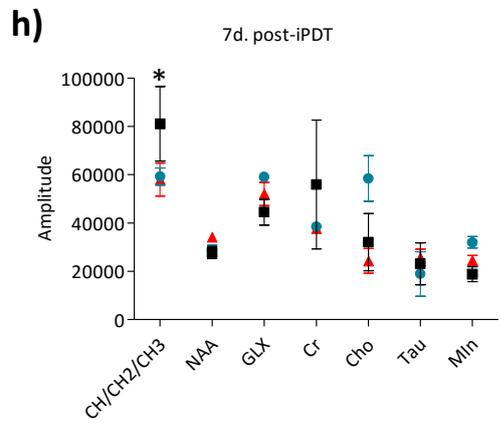
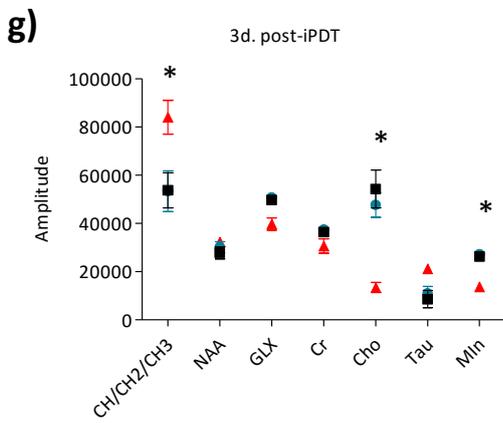
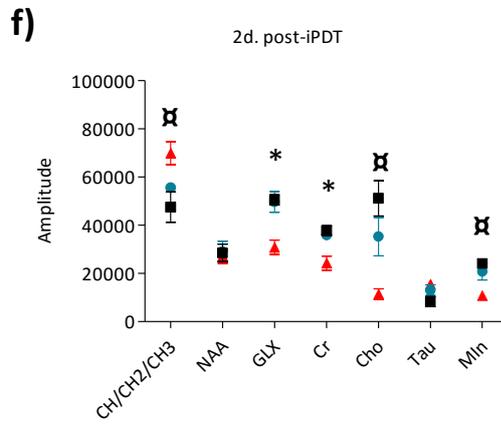
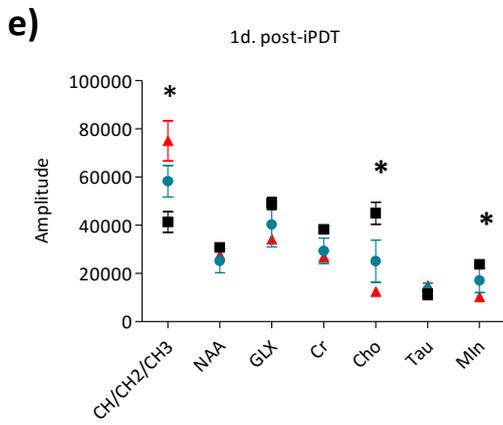
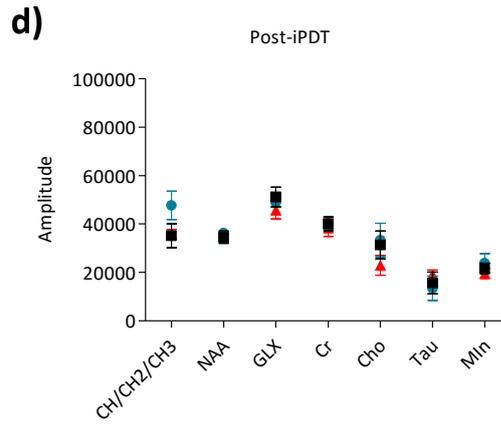
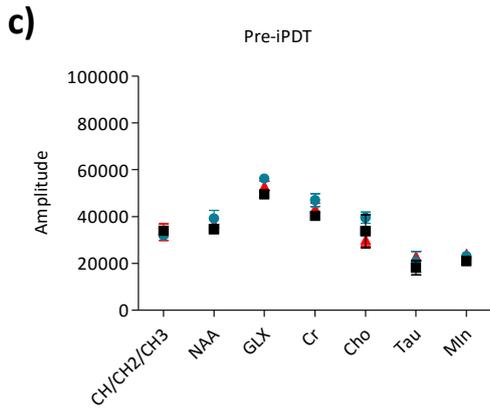
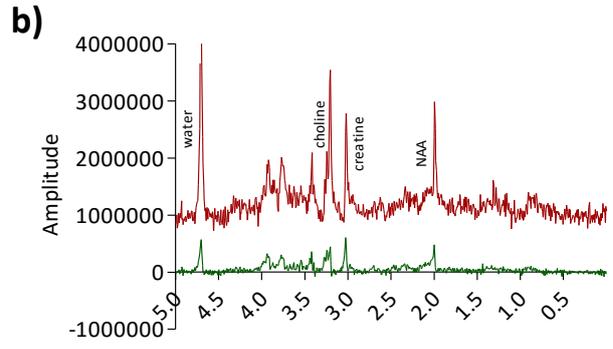
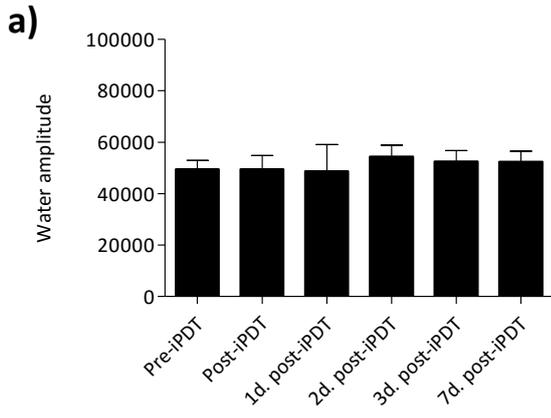
cell membrane turnover [46]. The Cho level may be suggested to predict the malignancy of gliomas. The Cho level has also been found to correlate with the cellular density of tumors and the Cr peak appears to be an indicator of cell energy metabolism and can be used to distinguish pure tumors from pure necrosis. It was described that Cho, lipid and lactate levels normalized to Cr are strong predictors of survival [48].

The stability of metabolites rate in the contralateral side during the longitudinal follow of each rat was also checked to assume that iPDT had no effect on the healthy hemisphere. MRS *spectra* for each rat were acquired from the tumor and contralateral side. The analysis of the MRS *spectra* provided precious information on the metabolic state (**Figure 5**). The metabolite rates were normalized to the water amplitude of the contralateral side, usually used for its low variability [49]. The maximum variation of water amplitude reaches a mean value of 9% between 1 and 2 days post-iPDT (**Figure 5a**). Seven metabolites of the cerebral metabolism devoted all our attention lipid (CH/CH₂/CH₃), NAA, GLX, Cr, Cho, Tau and MIn (**Figure 5b**) and their expression was assessed at different days after iPDT for the three groups (**Figs 4c-h**). As expected, before treatment, all groups displayed comparable levels of each metabolite, considered as a metabolic signature of the tumor tissue (**Figure 5c**).

No significant difference appeared just after iPDT but very interestingly as soon as 1 day post-iPDT, the responder group distinguished itself from control and non-responder groups by the lipid amplitude which was, 2 days post-iPDT, statistically significantly higher whereas Cho and MIn amplitudes were reduced (**Figure 5e**). These discrepancies were accentuated 3 days post-treatment (**Figure 5f and g**).

Figure 5: Metabolic profiles of the three groups. ¹H-MR spectroscopy PRESS-1H sequence for the spectra acquisition were used (TR/TE : 2500/20ms, NEX : 512, VOI : 2.5x2x3mm). The variability of the water amplitude in the contralateral voxel compared day per day. The values vary up to 9% (**a**). The spectra of the tumor voxel (red spectrum) and the contralateral voxel (black spectrum) with the following peaks: CH/CH₂/CH₃ 0.89, 1.31, 5.33; NAA 2.01, 2.49, 2.65, 2.05; glutamine 2.45; glutamate 2.35; GLX 2.35, 2.45, 2.04, 3.76; Cr 3.03, 3.92; Cho 3.22; tau 3.41, 3.24; Min 3.52, 3.63 (**b**). Relative amplitude (/water amplitude) for each metabolite for the responder group (red triangle), non-responder group (blue circle) and control group (black square) just before iPDT (**c**), just after iPDT (**d**), 1 day after iPDT (**e**), 2 days after iPDT (**f**), 3 days after iPDT (**g**) and 7 days after iPDT (**h**). Data are presented as mean ± standard deviation (SD), responder group n=5; non-responder group n=3; control group n=5. A non-parametric Mann-Whitney statistical test was used to compared the responder and non-responder groups with p<0.010 and responder to control groups with p<0.005*.





For the responder group, the lipid level evolution was reversed from 3 days post-iPDT (**Figure 5h**). The observation of elevated lipid levels is believed to be associated with a membrane breakdown; it depicts necrosis process related to an insufficient blood flow leading to ischemia. It could also be the result of anaerobic glycolysis. According to these results, the lipid analysis may be very useful in an early differentiation of the tumor recurrence post-iPDT. Moreover, the hypothesis of a necrosis death pathway was also confirmed by the ADC map, illustrating a major increase in the tumor water mobility in the responder group (**Figure 3c**). After radiotherapy, a lipid signal is also observed and could originate from the change of metabolism of irradiated cells [50]. Kimura *et al.* show that the ratio Cho/lipid was also used in the attempt to diagnose radiation necrosis, describing in that case, a high lipid-dominant peak [51].

We also evidenced that from the first day post-iPDT the relative amplitudes of Cho and MIn metabolites were statistically significantly different for the non-responder group. Choline is involved in the membrane metabolism and its decrease in the responder group indicated a rapid cellular membrane turnover. The third metabolite which emerged was MIn, found in great abundance within glial cells as indicator of the microglial activation and proliferation [52]. MIn is one of nine distinct isomers of inositol. It is found in phospholipids which function as cellular mediators of signal transduction, in metabolic regulation, and growth. Its decrease in the responder group argues the proliferation shutdown.

MRS modality highlights very precious qualitative data on the tumor response mechanisms. Three main metabolites, Lipids, Cho and MIn, could be suggested as early indicator of treatment response.

Vascular effects and proliferation rate

In order to argue the MRI observations, we also performed immunohistochemistry analysis. Histological examination of tissue sections taken from brain tissue 1 day after iPDT indicated an *edema* into both tumor and BAT areas (**Figure 6**). However, only responder rats exhibited a major inflammatory process with neutrophils infiltration (**figure 6a and d**). Li *et al.* also reported that immune response plays a key role in iPDT anti-tumor activity, inducing an increase in immune cells infiltration [53]. **Figure 6b** demonstrated the cell death induction by many apoptotic bodies into the tumor area. In

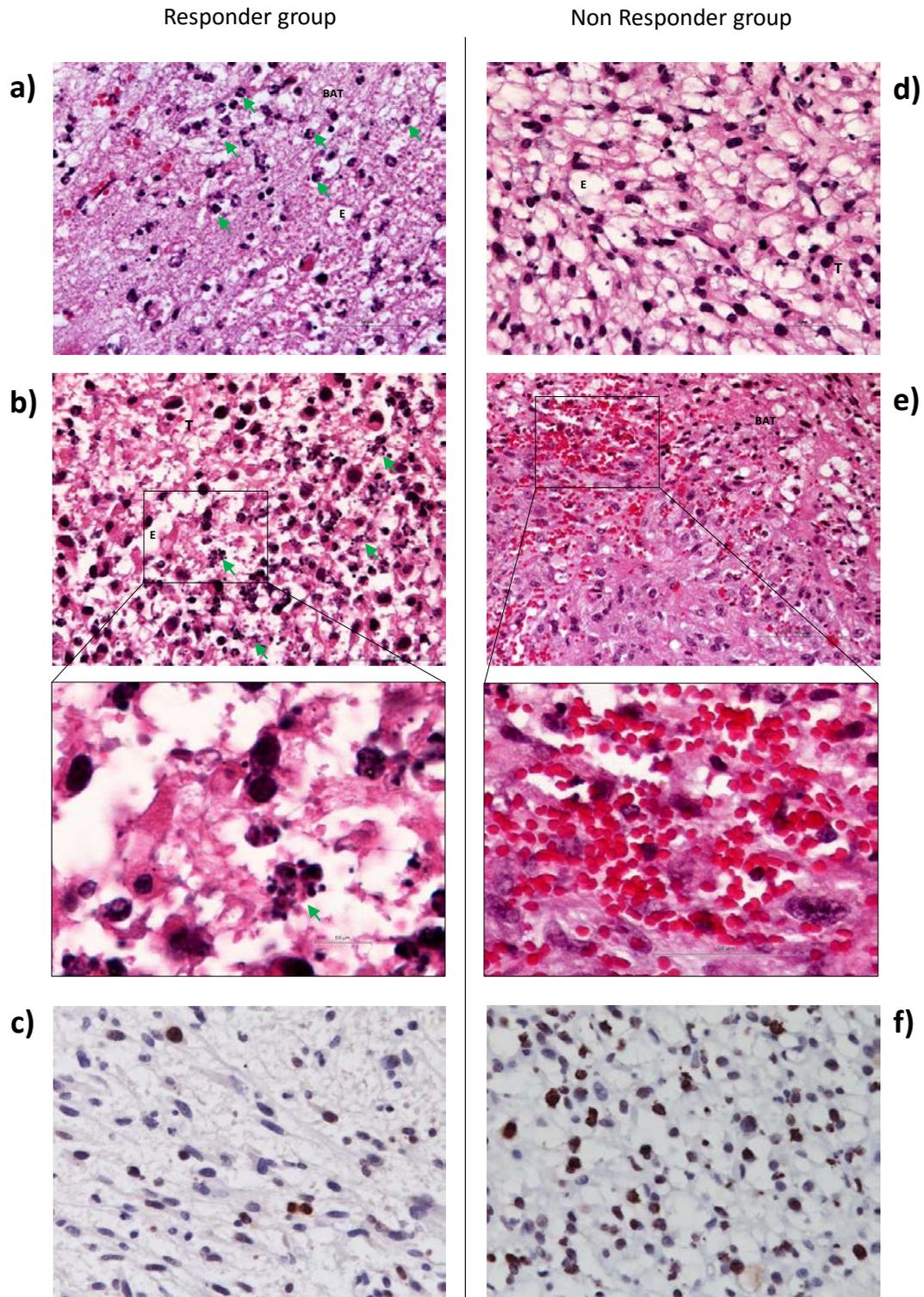


Figure 6: Histological images of U87MG tumor and BAT, 1 day post-iPDT for the responder (left) and non-responder groups (right). Representative *edema* images of hematoxylin-eosin staining indicate in responder group a major neutrophils infiltration (green arrow) (a) and apoptotic bodies (green arrow) (b) versus a lack of neutrophil infiltration (d) and a bleeding process (x40) (e). Representative images of Ki67 staining counterstained with hematoxylin-eosin in responder group (c) and in non-responder group (f). Abbreviations: T: Tumor; BAT: Brain Adjacent to Tumor; E: Edema.

accordance with the decrease of Cho and MIn levels, an intense decrease of Ki67 index was observed into the tumor tissue after iPDT for the responder group around 2 times less compared to the non-responder group (**Figure 6c and f**). For the non-responder group, iPDT induced major micro-hemorrhages into the BAT (**Figure 6e**). This observation is also in accordance with T2* map images.

Monte Carlo simulation of light scattering

To understand the differential tumor response within the treated group (*i.e.* responder and non-responder), we explored the notion of light dosimetry. To take into account the light dose deposition, we performed Monte Carlo simulation under MOSE software. The settings were estimated from our experimental *in vivo* conditions. They concerned the optical properties of the tumor and healthy tissues with AGuIX® nanoparticles, the fiber placement as well as the radiant power, the radiant energy and the light wavelength. Based on the scattering of the emitted photons and due to the optical fiber positioning, we determined that only the tumor tissue of the responder group received a sufficient photodynamic dose to the tumor bulk (**Figure 7**). The isodose curves were deduced by simulation from the light source, corresponding to 80, 60, 40, 20, 10, 5 and 2 % of the initial light dose and to complete these investigations, we also evaluated the percentage of photons into the tumor tissue. We obtained an average of about 71% *versus* 67% (**Figures 7c and 7d**), respectively. This slight difference argues that the positioning of the optical fiber to the ring of the tumor volume could be also a strong contributing factor. Molecular oxygen concentration is heterogeneous within the tumor, due to differences in vascularization and oxygen supply and we previously demonstrated that the margins of the orthotopic human U87 GBM model xenografted in nude rat were more vascularized than its center [26].

The light distribution through the whole tumor volume in deep-seated tumor remains a limiting factor to reach an optimal PDT effect. To complicate matters, its planning depends mainly on photosensitizer concentration, light diffusion and oxygen consumption which can vary during treatment (*e.g.* photobleaching of the photosensitizer, variations of tissue optical properties and of molecular oxygen concentrations due to photochemical consumption during treatment and/or vascular damage). As opposed to chemotherapy, where the main factor is the drug dose, to be

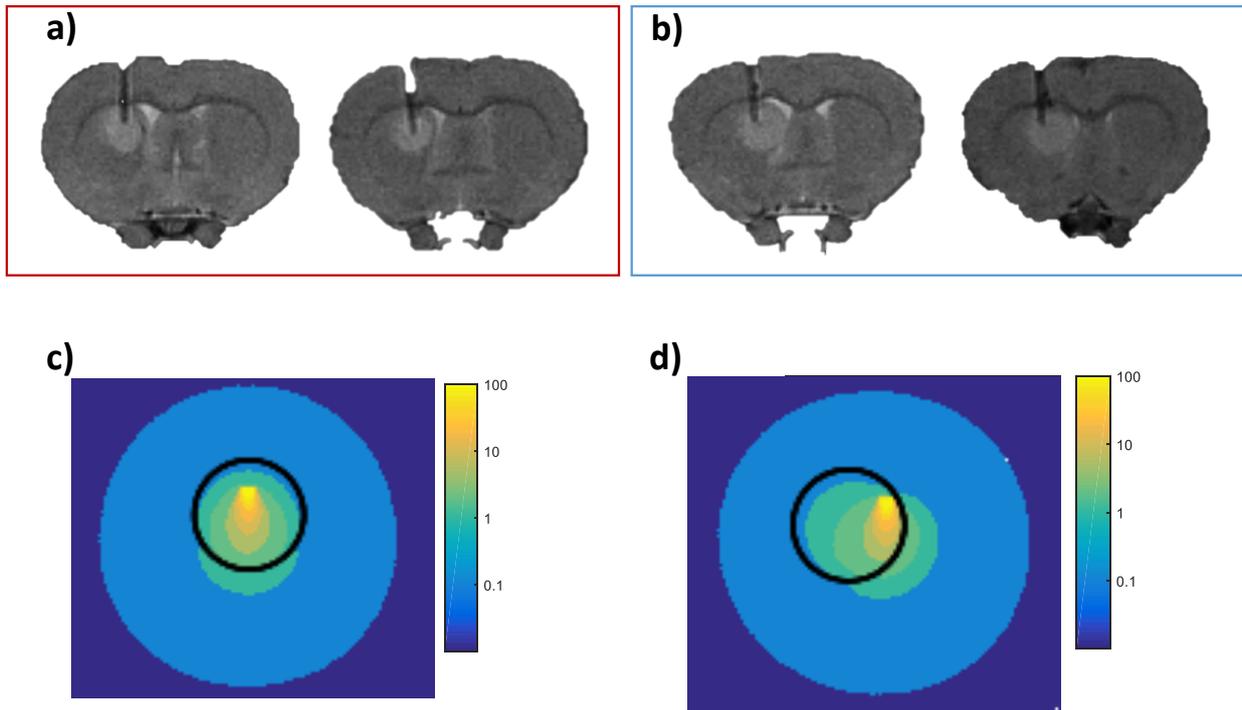


Figure 7: Simulation of the photons propagation. Two illustrative implantations of the fiber positioning into the tumor tissue of responder rats (red block); proton density weighted MRI (TR/TE : 5000/33 ms, NEX : 2, FOV : 4x4 cm, matrix : 256x256, SI : 1 mm) (a), and two other representative optical fiber implantation into the tumor of non-responder group (blue block) (b); proton density weighted MRI (TR/TE : 5000/33 ms, NEX : 2, FOV : 4x4 cm, matrix : 256x256, SI : 1 mm). Monte Carlo simulation of the light scattering through the tumor tissue (sphere of 2 mm diameter (black circle), $\mu_a = 0.094 \text{ mm}^{-1}$ $\mu_s = 6.32 \text{ mm}^{-1}$) and healthy tissue around ($\mu_a = 0.057 \text{ mm}^{-1}$ $\mu_s = 28 \text{ mm}^{-1}$ from [54]) which illustrates the isodoses distribution in the responder group (c) and in the non-responder group (d). Each colored line represents an irradiated volume receiving the same light dose. The isodose curves decrease with the distance from the light source from yellow to blue, corresponding to 80, 60, 40, 20, 10, 5 and 2 % of the initial light dose.

determined by a classical dose escalation methodology, PDT not only is linked to a molecule but is a complex technique wherein several factors (photosensitizer, light dose, and oxygen) interact with each other. A modification of the optical fiber positioning from the center to the ring led to a different photodynamic dose. These difficulties make the determination of the PDT modalities a nonlinear and multivariate optimization problem, and a successful dosimetry strategy has to take into consideration these particular aspects.

Review of results

As previously published by our group, we would like to point out that tumor response post-PDT once again demonstrates the crucial role of light dose deposition [7]. The multimodal MRI approach and MRS allow us to have a better understanding of the early effects induced by AGuIX® nanoparticles after iPDT. We selected the different aspects of the treatment response by their direct or indirect effects. Classically PDT leads to tumor eradication through the direct effect (destruction of tumor cell), and the indirect effect (collapse of tumor vascularization and activation of the immune and inflammatory response). We summarized the longitudinal tumor response in **Table 1**, characterized by a major inflammatory process with a cytotoxic and vasogenic *edema*, an ischemia and antiproliferative activity. The ischemia was validated by the rise in the CH/CH₂/CH₃ level. The antiproliferative effect was also confirmed by the higher level in lipids, the decrease in Cho and Min expression, and Ki67 staining. A necrosis deduced from the high CH/CH₂/CH₃ level and ADC map was also observed, showing an increase of the water mobility in the tumor center.

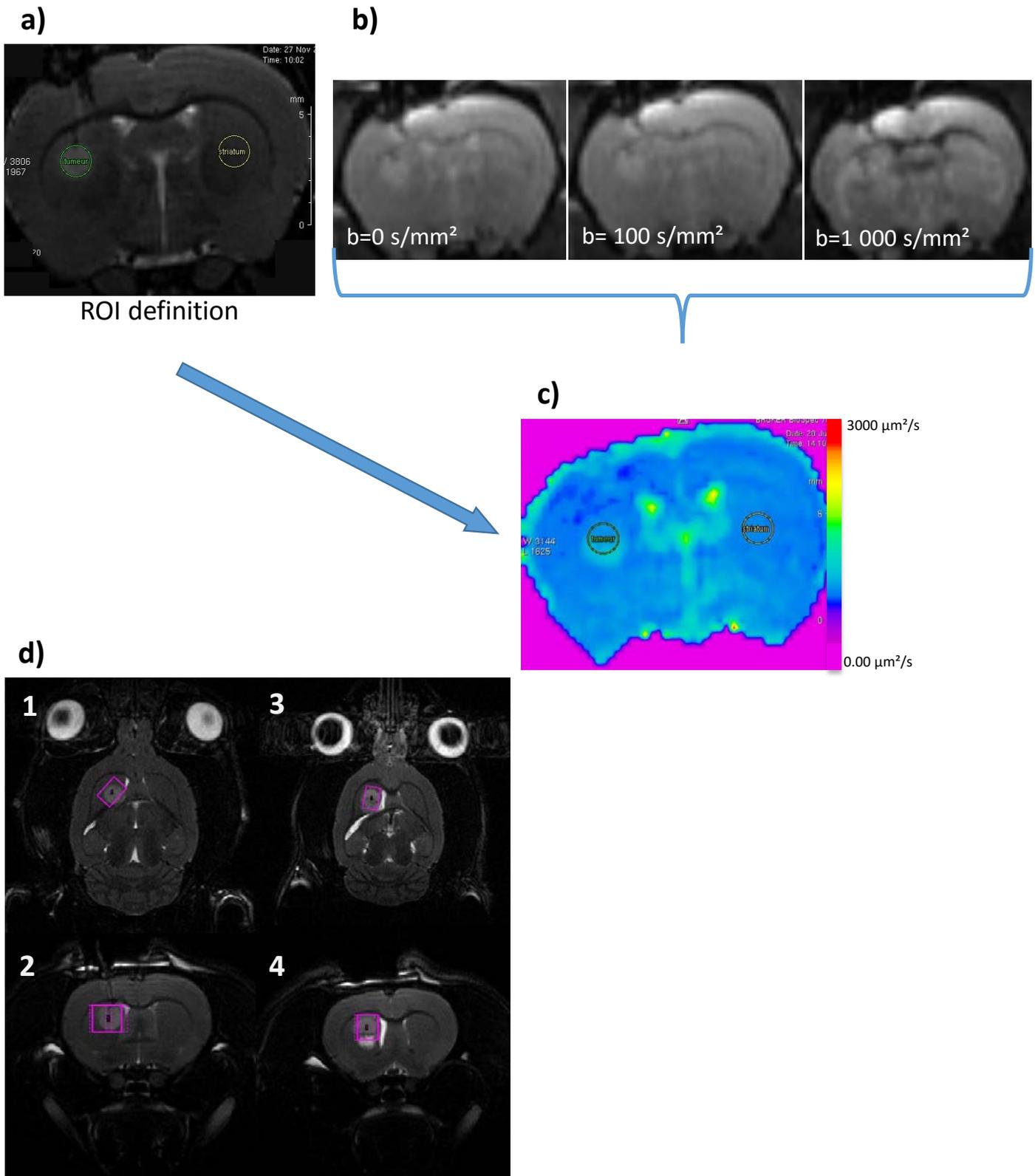
In this original preclinical paper using an orthotopic human GBM model xenografted in nude rats, early predictive values were highlighted using MRI sequences at different times after iPDT. Moreover, with ¹H-MRS, we applied the quantitative spectral analysis to measure and compare metabolites expression before and after iPDT for the tumor tissue and in the healthy contralateral hemisphere. For the first time, we demonstrated the ability of a longitudinal follow-up to characterize the tumor response by structural, vascular and metabolic ways in a time-dependent manner and unexpectedly, we clearly highlighted the ability to discriminate non-responding from responding animals. MR imaging techniques can potentially help evaluate the underlying key histopathological

Table 1 : Summary of photo-induced events during PDT, classified according to their direct (red) or indirect (blue) effects. Level of each indicator is compared in a time dependent manner (1 vs 7 days post-iPDT) and group dependent manner (Sham vs non-responder vs responder).

	Events	Indicators	Indicator level 1d. Post-iPDT			Indicator level 7d. Post-iPDT		
			Sham	Non-Responder	Responder	sham	Non-Responder	Responder
Direct effect	Proliferation rate	Choline	→	→	↓	→	↑	↑
		Myo Inositol	→	→	↓	↓	↑	↑
		KI67 index	→	→	↓	→	ND.	↑
	Tumor cell destruction	CH2/CH3	→	→	↑	↑	→	↓
		ADC values	→	→	↑	→	→	↓
Indirect effect	Vascular damage	Hemorrhage	→	↑	→	↑	→	→
	Immune response	Edema	→	→	↑	→	→	→
		Neutrophils infiltration	HE coloration	No	No	Yes	ND.	ND.

Mention: →, ↑ or ↓ mean respectively stability, increasing or decreasing of indicator level compared to its previous state. ND : not determined.

features of GBM by showing the physiologic changes and metabolic activities, thus improving radiation treatment efficiency. We currently suggest an optimal and rational fractionation scheme for iPDT using these MRI sequences. These functional tools provide a new window to guide and monitor the treatment of gliomas. Application of these imaging techniques could lead to sophisticated and personalized patient care.



Supplementary figure 1: Positioning of ROI or VOI on T2 weighted images. ROI of the tumor and the contralateral side were selected according to the T2 weighted images of the slice of interest (TR/TE : 5000/77ms, NEX : 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) (a), example of three DW images ($b = 0$, 400 and 1000 s/mm²) (TR/TE : 3000/30ms, FOV: 4x4 cm, matrix : 128x128, SI : 1mm) (b); ADC map calculated from DWI, on which ROI are postioned (c), T2 weighted images (TR/TE : 5000/77ms, NEX : 2, FOV: 4x4 cm, matrix: 256x256, SI: 1 mm) in axial (1 and 3) and coronal (2 and 4) plane, showing the positioning of the MRS voxel of interest pre-iPDT (1 and 2) or 7 days post-iPDT (3 and 4) (d). The single slice of interest was selected according to the central position of the treatment optical fiber.

References

- [1] Carlsson s, Brothers S, Wahlestedt C. Emerging treatment strategies for glioblastoma multiforme. *EMBO Mol Med.* 2014; 6 : 1359-70.
- [2] Ducray F, Dutertre G, Ricard D, et al. Advances in adults' gliomas biology, imaging and treatment. *Bull Cancer.* 2010; 97 : 17-36.
- [3] Bechet D, Mordon S, Guillemin F et al. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: a complementary approach to conventional therapies. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40 : 229-41.
- [4] Bechet D, Tirand L, Faivre B et al. Neuropilin-1 Targeting Photosensitization-Induced Early Stages of Thrombosis via Tissue Factor Release. *Pharm. Res.* 2010; 27 : 468-79.
- [5] Tirand L, Frochot C, Vanderesse R et al. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J of Controlled Release.* 2006; 111 : 153-64.
- [6] Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB et al. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* 2011; 3 : 2516-39.
- [7] Tirand L, Bastogne T, Bechet D et al. Response surface methodology: an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 75 : 244-52.
- [8] Stummer W, Beck T, Beyer W, et al. Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. *J Neurooncol.* 2008; 87 : 103-9.
- [9] Stepp H, Beck T, Pongratz T, et al. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007; 26 : 157-64.
- [10] Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler O, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006; 7 : 392-401.
- [11] Kao HW, Chiang SW, Chung HW, et al. Advanced MR Imaging of Gliomas: An Update. *BioMed Research International.* 2013; [Epub ahead of print].
- [12] Frappaz D, Chinot O, Bataillard A, et al. Summary version of the Standards, Options and Recommendations for the management of adult patients with intracranial glioma (2002). *Br. J. Cancer.* 2003; 89 : S73-S83.
- [13] Hygino Da Cruz L, Rodriguez I, Domingues R, et al. Pseudoprogression and Pseudoresponse: Imaging Challenges in the Assessment of Posttreatment Glioma. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2011; 32 : 1978-85.
- [14] Bobek-Billewicz B, Stasik-Pres G, Majchrzak H, et al. Differentiation between brain tumor

recurrence and radiation injury using perfusion, diffusion-weighted imaging and MR spectroscopy. *Folia Neuropathol.* 2010; 48 : 81-92.

- [15] Le-Bihan, D. Diffusion MRI: what water tells us about the brain *EMBO Molecular Medicine*, 2014, 6, 569-73
- [16] Kalpathy-Cramer, J.; Gerstner, E. R.; Emblem, K. E.; Andronesi, O. & Rosen, B. Advanced Magnetic Resonance Imaging of the Physical Processes in Human Glioblastoma *Cancer Res*, 2014, 74, 4622-4637
- [17] Schaefer, P. W.; Grant, P. E. & Gonzalez, R. G. Diffusion weighted MR Imaging of the Brain *Radiology*, 2000, 217, 331-45
- [18] Padhani AR, Liu G, Mu-Koh D, et al. Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging as a Cancer Biomarker: Consensus and Recommendations. *Neoplasia*. 2009; 11 : 102-25.
- [19] Bian W, Hess CP, Chang SM, Nelson SJ, et al. Susceptibility-weighted MR imaging of radiation therapy-induced cerebral microbleeds in patients with glioma: a comparison between 3T and 7T. *Neuroradiology*. 2014; 56 : 91–6.
- [20] Mabray MC, Barajas RF, Cha S. Modern Brain Tumor Imaging. *Brain Tumor Res Treat.* 2015; 3 : 8-23.
- [21] Kwock L, Smith JK, Castillo M, et al. Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology: brain, breast, and prostate cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7 :859-68.
- [22] Wang W, Hu Y, Lu P, et al. Evaluation of the Diagnostic Performance of Magnetic Resonance Spectroscopy in Brain Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Plos one*. 2014; 9 : [Epub ahead of print].
- [23] Benard F, Romsa J, Hustinx R. Imaging gliomas with positron emission tomography and single-photon emission computed tomography. *Semin.Nucl. Med.* 2003; 33 : 148-62.
- [24] Oh J, Henry RG, Pirzkall A, et al. Survival Analysis in Patients With Glioblastoma Multiforme: Predictive Value of Choline-to-N-Acetylaspartate Index, Apparent Diffusion Coefficient, and Relative Cerebral Blood Volume. *J. Magn. Reson. Imaging.* 2004; 19 : 546-54.
- [25] Yu T, Feng Y, Feng X, et al. Prognostic factor from MR spectroscopy in rat with astrocytic tumour during radiation therapy. *B. J. Radiol.* 2015; 88 : 0-10.
- [26] Bechet D, Auger F, Couleaud P, et al. Multifunctional ultrasmall nanoplatfoms for vascular-targeted interstitial photodynamic therapy of brain tumors guided by real-time MRI. *Nanomedicine*. 2015; 11 : 657–70.
- [27] Le Duc G, Roux S, Paruta-Tuarez A, et al. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnol.* 2014; 5 : [Epub ahead of print].
- [28] Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage*. 2006; 31 :

1116–28.

- [29] Naressi A, Couturier C, Castang I, et al. Java-based graphical user interface for MRUI, a software package for quantitation of in vivo/medical magnetic resonance spectroscopy signals. *Comput Biol Med.* 2001; 31 : 269-86.
- [30] Stefan D, Di Cesare F, Andrasescu A, et al. Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals: the jMRUI software package. *Meas. Sci. Technol.* 2009; 20 : 104035.
- [31] Vanhamme L, Van Den Boogaart A, Van Huffel S. Improved method for accurate and efficient quantification of MRS data with use of prior knowledge. *J. Magn. Reson.* 1997; 129 : 35-43.
- [32] Pery E, Blondel W, Thomas C. Monte Carlo modeling of multilayer phantoms with multiple fluorophores: simulation algorithm and experimental validation. *J. Biomed. Opt.* 2002; 14 : 024048.
- [33] Bastogne T, Samson AA, Vallois P, et al. Phenomenological modeling of tumor diameter growth based on a mixed effects model. *J. Theor. Biol.* 2010; 262 : 544-52.
- [34] Mandonnet E, Pallud J, Clatz O, et al. Computational modeling of the WHO grade II glioma dynamics: principles and applications to management paradigm. *Neurosurg. Rev.* 2008; 31 : 263-9.
- [35] Ribba B, Watkin E, Tod M, et al. A model of vascular tumour growth in mice combining longitudinal tumour size data with histological biomarkers. *Eur. J. Cancer.* 2011; 47 : 479-90.
- [36] Tylcz JB, Bastogne T, Benachour H, et al. A Model-based Method of Characterizing the Pharmacokinetics of Engineered Nanoparticles in Pilot Studies. *IEEE J NB.* 2015; 14 : 368-77.
- [37] Benachour A, Seve A, Bastogne T, et al. Multifunctional Peptide-Conjugated Hybrid Silica Nanoparticles for Photo-dynamic Therapy and MRI. *Theranostics.* 2012; 2 : 889-904.
- [38] Hein PA, Eskey CJ, Dunn JF, et al. Diffusion-Weighted Imaging in the Follow-up of Treated High-Grade Gliomas: Tumor Recurrence versus Radiation Injury. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2004; 25 : 201-9.
- [39] Patterson DM, Padhani AR, Collins DJ, et al. Technology Insight: water diffusion MRI a potential new biomarker of response to cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol.* 2008; 5 : 220-33
- [40] Plaks, V, Koudinova N, Nevo U, et al. Photodynamic Therapy of Established Prostatic Adenocarcinoma with TOOKAD: A Biphasic Apparent Diffusion Coefficient Change as Potential Early MRI Response. *Neoplasia.* 2004; 6 : 224-33
- [41] Chenevert TL, Stegman LD, Taylor JMG, et al. Diffusion Magnetic Resonance Imaging: an Early Surrogate Marker of Therapeutic Efficacy in Brain Tumors. *J. Natl. Cancer Inst.,* 2000; 92 : 2029-36

- [42] Hall D, Moffat B, Stojanovska J, et al. Therapeutic efficacy of DTI-015 using diffusion magnetic resonance imaging as an early surrogate marker. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 : 7852-9
- [43] Cui Y., Zhang XP, Sun YS, et al. Apparent Diffusion Coefficient: Potential Imaging Biomarker for Prediction and Early Detection of Response to Chemotherapy in Hepatic Metastases. *Radiology.* 2008; 248 : 894-900
- [44] Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy: PDT Mechanisms. *Clin endosc.* 2013; 46 : 24-9
- [45] Quail D, Joyce J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 2013; 19 : 1423-37.
- [46] Yang Y, Rosenberg GA. Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2011; 42 : 3323-8.
- [47] Opstad K, Bell B, Griffiths J, et al. Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas. *Br. J. Cancer.* 2009; 100 : 789-94.
- [48] Marcus KJ, Astrakas LG, Zurakowski d, et al. Predicting survival of children with CNS tumors using proton magnetic resonance spectroscopic imaging biomarkers. *Int J Oncol.* 2007; 30 : 651-7.
- [49] Meyerand ME, Pipas JM, Mamourian A, et al. Classification of Biopsy-Confirmed Brain Tumors Using Single-Voxel MR Spectroscopy. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 1999; 20 : 117-23.
- [50] Sundgren P. MR Spectroscopy in Radiation Injury. *AJNR: Am. J. Neuroradiol.* 2009; 30 : 1469-76.
- [51] Kimura T, Sako K, Gotoh t, et al. In vivo single-voxel proton Mr Spectroscopi in brain lesion with ring-like enhancement. *NMR biomed.* 2001; 14 : 339-49.
- [52] Galanaud D, Nicoli F, Fur YL, et al. Multimodal magnetic resonance imaging of the central nervous system. *Biochimie.* 2003; 85 : 905-14.
- [53] Li F, Cheng Y, Lu J, et al. Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice: a dependence on the activities of T cells and complement C3. *J Cell Biochem.* 2011; 112 : 3035-43.
- [54] Angell-Petersen E, Spetalen S, Madsen SJ, et al. Influence of light fluence rate on the effects of photodynamic therapy in an orthotopic rat glioma model. *J Neurosurg.* 2006; 104 : 109-17.

4

Conclusion

Dans le cadre du cancer, nous savons que d'un individu à l'autre, la réponse à un même traitement est très variable. Cette différence de réponse provient aussi bien du statut du patient lui-même (âge, sexe, KPS...) que des propriétés intrinsèques de la tumeur (génétique, moléculaire, cellulaire...). Nous nous dirigeons donc de plus en plus vers des thérapies ciblées et personnalisées afin d'atteindre un meilleur taux de réponse aux traitements.

Les techniques par IRM sont donc un moyen évident pour évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement rapidement et adapter la prise en charge du patient au plus vite, si le traitement ne s'avère pas efficace d'emblée.

Nous avons choisi d'utiliser quatre séquences IRM pour évaluer la réponse tumorale au traitement en l'observant à plusieurs niveaux :

- anatomique (localisation et taille *via* les images pondérées en T2)
- cytoarchitectural (cellularité *via* la mesure de l'ADC),
- inflammatoire (oedème vasogénique, cytotoxique, *via* la mesure de l'ADC)
- métabolique (expression de différentes métabolites impliquées dans la prolifération et la mort cellulaire *via* la SRM)
- vasculaire (*via* les cartes de T2* faisant apparaître les microhémorragies),

Les séquences IRM nous permettent de mieux comprendre le déroulement temporel des effets photo-induits et ainsi de définir les événements détectables précocement *i.e.* avant la reprise de croissance et donc d'évaluer l'intérêt de réitérer le traitement si besoin.

Il est bien connu que le suivi conventionnel du volume tumoral seul n'est pas suffisant pour prédire à lui seul l'efficacité d'un traitement [168]. La marge d'erreur sur l'estimation de la taille tumorale est manipulateur-dépendant. Les séquences conventionnelles pondérées T2, FLAIR et T1 avec et sans agent de contraste ne permettent pas de prédire suffisamment tôt le type de réponse tumorale notamment suite à une radiochimiothérapie concomitante, car les zones de rehaussement de contraste ne sont pas spécifiques. Par exemple, un rehaussement de signal transitoire est observé chez 20 à 30% des patients, phénomène appelé pseudoprogression, qui est un effet du traitement et non le signe d'une réelle progression [31]. Il est également important de mentionner que la différenciation entre un rehaussement de contraste dû à une nécrose tissulaire, un oedème cytotoxique ou vasogénique est difficile voire impossible à différencier [141].

Pour l'instant, les critères d'évaluation de la réponse au traitement des GBM reposent surtout sur des mesures de volume tumoral et des régions prenant le contraste après injection d'agent de contraste (RECIST, Mc donald, RANO). Tous ces critères ne permettent pas d'assurer un "verdict" sur les changements induits par le traitement avant 12 semaines car comme nous l'avons mentionné plusieurs

événements biologiques peuvent se dissimuler derrière une même image [140]. *De facto*, la SRM, la diffusion et la T2* apparaissent utiles pour discriminer une progression, d'une nécrose ou d'une récurrence [133].

Beaucoup d'études cliniques suggèrent l'utilisation de l'ADC pour prédire la réponse à un traitement. Smith *et al.* l'utilisent pour distinguer la récurrence tumorale des dommages post-résection induits, Moffat *et al.* la suggèrent dans le cadre de la radiochimiothérapie et sont capables trois semaines après l'initiation du traitement de prédire la réponse volumique [169] [159]. La plupart des études précliniques alliant IRM et PDT ont été faites sur des cancers de la prostate en ectopique, et démontrent dans l'ensemble une augmentation de l'ADC dans les jours suivant le traitement bien que les conditions de traitements soient assez disparates. Les essais précliniques utilisant l'ADC dans des modèles de gliomes ont plutôt visé à évaluer les effets de la radiothérapie ou de la chimiothérapie. A titre d'exemple, Chenevert *et al.* ont mis en évidence sur un modèle de rat que l'ADC était sensible au niveau de destruction induit par des doses croissantes d'agent alkylant (Bis-chloroéthyl nitroso-urée) [160].

Dans notre étude, nous avons montré que les valeurs d'ADC intratumorales augmentaient un jour après traitement et restaient élevées jusqu'à trois jours post-iPDT. Cette augmentation précoce de la mobilité des molécules d'eau apparaît chez les animaux répondeurs, signant un effet direct sur les cellules tumorales, corroborée par l'élévation du pic de lipides/lactate et la diminution de choline en SRM. Il est également intéressant de noter que d'autres variations d'ADC surviennent 1 à 2 jours post-iPDT :

- une première autour de la tumeur, qui correspond à un œdème vasogénique provenant d'une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, et qui facilite l'influx de cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral,
- une seconde sous la tumeur, qui correspond à un œdème cytotoxique, *i.e.* une accumulation anormale de liquide intracellulaire suite au dysfonctionnement des pompes Na^+/K^+ .

Plusieurs études démontrent qu'une augmentation précoce de l'ADC après traitement est un bon facteur pronostic universel *i.e.* applicable à différents types tumoraux et différents types de traitements [170] [157] [171] [172].

Wang *et al.* avancent le même type de réponse après une PDT médiée par une phtalocyanine sur un adénocarcinome de prostate et confirment que l'élévation de l'ADC après traitement constitue une réaction spécifique à la iPDT que nous ne retrouvons pas dans le groupe non-répondeur [155].

L'utilisation de la SRM monovoxel pour fournir des indicateurs précoces de réponse au traitement présente un fort attrait mais reste toujours en attente d'une validation solide. Cette technique d'imagerie reste difficile à standardiser.

Comme nous l'avons dit précédemment, beaucoup d'études utilisent des ratios de métabolites pour exprimer les changements de métabolisme suite à un traitement. Nous avons choisi de présenter l'évolution des métabolites de manière relative à la quantité d'eau dans le voxel controlatéral. Cette référence apparaît plus stable que la créatine utilisée classiquement [145] [146]. L'analyse des spectres SRM du groupe répondeur montre une augmentation des lipides/lactate et une diminution du taux de choline et de myo-inositol dès un jour post-iPDT. Tout comme pour l'ADC ces tendances se maintiennent jusqu'à trois jours post-iPDT et disparaissent à 7 jours au moment où la croissance n'a pas encore totalement repris.

Ce résultat corrobore l'augmentation d'ADC intratumoral, paramètre indicateur d'une nécrose, et sont confirmés par la diminution de l'indice de prolifération cellulaire (marquage KI67) en immuno-

histochimie [144] [173].

Les GBM sont des tumeurs fortement vascularisées, dont la prolifération et la progression dépendent de leur angiogénèse.

La PDT cause des effets directs et indirects, notamment vasculaires, qu'il est important de caractériser. Ces effets dépendent du type de photosensibilisateur utilisé, et se déclinent de la vasoconstriction à la formation de *thrombi*, en passant par la formation de stases du flux sanguin et des fuites vasculaires. Ces événements induisent la formation de zones hypoxiques plus ou moins importantes, dans lesquelles les cellules en souffrance libèrent des facteurs pro-angiogéniques, des cytokines pro- ou anti-inflammatoires.

Des études rapportent des effets bénéfiques suite à l'induction de dommages vasculaires, correspondant à une diminution du flux sanguin qui s'accompagnent de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF α) se traduisant par une augmentation du temps sans progression [77] [174].

Cependant, l'induction d'une trop forte hypoxie par les dommages infligés à la microvascularisation mène également à la surexpression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF et l'angiopoïétine-2, ainsi que des chémokines comme le CXCL12 [175] [176] [177]. La formation de *thrombi* et la libération de VEGF peuvent ensuite conduire indirectement (*i.e. via* le recrutement de cellules myéloïdes) à la dégradation de la matrice extracellulaire par l'activation de metalloprotéinases et de l'urokinase plasminogène (uPA). La libération de ces facteurs promeut l'angiogénèse, la migration cellulaire, et donc la reprise de croissance tumorale [178] [179] [180] [181].

L'analyse des microhémorragies indiquent que dans le cas des animaux répondeurs, les effets vasculaires s'accompagnent d'une nécrose des cellules tumorales et d'effets inflammatoires bénéfiques. Dans le cas des non-répondeurs, les effets vasculaires ne s'accompagnent pas d'effets directs aux cellules tumorales, et ne déclenchent pas d'effets inflammatoires, ce qui se traduit par la poursuite de la croissance tumorale.

La bonne conduite de la iPDT est soumise à plusieurs contraintes [178] :

- la distribution non-homogène de la lumière à travers la zone à traiter,
- la dose suboptimale de photosensibilisateur,
- la dynamique de la réaction photodynamique (consommation d'oxygène, photoblanchiment du photosensibilisateur).

Dans le cas de la iPDT, où la fibre de traitement est amenée au sein même de la tumeur, il nous a paru intéressant d'étudier la distribution théorique des photons au sein du volume tumoral par simulation de Monte Carlo afin d'apporter des éléments de réponse quant aux réponses différentielles à la iPDT du groupe répondeur et non-répondeur.

Les simulations affichent une quantité de photons absorbés par unité de surface plus élevées dans la configuration d'un cas répondeur, que non-répondeur (71% vs 67%). Cependant, il semble surtout que la majorité de la dose ne soit pas délivrée au même endroit. Chez les cas non-répondeurs, les fortes doses de lumières sont délivrées en périphérie de la tumeur, alors que chez les cas répondeurs, elles sont déposées au centre tumoral.

Ces constatations laissent à penser que le déclenchement d'effets antivasculaires isolés ne permettent pas de mener à bien la iPDT, et au contraire, peuvent être source de libération de facteurs pro-tumoraux permettant la reprise tumorale.

Pour conclure, la localisation de la dose de lumière délivrée à la tumeur est essentielle au succès du traitement, mais plus que cela, un apport trop faible en énergie peut mener à une réponse pro-angiogénique promouvant la croissance tumorale. La capacité à contrôler la distribution de la lumière lors de la iPDT semble donc un point crucial dans le développement de la iPDT.

L'IRM de diffusion et la SRM fournissent des indicateurs précoces de la réponse au traitement permettant de différencier les non-répondeurs des répondeurs par l'augmentation de l'ADC un jour post-iPDT suivie de l'augmentation des lipides/lactate et de la diminution de la choline et du myo-inositol évaluées par la SRM. Ces indicateurs précoces fournissent des renseignements pour planifier un schéma de réitération de la iPDT, adapté et personnalisé, en fonction de chaque cas.

Troisième partie

Vers une thérapie bimodale

1

Une nouvelle stratégie pour la thérapie photodynamique des tumeurs profondes

Sommaire

1.1 Solutions actuelles à la limitation de la pénétration de la lumière en thérapie photodynamique	133
1.2 Radiothérapie et thérapie photodynamique (PDTX)	136
1.2.1 Interactions rayonnement-matière	137
1.2.2 Nanoparticules métalliques pour améliorer la radiothérapie (<i>Theranostics 2015</i>)	138
1.2.3 Nanoparticules scintillantes pour la PDTX	157
1.2.4 Complémentarité d'action entre la radiothérapie et la PDT	160

1.1 Solutions actuelles à la limitation de la pénétration de la lumière en thérapie photodynamique

L'utilisation de la PDT sur des tumeurs profondes est limitée par la faible profondeur de pénétration de la lumière visible en milieu biologique. En effet, les milieux biologiques sont composés de chromophores endogènes (principalement, oxyhémoglobine, flavines et mélanine) qui absorbent les rayonnements visibles atténuant fortement la pénétration des photons en fonction de la distance, et réduisant leur rayon d'action. Ainsi, l'efficacité de la PDT décroît avec l'épaisseur de tissu à traverser, augmentant le risque d'un mauvais contrôle local menant à des récives.

Plusieurs stratégies peuvent être suggérées pour améliorer la distribution de la lumière dans les tumeurs profondes.

Ces stratégies reposent sur l'utilisation de nouvelles sources d'excitation du photosensibilisateur capables de pénétrer plus en profondeur dans le tissu afin d'activer le photosensibilisateur quelque soit son éloignement de la source. Trois grandes stratégies sont en cours de développement : l'absorption à deux photons (ADP) et l'*up-conversion* (cf. partie I 2.3.2) qui exploitent les rayonnements infrarouges qui se trouvent dans la fenêtre thérapeutique (entre 700 et 1100 nm) des tissus biologiques, et l'excitation par rayons X, dont le rayonnement est très peu atténué par les tissus biologiques lui permettant d'atteindre les tumeurs profondes facilement. Cependant, l'utilisation de nouvelles sources nécessite la conception de photosensibilisateurs adaptés aux nouvelles modalités d'excitation.

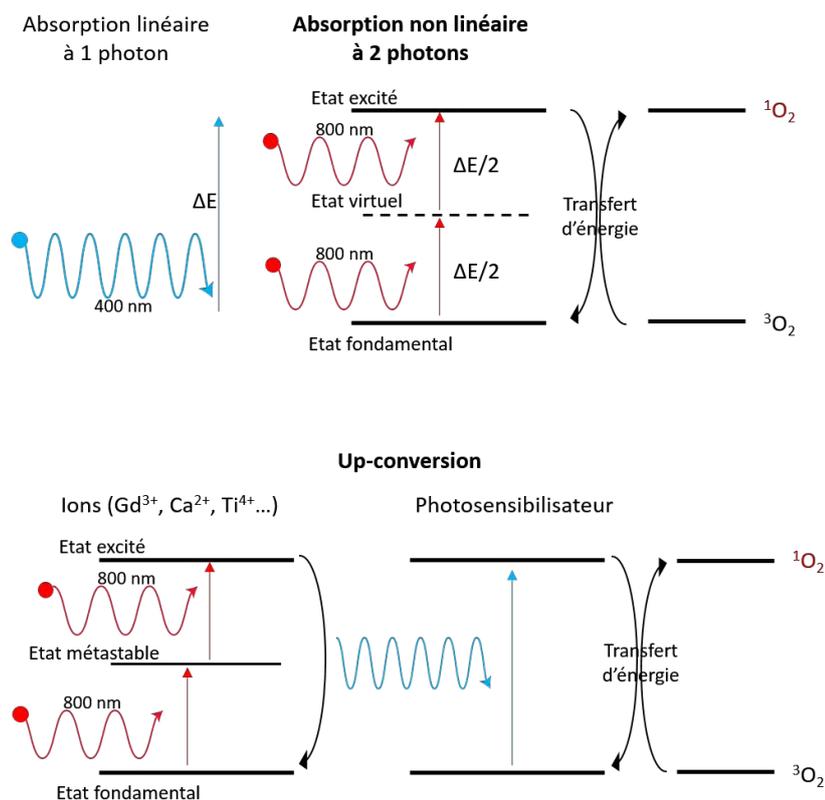


FIGURE 33 – Schéma explicatif du phénomène d'absorption à deux photons (ADP). L'absorption simultanée de deux photons émettant dans le proche infrarouge apportent une énergie équivalente à celle apportée par un seul photon de moindre longueur d'onde (mais d'énergie plus élevée) nécessaire pour que le photosensibilisateur passe de son état fondamental à son état excité. Le photosensibilisateur excité réagit ensuite avec l'oxygène moléculaire du milieu pour former de l'oxygène singulet. Schéma explicatif du phénomène d'*up-conversion*. Un ion de terre rare, d'alcalino-terreux ou de métaux de transition absorbe et stocke l'énergie d'un photon émettant dans l'infrarouge ou le proche infrarouge lui permettant d'atteindre un état excité intermédiaire dit métastable. L'absorption consécutive d'un autre photon émettant dans l'infrarouge ou le proche infrarouge lui permet d'atteindre un état excité supérieur. Par processus anti-Stokes, l'ion lors de sa désexcitation émet un photon de fluorescence de plus grande énergie donc de moindre longueur d'onde dans le visible. L'absorption de ce photon par un photosensibilisateur lui permet de passer dans son état excité et de réagir ensuite avec l'oxygène moléculaire du milieu pour former de l'oxygène singulet.

L'ADP est un phénomène d'optique non linéaire qui consiste en l'absorption simultanée de deux photons de moindres énergies (et donc de longueur d'onde plus élevée) par une molécule dans son état fondamental pour conduire à un état excité de plus haute énergie. La somme de l'énergie des deux photons absorbés correspond à l'énergie nécessaire pour passer de l'état fondamental à l'état excité. Ainsi, il devient possible d'exciter un photosensibilisateur par l'absorption simultanée de deux photons émettant dans le proche infrarouge pour atteindre le même niveau d'excitation qu'avec l'émission d'un seul photon émettant dans le visible (Figure 33). Cependant, la probabilité que le photosensibilisateur absorbe deux photons est très faible. L'utilisation de source laser pulsée ultra-rapide de forte irradiances (de l'ordre du MW - GW / cm²) favorise l'ADP en augmentant le rendement

d'excitation du photosensibilisateur et donc la génération d'ERO. Pour l'amélioration de l'efficacité de l'ADP, des photosensibilisateurs avec une section efficace d'absorption biphotonique (probabilité d'absorption des photons par un fluorophore à une longueur d'onde donnée) plus grande doivent être développés tout en conservant des propriétés de photostabilité, de solubilité et de biocompatibilité rendant leur synthèse difficile [182]. Cependant, l'ADP souffre tout de même d'un mauvais rendement de production d'oxygène singulet, et est une technique hautement résolue spatialement (puisque les deux photons doivent être absorbés simultanément à un même point) qui ne permet pas de traiter de gros volume [91].

L'*up-conversion* (ou conversion ascendante) est un concept plus récent qui nécessite l'utilisation d'UCN (*UpConversion Nanoparticle*) qui peuvent convertir une lumière dans l'infra rouge ou le proche infrarouge en lumière visible pour activer un photosensibilisateur (Figure 33). Ce processus utilise les propriétés de certains matériaux comme les ions trivalents de terre rares (Gd^{3+} , La^{3+} , Y^{3+}), des ions alcalino-terreux (Ca^{2+} , Ba^{2+} et Sr^{2+}) ou des métaux de transition (Ti^{4+} , Zr^{4+}) qui présentent la caractéristique de pouvoir absorber consécutivement plusieurs photons incidents de faible énergie (donc de longueur d'onde élevée) pour émettre un photon de plus haute énergie (donc de longueur d'onde plus faible) par processus d'émission anti-stokes. Ces matériaux possèdent plusieurs états électroniques intermédiaires. Chaque état intermédiaire est atteint par l'absorption d'un photon proche infrarouge supplémentaire, dont l'énergie est stockée. Lors de la désexcitation, l'électron retourne à son état fondamental en émettant un photon d'énergie supérieure (donc de moindre longueur d'onde) qui excite à son tour une molécule (ici le photosensibilisateur) capable d'absorber à la longueur d'onde émise, et donc de générer des ERO par réaction avec l'oxygène environnant [183]. Contrairement à l'ADP, de fortes irradiances ne sont pas nécessaires pour favoriser la réaction d'*up-conversion*, et l'UCN permet de vectoriser le photosensibilisateur. Pour une efficacité optimale d'*up-conversion* et donc une génération optimale de ERO, il est très important que le spectre d'absorption du photosensibilisateur correspondent au spectre d'émission de l'UCN. Tout comme l'ADP, l'utilisation d'une source d'excitation dans le proche infrarouge reste sujette à une atténuation de son rayonnement par le milieu biologique limitant son rayon d'action, et peut ne pas être totalement adaptée à des tumeurs profondes.

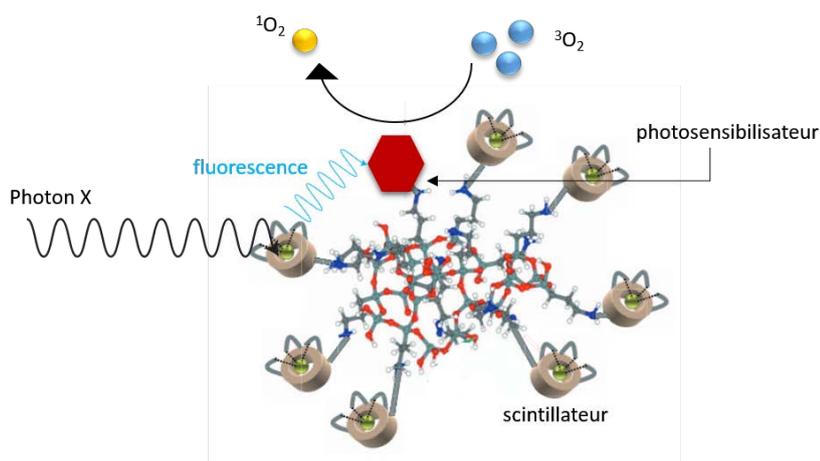


FIGURE 34 – Un photon X incident est absorbé par un atome de lanthanide, qui une fois excité, luminesce dans le visible à une longueur d’onde spécifique. Un photosensibilisateur capable d’absorber le photon émis est alors excité et peut réagir avec l’oxygène moléculaire environnant pour former de l’oxygène singulet.

Le concept d’excitation par rayons X, comme source d’excitation du photosensibilisateur fait appel à l’utilisation de nanoparticules contenant un scintillateur, qui peuvent convertir l’énergie provenant des rayons X en lumière visible et permettent de s’affranchir d’une source lumineuse externe. Le principe repose sur la capacité des rayons X à exciter des matériaux dit scintillants, qui émettent ensuite dans le visible et excitent le photosensibilisateur (Figure 34). Le mécanisme optique est détaillé dans la section suivante. Contrairement à l’ADP ou à l’*up-conversion*, la PDT excitée en X (PDTX) présente un affranchissement total vis-à-vis de la pénétration du rayonnement dans le milieu biologique.

1.2 Radiothérapie et thérapie photodynamique (PDTX)

L’idée de combiner la pénétration des rayons X dans le tissu avec la genèse d’un effet photodynamique est présentée en 1994 par Kokotov *et al.* qui proposent les prémisses des nanoparticules scintillantes [184]. En revanche, l’idée que les porphyrines puissent modifier la sensibilité aux rayonnements ionisants commençait déjà à être évoquée dès les années 50 [185] [186]. Plus récemment, il a en effet été démontré que dans certaines conditions d’irradiations, les photosensibilisateurs pouvaient se comporter comme des radiosensibilisants [187] [188]. Kulka *et al.* ont utilisé le Photofrin II® avec une énergie d’irradiation de 225 kV. Un effet radiosensibilisant a été obtenu uniquement sur les lignées radiorésistantes testées (U373 et RT4) [187]. L’hypothèse avancée portait sur la possibilité d’une interaction entre les oligomères de porphyrines, présents dans le Photofrin II®, et les ERO formées (surtout le radical hydroxyle) générant une nouvelle chaîne de production d’ERO et démultipliant les dégâts causés aux cellules. Bistolfi *et al.* ont, quant à eux, avancé l’hypothèse d’une radioluminescence et d’une radiochemiluminescence rouges, émises lors de l’irradiation. La radioluminescence rouge proviendrait de photons secondaires, d’énergies moindres donc de longueurs d’onde plus grandes, émis à la suite d’interaction entre les rayonnements X et la matière. La radiochemiluminescence rouge proviendrait de la capacité de certaines espèces formées lors de l’irradiation (carbonyls formés lors de l’oxydation d’un acide gras, ou oxygène singulet) à émettre, lors de leur désexcitation, un photon d’une longueur d’onde en adéquation avec le spectre d’absorp-

tion du photosensibilisateur (HpD), menant à son excitation et donc à une augmentation des lésions cellulaires.

Cependant, l'interaction entre le photosensibilisateur et les rayons X est très peu spécifique, rendant la probabilité d'activation de ce premier faible [188]. Une optimisation du mécanisme d'activation est donc indispensable, et la présence d'un transducteur d'énergie, tel qu'un matériau scintillant peut potentiellement améliorer le rendement d'activation du photosensibilisateur lors d'une excitation par des rayons X.

Liu *et al.* démontrent que le complexe scintillant $\text{LaF}_3:\text{Tb-MTCP}$ (méso-tétra(4-carboxyphényl)porphyrine) génère deux fois plus d'oxygène singulet que la MTCP seule, mettant en évidence la nécessité de l'optimisation de l'activation du photosensibilisateur par les rayons X pour une application thérapeutique efficace [189].

1.2.1 Interactions rayonnement-matière

En radiobiologie, les interactions rayonnement-matière sont de trois types selon l'énergie du rayonnement incident et la densité du milieu (Figure 35). On peut observer (Figure 36) :

1. L'effet photoélectrique, qui est prépondérant dans le domaine des faibles énergies, autour de quelques dizaines de keV, est exacerbé par la présence d'atomes avec un numéro atomique élevé (Figure 35). L'effet photoélectrique est caractérisé par une absorption totale de l'énergie d'un photon X incident par un électron des couches profondes qui est alors éjecté, ce qui conduit à l'ionisation de l'atome. L'émission consécutive d'une fluorescence X ou d'un électron Auger s'ensuit lors de la desexcitation de l'atome.
2. L'effet Compton qui est prépondérant pour des énergies supérieures à 100 keV, apparaît lorsque l'énergie du photon X incident est largement supérieure à celle des électrons rencontrés. Lors de la "collision", celui-ci ne cède qu'une partie de son énergie menant à l'éjection d'un photoélectron et à la diffusion d'un photon X de moindre énergie (qui à son tour peut générer des effets photoélectrique ou Compton). L'effet Compton est très peu dépendant du numéro atomique de la matière (Figure 35).
3. L'effet de matérialisation ou création de paires électron-positon nécessite un photon incident avec une énergie supérieure au seuil énergétique pour créer une paire électron-positon soit 1,022MeV [190].

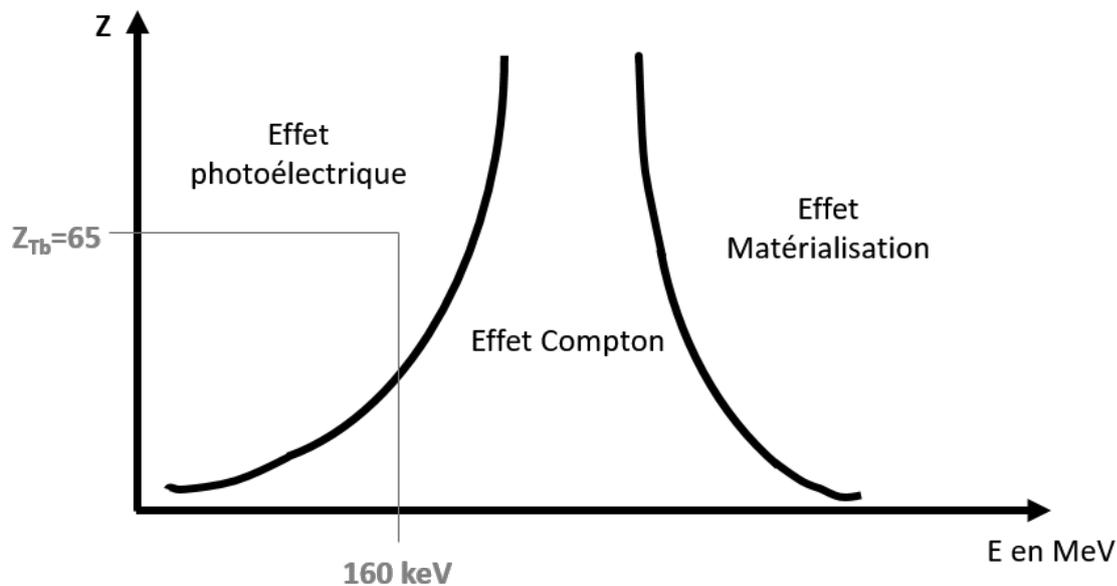
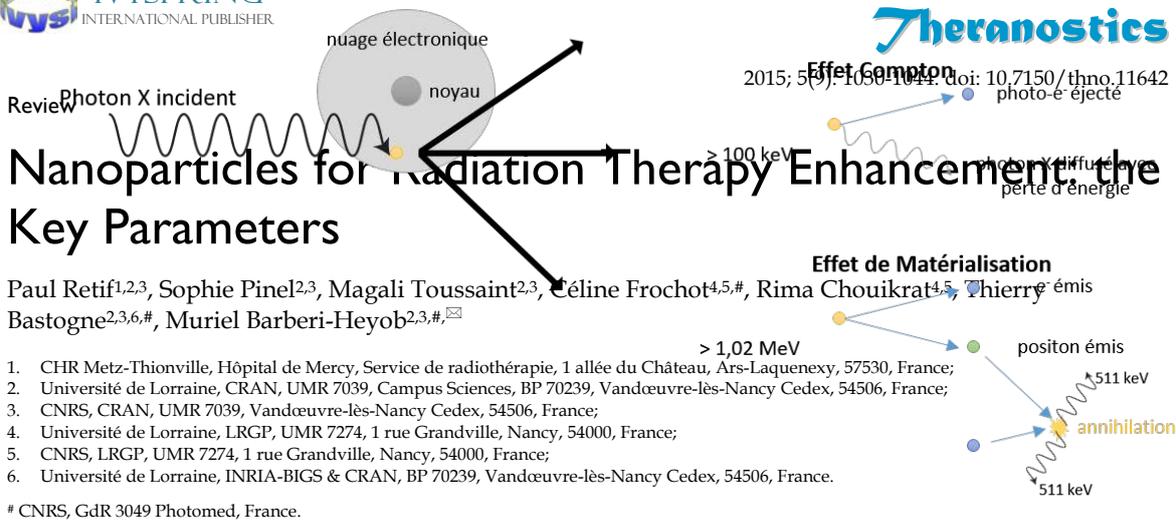


FIGURE 35 – Prépondérance des effets produits lors de l'interaction rayonnements ionisants - matière en fonction du numéro atomique Z de la matière (densité) et de l'énergie du rayonnement incident.

1.2.2 Nanoparticules métalliques pour améliorer la radiothérapie (*Theranostics 2015*)

Cette revue de la littérature présente les stratégies de radiosensibilisation qui reposent sur l'utilisation de nanoparticules à numéro atomique élevé (Z). Elle propose de déterminer les facteurs critiques qui influencent le pouvoir radiosensibilisant de ces nanoparticules métalliques, de décrire les méthodes utilisées pour évaluer leur efficacité, afin d'améliorer le développement de cette stratégie thérapeutique.



Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters

Paul Retif^{1,2,3}, Sophie Pinel^{2,3}, Magali Toussaint^{2,3}, Céline Frochet^{4,5,#}, Rima Choukrat^{4,5}, Thierry Bastogne^{2,3,6,#}, Muriel Barberi-Heyob^{2,3,6,#}

1. CHR Metz-Thionville, Hôpital de Mercy, Service de radiothérapie, 1 allée du Château, Ars-Laquenexy, 57530, France;
2. Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Campus Sciences, BP 70239, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France;
3. CNRS, CRAN, UMR 7039, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France;
4. Université de Lorraine, LRGP, UMR 7274, 1 rue Grandville, Nancy, 54000, France;
5. CNRS, LRGP, UMR 7274, 1 rue Grandville, Nancy, 54000, France;
6. Université de Lorraine, INRIA-BIGS & CRAN, BP 70239, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France.

CNRS, GdR 3049 Photomed, France.

FIGURE 36 – L'effet photoélectrique est prépondérant à des énergies de l'ordre de la dizaine de keV : un électron est arraché à la matière lorsque l'énergie du photon incident est supérieure à celle de l'électron (effet photoélectrique). L'effet Compton est majoritaire entre 100 keV et 10 MeV. L'énergie du photon incident est partiellement cédée à un électron et le photon continue son trajet avec une moindre énergie jusqu'à sa matérialisation par génération de paire électron-positon. A partir de 1,022 MeV le phénomène de matérialisation est possible pour créer des paires électron-positon de 0,51 MeV chacun. Ces particules peuvent ensuite perdre leur énergie par effet photoélectrique ou Compton, ou s'annihiler et créer de nouveaux photons d'énergie 511 keV. Les photoélectrons émis lors de ces interactions induisent la génération d'électrons secondaires comme les électrons Auger qui peuvent également créer de nouveaux photons d'énergie 511 keV. Les photoélectrons émis lors de ces interactions induisent la formation d'espèces radicalaires et d'ERO comme le radical hydroxyle, l'ion peroxynitrate ou des radicaux du monoxyde d'azote.

Received: 2015.01.20; Accepted: 2015.03.26; Published: 2015.06.11

Abstract

This review focuses on the radiosensitization strategies that use high-Z nanoparticles. It does not establish an exhaustive list of the works in this field but rather propose constructive criticisms pointing out the critical factors that could improve the nano-radiation therapy. Whereas most reviews show the diverse advantages of nanoparticles in preclinical studies, it is also noted through the prism of the medical physicist. In particular, we described and evaluated the influence of X-rays energy spectra using a numerical analysis. We observed a lack of standardization in preclinical studies that could partially explain the low number of translation to clinical applications for this innovative therapeutic strategy. Pointing out the critical parameters of high-Z nanoparticles radiosensitization, this review is expected to contribute to a larger preclinical and clinical development.

Key words: Cancer; Nanoparticles; Radiation therapy; Radiobiology; Radiosensitization; Photodynamic therapy.

Introduction

Nanomedicine is based on drug delivery using organic nanomaterials as nanocarriers [1]. Inorganic-based nanomaterials are mostly developed for other health care applications such as *in vitro* diagnosis and *in vivo* imaging. For example, magnetic nanoparticles (NP) are used for cell sorting applications in clinical diagnosis or magnetic resonance imaging (MRI) [2]. More recently, nanomaterials have been developed to play a pivotal therapeutic role by their own. A prominent illustrative example is NPs-based magnetic hyperthermia being developed for the treatment of cancer by the startup Magforce. In this

treatment, aminosilane-coated magnetic NPs are injected into the tumor and subsequently heated with a newly developed magnetic field applicator in order to induce apoptotic cell death [3].

Over the last decades, many research programs dealt with *in vitro* and *in vivo* applications of NPs in radiation therapy. Given that radiation therapy is not a selective antitumor treatment, the main challenge for radiation oncologists, medical physicists and radiobiologists is to increase its therapeutic efficacy without increasing damages dealt to the surrounding healthy tissues. Hence, the goal of combining NPs

with radiation therapy is to increase the differential effect between healthy and tumor tissues.

Different mechanisms of interaction between X-rays and NPs are expected according to NPs chemical nature. We could distinguish between (i) high atomic number Z, NPs that enhance the photoelectric and Compton effects (and thus the subsequent emissions of secondary electrons) to increase conventional radiation therapy efficacy; (ii) X-ray triggered drug-releasing NPs that, for instance, uses drug-loaded NP [4]. Under irradiation, the NP capsule is destroyed and the drug is released inside the targeted tissues. (iii) Self-lighting photodynamic NPs that are usually made of a lanthanide-doped high-Z core [5]. Once irradiated by X-rays, the scintillator core emits a visible light and activates a photosensitizer that generates singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) for tumor destruction. These NPs combine both photodynamic therapy (PDT) that generates reactive oxygen species (ROS) and enhanced radiation therapy (high-Z core).

The present review focuses on the radiosensitization strategies that use high-Z NPs. In this context, these NPs can intensify the production of secondary electrons and ROS that in turn enhance radiation therapy effects. The most studied NPs are gold-based NPs (GNPs) that were widely described in particular by Hainfeld *et al.* [6]. Recent studies have also reported the use of lanthanide-based NPs, titanium oxide nanotubes or cadmium selenide quantum dots [7-10]. For example, gadolinium-based NPs, besides their high-Z, offer an innovative approach due to their capacity to act as powerful contrast agents in MRI [11]. Interestingly, some authors used silver-based NPs to take advantage of its excellent surface enhanced Raman scattering and broad-spectrum antimicrobial activities [12].

There are only few NPs available on the market which is probably a consequence of the difficulties to create large-scale production with adapted characterizations and the high-cost of the whole process. In a recent review, Coulter *et al.* [13] highlight the gap between the wealth of preclinical data supporting high-Z NPs as effective radiosensitizers and the low number of clinical studies (indeed only one phase I clinical trial) and regret the lack of rigorous and systematic methodologies to evaluate NPs efficacy. In agreement with this observation, we focused on the critical parameters that could influence the radiosensitizing power of nanoparticles and methods used to assess the radiosensitizing properties of high-Z nanoparticles *in silico*, *in vitro* and *in vivo*.

The aim of this review is not to establish for the first time an exhaustive list of the works in this field but rather propose constructive criticisms pointing out critical factors that could improve the

nano-radiation therapy strategies. While most reviews show the chemists and/or biologists points of view, the present analysis is also seen through the prism of the medical physicist.

We have studied 64 papers that mentioned the words *radiation therapy* (or *radiotherapy*) and *nanoparticles* during the period late 2008 - 2014. In our meta-analysis, we have distinguished on one side, the factors unrelated to nanoparticle, and on the other, parameters depending on the nanoparticle design. Notably, we have carried out a numerical analysis to assess the influence of the irradiation source by measuring the dose modifying factor on survival curves for *in vitro* studies which used clinical X-rays only (no isotopes, ions, synchrotron or electron beams). Furthermore, this paper describes the multi-scale impact of nanoparticle design, as it could determine the interaction probability with ionizing radiations (we considered X-rays only), the capacity to generate ROS and the cellular localization or tissue distribution of NPs.

How to measure the nanoparticle-mediated improvement?

In this part, following the description of recommended methods to measure *in vitro* radiation therapy efficacy, we will detail three approaches to assess the enhancement of radiation therapy efficacy by NPs: (i) the determination of the Dose Modifying Factor (DMF) based on survival curves, (ii) the determination of the Nanoparticle-mediated Enhancement Ratio (NER) after a single radiation dose and (iii) the variation of the ROS production upon irradiation.

When possible, the DMF should be chosen over the NER which can be seen as a "special case" of the DMF where only one irradiation dose had been applied. The measurement of the ROS production can be done alone or in addition to the DMF/NER evaluation in order to find which lethal effects are prevailing.

In vitro assessment of radiation therapy effect

In radiation therapy, clinically relevant dose of radiation generate DNA damage that could lead to early cell death but rather result in cell death after one or more cell divisions. Hence, a cell is "radiobiologically dead" only if its reproductive integrity is lost. *In vitro*, the gold standard to evaluate the cytotoxicity of ionizing radiations is the clonogenic assay (also called CFU assay for Colony Forming Unit) as it tests every cell in the population for its ability to undergo unlimited division, thus taking into account the "cell reproductive death" [14]. Results of clonogenic assay are generally plotted as "survival curves" which represent the fraction of surviving cells as a function of

the dose (typically 0 to 10 Gy). The linear-quadratic (LQ) model is the most common representation used to fit the experimental curves and to describe cell survival. For a single fraction at a dose D [Gy], the fraction of surviving cells S is described by the LQ model as:

$$S = e^{-(\alpha D - \beta D^2)}$$

where α and β are two model parameters. The LQ model also allows the estimation of the SF2 parameter that describes the survival fraction at 2 Gy, *i.e.* a dose fractionation widely used in clinical practice for curative treatments. Even though the LQ model is widely used in radiation therapy studies, it is also still controversial [15]. Moreover, it was not proven that the LQ model could describe dose-effect relations in the presence of NPs and it should therefore be used with care.

Measurement of the DMF on survival curves

To evaluate the efficacy increase in classical radiation biology, it is customary to use the Relative Biological Effectiveness (RBE) which is defined as the ratio of a dose of standard radiation (*e.g.* photons) to a dose of any other type of ionizing particles (*i.e.* protons, neutron, *etc.*) to produce the same biological effect [16]. The RBE is clinically relevant as it could allow clinicians to adapt the delivered doses according to the performances of the new therapeutic system or strategy, in comparison to conventional treatments. For example, medical physicists and radiation oncologists would have to deliver 30 Gy with NPs instead of delivering 60 Gy, if the therapeutic strategy “X-rays with NPs” was characterized by a RBE of 2. The concept of RBE has already been discussed by the International Commission on Radiological Protection (ICRP) [17] and the International Commission on Radiation Units & Measurement (ICRU) [18].

The RBE is very close to the concept of DMF that applies to radiosensitizers or radioprotectors and should be useful and relevant with NPs. As defined by the International Atomic Energy Agency (IAEA) [19], the DMF is:

$$DMF = \frac{\text{Dose to produce an effect with radiosensitizer / radioprotector}}{\text{Dose to produce the same effect without radiosensitizer / radioprotector}}$$

Typically, *in vitro* experiments yielding to survival curves and LQ model parameters are suitable and useful to determine the DMF.

For example using the results of Jain *et al.* [20] who irradiated MDA-MB-231 cells with a 6 MV accelerator, we measured a SF2 of 72.3%. Then we observed that the dose in presence of 1.9 nm GNPs, which lead to a survival fraction of 72.3%, is 1.39 Gy. Therefore the DMF calculated from this particular set of results is equal to 0.695. As the DMF is inferior to 1,

the GNPs used by Jain *et al.* have an *in vitro* radiosensitizing power at 6 MV regarding MDA-MB-231 breast cancer cells.

Measurement of the NER (mono-dose)

Even though the DMF is a relevant parameter for clinical practice, it is not systematically available in preclinical studies that evaluate and compare the radiosensitizing properties of specific NPs. Indeed, the DMF determination implies to test different doses of radiations and this approach is not always feasible, in particular in *in vivo* studies. Some authors have just compared biological effects induced by X-ray therapy in presence or absence of NPs for a single radiation dose. In these cases, only the “NP-mediated” Enhancement Ratio (NER, by similarity to the well-known oxygen enhancement ratio) is available [21].

As an illustration, Xiao *et al.* [22], evaluated the viability of HeLa cells after an exposition to multifunctional core/satellite nanotheranostics followed by an irradiation of 6 Gy. We measured that the cell viability without nanotheranostics after a 6 Gy irradiation was 88%. The viability for 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of nanotheranostics after a 6 Gy irradiation was 69%. Therefore the NER for this result is 0.784.

Measurement of ROS

Although the role of ROS in the treatment of cancer is controversial, the evaluation of their production could bring new information concerning the radiosensitizing effect of the studied NPs.

Because of the high sensitivity and the simplicity in data collection, some authors [23-25] have chosen to assess the radiosensitizing power of NPs by measuring variations in the production of ROS upon irradiation. To assess that, authors have conducted experiments in solution (water or other solvent) or *in vitro* using chemical probes that fluoresce in presence of ROS. Fluorescence was commonly monitored using fluorescence spectroscopy or microscopic imaging techniques due to their high spatial resolution.

For example, Takahashi *et al.* proved the improvement of ROS generation of their CdSe NPs under irradiation using hydroethidine-dihydroethidium (DHE) which is a reagent that is converted to ethidium on reaction with ROS such as O_2^- and OH^- . Generation of ROS was observed as a function of X-rays doses in aqueous solution, and its amount depended on the concentration of NPs [9]. More recently, Townley *et al.* evaluated the formation of ROS by their titanium NPs after irradiation in water using coumarin that reacts with ROS to generate highly fluorescent 7-hydroxycoumarin. In the absence of NPs they observed no fluorescence. In the presence of NPs,

bright fluorescence indicated ROS production [26]. Few authors described results that followed the same tendency [13, 27-29].

According to the chemical probe chosen, authors have focused on different ROS. Misawa *et al.* reported the use of the chemical probe aminophenyl fluorescein (APF) to analyze the GNP-induced enhancement of $\cdot\text{OH}$ as this fluorescein derivative yield a bright green-fluorescent product when it reacts with $^1\text{O}_2$ or $\text{OH}\cdot$ [24]. Similarly, Gara *et al.* [25] used phenol (PhOH), furfuryl alcohol (FFA) and histidine (HIS) as scavengers to evaluate the ROS formation of silicon NPs. They showed that the NPs are capable of enhancing the yields of $\text{O}_2\cdot^-/\text{HO}_2\cdot$ and $\text{OH}\cdot$ in aqueous suspensions as a consequence of X-rays absorption. Moreover, $^1\text{O}_2$ is formed in irradiated solutions only in the presence of the NPs.

Among the 64 papers we analyzed, 7 papers are dealing with the *in vitro* evaluation of ROS. They all used the cell-permeable fluorogenic probe DCFH-DA, commonly known as dichlorodihydrofluorescein, supplied as the diacetate ester. It is used as an indicator of ROS. Following enzymatic or base-catalyzed cleavage of the diacetate groups, it is readily oxidized to the highly fluorescent product dichlorofluorescein (DCF).

Parameters not depending on nanoparticles design

The present paragraph focuses on nanoparticle-independent parameters that can significantly alter the radiosensitizing power of NPs, *i.e.*: (i) the biological evaluation methodologies, (ii) the energy of the incident photon beam and (iii) the irradiation setup.

Biological evaluation methodology

Consistently with classical experimental methods in radiobiology, lot of authors performed clonogenic assays to compare the cytotoxicity of radiations with or without NPs [9, 30-33]. Chang *et al.*, Liu *et al.* and Butterworth *et al.* reported radiation dose-survival curves, allowing the comparison of response profiles, while Chang *et al.*, Roa *et al.*, Rima *et al.* and Coulter *et al.* tested only one dose of radiation. Most of studies focused on results obtained after 2 Gy-irradiation as this dose is consistent with radiotherapy clinical fractionation [31, 32, 34]. To evaluate the radiosensitizing effect of NP, other biological tests such as viable cell count using Trypan blue, metabolic assays, apoptosis detection, or $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ foci detection were also reported, alone and instead of clonogenic assays, or in addition and in comparison to them. It is noteworthy that in many cases, these biological tests have been conducted before clonogenic assays and

applied to NP alone. Metabolic assays used were mainly based on the enzymatic reduction of tetrazolium dye (MTT, MTS, WST-1) but also on the resazurin sodium salt reduction (Alamar blue test) [21]. Except in Liu *et al.* study, articles concluded to a reduced cell viability rate when irradiation was combined with NP exposure [32]. When comparison was possible, results of metabolic assays and clonogenic assays were concordant [28, 31, 35, 36]. Even though the "time" was not systematically mentioned, it is noteworthy that these metabolic tests could have been performed at different time post-irradiation. According to whether they were made in short- or long-term after irradiation, the results obtained do not reflect the same mechanisms of cell loss. Indeed, Mowat *et al.* that have measured cell viability 7 days post-irradiation have included the radiation-induced mitotic cell death [37], while several works only considered the cell death occurring in the first 24h or 48h [31, 35].

Few authors have also investigated cell apoptosis to compare radiation cytotoxicity with or without NP exposure. Cell apoptosis have been detected by flow cytometry after Annexin-FITC staining [28, 38] or by identifying the sub-G1 population [13, 31]. Authors demonstrated an increase in cell apoptosis when irradiated cells were in contact with NP.

Instead of or in complement with methods to evaluate cell survival, many authors have compared the radiation-induced DNA damage in presence or absence of NP. Experiments were based on the detection of DNA double-strand breaks as they are the most lethal lesions. To do that, differential plasmid DNA migration on agarose gel electrophoresis [39, 40] and comet assays [41] have been reported. More frequently, foci of $\gamma\text{H}_2\text{AX}$ and/or foci of 53BP1 which are well-known as markers of DNA double strand breaks were detected by immunofluorescence techniques. *In fine*, the interpretation of results remains difficult because of the heterogeneity of protocols used. In some studies, authors have fixed cells rapidly post-irradiation and have thus investigated the number of radiation-induced lesions while in other cases [32, 42], authors have followed the capacity of cells to repair DNA double strand breaks, assuming that only unrepaired lesions could cause cell death [43].

In vivo experiments aiming to evaluate the radiosensitizing potential of NPs have been performed using tumor xenografts in immunodeficient rodents and tumor growth or animal survival have been followed [11, 38, 44-46]. In case of NP with imaging application, orthotopic models, notably intracranial xenografts were preferred as they are more relevant than subcutaneous ones [11, 46]. According to studies, the route of NP administration differed: intratumoral

injection reported by Maggiorella *et al.* or Chattopadhyay *et al.* allowed to overcome the problems of biodistribution [42, 45]; by contrast, for intravenous or intraperitoneal administrations [38, 46] it could be necessary to optimize the drug-irradiation interval [11]. Generally, irradiation to treat tumor-bearing animals was delivered as a single dose comprised between 5 and 35 Gy [46, 47]. Only Maggiorella *et al.* have tested a fractionated schedule (2 x 4 Gy) [45].

Histological observation and immunohistochemical analysis have been carried out to illustrate treatment-induced cell death. Especially, the TUNEL assay allowing the apoptosis detection has been reported [30, 45].

The energy of the incidents X-rays (source)

In X-ray external radiation therapy, low energy beams (until 200 kV) have very few applications and are dedicated to skin treatments (< 5 mm in depth, *e.g.* melanoma, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, keloid) (Fig. 1). Medium energies 200 kV to 1 MV (orthovoltage and supervoltage X-rays) were widely used for shallow treatments since the 1930's - 1940's but became less advantageous at the advent of high-energy electrons during the 1960's - 1970's. Nowadays, high-energy beams, also called megavoltage beams, (1 to 25 MV) are by far the most commonly used as they allow the treatment of deep tumors (> 2 cm in depth).

As the impact of the beam energy on the RBE (without NPs) has already been shown [48], it is then legitimate to ask whether the beam energy would have an impact on the radiosensitizing properties of high-Z-NPs. Cell damages following interactions between X-rays and high-Z NPs mostly result from the photoelectric effect which is prevailing until the photon energy reaches 500 keV (*e.g.* for Au). As a consequence, one could conclude that the radiosensitizing effect of these NPs should be stronger for

low-energy beams. However, radiation therapy beams are poly-energetic, and high-energy spectra have a low-energy component which triggers photoelectric effects. Moreover the medium- and high-energy components should theoretically interact with matter (here in high-Z NPs and biological matter) by Compton effect, therefore releasing lower energy photons. These latter, depending on their energy, trigger in turn either photoelectric or Compton effects. That is why a substantial radiosensitizing effect of high-Z NPs can be expected for high-energy beams.

In order to assess this crucial question, we have carried a numerical analysis only based on *in vitro* results; corresponding studies have been summarized in Table 1. Indeed, among the publications that we studied, 18 evaluated the radiosensitizing effect of NPs using an analytical method or a Monte Carlo simulation algorithm (MCNP5, MCNPX, Geant4, PENELOPE or EGSnrc) often comparing kV and MV photons. We did not take them into account because Butterworth *et al.* [33] have already shown that *in vitro* experiments did not fit early physical predictions. Even though, we reported these publications in the Table 2.

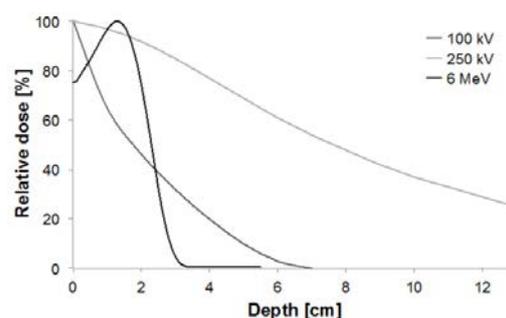


Figure 1. Depth-dose curves normalized at the depth of maximum for 100 kV, 250 kV and 6 MeV beams (kV = photons, MeV = electrons).

Table 1. *In vitro* or *in vivo* experiments dealing with the radiation therapy enhancement by nanoparticles.

REFERENCE	EXPERIMENTS	PARTICLE	SOURCE	MATERIAL	SIZE (range; nm) [nm]	DMF
[43]	<i>In vitro</i>	γ	¹²⁵ I	Au	50	
[34]	<i>In vitro</i>	Not Applicable	Not Applicable	Gd	5	
[26]	<i>In vitro</i>	X	250 kV	Ti	65	
[41]	<i>In vitro</i>	X	40 kV	Fe	10	
				Bi	30	
[46]	<i>In vivo</i>	X	100 kV	Au	10	
[42]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Au	30	0.74
	<i>In vivo</i>					
[38]	<i>In vitro</i>	γ	¹³⁷ Cs	Au	4.8-46.6	
	<i>In vivo</i>					
[45]	<i>In vitro</i>	X or γ	⁶⁰ Co	Hf	50	0.765
	<i>In vivo</i>		6 MV			
[13]	<i>In vitro</i>	X	160 kV	Au	1.9	
[11]	<i>In vivo</i>	X (synchrotron)	50-350 keV	Gd	2	
[28]	<i>In vitro</i>	X	90 kV	Au	14	

[79]	<i>In vitro</i>	Electrons	6 MV	Au	5-13	
[20]	<i>In vitro</i>	X or Electrons	60 keV	Au	1.9	0.499
			160 kV			0.695
			6 MV			0.695
			15 MV			0.706
			6 MeV			0.718
			16 MeV			0.745
						0.776
						1.18
[21]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	50	
[37]	<i>In vitro</i>	X	660 kV	Gd	5	
			6 MV			
[80]	<i>In vitro</i>	X	200 kV	Au	Not Applicable	
[32]	<i>In vitro</i>	X or Protons	6.5 keV	Au	6.1	0.354
			45 kV			0.411
			160 kV			0.496
			6 MV			
			3 MeV			
[81]	<i>In vitro</i>	X	160 kV	Au	1.9	0.46
						0.516
						0.908
						0.949
						0.977
						1
						1.17
						1.22
[82]	<i>In vivo</i>	X (synchrotron)	20-190 keV	Au	1.9	
			80-300 keV			
[83]	<i>In vitro</i>	Carbon ions	276 MeV/amu	Pt	3	
[84]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	80 kV	Au	2	
[50]	<i>In vitro</i>	X	40 kV	Au	37.5	
			80 kV			
			120 kV			
[40]	<i>In vitro</i>	X	30 kV	Au	8	0.2
			80 kV		20	0.25
			100 kV		37	0.5
			120 kV		74	
			150 kV		92	
[49]	<i>In vitro</i>	X or Electrons	80 kV	Au	1.9	0.1
			150 kV			0.221
			6 MeV			
			12 MeV			
[31]	<i>In vitro</i>	γ	¹³⁷ Cs	Au	10.8	
[85]	<i>In vitro</i>	γ	¹³⁷ Cs	La	10	
[30]	<i>In vitro</i>	X or γ	200 kV	Au	10.8	
	<i>In vivo</i>		⁶⁰ Co			
			¹³⁷ Cs			
[86]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	4.7	
[87]	<i>In vitro</i>	γ or carbon ions	⁶⁰ Co	Au	1.9	
			62 MeV			
[52]	<i>In vitro</i>	X	105 kV	Au	50	
			220 kV			
			6 MV			
[88]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Au	13	
[89]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	50 keV	Au	1.9	
	<i>In vivo</i>		88 keV		15	
[90]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Bi	50	
[91]	<i>In vitro</i>	X	150 kV	Au	23	0.66
	<i>In vivo</i>		175 kV			
[8]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Ti	10	0.627
						0.637
[7]	<i>In vivo</i>	X	200 kV	Ti	10	
[23]	<i>In vitro</i>	X	120 kV	Fe	3-20	
[25]	<i>In vitro</i>	X	4 MV	Si	3	
[24]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	Au	5-250	
[27]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	Not Applicable	48	
[47]	<i>In vitro/In vivo</i>	X	6 MV	Au	28.9-47	
[10]	<i>In vitro</i>	X	6 MV	CdSe	25	0.631
[92]	<i>In vitro</i>	X	150 kV	Ce	7	
			10 MV			
[9]	<i>In vitro</i>	X	100 kV	CdSe	10	
[51, 61]	<i>In vitro</i>	X (synchrotron)	30-100 keV	Au	1.9	
[61]	<i>In vitro</i>	X	120 kV	Au	1	

Table 2. Analytical or Monte Carlo calculations concerning the radiation therapy enhancement by nanoparticles.

REFERENCE	CODE	PARTICLE	SOURCE	MATERIAL	SIZE [nm]
[55]	GEANT4	X	150 kV 15 MV	Au	Not Applicable
[93]	MCNP5	X or γ	¹²⁵ I ¹⁶⁹ Yb ¹⁹² Ir 50 kV	Au	1.9
[94]	EGSnrc	X or γ	¹⁰³ Pd ¹²⁵ I ¹⁶⁹ Yb ¹⁹² Ir 50 kV 6 MV	Au	1.9
[95]	Analytical calculation	X	6 MV	Au	100
[96]	PENELOPE	X	110 – 500 kV	Gd	Not Applicable
[63]	MCNP5 PENELOPE	X or γ	¹⁰³ Pd ¹²⁵ I ¹⁶⁹ Yb ¹⁹² Ir 6 MV	Au	1.9 5 30 100
[97]	GEANT4	X	6 MV 15 MV	Au	1.9
[58]	GEANT4	X	20 – 150 keV 160 kV	Au	1.9
[98]	PENELOPE	X	110 – 500 kV	I	Not Applicable
[99]	GEANT4	Electrons	50 keV 250 keV 1 MeV 4 MeV	Au	2 50 100
[45]	PENELOPE	X	200 keV 1 MeV 6 MeV	Hf	50
[100]	Analytical calculation	X	80 – 120 kV	Au	1.9
[101]	Analytical calculation	X	6 MV	Au	100
[59]	GEANT4	X	80 kV 6 MV	Au	400
[102]	PENELOPE	X	220 kV	Au	Not Applicable
[103]	MCNPX	X or γ	50 – 120 keV ⁶⁰ Co 6 MV 18 MV	Au	30 50 100
[104]	GEANT4	X	6 MV	Au	10 100
[105]	Analytical calculation; Eclipse 8.6 @Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA	X	6 MV	Au	1.9

We divided the performed studies using medical X-rays into two categories: the first one corresponds to low and medium energies, *i.e.* comprised between 1 kV and 1 MV and the other one corresponds to high energies (*i.e.* 1 to 25 MV). When achievable, we measured the DMF in papers that contain survival curves to quantify the radiosensitizing effect of NPs. The "biological effect" was defined as the SF₂ without NPs (Fig. 2).

A plot of the calculated DMF values *versus* beam energy is illustrated on figure 3. Due to the multitude of irradiations settings and environments between experiments, the inter-study comparison of the DMF should be considered with care. Moreover, in some studies, the energy is not the only parameter that varied. Therefore, in order to analyze the source en-

ergy parameter only, we have decided to focus on the analysis of papers where the energy was the only variable (Fig. 3). Rahman *et al.* [49] reported high dose enhancement (DMF \leq 0.1) at 80 and 150 kV in the same study. Survival curves were obtained using a colorimetric method. It seems that in the presence of NPs, curves do not follow the LQ model anymore ($\alpha \rightarrow 0$ when the concentration increases). The authors concluded that their results gave an indication of some energy dependence because the source was the only parameter that was changed. Brun *et al.* [40] assessed the effect of 6 combinations energy/filtration. They could not clearly observe an energy dependence but did not directly measure the cell survival. Their conclusions were based on a plot of the dose enhancement factor *versus* the effective X-ray energy but

the enhancement factor was linked to the loss of supercoiled DNA. In another study, Brun *et al.* [50] evaluated the enhancement of X-ray-induced degradations of human centrin 2 proteins (Hscen2). Centrins are small acidic proteins, highly conserved in eukaryotes, from algae and yeast to humans. They demonstrated that X-ray-induced degradations could not lead to explicit energy dependence. However, one could regret that non-standard biological assays were used in these studies. Recently, Rahman *et al.* [51] observed the influence of the energy of synchrotron-based mono-energetic photon beams (from 30 to 100 keV) and found out that the optimal energy was 40 keV. However, no correlation was made between the source energy and the in-vitro radiosensitization by NPs.

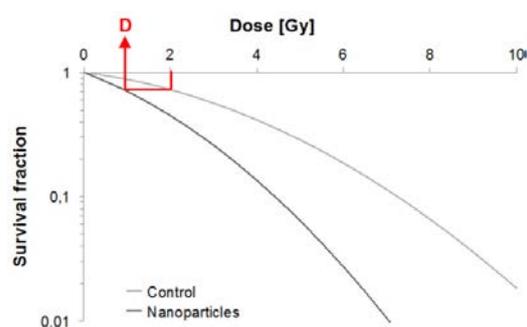


Figure 2. Survival curve example. Illustration of our DMF assessment strategy.

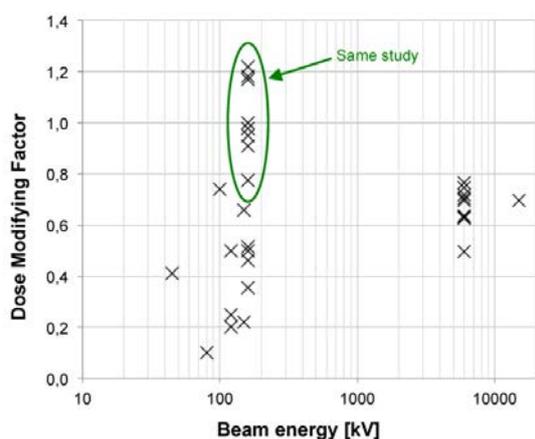


Figure 3. Plot of the calculated DMF values from publications versus beam energy. For energies up to 200 kV, we identified 21 publications dealing with in vitro, 2 in vivo and 2 with both in vitro and in vivo experiments during the period 2008-2014. In the range from 200 kV to 1 MV, 3 in vitro publications were studied. Upon in vitro experiments, the DMF varies from 0.1 to 1.2. Lower values (which are representative of a high radiosensitization) were observed for lower energies. Concerning high-energy beams, 13 publications were analyzed for in vitro, 1 for in vivo experiments and 1 for both; 1 used a 4 MV beam, 13 a 6 MV, 1 a 10 MV and 1 a 15 MV. Upon in vitro experiments, the DMF varies from 0.7 to 0.8 for passive GNP, 0.5 for PEG-coated GNP and 0.6 for a Photofrin® and quantum dots combination.

Two papers [20, 52] demonstrated a noteworthy influence of the energy on the radiosensitizing effect of NPs in SK-OV-3 (105 kV, 220 kV, 6 MV) and MDA-MB-231 (160 kV, 6 MV and 15 MV) cell lines. Concerning the results published by Jain *et al.* we measured, at 160 kV, DMF values of 0.499, 1.180 and 0.776 for MDA-MB-231, DU145 and L132 cell lines respectively. Thus, the cell line parameter seems highly influent. However, for the 6 MV beam, we measured DMFs of 0.695, 0.718 and 0.706 for the 3 cell lines respectively. The DMF measured for MDA-MB-231 after a 15 MV irradiation is 0.695. Surprisingly, at high energies, results do not depend on the cell lines anymore, pointing out that kV irradiations are more subject to additional variations than MV ones.

As results DMF are, to some extent, disparate for low and medium energy X-rays, they are interestingly similar for high energies (6 MV in particular). This may be due to a noteworthy diversity of low- and medium-energy spectra. Indeed the later beams differ widely from one another for the following reasons (not exhaustive list): large number of tube manufacturers, anode materials, filters, *etc* and this is certainly a major drawback for the comparison of studies. On the contrary, clinical MV spectra are remarkably similar which makes them more suited for comparisons.

Based on *in vitro* and *in vivo* studies published during 2008-2014, we found that there are evidences that the energy of the X-rays source has a major influence on the radiosensitizing power of NPs. We notably noticed that 6 MV irradiations resulted in a DMF close to 0.65 with a low variability even for different NPs designs or cell types. For example, applying a DMF of 0.65 to clinical situations means fractions of 2 Gy could be replaced by 1.3 Gy fractions with the same biological effect on tumors that contain NPs. It could be an important benefit for the patient with less side effects and a better treatment tolerance. Working at 6 MV, besides facilitating the comparisons of NPs, would allow easier transitions to clinics where high-energy X-rays are the standards. Nevertheless, as high-energy medical linear accelerators are not easily accessible, a standardization of low-energy irradiation protocols should be proposed to evaluate the radiosensitizing power of NPs in laboratory.

Irradiation setup

The irradiation methodology may drastically influence the studies results and only few authors have detailed this point. The irradiation should be reproducible, repeatable and close to the clinical situations. It is therefore recommended to comply with the following propositions. The absorbed dose should be correctly calculated: cells/tissues/tumor should be at

the electronic equilibrium (\approx surrounded by sufficient water equivalent medium). If possible, cells or animal models should be surrounded with water equivalent materials that could bring scattered photons of lower energy (which interacts by photoelectric effect).

The energy held by the scattered photon is related to the energy of the incident photon [53]. Therefore backscattered photons, which carry less energy, are interesting for X-rays-NPs interactions purposes. Then the cells/tissues/tumor should be located in a low dose gradient: after the depth of the maximum dose and inside the beam, off the penumbra region. Sufficient medium should be placed after the cells/tissues/tumor in order to generate enough scattered photons (Compton effect). Finally, cells/tissue/tumor should be at a clinical distance from the source (*e.g.* 100 cm for a high-energy medical accelerator). Advices from a medical physicist could be of great use. The figure 4 illustrates an example of an irradiation scheme for a 6 MV accelerator treating a cell well plate.

For precise inter-study comparisons, the irradiation methodology should be the same with similar beam energy spectra. That is why high-energy beams (*e.g.* 6 MV) are well suited for that purpose.

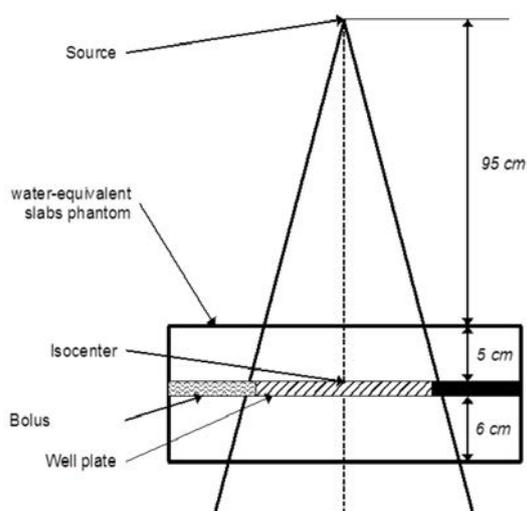


Figure 4. Example of a standard irradiation setup for a 6 MV irradiation of a cell-well plate placed at the linear accelerator's isocenter under 5 cm of water-equivalent slabs.

Influence of nanoparticles design on the radiosensitization

NPs usually have a simple structure composed of a core, a shell and a surface [54]. In the case of radiosensitizing NPs, the core is usually made of high-Z materials such as silver, lanthanides and most extensively of gold, in order to exploit the increased photon

absorption. The shell, which is chemically or physically bound to the core, acts as a base on which surface molecules (which sometimes include active agents) are anchored or bound with or without spacers. However, the high Z-elements can also be chelated by ligands present at the surface or inside the nanoparticle. The surface molecules usually consist of site-, tissue-, cell- and/or receptor-specific molecules (targeting units). In the following paragraphs we will review the influence of the NPs design on: (i) interactions between X-rays and NPs, (ii) the ROS generation upon irradiation and (iii) the biodistribution of NPs.

X-rays -nanoparticles interactions

Theoretical principles of X-rays interactions with NP have already been described [33]. X-ray interactions with matter happen mostly at low energy where the photoelectric effect is dominant (Fig. 5). The photoelectric effect occurs when the incident X-ray photon is absorbed by the atom, resulting in the ejection of an electron. This effect is prevailing until the photon energy reaches a medium energy (*e.g.* 500 keV for Au) with a cross-section varying with Z^4 or Z^5 depending on the material and is enhanced by an increased absorption by electron shells (K, L, M, etc.) at low energies. As the atom is left in an ionized state, a characteristic X-ray or an Auger-electron emission follows the ejection of a photoelectron. That is why the radiosensitizing NPs are based on high-Z materials. More theoretical proofs can be found in the literature [6, 55]. The Auger effect especially concerns low-Z atoms [56] and therefore would not be a major contributor to the dose deposited in the presence of high-Z NPs. Indeed, it is dominant for $Z < 15$ but almost equal to 0 for $Z > 60$ [57].

For medium- or high-energy beams (always poly-energetic in clinical routine), the low-energy component of the spectrum will interact with matter by photoelectric effect and the medium- and high-energy components are more likely to interact by Compton effect. Compton effect occurs when the incident X-ray ejects an electron and a photon is scattered from the atom. This effect does not depend on the Z of the targets. The scattered photon, depending on its energy, will trigger either photoelectric or Compton effects.

Compton, Photo- or Auger-electrons can induce the emission of secondary electrons (also called delta rays) that are believed to be responsible for the majority of cells damages. One should notice that for very low energies photons, the ejected photoelectron might not carry a sufficient energy to cause subsequent ionizations. Opposite information about the dose deposited by Auger or photo-electrons in the vicinity of the NPs have been published in the litera-

ture. McMahon *et al.* found that the contribution of Auger electrons was dominant [58] and Douglass *et al.* claimed that the Auger electrons contribution was insignificant [59] even though they were using the same simulation code (Geant4). Some authors described an auto-absorption phenomenon that can be amplified by the size of the NPs and the presence of other high-Z atoms in its vicinity (*e.g.* a cluster of NPs)

[58]. Low-energy secondary species would be the first to be absorbed. Therefore the design of the NPs is of utmost importance concerning the radiation therapy enhancement; high-Z components can increase the number of secondary species because of a Z^5 dependence of the photoelectric effect and bigger NPs or clusters tends to favor the auto-absorption of low energy electrons.

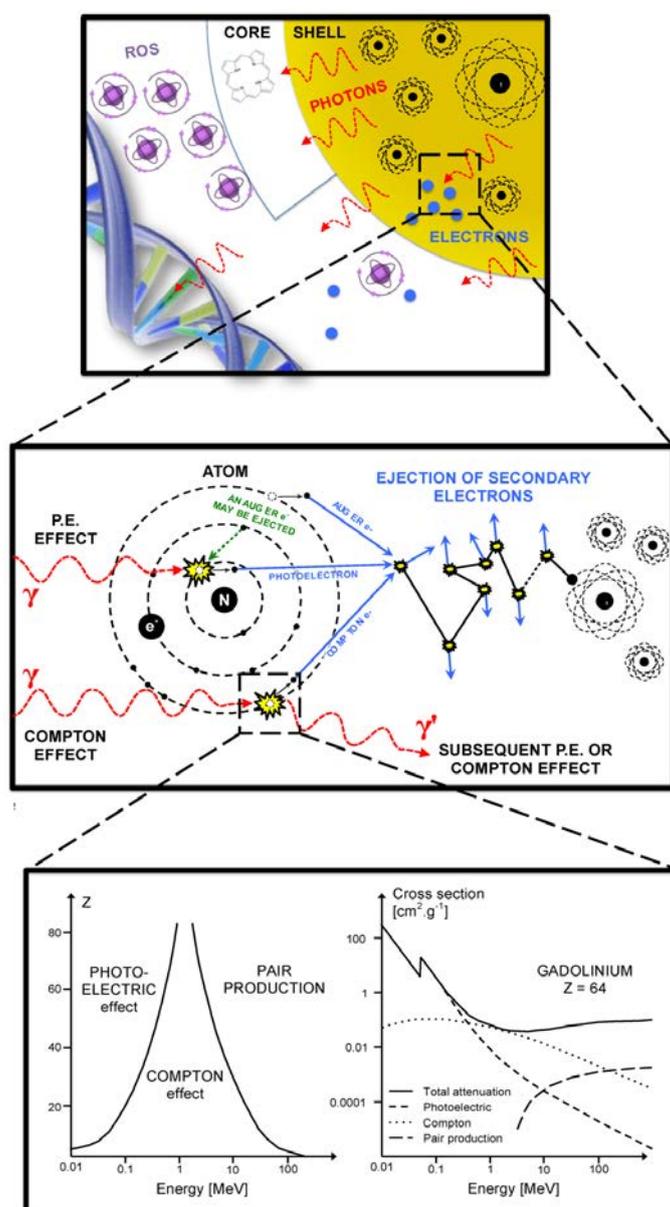


Figure 5. Interactions of X-rays with NPs result directly or indirectly in the production of secondary species: photons, electrons and later ROS. Secondary photons or electrons are mostly generated either by photoelectric or Compton effect. The photoelectric effect interaction probability varies with Z^4 or Z^5 and dominant until the incident photon energy reaches ≈ 500 keV.

Heavy metal-based NPs have also been suggested as effective tumor-targeting theranostic agents with dual functions: efficient targeted system for tumor imaging and irradiation dose amplifier for radiotherapy under the guidance of computed tomography imaging [60]. Guided by tumor-targeted X-ray computed tomography imaging, their radiosensitizing effect was investigated using a clinical megavoltage photon beam. In this innovative study, BaYbF5: 2% Er³⁺ NPs could be excited by near-infrared laser and emit upconversion luminescence with greatly suppressed auto fluorescence, photo damage and toxicity, which could be ideal for cell or even tissue tracking.

ROS generation upon X-rays

The mechanisms involved in the ROS generation upon X-rays irradiation in the presence of NPs differ depending on the composition, size, and potential of these NPs. Thereby, Misawa *et al.*, using two kinds of fluorescent probe APF and DHE, compared the ROS production when GNP, from 5 to 250 nm, were subjected to X-rays irradiation and UV light in water [24]. GNP-induced enhancement of $\cdot\text{OH}$ and O_2^- generation was confirmed. Moreover, the authors demonstrated that smaller diameter GNP with larger surface area showed a greater yield of ROS. The increase in ROS generation was also corroborated by recently published results of Klein and *al.*, which illustrates the *in vitro* formation of ROS in SuperParamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) loaded MCF-7 cells exposed to X-rays. In particular, they demonstrated that citrate-coated SPIONs may function as excellent radiosensitizers upon enhancing the impact of X-rays on the ROS generation for about 240% when compared with X-ray treated cells without internalized SPIONs. The ROS production in iron oxide NP loaded cells was explained to originate from both, the release of iron ions and the catalytically active surfaces of silica NPs with an oxidation of SiO₂ following irradiation [23-25]. Interestingly, a link was evidenced between the intracellular localization of SPIONs, and the ROS generation; functionalization with an amine function of silica NPs can significantly increase the

ROS production due to their positive surface charge, which facilitates NPs accumulation in the membranes of the endoplasmic reticulum, vesicles and especially mitochondria [61]. SPIONs presence in the membranes also induced a membrane lipid peroxidation, improving the radiosensitizing effect [61].

Influence of nanoparticles design on tumor selectivity, cellular uptake, intracellular localization and biodistribution

As organs at risks may be at the vicinity of the tumor and given that there is some evidence of an energy dependence of the radiosensitization by NPs, this observation has to be taken into consideration when prescribing NPs (Fig. 6). Therefore, it is of utmost importance that radiosensitizing NPs concentrate in the tumor and not in the healthy organs at its vicinity. That is why it has been suggested that GNP-based radiosensitizers should have targeting moieties (*e.g.* glucose, antibodies) to improve NP uptake by tumor cells. For example, Chattopadhyay *et al.* demonstrated that trastuzumab-conjugated GNPs were well-internalized into HER-2 overexpressing SK-BR-3 breast cancer, while non-targeted NPs had little or no internalization in these cells, and trastuzumab-conjugated GNP have led to 5 times more DNA double strand breaks than the non-targeted GNP. It should also be noticed that the energy spectrum of radiation therapy beams always depends on the clinical setting (depth, field size, in-field localization of NPs, *etc.*). Scarboro *et al.* calculated 6 MV energy spectra variations with treatment parameters [62]. They showed that when the depth along the central axis increased, the low-energy contribution of the spectrum increased and the high-energy part decreased. For instance, for a 10 cm x 10 cm field, at a depth of 10.0 cm the flux of particles which carry an energy of 100 keV is two times more important than at a depth of 1.6 cm. Therefore, the radiosensitizing effect of NPs may be slightly more important for deep tumors. They also noticed that off axis spectra contained dramatically more low energy components than central axis ones.

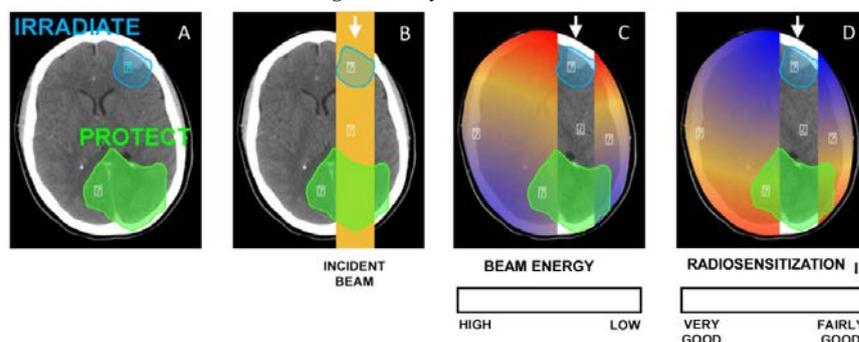


Figure 6. (A) Illustration of a clinical scenario where a volume (blue) has to be irradiated while a part of an organ (green) has to be protected. (B) A simple anterior beam is irradiating the blue volume. (C) The beam energy is maximum in the irradiation field and is reduced out of the field. (D) Given that the interaction probability is higher for low-energy photons, the radiosensitization in presence of NPs should be higher out of the irradiation field. In this case, the green volume that has to be protected would be in the most radiosensitized area.

At a cellular level, several studies aimed at estimating the diffusion abilities of secondary species induced in case of interactions between X-rays and NP and most of authors have concluded that the path of secondary electrons is very limited, from a few tens of nanometers to a few micrometers. For example, Chattopadhyay *et al.* using a 100 kVp X-ray beam and GNPs, reported that 99% of the Auger electrons were stopped before 100 nm, because of their low average energy and a very short penetration range [42, 63]. Meesungnoen *et al.*, for their part, have described a penetration range shorter than 20 μm for photoelectrons with an average energy of about 43 keV [64]. Given that the cell size was about 10-20 μm , these works suggest that lethal effects resulting from X-rays and NP interactions could only be obtained if NPs are localized into the cell. Hence, the internalization of NP into tumor cells is a pre-requisite. Cellular uptake of NPs is highly dependent on the design of the nano-object and numerous studies have demonstrated that modifications of the physicochemical properties of the NP have great consequences on the cellular entry and biological processes [65]. In a recent work, Rima *et al.* assessed the cellular internalization mechanisms for sub-5 nm gadolinium-based NPs and evidenced both passive diffusion for single particles and macropinocytosis in case of agglomerates [34]. Herein, significant radiosensitization was only found with NPs clusters.

Besides the impact on cellular uptake, NP design also determines their intracellular localization, which in turn exerts a critical impact on the induced radiosensitization. In particular, the functionalization of the NPs plays a central role in the redirection of the particle to specific cell subcompartments. For instance, Kong *et al.* demonstrated that their GNPs were mostly bound to the cell membrane, while thioglucose-GNPs were distributed in the cytoplasm, leading to a higher decrease in cell survival after X-rays irradiation [35]. However, in a recent study [66], a sub-50 nm nuclear-targeting rattle-structured upconversion core/mesoporous silica nanotheranostic system was designed to directly deliver radiosensitizing drug Mitomycin C into the nucleus for greatly enhanced damaging of the DNA with the assistance of X-ray irradiation. More importantly, the authors develop a new theranostic technique of "intranuclear radiosensitization", meaning that the radiosensitizing drug molecules released into the nucleoplasm may not only efficiently break down the intranuclear DNA, but also effectively enhance the radiotherapy efficacy due to the intranuclear chemodrug-sensitized radiation enhancement effects. Moreover, *in vitro* significant radiosensitization has been noted for GNPs localized far from the cell nucleus [49]. Consistently, according to

the recent literature in this field, it seems that the relative distance from the DNA is not a crucial factor [52, 67].

Concerning *in vivo* applications of NP-based radiosensitization, the first priority concerns the NP selectivity for tumor tissue to avoid any radiosensitization of adjacent normal tissue. To circumvent this difficulty, intratumoral injection was sometimes preferred and used [42, 45]. For systemic delivery, the engineering of NPs on the size, shape, physicochemical characteristics and targeting moieties is critical, given that these parameters strongly affect the circulation time of the NPs, their biodistribution and their availability for effective therapy [68]. As described by Dufort *et al.*, after intra-venous injection, accumulation of GNPs in the tumor tissue could be achieved passively by relying on the increased permeation and retention of the leaky vasculature of tumors (EPR effect) [65]. Nevertheless, the tumor-to-normal tissue NP ratios need to be improved in further preclinical trials. Notably, in preclinical *in vivo* studies, few experiments were conducted to optimize the time between NPs administration and irradiation, while this point appears to be critical. However, NPs have been suggested as theranostic agents for tumor imaging and irradiation dose amplifier for radiotherapy under the guidance of computed tomography imaging [60].

Future applications: e.g. photodynamic-therapy combined with high-Z radiosensitizers

PDT is based on the concept that certain Photosensitizers (PS) can be localized in neoplastic tissue, and can subsequently be activated with the appropriate wavelength of light to generate active molecular species such as free radicals and singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) that are toxic to tumors. The limited penetration range of light makes this therapy most appropriate for small or superficial lesions. In order to treat deep lesions, it may be possible to use X-rays as excitation source instead of light. With this novel therapeutic approach, the light penetration problem can be overcome and activation of the photosensitizer within tumors would be performed using ionizing radiation. This new modality will allow treatment of deep tumors using lower radiation dose than conventional radiotherapy.

Chen W and Zhang J described for the first time the potential of NPs to enable simultaneous radiation and photodynamic treatment in 2006 [5] and in a review in 2008 [69]. They obtained an US patent in 2007 for luminescent NPs with attached PSs such as porphyrins used as a new type of agents for PDT. Upon exposure to ionizing radiation, light would be emitted from the NPs to activate the PS; as a consequence, $^1\text{O}_2$

would be produced to increase the killing of cancer cells by ionizing radiation. No external light would be necessary to activate the PS within the tumor. Chen and Zhang described the synthesis of $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ -meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine (MTCP) NP conjugated to folic acid and investigated the energy transfer as well as the formation of $^1\text{O}_2$ following X-ray irradiation [70]. They proved that upon X-ray irradiation, the porphyrin alone is a radiosensitizer but the effect is enhanced when MTCP is coupled to $\text{LaF}_3:\text{Tb}^{3+}$ NPs targeted or not with folic acid. The average energy transfer rate in the MTCP conjugates is 56.7%. The same team realized also ZnO-MTAP (meso-(o-amino-phenyl porphine)conjugate in which the energy transfer is around 89 % [70].

In 2009, Morgan *et al.* [71] tried to calculate the physical parameters required for nanoscintillators to deliver cytotoxic levels of $^1\text{O}_2$ at therapeutic radiation doses drawing on the published literature from several disparate fields. It appears that the light yield of scintillators, the efficiency of energy transfer to the PS and the cellular uptake of the NPs all need to be fairly well optimized to observe a cytotoxic effect. To calculate the required light yield for the NPs to have a PDT effect (formation of 5.6×10^7 of $^1\text{O}_2$) at therapeutic radiation doses, they assumed a non-clinical single-fraction radiation dose of 60 Gy, $\Phi_{\text{FRET}} = 0.75$, $\Phi_{\Delta} = 0.89$ and that NPs occupy a 5% volume fraction in the tissue. They estimated that the efficacy of the combination therapy would likely be restricted to X-ray energies below 300 keV.

Scaffidi *et al.* in 2011 [72], described Y_2O_3 nanoscintillator, a fragment of HIV-1 TAT peptide and psoralen. The authors used commercially available 12 nm diameter cubic-phase Y_2O_3 nanoscintillators on which they coupled TAT or psoralen-TAT. PC-3 human prostate cancer cells were used and they could observe a modest *in vitro* reduction in cell number after X-ray excitation (2 Gy at 160 or 320 kV).

Our team published very recently a paper about X-ray-induced $^1\text{O}_2$ activation with nanoscintillator-coupled porphyrins (Fig. 7) [73]. Tb_2O_3 coated with a polysiloxane layer is a biocompatible nanoscintillator that exhibits an appropriate pattern of biodistribution *in vivo* after injection. The average size of the core-shell NPs grafted with porphyrin is 9.9 nm. Using time-resolved laser spectroscopy and $^1\text{O}_2$ chemical probes, we demonstrated that after X-ray irradiation of the nano-objects, we could observe the formation of $^1\text{O}_2$ as well as a decrease of the luminescence of the core and the increase of the fluorescence of the porphyrin, proving the energy transfer between the core and the photosensitizer. By elaborating new NPs, we hope to increase the efficiency and prove the concept *in vitro* and *in vivo*.

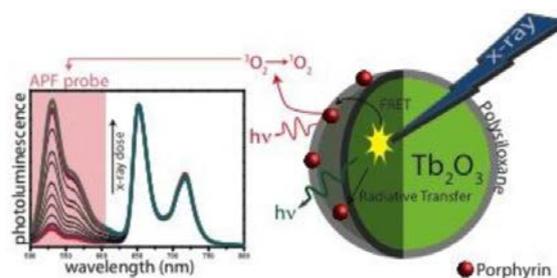


Figure 7. Luminescence of APF probe after X-rays excitation of nanoparticles composed of a Tb_2O_3 core, polysiloxane shell in which and porphyrins are covalently linked.

In 2015, inspired by the complementary advantages of PDT and radiotherapy, Zhang *et al.* described the integration of a scintillator and a semiconductor as an ionizing-radiation-induced PDT agent, achieving synchronous radiotherapy and depth-insensitive PDT with diminished molecular O_2 dependence [74]. These very encouraging results are the basis of new NPs developments. Recent Monte Carlo simulations have also been used to numerically estimate the spatial energy distribution resulting from the interaction between the X-ray photon and the NP, leading to a photodynamic and radiosensitization efficiencies. These simulations demonstrated that a significant fraction of energy is deposited within the NPs despite a primary interaction occurring in the surrounding media [75].

Conclusion and future perspectives

We have reviewed parameters that influence the radiosensitizing power of NPs: the biological evaluation methodology, the X-rays energy, the irradiation setup, the X-rays-NPs interaction, the ROS generation and the biodistribution of the NPs. A numerical evaluation was performed to assess the impact of the X-rays energy spectrum on the cell survival in presence of NPs. After the analysis of 64 papers from the literature, we noted that a large number of prospective studies have been carried out on the NPs-enhanced radiation therapy. However, only a few papers were comparable because the experimental settings were different, thus leading to uncertainty as to whether some parameters were influential or not, indicating that more investigations and standardizations are needed to converge towards a conclusion. Nevertheless, the present review strengthens the approach of using NPs to improve radiation therapy. Another parameter that has just been evaluated by Jain *et al.* is the influence of the oxygen conditions [76]. They showed that the radiosensibilization power of GNP is lower in hypoxic conditions. The knowledge

of these critical parameters could help investigators to design and evaluate new NPs in a more normalized approach which will be necessary for further translation to clinical applications.

Due attention needs to be paid to the recent emergence of very promising reports about the *in vitro/in vivo* synergetic therapy based on radiosensitization for instance, (i) an enhanced radiotherapy and photothermal ablation under the potential trimodal imaging guidance [22], or a simultaneous dual-mode imaging and localized therapy *via* synergetic chemo-/radiotherapy [77] or a synergetic chemo-/radio-/PDT and simultaneous magnetic/upconversion luminescent bimodal imaging [78].

Last but not least, *in silico* tests could be suggested to screen different nanoparticle designs as a first step to identify the most promising nano-objects. Indeed, a numerical model-based design could allow for quick screening of a large number of architectural configurations and finally identify the most promising formulations to enhance the dose deposition.

Abbreviations

ADPA, anthracenedipropionic acid; AIEA, International Atomic Energy Agency; APF, aminophenyl fluorescein; CFU, colony forming unit; DCFH, Dichlorodihydrofluorescein; DHE, dihydroethidium; DHF, dichlorofluorescein; DMF, Dose Modifying Factor; DNA, deoxyribonucleic acid; EPR, enhanced permeability and retention; FFA, furfuryl alcohol; GNP, gold-based nanoparticle; HIS, histidine; LQ, linear-quadratic; IAEA, International Atomic Energy Agency; ICRP, International Commission on Radiological Protection; ICRU, International Commission on Radiation Units & Measurement; MRI, magnetic resonance imaging; NER, Nanoparticle-mediated Enhancement Ratio; NP, nanoparticle; PDT, photodynamic therapy; PS, photosensitizer; RBE, Relative Biological Effectiveness; ROS, reactive oxygen species; SF2, survival fraction at 2 Gy; ¹O₂, singlet oxygen; SOSG, singlet oxygen sensor green; SPION: superparamagnetic iron oxide nanoparticles.

Acknowledgement

This work was supported by the research funds of the ANR P2N ANR-10-NANO-0009 PDTX and INCa "PDTX-Nano", the French Ligue Nationale Contre le Cancer and the French INCa (Institut National du Cancer) project 2011-130 entitled "PDTX-Nano".

The authors would like to thank Wael Rima for his advices and the review of the English language of this manuscript.

Competing Interests

The authors have declared that no competing interest exists.

References

- Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol.* 2006; 24: 1211-7.
- Thiesen B, Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperth.* 2008; 24: 467-74.
- Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, van Landeghem FK, Waldoefner N, Teichgraber U, et al. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol.* 2006; 78: 7-14.
- Starkewolf ZB, Miyachi L, Wong J, Guo T. X-ray triggered release of doxorubicin from nanoparticle drug carriers for cancer therapy. *Chem Commun.* 2013; 49: 2545-7.
- Chen W, Zhang J. Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; 6: 1159-66.
- Hainfeld JF, Dilmanian FA, Slatkin DN, Smilowitz HM. Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60: 977-85.
- Townley HE, Kim J, Dobson PJ. In vivo demonstration of enhanced radiotherapy using rare earth doped titania nanoparticles. *Nanoscale.* 2012; 4: 5043-50.
- Mirjoleit C, Papa AL, Crehan G, Raguin O, Seignez C, Paul C, et al. The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept. *Radiother Oncol.* 2013; 108: 136-42.
- Takahashi J, Misawa M. Analysis of Potential Radiosensitizing Materials for X-Ray-Induced Photodynamic Therapy. *Nanobiotechnol.* 2007; 3: 116-26.
- Yang W, Read PW, Mi J, Baisden JM, Reardon KA, Larner JM, et al. Semiconductor nanoparticles as energy mediators for photosensitizer-enhanced radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 72: 633-5.
- Le Duc G, Miladi I, Alric C, Mowat P, Brauer-Krisch E, Bouchet A, et al. Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based nanoparticles. *ACS nano.* 2011; 5: 9566-74.
- Liu P, Huang Z, Chen Z, Xu R, Wu H, Zang F, et al. Silver nanoparticles: a novel radiation sensitizer for glioma? *Nanoscale.* 2013; 5: 11829-36.
- Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, Taggart LE, Dickson GR, McMahon SJ, et al. Cell type-dependent uptake, localization, and cytotoxicity of 1.9 nm gold nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 2673-85.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006; 1: 2315-9.
- Kirkpatrick JP, Brenner DJ, Orton CG. The linear-quadratic model is inappropriate to model high dose per fraction effects in radiosurgery. *Med Phys.* 2009; 36: 3381-4.
- Agency IAE. Relative Biological Effectiveness in Ion Beam Therapy. International Atomic Energy Agency; 2008.
- Valentin J. Relative Biological Effectiveness (RBE), Quality Factor (Q), and Radiation Weighting Factor (W_r). International Commission on Radiological Protection; 2003.
- ICoR Units Measurements. Quantitative Concepts and Dosimetry in Radiobiology. International Commission on Radiation Units and Measurements; 1979.
- Podgoršak EB, Agency IAE. Radiation oncology physics: a handbook for teachers and students. International Atomic Energy Agency; 2005.
- Jain S, Coulter JA, Hounsell AR, Butterworth KT, McMahon SJ, Hyland WB, et al. Cell-specific radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011; 79: 531-9.
- Sim L, Fielding A, English M, Waclawik E, Rockstroh A, Soekmadji C, et al. Enhancement of biological effectiveness of radiotherapy treatments of prostate cancer cells in vitro using gold nanoparticles. Coogee Beach, Sydney, NSW: 2011 International Nanomedicine Conference. 2011.
- Xiao Q, Zheng X, Bu W, Ge W, Zhang S, Chen F, et al. A core/satellite multifunctional nanotheranostic for in vivo imaging and tumor eradication by radiation/photothermal synergistic therapy. *J Am Chem Soc.* 2013; 135: 13041-8.
- Klein S, Sommer A, Distel LV, Neuhuber W, Kryschi C. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as radiosensitizer via enhanced reactive oxygen species formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 425: 393-7.
- Misawa M, Takahashi J. Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine.* 2011; 7: 604-14.
- David Gara P, Garabano N, Llansola Portoles M, Moreno MS, Dodat D, Casas O, et al. ROS enhancement by silicon nanoparticles in X-ray irradiated aqueous suspensions and in glioma C6 cells. *J Nanopart Res.* 2012; 14: 1-13.
- Townley HE, Rapa E, Wakefield G, Dobson PJ. Nanoparticle augmented radiation treatment decreases cancer cell proliferation. *Nanomedicine.* 2012; 8: 526-36.

27. Wang L, Yang W, Read P, Lerner J, Sheng K. Tumor cell apoptosis induced by nanoparticle conjugate in combination with radiation therapy. *Nanotechnology*. 2010; 21: 475103.
28. Geng F, Song K, Xing JZ, Yuan C, Yan S, Yang Q, et al. Thio-glucose bound gold nanoparticles enhance radio-cytotoxic targeting of ovarian cancer. *Nanotechnology*. 2011; 22: 285101.
29. Cui FB, Li RT, Liu Q, Wu PY, Hu WJ, Yue GF, et al. Enhancement of radiotherapy efficacy by docetaxel-loaded gelatinase-stimuli PEG-Pep-PCL nanoparticles in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2014; 346: 53-62.
30. Chang M-Y, Shiau A-L, Chen Y-H, Chang C-J, Chen HHW, Wu C-L. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci*. 2008; 99: 1479-84.
31. Roa W, Zhang X, Guo L, Shaw A, Hu X, Xiong Y, et al. Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. *Nanotechnology*. 2009; 20: 375101.
32. Liu CJ, Wang CH, Chen ST, Chen HH, Leng WH, Chien CC, et al. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys Med Biol*. 2010; 55: 931-45.
33. Butterworth KT, McMahon SJ, Currell FJ, Prise KM. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale*. 2012; 4: 4830-8.
34. Rima W, Sancey L, Aloy MT, Armandy E, Alcantara GB, Epicier T, et al. Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles. *Biomaterials*. 2013; 34: 181-95.
35. Kong T, Zeng J, Wang X, Yang X, Yang J, McQuarrie S, et al. Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles. *Small*. 2008; 4: 1537-43.
36. Khoshgard K, Hashemi B, Arbabi A, Rasaei MJ, Soleimani M. Radiosensitization effect of folate-conjugated gold nanoparticles on HeLa cancer cells under ultraviolet superficial radiotherapy techniques. *Phys Med Biol*. 2014; 59: 2249-63.
37. Mowat P, Mignot A, Rima W, Lux F, Tillement O, Roulin C, et al. In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2011; 11: 7833-9.
38. Zhang XD, Wu D, Shen X, Chen J, Sun YM, Liu PX, et al. Size-dependent radiosensitization of PEG-coated gold nanoparticles for cancer radiation therapy. *Biomaterials*. 2012; 33: 6408-19.
39. Butterworth KT, Wyer JA, Brennan-Fournet M, Latimer CJ, Shah MB, Currell FJ, et al. Variation of strand break yield for plasmid DNA irradiated with high-Z metal nanoparticles. *Radiat Res*. 2008; 170: 381-7.
40. Brun E, Sanche L, Sicard-Roselli C. Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution. *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*. 2009; 72: 128-34.
41. Hossain M, Luo Y, Sun Z, Wang C, Zhang M, Fu H, et al. X-ray enabled detection and eradication of circulating tumor cells with nanoparticles. *Biosens Bioelectron*. 2012; 38: 348-54.
42. Chattopadhyay N, Cai Z, Kwon YL, Lechtman E, Pignol JP, Reilly RM. Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to X-radiation. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 137: 81-91.
43. Ngwa W, Kordecki H, Kassis AI, Kumar R, Sridhar S, Makrigrigors GM, et al. In vitro radiosensitization by gold nanoparticles during continuous low-dose-rate gamma irradiation with I-125 brachytherapy seeds. *Nanomedicine*. 2013; 9: 25-7.
44. Chattopadhyay N, Fonge H, Cai Z, Scollard D, Lechtman E, Done SJ, et al. Role of antibody-mediated tumor targeting and route of administration in nanoparticle tumor accumulation in vivo. *Mol Pharm*. 2012; 9: 2168-79.
45. Maggiorella L, Barouch G, Devaux C, Pottier A, Deutsch E, Bourhis J, et al. Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles. *Future Oncol*. 2012; 8: 1167-81.
46. Hainfeld JF, Smilowitz HM, O'Connor MJ, Dilmanian FA, Slatkin DN. Gold nanoparticle imaging and radiotherapy of brain tumors in mice. *Nanomedicine*. 2013; 8: 1601-9.
47. Jeong SY, Park SJ, Yoon SM, Jung J, Woo HN, Yi SL, et al. Systemic delivery and preclinical evaluation of Au nanoparticle containing beta-lapachone for radiosensitization. *J Control Release*. 2009; 139: 239-45.
48. LAB SL, et al. Biological Effectiveness of Low Linear-Energy Transfer Radiation as a Function of Energy. National Council on Radiation Protection & Measurements; Not released.
49. Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, He CF, Jackson P, Wong C, et al. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine*. 2009; 5: 136-42.
50. Brun E, Duchambon P, Blouquit Y, Keller G, Sanche L, Sicard-Roselli C. Gold nanoparticles enhance the X-ray-induced degradation of human centrin 2 protein. *Rad Phys Chem*. 2009; 78: 177-83.
51. Rahman WN, Corde S, Yagi N, Abdul Aziz SA, Annabell N, Geso M. Optimal energy for cell radiosensitivity enhancement by gold nanoparticles using synchrotron-based monoenergetic photon beams. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9: 2459-67.
52. Chithrani DB, Jelveh S, Jalali F, van Prooijen M, Allen C, Bristow RG, et al. Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy. *Radiat Res*. 2010; 173: 719-28.
53. Mohr PJ, Taylor BN, Newell DB. CODATA recommended values of the fundamental physical constants: 2006a. *J Phys Chem Ref Data*. 2008; 37: 1187-284.
54. Fukumori Y, Ichikawa H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Adv Powder Technol*. 2006; 17: 1-28.
55. McMahon SJ, Mendenhall MH, Jain S, Currell F. Radiotherapy in the presence of contrast agents: a general figure of merit and its application to gold nanoparticles. *Phys Med Biol*. 2008; 53: 5635-51.
56. Martin JE. *Physics for Radiation Protection*. Wiley; 2013.
57. Feldman LC, Mayer JW. *Fundamentals of Surface and Thin Film Analysis*. Prentice Hall PTR; 1986.
58. McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, et al. Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles. *Sci Rep*. 2011; 1: 18.
59. Douglass M, Bezak E, Penfold S. Monte Carlo investigation of the increased radiation deposition due to gold nanoparticles using kilovoltage and megavoltage photons in a 3D randomized cell model. *Med Phys*. 2013; 40: 071710.
60. Xing H, Zheng X, Ren Q, Bu W, Ge W, Xiao Q, et al. Computed tomography imaging-guided radiotherapy by targeting upconversion nanocubes with significant imaging and radiosensitization enhancements. *Sci Rep*. 2013; 3: 1751.
61. Klein S, Dell'Arciprete ML, Wegmann M, Distel LV, Neuhuber W, Gonzalez MC, et al. Oxidized silicon nanoparticles for radiosensitization of cancer and tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 434: 217-22.
62. Scarboro SB, Followill DS, Howell RM, Kry SF. Variations in photon energy spectra of a 6 MV beam and their impact on TLD response. *Med Phys*. 2011; 38: 2619-28.
63. Lechtman E, Chattopadhyay N, Cai Z, Mashouf S, Reilly R, Pignol JP. Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location. *Phys Med Biol*. 2011; 56: 4631-47.
64. Meesungnoen J, Jay-Gerin JP, Filali-Mouhim A, Mankhetkorn S. Low-energy electron penetration range in liquid water. *Radiat Res*. 2002; 158: 657-60.
65. Dufort S, Sancey L, Coll JL. Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Adv Drug Delivery Rev*. 2012; 64: 179-89.
66. Fan W, Shen B, Bu W, Zheng X, He Q, Cui Z, et al. Design of an intelligent sub-50 nm nuclear-targeting nanotheranostic system for imaging guided intranuclear radiosensitization. *Chem Sci*. 2015; 6: 1747-53.
67. Chattopadhyay N, Cai Z, Pignol JP, Keller B, Lechtman E, Bendayan R, et al. Design and characterization of HER-2-targeted gold nanoparticles for enhanced X-radiation treatment of locally advanced breast cancer. *Mol Pharm*. 2010; 7: 2194-206.
68. Conde J, Doria G, Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. *J Drug Deliv*. 2012; 2012: 751075.
69. Chen W. Nanoparticle Self-Lighting Photodynamic Therapy for Cancer Treatment. *J Biomed Nanotechnol*. 2008; 4: 369-76.
70. Liu Y, Chen W, Wang S, Joly AG. Investigation of water-soluble x-ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation. *Appl Phys Lett*. 2008; 92.
71. Morgan NY, Kramer-Marek G, Smith PD, Camphausen K, Capala J. Nanoscintillator conjugates as photodynamic therapy-based radiosensitizers: calculation of required physical parameters. *Radiat Res*. 2009; 171: 236-44.
72. Scaffidi JP, Gregas MK, Lauly B, Zhang Y, Vo-Dinh T. Activity of psoralen-functionalized nanoscintillators against cancer cells upon X-ray excitation. *ACS nano*. 2011; 5: 4679-87.
73. Bulin A-L, Truillet C, Choukrat R, Lux F, Frochet C, Amans D, et al. X-ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator-Coupled Porphyrins. *J Phys Chem C*. 2013; 117: 21583-9.
74. Zhang C, Zhao K, Bu W, Ni D, Liu Y, Feng J, et al. Marriage of scintillator and semiconductor for synchronous radiotherapy and deep photodynamic therapy with diminished oxygen dependence. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015; 54: 1770-4.
75. Bulin AL, Vasil'ev A, Belsky A, Amans D, Ledoux G, Dujardin C. Modelling energy deposition in nanoscintillators to predict the efficiency of the X-ray-induced photodynamic effect. *Nanoscale*. 2015.
76. Jain S, Coulter JA, Butterworth KT, Hounsell AR, McMahon SJ, Hyland WB, et al. Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions. *Radiother Oncol*. 2014; 110: 342-7.
77. Fan W, Shen B, Bu W, Chen F, Zhao K, Zhang S, et al. Rattle-structured multifunctional nanotheranostics for synergistic chemo-/radiotherapy and simultaneous magnetic/luminescent dual-mode imaging. *J Am Chem Soc*. 2013; 135: 6494-503.
78. Fan W, Shen B, Bu W, Chen F, He Q, Zhao K, et al. A smart upconversion-based mesoporous silica nanotheranostic system for synergistic chemo-/radio-/photodynamic therapy and simultaneous MR/UCL imaging. *Biomaterials*. 2014; 35: 8992-9002.
79. Xiao F, Zheng Y, Cloutier P, He Y, Hunting D, Sanche L. On the role of low-energy electrons in the radiosensitization of DNA by gold nanoparticles. *Nanotechnology*. 2011; 22: 465101.
80. Xing JZ, Xiaoyan Y, Jie C, Biao H, Roa W. Electronic dynamic cellular sensor used to measure gold nanoparticles enhanced radiotherapy. *Life Science Systems and Applications Workshop (LiSSA), 2011 IEEE/NIH*. 2011: 20-3.

81. Butterworth KT, Coulter JA, Jain S, Forker J, McMahon SJ, Schettino G, et al. Evaluation of cytotoxicity and radiation enhancement using 1.9 nm gold particles: potential application for cancer therapy. *Nanotechnology*. 2010; 21: 295101.
82. Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kalef-Ezra JA, Smilowitz HM. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol*. 2010; 55: 3045-59.
83. Porcel E, Liehn S, Remita H, Usami N, Kobayashi K, Furusawa Y, et al. Platinum nanoparticles: a promising material for future cancer therapy? *Nanotechnology*. 2010; 21: 85103.
84. Rahman WN, Wong CJ, Yagi N, Davidson R, Geso M. Dosimetry And Its Enhancement Using Gold Nanoparticles In Synchrotron Based Microbeam And Stereotactic Radiosurgery. *AIP Conference Proceedings*. 2010; 1266: 107-10.
85. Withers NJ, Plumley JB, Triño ND, Sankar K, Akins BA, Rivera AC, et al. Scintillating-nanoparticle-induced enhancement of absorbed radiation dose. *SPIE Proceedings*; 2009: 718917-8.
86. Liu CJ, Wang CH, Chien CC, Yang TY, Chen ST, Leng WH, et al. Enhanced x-ray irradiation-induced cancer cell damage by gold nanoparticles treated by a new synthesis method of polyethylene glycol modification. *Nanotechnology*. 2008; 19: 295104.
87. Kaur H, Pujari G, Semwal MK, Sarma A, Avasthi DK. In vitro studies on radiosensitization effect of glucose capped gold nanoparticles in photon and ion irradiation of HeLa cells. *Nucl Instrum Methods Phys Res, Sect B*. 2013; 301: 7-11.
88. Wang C, Li X, Wang Y, Liu Z, Fu L, Hu L. Enhancement of radiation effect and increase of apoptosis in lung cancer cells by thio-glucose-bound gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. *J Nanopart Res*. 2013; 15: 1-12.
89. Bobyk L, Edouard M, Deman P, Vautrin M, Pernet-Gallay K, Delaroche J, et al. Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment. *Nanomedicine*. 2013; 9: 1089-97.
90. Alqathami M, Blencowe A, Yeo UJ, Franich R, Doran S, Qiao G, et al. Enhancement of radiation effects by bismuth oxide nanoparticles for kilovoltage x-ray beams: A dosimetric study using a novel multi-compartment 3D radiochromic dosimeter. *J Phys Conf Ser*. 2013; 444: 012025.
91. Joh DY, Sun L, Stangl M, Al Zaki A, Murty S, Santoiemma PP, et al. Selective targeting of brain tumors with gold nanoparticle-induced radiosensitization. *PLoS ONE*. 2013; 8: e62425.
92. Briggs A, Corde S, Oktaria S, Brown R, Rosenfeld A, Lerch M, et al. Cerium oxide nanoparticles: influence of the high-Z component revealed on radioresistant 9L cell survival under X-ray irradiation. *Nanomedicine*. 2013; 9: 1098-105.
93. Cho SH, Jones BL, Krishnan S. The dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) via brachytherapy using low-energy gamma-/x-ray sources. *Phys Med Biol*. 2009; 54: 4889-905.
94. Jones BL, Krishnan S, Cho SH. Estimation of microscopic dose enhancement factor around gold nanoparticles by Monte Carlo calculations. *Med Phys*. 2010; 37: 3809-16.
95. Berbeco RI, Ngwa W, Makrigiorgos GM. Localized dose enhancement to tumor blood vessel endothelial cells via megavoltage X-rays and targeted gold nanoparticles: new potential for external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011; 81: 270-6.
96. Garnica-Garza HM. Treatment planning considerations in contrast-enhanced radiotherapy: energy and beam aperture optimization. *Phys Med Biol*. 2011; 56: 341-55.
97. McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Coulter JA, Jain S, Butterworth KT, et al. Nanodosimetric effects of gold nanoparticles in megavoltage radiation therapy. *Radiother Oncol*. 2011; 100: 412-6.
98. Perez-Lopez CE, Garnica-Garza HM. Monte Carlo modeling and optimization of contrast-enhanced radiotherapy of brain tumors. *Phys Med Biol*. 2011; 56: 4059-72.
99. Chow JC, Leung MK, Jaffray DA. Monte Carlo simulation on a gold nanoparticle irradiated by electron beams. *Phys Med Biol*. 2012; 57: 3323-31.
100. Ngwa W, Makrigiorgos GM, Berbeco RI. Gold nanoparticle enhancement of stereotactic radiosurgery for neovascular age-related macular degeneration. *Phys Med Biol*. 2012; 57: 6371-80.
101. Detappe A, Tsiamas P, Ngwa W, Zygmanski P, Makrigiorgos M, Berbeco R. The effect of flattening filter free delivery on endothelial dose enhancement with gold nanoparticles. *Med Phys*. 2013; 40: 031706.
102. Garnica-Garza HM. Monte Carlo modeling of converging small-field contrast-enhanced radiotherapy of prostate. *Phys Med*. 2013; 29: 493-9.
103. Mesbahi A, Jamali F, Garehaghaji N. Effect of photon beam energy, gold nanoparticle size and concentration on the dose enhancement in radiation therapy. *BI*. 2013; 3: 29-35.
104. Tsiamas P, Liu B, Cifter F, Ngwa WF, Berbeco RI, Kappas C, et al. Impact of beam quality on megavoltage radiotherapy treatment techniques utilizing gold nanoparticles for dose enhancement. *Phys Med Biol*. 2013; 58: 451-64.
105. Tu S-J, Yang P-Y, Hong J-H, Lo C-J. Quantitative dosimetric assessment for effect of gold nanoparticles as contrast media on radiotherapy planning. *Rad Phys Chem*. 2013; 88: 14-20.

L'objectif de l'utilisation de nanoparticules en radiothérapie est d'augmenter le différentiel d'effet entre le tissu sain et le tissu tumoral, afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique sans causer de dommages additionnels au tissu sain.

Plusieurs mécanismes d'interaction sont possibles entre une nanoparticule métallique et les rayonnements X. L'emploi de nanoparticules à Z élevé qui, soumises à des rayonnements X, augmentent l'effet photoélectrique et l'effet Compton (ainsi que les électrons secondaires émis), augmentant l'effet radiothérapeutique. Les rayons X peuvent également servir à détruire des nanocapsules relarguant un principe actif au niveau tumoral uniquement. Enfin, l'utilisation de nanoparticules scintillantes qui, excitées par les rayons X, combinent un effet photodynamique (par la production d'ERO suite à l'excitation du photosensibilisateur) et un effet radiothérapeutique augmenté (par la présence de la nanoparticule à numéro atomique élevé).

L'utilisation de nanoparticules en radiothérapie nécessite de définir des critères d'évaluation standard permettant d'estimer l'amélioration apportée. L'évaluation de l'effet des rayonnements X *in vitro* est généralement réalisée *via* des essais clonogéniques. Ils intègrent les effets de morts précoces et tardives en mesurant la capacité des cellules à se diviser indéfiniment (en créant des clones). Ces résultats sont généralement présentés sous forme de courbes de survie en fonction de la dose d'irradiation reçue, puis les données expérimentales sont modélisées par le modèle linéaire quadratique. Ces courbes de survie donnent lieu ensuite à différents critères d'évaluation. L'agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) propose d'utiliser la DMF (*Dose Modifying Factor*) :

$$DMF = \frac{\text{Dose pour produire un effet avec une nanoparticule}}{\text{Dose pour produire le même effet sans nanoparticule}}$$

La DMF ne peut être utilisée que lorsque plusieurs doses d'irradiation sont testées. Lorsque les études *in vitro* ne comparent que l'effet biologique induit en présence ou en absence de nanoparticules à une seule dose d'irradiation le NER (*Nanoparticles-mediated Enhancement Ratio*) est utilisé :

$$NER = \frac{\text{Effet biologique produit avec une nanoparticule}}{\text{Effet biologique produit sans nanoparticule à la même dose d'irradiation}}$$

Enfin, l'évaluation de la production d'ERO peut fournir des informations sur la capacité de la nanoparticule à augmenter l'effet de la radiothérapie. L'utilisation de sondes fluorescentes en présence d'ERO de manière plus ou moins spécifique peut permettre de déterminer le type d'ERO produites et leur quantité.

D'autres paramètres que les nanoparticules elles-mêmes peuvent avoir un impact sur la capacité radiosensibilisante des nanoparticules. La méthodologie d'évaluation biologique doit être prise en compte. En effet, différents tests sont réalisés pour évaluer la cytotoxicité des radiations ionisantes en présence de nanoparticules, tels que des comptages de viabilité, des tests métaboliques, ainsi que des essais clonogéniques. D'une part, les protocoles ne sont pas toujours standardisés, rendant difficile les interprétations de résultats inter-études, et d'autre part, le délai entre l'irradiation et la réalisation du test n'est pas toujours mentionné, alors qu'il influence fortement les résultats obtenus. Les mécanismes de pertes cellulaires impliqués ne seront pas les mêmes, selon que le test ait été réalisé immédiatement ou plus longtemps post-irradiation.

Il a également été démontré que l'énergie du faisceau de photon incident avait un impact sur l'efficacité biologique. En radiothérapie, les faisceaux de photons X de faibles énergies (<200 kV) sont

très peu utilisés, et sont réservés à des traitements de la peau. Les faisceaux couramment utilisés en clinique, sont de l'ordre du megavoltage (1 à 25 MV) et permettent de traiter des tumeurs profondes (>2 cm de profondeur). Les dommages cellulaires provenant de l'interaction entre les rayons X et les nanoparticules à Z élevé résultent principalement de l'effet photoélectrique, qui est prédominant pour des énergies inférieures à 500 keV. Théoriquement, l'effet radiosensibilisant devrait donc être plus important pour les faisceaux de plus faible énergie. La comparaison de la DMF en fonction de l'énergie du faisceau de photons X incident de plusieurs études, a montré que bien que des DMF plus faibles soient atteintes avec des énergies autour de 100 keV, une diminution de la DMF était aussi observée avec des faisceaux de 6 MV. De plus, les DMF à 6MV présentaient très peu de variabilité inter-études, bien que le type de nanoparticules et de cellules diffèrent.

La conception de la nanoparticule elle-même, modifie les interactions avec les rayonnements ionisants. Elles sont généralement composées d'un cœur de métal à Z élevé (or, argent, lanthanides...), d'une coquille structurant la nanoparticule, et qui permet de la fonctionnaliser (furtivité, adressage...). Du fait de leur numéro atomique élevé, leur interaction avec les rayons survient principalement à des énergies basses où l'effet photoélectrique est prépondérant. Mais les nanoparticules peuvent aussi interagir avec des faisceaux de rayonnements de plus hautes énergies qui sont poly-énergétiques. Leur composante de faible énergie interagit avec la matière par effet photoélectrique et leur composante de forte énergie par l'effet Compton principalement. Les électrons secondaires (de plus faible énergie) émis à la suite de ces différentes interactions peuvent causer également des dommages cellulaires. Leur contribution à l'ionisation de la matière serait surtout observée à proximité de la nanoparticule (>200 nm), tandis que les électrons secondaires de plus fortes énergies contribueraient plutôt au dépôt de dose à plus grande échelle (quelques micromètres). Cependant, il semblerait que la taille de la nanoparticule et sa distribution (sous forme de *cluster*) influence sa capacité à augmenter la radiothérapie [191]. Les plus grosses nanoparticules ou *clusters* favoriseraient l'auto-absorption des électrons de faibles énergies, diminuant l'amélioration des effets induits.

De même, leur taille, charge et composition peut influencer leur capacité à générer des ERO. Il semblerait qu'une relation inverse existe entre le diamètre des nanoparticules d'or et leur capacité à générer des ERO lors d'une irradiation X [192]. La fonctionnalisation de la surface de SPION (*Super-Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticle*) par un groupement de charge positive modifiait leur localisation intracellulaire et augmentait significativement leur production de ERO. En effet, leur localisation dans les membranes des organites (réticulum endoplasmique, mitochondrie, membrane plasmique) induisent une peroxydation des lipides augmentant également l'effet radiosensibilisant [193].

A l'échelle cellulaire et même tissulaire, il est important que les nanoparticules soient internalisées sélectivement dans les cellules cibles afin que les effets cytotoxiques générés n'affectent pas les organes à risque dans le voisinage immédiat du tissu lésé. La sélectivité vis-à-vis du tissu tumoral peut être favorisée par l'ajout de molécules d'adressage à la surface des nanoparticules (anticorps, peptide, glucose, acide folique...). Les électrons secondaires produits lors de l'interaction entre la nanoparticule et les rayonnements ionisants semblent diffuser sur des distances comprises entre quelques nanomètres jusqu'à quelques micromètres, impliquant nécessairement l'internalisation des nanoparticules dans la cellule pour générer un effet létal [194] [195]. Les modifications des propriétés physico-chimiques des nanoparticules modifient également leur incorporation intracellulaire. Rima *et al.* ont montré que des petites nanoparticules de gadolinium de moins de 5 nm de diamètre, entraient par diffusion passive, et par macropinocytose lorsqu'elles étaient agglomérées [196].

Il est donc important de prendre en compte ces différents paramètres lors de la conception du nano-objet, puis lors des essais précliniques, afin d'améliorer le développement de cette stratégie.

La stratégie de radiothérapie augmentée par des nanoparticules à Z élevé, ouvre sur d'autres applications telles que la PDTX pour augmenter l'efficacité de traitement localement.

1.2.3 Nanoparticules scintillantes pour la PDTX

Principe de la PDTX

Le principe de la PDTX repose sur l'utilisation de matériaux "scintillants" *i.e.* capables d'absorber une radiation ionisante et d'émettre de la luminescence dans le domaine UV-visible à une longueur d'onde correspondant au spectre d'absorption du photosensibilisateur utilisé (Figure 37) [197].

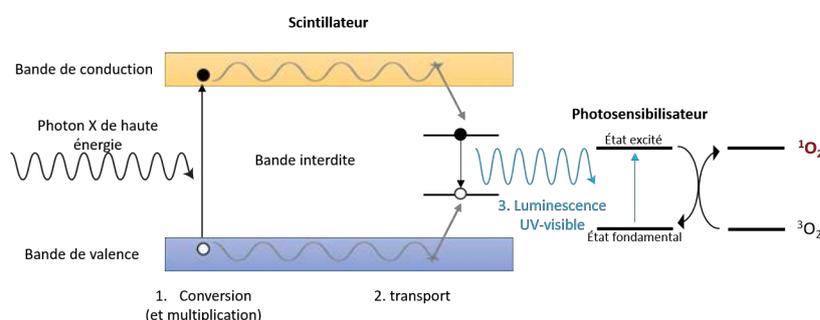


FIGURE 37 – Principe du mécanisme de conversion de l'énergie dans un scintillateur. Le processus de scintillation est divisé en trois phases consécutives : 1. conversion (et multiplication), 2. transport, 3. luminescence. Ce processus se déroule à des niveaux d'énergies électroniques impliquant la bande de valence et de conduction du matériau séparées par une large bande interdite nécessitant un apport d'énergie très intense pour faire sauter un électron de la bande de valence à la bande de conduction. Pendant la phase 1, l'interaction entre un photon de haute énergie (100 keV et 1 MeV) et le matériau se produit par effet photoélectrique ou Compton, en dessous de 100 keV l'effet photoélectrique est d'une importance majeure. Plusieurs paires électron-trou (respectivement cercle noir et blanc) sont créées par le passage d'un électron de la bande de valence à la bande de conduction et thermalisées. Lors de la phase 2, les paires migrent à travers le matériau et des pertes d'énergies se produisent par transfert non radiatif. La phase 3 consiste en l'emprisonnement des paires dans le centre de luminescence qui y cèdent leur énergie par différents processus rapides ou non, entraînant l'émission de rayonnement UV-visible, qui dans le cas d'un transfert lent mène au phénomène d' *afterglow* ou luminescence rémanente.

Les nanoparticules scintillantes sont déjà beaucoup utilisées dans le domaine de la sécurité et du diagnostic médical en tant que détecteurs de rayonnements ionisants [198].

Le processus de scintillation au sein d'une nanoparticule scintillante se déroule en quatre étapes :

1. d'abord la conversion de la radiation incidente en un large nombre de paires électron-trou,
2. puis le transfert de l'énergie des paires électron-trou au centre luminescent,
3. ensuite l'émission dans le domaine UV-visible,
4. et le transfert d'énergie au photosensibilisateur.

La gamme d'énergie du rayonnement incident qui excite le scintillateur a son importance dans l'efficacité du mécanisme de scintillation. Lors de l'utilisation de rayonnements X pour activer un matériau scintillant, l'effet photoélectrique est à privilégier car il favorise la formation de paire électron-trou en arrachant des électrons dans les orbitales internes. L'effet Compton, correspondant à une absorption partielle de l'énergie, est à éviter car il limite le rendement lumineux [198].

L'émission de luminescence doit être à une longueur d'onde en concordance avec le spectre d'absorption du photosensibilisateur afin de l'exciter et donc générer un effet photodynamique. La recherche s'est donc concentrée sur le développement de nanomatériaux scintillants, qui convertissent les photons X de haute énergie en lumière UV-visible à une longueur d'onde de 400 nm environ correspondant à la bande d'absorption maximale des porphyrines.

Nanoparticules scintillantes

L'équipe de Chen *et al.*, en 2006, sont les premiers à décrire en détail le principe de PDTX sur des nanoparticules composées d'halogènes et d'alcalino-terreux dopés avec un lanthanide [199]. Les preuves de concept d'une luminescence prolongée qui persiste, de 10 min à plusieurs heures, après l'arrêt de la source d'excitation, ainsi que celle d'un transfert non radiatif par FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) entre la nanoparticule scintillante (Cadmium-Selenium) et le photosensibilisateur (porphyrine) y sont données.

Cette étude permet également d'élaborer un cahier des charges des nanoparticules scintillantes, qui doivent regrouper les caractéristiques fondamentales suivantes :

- une bonne dispersion ainsi qu'une stabilité dans un environnement biologique,
- une synthèse accessible permettant un chargement du photosensibilisateur facile et solide,
- un bon rendement de luminescence pour le scintillateur qui dépend principalement de sa fabrication et de l'énergie des rayonnements X utilisés [198],
- un bon chevauchement spectral entre l'émission du scintillateur et l'absorption du photosensibilisateur, duquel découle
- un bon rendement de transfert d'énergie scintillateur/photosensibilisateur et un bon rendement quantique d'oxygène singulet.

Ces nanoparticules scintillantes peuvent fournir deux effets différents : une augmentation du dépôt de dose dû à la présence d'éléments lourds dans la nanoparticule (métal, lanthanide, fluorure...) (cf. section 1.2.2) et un effet photodynamique dû au transfert d'énergie entre l'élément lourd et le photosensibilisateur. C'est pourquoi la composition, la taille (et donc la distance entre le scintillateur et le photosensibilisateur), la distribution cellulaire ainsi que l'énergie du rayonnement incident jouent sur la capacité d'amélioration de l'effet thérapeutique.

Le tableau 8 collige les paramètres déterminants de plusieurs études sur la PDTX (Tableau 8). Le premier paramètre commun concerne l'utilisation majoritaire de nanoparticules dopées par des lanthanides car ils présentent deux avantages pour la PDTX : les lanthanides (Gd, Tb, Eu, Ce...) sont des éléments lourds pouvant absorber les rayons X, mais sont également des ions luminescents, pouvant émettre dans l'UV-visible à des longueurs d'onde compatibles avec la plupart des photosensibilisateurs. Le terbium et l'euprotium, sous leur forme Tb(III) et Eu(III), sont particulièrement intéressants en PDTX. En effet, leur rendement de luminescence est élevé et leur longueur d'onde d'émission qui sont respectivement à 544 et 620 nm chevauchent bien les bandes d'absorption de certains photosensibilisateurs (Figure 38).

Le choix du couple scintillateur/photosensibilisateur est très important pour l'efficacité du transfert d'énergie. Une nanoparticule de LaF₃:Tb conjuguée à du rose Bengale présentait une efficacité de transfert d'énergie évaluée à 85% alors que celle de LaF₃:Tb conjuguée à une MTCP présentait une

efficacité de transfert évaluée à 57% [200] [189]. Cette différence de qualité de transfert provient de la moins bonne complémentarité spectrale entre le Tb et la MTCP qu'entre le Tb et le rose bengale, soulignant l'importance de la conception du nano-objet (Figure 38).

Cependant, il ne faut pas oublier de prendre en compte le type de greffage du photosensibilisateur et la taille des nano-objets qui peuvent fortement influencer le transfert d'énergie.

TABLE 8 – Résumé non exhaustif des principaux travaux menés sur l'utilisation de nanoparticules excitables en X pour la PDT. Tiré de [201]

Nano-objet	Taille (nm)	PS	Energie RX	Expérimentation	Etude
LaF3 :Tb	15	MTCP	250 keV	Photophysique	Liu et al. 2008
GdO2S :Tb	20	Photofrin II	120 kVp	<i>In vitro</i>	Abliz et al. 2011
Tb2O3	3	Porphyrine	44 kV	Photophysique	Bulin et al. 2013
LaF3 :Ce	2000	PPIX	90 kV	<i>In vitro</i>	Zou et al. 2014
Cu-Cy	50-100	/	90 kV	<i>In vivo</i>	Ma et al. 2014
SrAl2O4 :Eu	80	MC540	50 kV	<i>In vivo</i>	Chen et al. 2015
SiC/SiOx	/	H2TPACPP	6 MV	<i>In vitro</i>	Rossi et al. 2015
LiYF4 :Ce	34	ZnO	220 keV	<i>In vivo</i>	Zhang et al. 2015
ZnS :Cu,Co	4	TBrRh123	120 kVp	<i>In vitro</i>	Ma et al. 2014b

H2TPACPP: tetra(N-propynyl-4-aminocarbonylphenyl) porphyrin; MTAP: meso-tetra(o-amino phenyl) porphyrin; TBrRh123: tetrabromorhodamine-123.

Le tableau montre également que des énergies de l'ordre du KeV sont majoritairement utilisées pour activer les nanoparticules scintillantes. Ces niveaux d'énergie correspondent à ceux utilisés en radiologie ou en curiethérapie. Une étude a été menée avec un niveau d'énergie clinique à 6 MV par Rossi *et al.* montrant un effet additif des rayons X et de la PDT par l'utilisation de nanofils de SiC/SiOx conjugués à une porphyrine sur une lignée de carcinome pulmonaire humain A549 [207]. Une diminution de la fraction de survie a été observée à 2 Gy, bien que les nanoparticules soient déjà cytotoxiques par elles-mêmes. Cependant, ils ont montré qu'une excitation à haute énergie était possible.

L'enjeu final est de déterminer la dose de rayonnement nécessaire afin que le rendement de luminescence puisse générer un effet photodynamique cytotoxique en restant dans des niveaux de doses de radiations thérapeutiques [211]. Morgan *et al.* étudient la question en calculant les para-

mètres physiques requis pour que les nanoparticules scintillantes génèrent des ERO, principalement l'oxygène singulet, à des doses de rayonnements X thérapeutiques. Il en ressort principalement que le rendement de luminescence du nanoscintillateur, l'efficacité de transfert au photosensibilisateur et l'incorporation cellulaire du nano-objet nécessitent tous d'être optimisés. En revanche, il semble qu'en ce qui concerne le transfert d'énergie entre le rayonnement X et le nanoscintillateur, celui-ci soit optimal pour des énergies inférieures à 300 keV, limitant leur utilisation en radiothérapie conventionnelle.

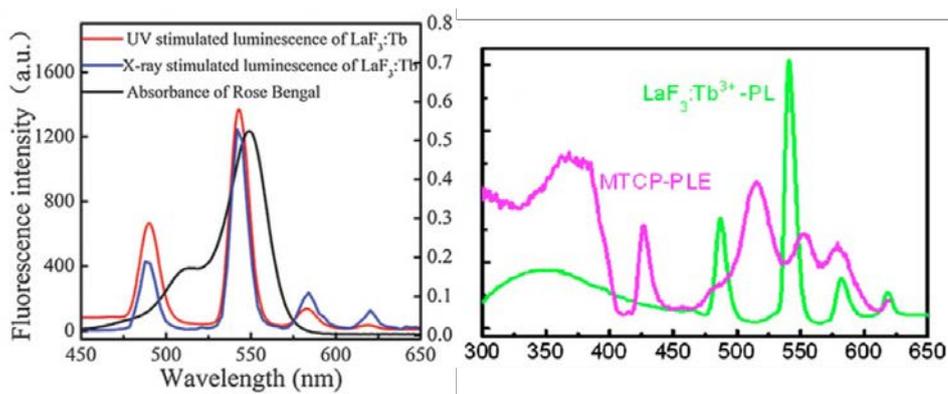


FIGURE 38 – **A gauche** : la nanoparticule scintillante de $\text{LaF}_3:\text{Tb}$ présente un spectre d'émission de fluorescence typique du terbium qui se caractérise par la présence de 4 pics à 480, un maximum à 550, 580 et 620 nm. Celle-ci émet de la fluorescence après excitation par des rayonnements UV (spectre rouge) ou X (spectre bleu). Le spectre d'absorption (en noir) du rose bengale (photosensibilisateur) présente un pic principal à 550 nm qui chevauche parfaitement le maximum d'émission de fluorescence du Tb, conformation idéale pour un bon rendement de transfert d'énergie entre le scintillateur et le photosensibilisateur [200]. **A droite** : la nanoparticule scintillante de $\text{LaF}_3:\text{Tb}$ présente également un profil d'émission de fluorescence caractéristique du Tb (spectre vert). La superposition du spectre d'absorption de la MTCP (photosensibilisateur) montre un chevauchement imparfait au niveau du maximum d'émission du Tb à 550 nm, et un chevauchement parfait à 580 nm entre l'absorption du photosensibilisateur et l'émission du Tb [189]. Résultats tirés de [200] [189].

1.2.4 Complémentarité d'action entre la radiothérapie et la PDT

La cascade de réactions induite par l'interaction des rayonnements avec le milieu biologique est généralement divisée en trois étapes :

- l'étape physique, très rapide ($<10^{-15}$ s), pendant laquelle les interactions entre les photons X incidents et les atomes de la matière, mènent à leur ionisation ou excitation.
- l'étape physico-chimique qui suit, (10^{-15} et 10^{-6} s post-irradiation), voit les espèces ionisées ou excitées réagir directement ou indirectement avec leur milieu. On distingue l'action directe, où les rayonnements ionisants altèrent directement la cible moléculaire (ADN, macromolécules), et l'action indirecte, où les rayons X incidents ionisent ou excitent les molécules d'eau du milieu, créant des espèces radicalaires très réactives telles que le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$), hydrogène ($\text{H}\cdot$), les électrons hydratés (e_{aq}^-) qui, en présence d'oxygène, peuvent ensuite se recombiner pour donner d'autres espèces réactives comme l'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroperoxyde ($\text{HO}_2\cdot$). Ces ERO diffusent dans le milieu environnant

en oxydant différentes macromolécules (lipides des membranes des organelles, protéines du cytosquelette, ADN...) causant divers dommages cellulaires.

- L'étape biologique qui s'étend de quelques heures à plusieurs années. Les effets directs et indirects peuvent causer des lésions i) membranaires par peroxydation des lipides, menant à un dysfonctionnement des organites touchées ou à la mort par nécrose de la cellule, si la membrane plasmique a fortement été touchée, ii) cytoplasmiques en oxydant les protéines du cytosquelette, altérant le fonctionnement cellulaire, iii) à l'ADN qui, si elles ne sont pas réparées, peuvent mener à une mort différée, ou à une mutation. Les dommages engendrés peuvent donc être létaux, *i.e.* mener à une mort précoce par apoptose/nécrose ou tardive par perte des capacités de division. Ils peuvent aussi être sublétaux *i.e.* réparés rapidement. Dans ce cas, la cellule survit et si elle a accumulé des mutations lors de la réparation, cela peut entraîner une cancérisation secondaire.

La radiothérapie engendre principalement des dommages différés en touchant l'ADN, et qui mènent à une perte irréversible de la capacité de division. La mort précoce par altération des membranes et un phénomène beaucoup moins observé.

Les nanoparticules scintillantes fonctionnalisées par un photosensibilisateur offrent des perspectives d'amélioration thérapeutique prometteuses grâce à la complémentarité d'action entre la radiothérapie et la PDT. Concernant les mécanismes radiophysiques et radiobiologiques induits, deux modes d'action complémentaires sont recherchés : le cœur de lanthanide peut renforcer l'effet photoélectrique des rayons X (Figure 35), augmentant ainsi les effets biologiques de la radiothérapie conventionnelle *i.e.* les effets décrits ci-dessus. Les molécules photo-activées par l'irradiation X, peuvent générer un effet photodynamique produisant des ERO complémentaires tel que l'oxygène singulet (1O_2) qui est hautement cytotoxique, et atteindre des cibles différentes de la radiothérapie conventionnelle selon la localisation intracellulaire de la nanoparticule, multipliant les cibles et les dommages induits. Ces deux modes d'action ainsi combinés laissent espérer des dommages radio-induits complémentaires sur des cibles moléculaires et subcellulaires différentes, à l'origine d'une mort cellulaire multifactorielle, suffisante pour aboutir à l'éradication tumorale.

2

Matériel et Méthodes

Sommaire

2.1	Caractérisation photophysique des nanoparticules terbium-porphyrine . .	163
2.1.1	Caractéristiques générales des nanoparticules	163
2.1.2	Caractérisation photophysique et physico-chimique des nanoparticules	164
2.2	Culture cellulaire	165
2.3	Mesure de Cytotoxicité	166
2.4	Mesure de l'incorporation cellulaire	166
2.5	Capacité clonogénique	167
2.6	Détection des espèces réactives de l'oxygène	170

2.1 Caractérisation photophysique des nanoparticules terbium-porphyrine

2.1.1 Caractéristiques générales des nanoparticules

Les nanoparticules hybrides multifonctionnelles étudiées ont été synthétisées par Albert Moussaron, sous la direction de François Lux et Olivier Tillement, à l'UMR 5306, CNRS, Université Claude Bernard, Lyon, Institut Lumière Matière. Elles sont constituées :

1. d'un squelette de fonctionnalisation en polysiloxane sur lequel sont greffés de façon covalente les parties suivantes :
2. des atomes de terbium Tb(III) chelatés par un dérivé du DOTA (acide 1,4,7,10-tétra-azacyclododécane - 1,4,7,10-tétra-acétique) constituant la partie luminescente de la nanoparticule, et ayant des propriétés d'agent de contraste en IRM,
3. le photosensibilisateur, qui est ici une porphyrine 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine) (lot 074aGA014, Porphychem, Dijon, France) que nous nommerons P1 sous sa forme libre.

Elles sont plus précisément constituées de 7 à 10 molécules de terbium, greffées à 0,2 P1/Tb. Les nanoparticules dites contrôle sans photosensibilisateur sont appelées "**Tb**", celles greffées avec de la P1 "**Tb@P1**", la porphyrine seule "**P1**" et le mélange nanoparticule de terbium non greffées/porphyrine "**Tb + P1**". Les concentrations respectives de Tb et de P1 dans le mélange Tb + P1 ont été calculées d'après le taux de greffage des Tb@P1.

2.1.2 Caractérisation photophysique et physico-chimique des nanoparticules

Le taux de greffage de la P1 sur les nanoparticules de Tb a été déterminé par une gamme étalon en absorption de la porphyrine. Pour pouvoir comparer l'échantillon (Tb@P1) à la référence (P1), la solution mère de porphyrine a été préparée dans du DMSO à 2 mM pour la solubilisation, puis diluée à 200 μ M dans de l'eau milliQ afin d'être dans le même milieu que l'échantillon. Une dilution en cascade contenant 5 points allant de 100 à 5 μ M a ensuite été réalisée pour effectuer la gamme étalon à 519 et 649 nm (pics correspondants respectivement à la bande QIV et QI). L'échantillon a lui aussi été dilué en cascade afin de vérifier en plusieurs points la proportionnalité de la gamme.

Les spectres d'absorption, de fluorescence, de rendement quantique en oxygène singulet et de fluorescence en temps décalé ont été réalisés au sein du LRGP (Laboratoire Réactions et Génie des Procédés), UMR 7274 CNRS, Université de Lorraine, avec l'aide de Rima Chouikrat et Philippe Arnoux.

Le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta ont été réalisés au sein du LIBio (Laboratoire d'Ingénierie des BIOMolécules) Université de Lorraine par Jordane Jasniewski.

Tous les spectres ont été mesurés en utilisant des cuves quartz à 4 faces.

Les spectres d'absorption et de fluorescence des nanoparticules ont été réalisés dans l'eau deutérée en utilisant respectivement, un spectrophotomètre et un spectrofluorimètre (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). L'excitation est assurée par une lampe Xénon à arc basse pression. Les rendements de fluorescence (Φ_{fluo}) sont déterminés par rapport à une solution référence, la tetraphénylporphyrine (TPP) diluée dans du toluène. Les solutions de référence (TPP) et de nanoparticules sont diluées jusqu'à ce que l'absorption de la bande de Soret à 419 nm soit comprise entre 0,10 et 0,25. Les rendements de fluorescence sont calculés selon la formule suivante :

$$\Phi_{fluo} = \Phi_{fluo(ref)} \times \frac{I}{I_{ref}} \times \frac{A_{ref}}{A} \times \frac{n}{n_{ref}}$$

Où :

Φ_{fluo} et $\Phi_{fluo(ref)}$: le rendement de fluorescence de l'échantillon dans l'eau deutérée et de la référence dans le toluène, respectivement,

I et I_{ref} : les aires sous les spectres de fluorescence entre 600 et 750 nm de l'échantillon et de la référence, respectivement,

A et A_{ref} : l'absorption à 419 nm de l'échantillon et de la référence, respectivement et

n et n_{ref} : l'indice de réfraction de l'eau deutérée et du toluène, respectivement.

Les rendements quantiques d'oxygène singulet (Φ_{Δ}) de l'échantillon sont déterminés dans l'eau deutérée à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France). Les échantillons sont excités à l'aide d'une lampe Xénon à arc placée sur un SPEX 1680 possédant un double monochromateur de 0,22 μ m. La luminescence de l'oxygène singulet, suite à une excitation à 419 nm, est mesurée à 1270 nm à l'aide d'un monochromateur double réseau PTI S/N 1565 et d'un détecteur IR InGaAs, refroidi à l'azote liquide (DSS-16A020L Electro Optical Systems INC). Les rendements quantiques d'oxygène singulet sont déterminés par rapport à une solution de référence de rose bengale diluée dans l'eau deutérée, suivant la formule suivante :

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta(ref)} \times \frac{I}{I_{ref}} \times \frac{A_{ref}}{A}$$

Où :

Φ_{Δ} et $\Phi_{\delta(ref)}$: les rendements quantiques de formation d'oxygène singulet de l'échantillon et de la référence, respectivement,

A et A_{ref} : l'absorption à 419 nm de l'échantillon et de la référence (rose bengale), respectivement,

I et I_{ref} : l'intensité du pic de luminescence à 1270 nm de l'échantillon et de la référence, respectivement.

Les spectres de fluorescence en temps décalé ont été acquis à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-22 (Jobin-Yvon Horiba, Longjumeau, France) équipé d'une lampe Xénon à flash, un compartiment thermostaté (25°C), un photomultiplicateur UV-visible R928 (Hamamatsu, Japon). Le faisceau d'excitation est diffracté par un monochromateur SPEX double réseau (1200 fentes/nm projeté à 500 nm). Tous les spectres ont été mesurés sur des cuves en quartz 4 faces. Toutes les acquisitions en émission ont bénéficié de la correction de la lampe et du photomultiplicateur et ont été comparées pour une même valeur d'absorption.

Les échantillons de nanoparticules, **Tb**, **P1**, **Tb + P1** et **Tb@P1** ont été préparés dans de l'eau milliQ filtrée 1 heure avant l'expérimentation. Après acquisition du spectre d'émission du Tb nous avons choisi de régler l'absorption des échantillons à 542 nm à une valeur de 0,114 pour la P1, Tb@P1 et 0,121 pour Tb + P1 (car c'est à cette valeur que le spectre d'émission du terbium chevauche celui de la porphyrine). L'absorption de l'échantillon Tb a été réglée à 294 nm à une valeur de 0,485. La fluorescence en temps décalé a ensuite été mesurée pour chaque échantillon avec les réglages suivants :

- Excitation : 294 nm
- Emission : 600 - 800 nm
- Fente : 2
- Temps du Flash : 41 ms
- Délai après Flash : 0,010 ms

Les spectres acquis dans ces conditions ont ensuite été corrigés par rapport à leur valeur d'absorption à 294 nm pour pouvoir être comparés.

Les mesures de taille par diffusion dynamique de la lumière sont réalisées avec un Zetasizer NanoZS (Malvern) équipé d'un laser He-Ne à 633 nm. Une filtration des échantillons sur une membrane en cellulose à porosité de 0,2 μm a été effectuée avant chaque mesure. Le potentiel zêta des nanoparticules a été déterminé sur le même appareillage. Avant mesure, les échantillons ont été dispersés dans une solution saline de NaCl à 0,01 mol/l et ajustés à pH 7,4.

2.2 Culture cellulaire

Les cellules U87 ont été obtenues de l'ATCC (*American Type Culture collection*, Manassas, E.U.) et proviennent d'une tumeur cérébrale humaine de grade IV d'après la classification O.M.S type glioblastome, astrocytome. Ce sont des cellules adhérentes, maintenues en culture dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco®, invitrogen™, Carlsbad, E.U.) supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%, PAN™ biotech GmbH), en antibiotiques (pénicilline/streptavidine 1%, Gibco®, invitrogen™), en pyruvate de sodium (1,25%), acides aminés essentiels (1%), acides aminés non essentiels (0,5%), vitamines (0,4%), L-glutamine, L-sérine, L-asparagine (1%) sous conditions standards : 5% CO₂, 37°C, 95% d'humidité.

2.3 Mesure de Cytotoxicité

La cytotoxicité des nanoparticules a été suivie par un test d'activité métabolique mitochondriale au MTT.

Le test d'activité métabolique est un test colorimétrique reposant sur la capacité de la succinate déshydrogenase mitochondriale à métaboliser le MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) en cristaux de formazan. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules.

- **Jour 1** Les cellules U87 sontensemencées dans une plaque 96 puits à 2.10^4 cellules/ml dans du milieu de culture.
- **Jour 3** Après 48 heures de croissance, (puits à 30-40% de confluence), la plaque est vidée par retournement, et 150 μ l de milieu contenant les différentes concentrations de nanoparticules à tester sont ajoutés. Trois molécules à trois concentrations sont testées : 200, 400 et 600 μ M de Tb pour les nanoparticules de Tb et de Tb@P1 et 40, 60 et 120 μ M de P1 équivalent Tb pour la P1.
- **Jour 4** Après 24 heures de contact entre les cellules U87 et les nanoparticules, la plaque est à nouveau vidée par retournement, les puits lavés 2 fois avec 150 μ l de l'HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco®, invitrogen™, Carlsbad, E.U.), et 150 μ l de milieu frais sont ajoutés dans chaque puits.
- **Jour 5** 24 heures après le changement de milieu, du MTT à une concentration finale de 0,5 mg/ml est ajouté dans chaque puits (50 μ l/puits). La solution de mère de MTT est préparée dans du PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Gibco®, invitrogen™, Carlsbad, E.U.) à 2 mg/ml. La plaque est mise à incuber à l'obscurité, à 37°C pendant 3 heures, puis le surnageant est ôté, et 120 μ l de DMSO 100% (Sulfoxyde de diméthyle, ACROS Organics™, Gell, Belgique) sont ajoutés pour lyser les membranes (5 min). La lecture de l'absorption est faite sur un lecteur de plaque (Multiskan Ascent, Thermo®) à 540 nm.

2.4 Mesure de l'incorporation cellulaire

L'incorporation des nanoparticules dans les cellules U87 a été mesurée par deux techniques différentes. Pour comparer l'incorporation des nanoparticules Tb et Tb@P1 un dosage du terbium par ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*) a été réalisé. Pour comparer l'incorporation de la P1 et de Tb@P1 une mesure de fluorescence de la P1 après extraction cellulaire, a été réalisée par un lecteur microplaque (TECAN Infinite M200, Männedorf, Suisse).

Le dosage de terbium a été réalisé à Lyon par Fabien Rossetti au sein de l'UMR CNRS 5306 à l'Université Claude Bernard, Lyon. Pour cela :

- **Jour 1** Les cellules U87 sontensemencées en flacon de culture cellulaire T175 cm^2 à 5.10^4 cellules/ml.
- **Jour 4** Les cellules à 80% de confluence ont été mises en contact avec les nanoparticules de Tb ou de Tb@P1 à une concentration de 600 μ M de Tb diluées dans du milieu de culture.
- **Jour 5** Le milieu contenant les nanoparticules a ensuite été éliminé, puis le tapis cellulaire lavé 2 fois à l'HBSS. Les cellules ont ensuite été trypsinées de manière classique et comptées avec un compteur de cellules automatique (TC20, BioRad, Hercules, E.U.). La suspension cellulaire a été centrifugée (300 g, 10 min) afin de ne récupérer que le culot cellulaire. Celui-ci

a été conservé à -20°C et envoyé à Lyon pour le dosage ICP-OES.

Les étapes du dosage ICP-OES sont rapidement exposées :

- Une minéralisation de l'échantillon par dissolution dans un acide, 3 heures à 80°C , est réalisée.
- L'échantillon est ensuite filtré ($0,2\ \mu\text{m}$) puis injecté et nébulisé.
- L'échantillon est ensuite ionisé. Ces étapes font appel à la partie plasma de gaz rare induit par couplage haute fréquence.
- L'échantillon est ensuite analysé en spectroscopie par émission optique. Les atomes ionisés émettent un photon à une longueur d'onde spécifique lorsqu'ils retournent à leur état fondamental. C'est cette propriété qui est utilisée pour caractériser la constitution d'un échantillon. Une gamme étalon avec des concentrations connues de l'élément à doser est réalisée en parallèle.

L'expérience a été réalisée sur trois passages cellulaires différents. Les résultats sont exprimés en ppb (partie par billion) correspondant à des $\mu\text{g/l}$. Le nombre de cellules étant connu, la quantification finale est exprimée en μg de Tb/ 1.10^6 cellules.

L'incorporation de la P1 et des nanoparticules Tb@P1 a été suivie par fluorescence avec le système de lecture de fluorescence microplaque TECAN Infinite M200.

- **Jour 1** Les cellules U87 sontensemencées dans des flacons de culture cellulaire T25 à 4.10^4 cellules/ml pour que 48 heures après le tapis cellulaire soit à 60-70% de confluence.
- **Jour 3** Après 48 heures d'incubation à 37°C , le milieu des boites est éliminé et remplacé par un milieu contenant les nanoparticules Tb@P1 ou la P1 seule. La solution mère de Tb@P1 est d'abord préparée dans l'eau milliQ à une concentration de 100 mM puis diluée dans du milieu de culture à $600\ \mu\text{M}$. La solution mère de P1 est d'abord préparée dans du DMSO à une concentration de 100 mM puis diluée dans du milieu de culture à 1 mM pour obtenir une solution de travail à $120\ \mu\text{M}$ de P1 (équivalent Tb) ne contenant pas plus de 0,12% de DMSO.
- **Jour 4** Après 24 heures de contact entre les cellules et les nanoparticules le milieu de culture est éliminé, le tapis cellulaire lavé 2 fois à l'HBSS puis les cellules trypsinées. Les cellules sont comptées avec le compteur automatique TC20 : 2 comptages par condition sont réalisés. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 300 g pendant 10 min. Le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon de lyse (0,5% Triton 100X, 0,2 N NaOH, qsp PBS) pendant ≈ 5 min. Après homogénéisation, $200\ \mu\text{l}$ du lysat sont déposés par puits dans une plaque noire 96 puits. Six puits par condition sont réalisés. La lecture de fluorescence est réalisée avec les réglages suivants, λ_{exc} : 420 nm et λ_{em} : 650 nm.

L'expérience a été réalisée sur trois passages cellulaire différents. Les résultats sont exprimés en nmoles de P1 incorporées/ 1.10^6 cellules.

2.5 Capacité clonogénique

Le test de capacité clonogénique a pour but de caractériser l'effet des rayonnements sur la capacité de division des cellules en tenant compte des effets tardifs et/ou précoce selon le moment choisi pour réaliser le test. Un des points majeurs dans la réussite d'un traitement et la capacité à engendrer des dégâts létaux, immédiats ou différés. Les dégâts induits par les radiations ionisantes peuvent être pris en charge par le système de réparation de la cellule ou par des voies de survie de la cellule. A terme, la cellule peut donc arrêter de se diviser et mourir ou réparer avec succès et survivre. Le test clonogénique permet de visualiser les cellules ayant toujours des capacités clonogéniques *i.e.* de division. Le nombre de clones définit la résistance de la lignée cellulaire aux rayonnements.

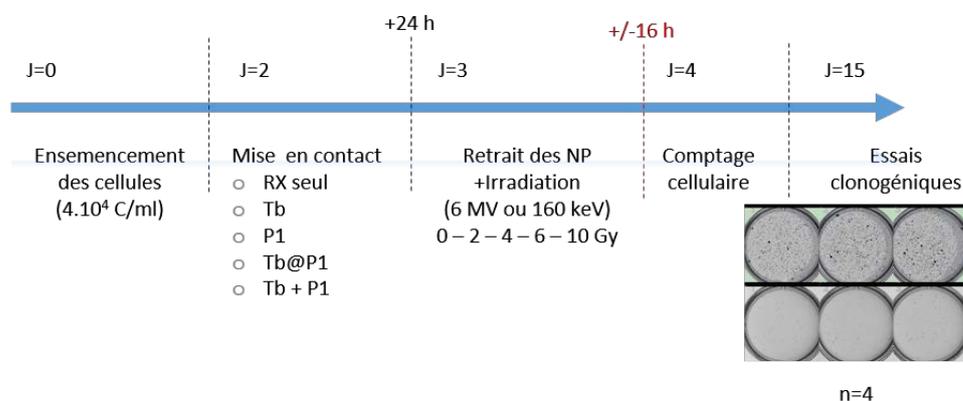


FIGURE 39 – L'expérimentation se déroule sur deux semaines, de l'ensemencement à la révélation des colonies après irradiation. L'irradiation a lieu 24 heures après la mise en contact des cellules avec les nanoparticules. Celles-ci sont retirées du milieu juste avant irradiation. Les essais clonogéniques en *soft agar* sont ensemencés 16 heures ou 1 heure post-irradiation afin de cumuler les effets directs et différés ou non. Les cellules sont incubées 12 jours avant le comptage des clones.

Pour cette expérimentation (Figure 39) :

- **Jour 1** Les cellules U87 sont ensemencées dans des flacons de culture T25 à $4 \cdot 10^4$ cellules/ml.
- **Jour 3** Les cellules sont ensuite mises en contact avec les différentes conditions : Tb, Tb@P1, P1 et Tb + P1 à $600 \mu\text{M}$ équivalent Tb diluées dans du milieu de culture après préparation des solutions mères (vues précédemment).
- **Jour 4** 24 heures après la mise en contact les flacons de culture sont vidés, lavés 2 fois avec de l'HBSS, puis le milieu est remplacé par du milieu sans nanoparticules. Les flacons sont ensuite irradiés.
- Plusieurs irradiations ont été réalisées :
 1. La première a été conduite sur un appareil clinique constitué d'un faisceau de photons de 6 MV produit par un accélérateur linéaire Clinac iX (Varian Medical Systems) situé dans le service de radiothérapie du CHR Metz-Thionville, Hôpital de Mercy (Figure 40). Les cellules ont été irradiées à 0, 2, 4, 6 et 10 Gy. Les cellules sont ensuite mises à l'incubateur (37°C , 5% CO_2 , 95% d'humidité) et trypsinées pour ensemencer les essais clonogéniques 16 heures après l'irradiation.
 2. La seconde a été conduite sur un appareil préclinique (Model Xrad 320, Precision XRay Inc, Cegelec) équipé d'un tube à rayons X d'un potentiel maximum de 320 keV et une puissance de 4000 W. Les irradiations ont été réalisées avec une énergie de 160 keV à 0, 2, 4, 6 et 10 Gy. Les cellules sont ensuite mises à l'incubateur (37°C , 5% CO_2 , 95% d'humidité) et trypsinées pour ensemencer les essais clonogéniques 16 heures après l'irradiation.
 3. La troisième a été conduite dans les mêmes conditions que la seconde irradiation excepté que les cellules ont été trypsinées et ensemencées 1 heure après l'irradiation.
- **Jour 5 (Jour 4 pour la troisième irradiation)** Les essais clonogéniques sont ensuite réalisés en *soft agar* (0,5% d'agar). L'agar est ensuite supplémenté avec 4 ml de SVF (20%), 1 ml de complément (5%), 200 μl d'antibiotiques (1%). 1,5 ml est déposé en fond de puits dans des plaques 6 puits puis laissé sous la hotte en attendant sa solidification. Les cellules sont ensuite trypsinées et comptées au compteur automatique TC20. Deux comptages par condition sont

réalisés. Trois puits par condition sont ensemencés avec 10 000 cellules/puits. Après avoir prélevé la quantité de cellules nécessaire, la suspension est centrifugée (300 g, 10 min) et le culot repris dans de l'agar 0,3% à une concentration de 10 000 cellules/ml. La seconde couche d'agar contenant les cellules est déposée sur la première à raison d'1 ml/puits. 3 puits pour chaque condition sont prévus, chaque puits est recouvert d'1 ml de milieu de culture complet. La lecture des essais clonogéniques est réalisée après 12 jours d'incubation à 37°C.

- **Jour 17** Pour la révélation des colonies, le milieu de culture est éliminé, et 1 ml de solution de MTT à 1 mg/ml est ajouté et incubé 3 heures à 37°C à l'obscurité pour colorer uniquement les colonies vivantes. Le comptage des colonies est réalisé par un compteur de colonies automatique Gel count™ (Oxford Optronix, Abingdon, R.U.).

Les expérimentations ont été menées sur 4 passages cellulaires différents.

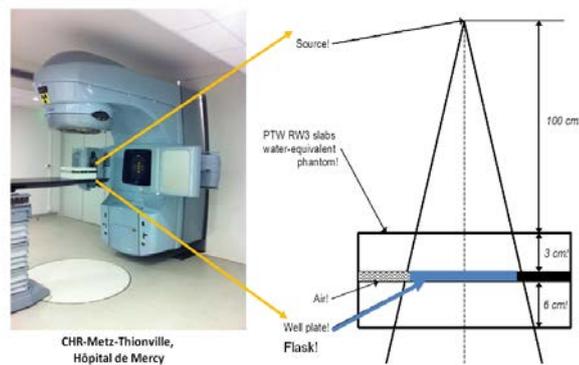


FIGURE 40 – Illustration du protocole d'irradiation à 6 MV. Les boîtes de culture de cellules sont contenues entre 6 et 3 cm de fantôme afin de se rapprocher au mieux des conditions d'irradiation cliniques.

Une courbe de fraction de survie en fonction de la dose d'irradiation employée est obtenue à partir du nombre de clones. Pour cela le *Plating Efficiency* ou PE est d'abord calculé d'après la formule :

$$PE = \frac{\text{nombre de colonies comptées}}{\text{nombre de colonies ensemencées}}$$

Puis, la fraction de survie ou FS est calculée d'après :

$$FS = \frac{PE_n \text{ Gy}}{PE_0 \text{ Gy}}$$

Où :

$PE_n \text{ Gy}$: le *Plating Efficiency* à la dose d'irradiation n ,

$PE_0 \text{ Gy}$: le *Plating Efficiency* à 0 Gy.

Ces données expérimentales ont ensuite été fittées par un modèle linéaire quadratique utilisé en radiothérapie pour modéliser l'effet d'un rayonnement ionisant sur un type tumoral. L'équation du modèle est la suivante :

$$FS = \exp -(\alpha D + \beta D^2)$$

Où :

FS : la fraction de survie,
 D : la dose en Gy,
 α et β : les paramètres du modèle.

L'équation du modèle fournit des paramètres α et β qui définissent mathématiquement l'allure de la courbe de survie.

La comparaison des effets couplés RX-nanoparticules a été faite suivant la notion de DMF (*Dose Modifying Factor*) qui en radiobiologie permet de montrer l'effet radiosensibilisant ou radioprotecteur d'une molécule par rapport au rayonnement seul.

$$DMF = \frac{\text{Dose pour produire un effet avec une nanoparticule}}{\text{Dose pour produire le même effet sans nanoparticule}}$$

2.6 Détection des espèces réactives de l'oxygène

L'efficacité du traitement couplant radiothérapie et PDT repose sur la capacité de la nanoparticule à augmenter la génération d'espèces réactives de l'oxygène, afin d'augmenter les dégâts létaux à la cellule par stress oxydant.

Afin d'évaluer la capacité des nanoparticules à induire la production d'ERO nous avons utilisé une sonde qui en présence d'ERO devient fluorescente. Cette sonde la H_2 -DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescéine-diacétate) (Molecular Probes, Eugene, E.U.) détecte principalement le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($OH\cdot$). Sous sa forme estérifiée, la H_2 -DCFDA traverse les membranes plasmiques, puis est hydrolysée par les estérases intracellulaires en dichlorofluorescéine (DCFH). En présence d'ERO notamment H_2O_2 et $OH\cdot$ la DCFH est oxydée en dichlorofluorescéine (DCF) qui a des propriétés fluorescentes (λ_{em} : 530 nm).

- **Jour 1** Les cellules U87 sontensemencées en plaque 24 puits à $5,5 \cdot 10^4$ cellules/ml (500 μ l/puits) dans du milieu de culture complet. Trois puits par condition sont prévus.
- **Jour 4** Les différentes conditions de nanoparticules sont mises à incuber pendant 24 heures avec les cellules U87 à une concentration de 600 μ M de Tb pour les nanoparticules de Tb et Tb@P1, et 120 μ M de P1 (équivalent de Tb) pour la P1.
- **Jour 5** Le milieu contenant les nanoparticules est éliminé puis les puits lavés 2 fois à l'HBSS. La sonde H_2 -DCFDA à 10 μ M diluée dans du milieu OPTI-MEM (Gibco, Invitrogen) est ajoutée à tous les puits sauf les puits témoins négatifs qui reçoivent 500 μ l de milieu OPTI-MEM. Les plaques sont incubées 30 min à 37°C.
- Le milieu est à nouveau éliminé, puis les puits lavés 2 fois à l'HBSS. La solution de TBHP (Tert-Butyl Hydroperoxide 70% dans l'eau) est ajoutée à 500 μ M diluée dans l'OPTI-MEM aux puits témoin positif (500 μ l/puits). Tous les autres puits reçoivent 500 μ l/puits d'OPTI-MEM. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à 37°C.
- Les plaques sont ensuite irradiées à 160 keV à 0, 2, et 4 Gy.
- Immédiatement après irradiation, le milieu est éliminé, les puits lavés 2 fois à l'HBSS et 500 μ l/puits de DMSO sont ajoutés pour lyser les cellules. 145 μ l de chaque puits sont prélevés et déposés dans un tube eppendorf de 1,5 ml puis 55 μ l de solution NaCl à 36% (3,6 g dans 10 ml d'eau distillée) y sont ajoutés pour faire précipiter les nanoparticules. Les tubes sont vortexés et centrifugés 6 min, à 20°C, 15 000 rcf.
- 150 μ l par tubes sont transvasés dans une plaque 96 puits noire pour la lecture de la fluorescence au TECAN avec les réglages suivants : λ_{Exc} :480 nm, λ_{Em} :530 nm, gain : 180, temps d'intégration : 30 μ s).

3

Résultats

Sommaire

3.1 Propriétés photophysiques du nano-objet	171
3.2 Cytotoxicité des nanoparticules	175
3.3 Incorporation cellulaire des nanoparticules	176
3.4 Formation d'espèces réactives de l'oxygène	179
3.5 Interaction rayonnement-nanoparticule-photosensibilisateur	180
3.5.1 Irradiation à une forte énergie (6 MV)	181
3.5.2 Irradiation à une faible énergie (160 keV)	182

3.1 Propriétés photophysiques du nano-objet

Le protocole de synthèse des AGuIX à base de gadolinium a été largement décrit. Les nanoparticules utilisées dans cette étude, des AGuIX à base de terbium, ont été élaborées selon le même type de procédé de synthèse [203], mise à part que l'ajout du photosensibilisateur a eu lieu pendant la synthèse de la nanoparticule, et non après.

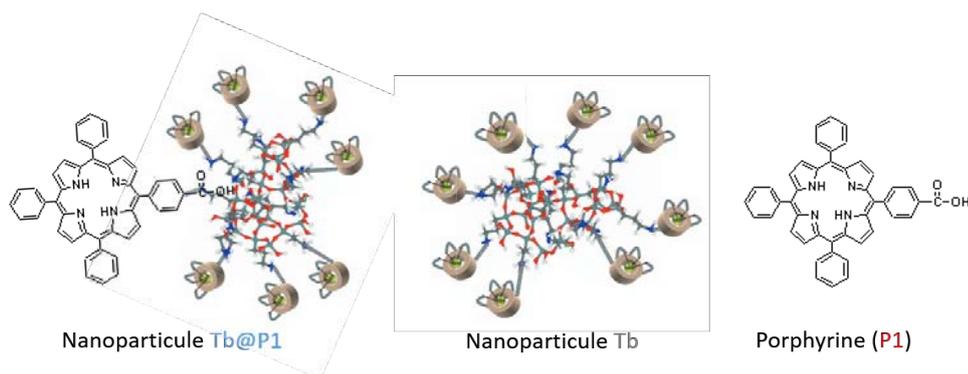


FIGURE 41 – Schéma simplifié de la nanoparticule de terbium fonctionnalisée par une porphyrine (Tb@P1). La matrice de polysiloxane (grise) supporte des atomes de terbium (jaune) chélatés par du DOTA (brun), ainsi qu'une molécule de porphyrine. La nanoparticule de terbium (Tb) est composée uniquement d'une matrice de polysiloxane et d'atomes de terbium chélatés par du DOTA.

Ce sont des édifices composés d'un réseau en polysiloxane portant en périphérie des atomes de terbium chélatés avec du DOTA (*1,4,7,10-tetra-azacyclododecane-1-glutaric anhydride-4,7,10-triacetic acid*) greffé covalamment à la matrice inorganique. Le greffage du photosensibilisateur qui est une TPP, (5-(4-Carboxyphényl)-10,15,20-(triphényl)porphyrine), est obtenu par la formation d'une liaison peptidique entre la fonction amine libre sur la nanoparticule et le groupement carboxylique de la TPP (Figure 41).

Pour contrôler que les effets induits par la nanoparticule de terbium couplée à la porphyrine, appelée Tb@P1 proviennent bien de l'édifice en lui-même et pas simplement de la mise en présence du Tb et de la porphyrine, nous avons étudié cinq conditions, appelées ci-dessous :

1. La première condition est la condition **RX seul**, où les cellules ne reçoivent qu'un seul traitement : les rayonnements X.
2. La seconde condition est la condition **Tb**, où les cellules sont mises en contact avec des nanoparticules de Tb à la concentration de 600 μM de Tb et reçoivent ensuite les rayonnements.
3. La troisième condition est la condition **P1**, où les cellules reçoivent 120 μM de P1 seule et ensuite les rayonnements.
4. La quatrième condition est la condition **Tb@P1** où les cellules sont mises en contact avec des nanoparticules de Tb greffées avec la P1 à une concentration de 600 μM de Tb (soit 120 μM de P1), et reçoivent ensuite les rayonnements.
5. La cinquième condition est la condition **Tb + P1** où les cellules sont mises en contact avec un mélange de nanoparticules de Tb à 600 μM , et de P1 à 120 μM , et reçoivent ensuite les rayonnements.

Taille. Le diamètre hydrodynamique a été mesuré par la méthode DLS (*Dynamic Light Scattering*), et les graphiques de dispersion de taille de la population montrent que les nanoparticules de Tb (en noir) sont monodisperses, et affichent un diamètre moyen de 3,1 nm (Figure 42.A). Ce diamètre hydrodynamique correspond à celui des AGuIX de gadolinium (cf. résultats partie 2) [212]. La distribution de taille des nanoparticules Tb@P1 (en bleu) présente un double pic à 3,1 et 7,5 nm, qui pourraient représenter deux sous-populations qui ne sont pas nettement séparées. La sous population à 3,1 nm pourrait être constituée de nanoparticules de Tb non greffées à la P1, et la sous-population à 7,5 nm correspondre aux nanoparticules de Tb conjuguées à la P1 (Figure 42.A).

Spectre d'absorption. Le spectre d'absorption est caractéristique des porphyrines (en rouge) et présente un pic majeur à 420 nm appelé bande de Soret, et quatre pics mineurs à 520 nm, 555 nm, 590 nm et 650 nm, appelés bandes Q (de QIV à QI respectivement). Nous constatons que le spectre d'absorption de la nanoparticule Tb@P1 est identique à celui de la P1, confirmant que le greffage de la P1 sur la nanoparticule n'altère pas ses propriétés d'absorption (Figure 42.B).

Taux de greffage en porphyrine. Après reconstitution dans l'eau milliQ d'un aliquot de nanoparticules dont la quantité de terbium est connue, le taux de greffage a été mesuré d'après une gamme étalon en absorption de la P1 diluée dans du DMSO:H₂O (1:125) pour se rapprocher au plus du milieu de dilution des nanoparticules. Le nombre de P1 par atome de Tb a été évalué à 0,2 P1/Tb soit 1 P1 pour 5 atomes de Tb, correspondant à 1 à 2 P1 par nanoparticule. Cependant, les graphiques de dispersion de diamètre hydrodynamique semble indiquer qu'une sous population de nanoparticules non greffées existe. Il est possible qu'une quantité minimale de P1 dans l'échantillon ne soit pas greffée, faisant surestimer la quantité effectivement greffée sur la nanoparticule (Figure 42.A et B).

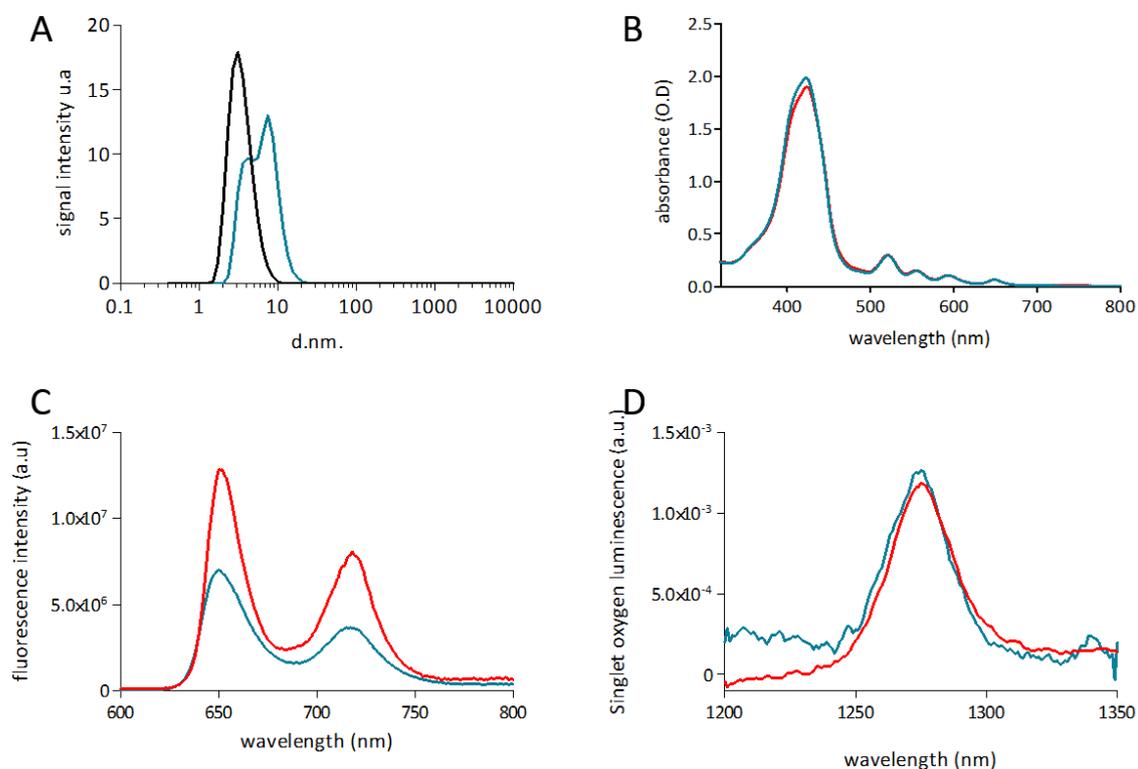


FIGURE 42 – Comparaison des propriétés photophysiques et physico-chimiques des nanoparticules Tb@P1 dans l'eau milliQ (ligne bleue) et de la P1 seule dans le toluène (ligne rouge). **A.** Distribution du diamètre hydrodynamique par DLS (*Dynamic Light Scattering* des nanoparticules Tb@P1 (en bleu) $\approx 7,5$ nm, et Tb (en noir) $\approx 3,1$ nm). **B.** Spectre d'absorption présentant les caractéristiques de la porphyrine (λ_{exc} : 419 nm). **C.** Spectre d'émission de fluorescence présentant le double pic à 650 et 720 nm spécifique des porphyrines **D.** Spectre de luminescence de l'oxygène singlet présentant une émission à 1270 nm pour les nanoparticules de Tb@P1 (bleue) et pour la référence le rose bengale (rouge) (λ_{exc} : 419 nm).

Rendement quantique de fluorescence. Le spectre de fluorescence, après excitation à 419 nm dans la bande de Soret, de la P1 montre le profil typique d'un spectre d'émission de porphyrine, avec un pic majeur à 650 nm et un second à 720 nm. La nanoparticule de Tb@P1 présente un profil comparable attestant de la conservation des capacités de fluorescence de la P1. Le rendement quantique de fluorescence a été mesuré d'après ces spectres. Il est de 0,11 vs 0,05 pour respectivement la P1 seule et la nanoparticule de Tb@P1 (Figure 42.C).

Rendement quantique en oxygène singlet. La production d'oxygène singlet est mesurée d'après la luminescence émise à 1270 nm par 1O_2 , après excitation du photosensibilisateur à 419 nm. Deux références ont été utilisées pour comparer le rendement de la nanoparticule Tb@P1 à un photosensibilisateur seul. Le rose bengale qui est soluble dans l'eau (même milieu que les nanoparticules) et qui présente un des rendements les plus élevés, et la P1 seule (dans le toluène) puisque c'est le photosensibilisateur conjugué sur la nanoparticule. Les spectres de luminescence de l'oxygène singlet de la nanoparticule Tb@P1 et du rose bengale présentent tout deux le pic typique de luminescence

à 1270 nm. La mesure du rendement quantique en oxygène singulet du rose bengale (dilution dans l'eau), de la P1 (dilution dans le toluène) et de la nanoparticule Tb@P1 (dilution dans l'eau) sont respectivement de 0,76, 0,61 et 0,60, permettant d'affirmer que le greffage, l'encombrement stérique ou d'autres interactions possibles entre nanoparticules ne diminuent pas la capacité à produire de l' 1O_2 (Figure 42.D).

Transfert d'énergie. L'intérêt de la construction d'une telle nanoparticule repose sur sa capacité à permettre l'échange d'énergie entre le Tb et la P1 après excitation du Tb (Figure 43.C). Pour faire la preuve de concept du transfert, nous avons choisi de suivre la fluorescence émise par la P1 en temps décalé. Le concept est simple : la durée de vie de la fluorescence de la P1 est autour de 6 à 9 ns. Le Tb, quant à lui, a une durée de vie de fluorescence de 300 μ s. Il est donc excité et l'émission de fluorescence est mesurée 10 μ s plus tard. Ainsi si les deux pics à 650 et 720 nm spécifiques des porphyrines sont observés, c'est qu'un transfert d'énergie aura eu lieu. Bien que le greffage ait son utilité propre en ce qui concerne l'assurance que les deux partenaires Tb et P1 seront adressés au même endroit, il assure aussi une proximité entre les deux, nécessaire au transfert d'énergie de type FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*). Un témoin expérimental a été utilisé pour valider l'hypothèse que la proximité entre les 2 molécules était essentielle au transfert d'énergie. Un mélange de nanoparticules de Tb (600 μ M) et de P1 (120 μ M), appelé **Tb + P1**, a été comparé aux résultats obtenus avec la nanoparticule greffée **Tb@P1** aux mêmes concentrations. La mesure de l'intensité de fluorescence, 10 μ s après l'excitation à 294 nm du Tb montre que les nanoparticules de Tb seul (en gris) ne fluorescent pas, qu'un léger pic est observé pour la P1 seule (en rouge) et le mélange Tb + P1 (en violet) et qu'une importante fluorescence apparaît pour la nanoparticule Tb@P1 (environ 3 fois plus importante comparée au Tb + P1) (Figure 43). Ces résultats montrent qu'une petite part de P1 pourrait être activée par un transfert radiatif entre le Tb et la P1, mais que le mécanisme principal semble être du FRET, mécanisme nécessitant une distance inférieure à 10 nm entre le donneur et l'accepteur, critère largement rempli d'après le diamètre hydrodynamique de la nanoparticule d'environ 7 nm.

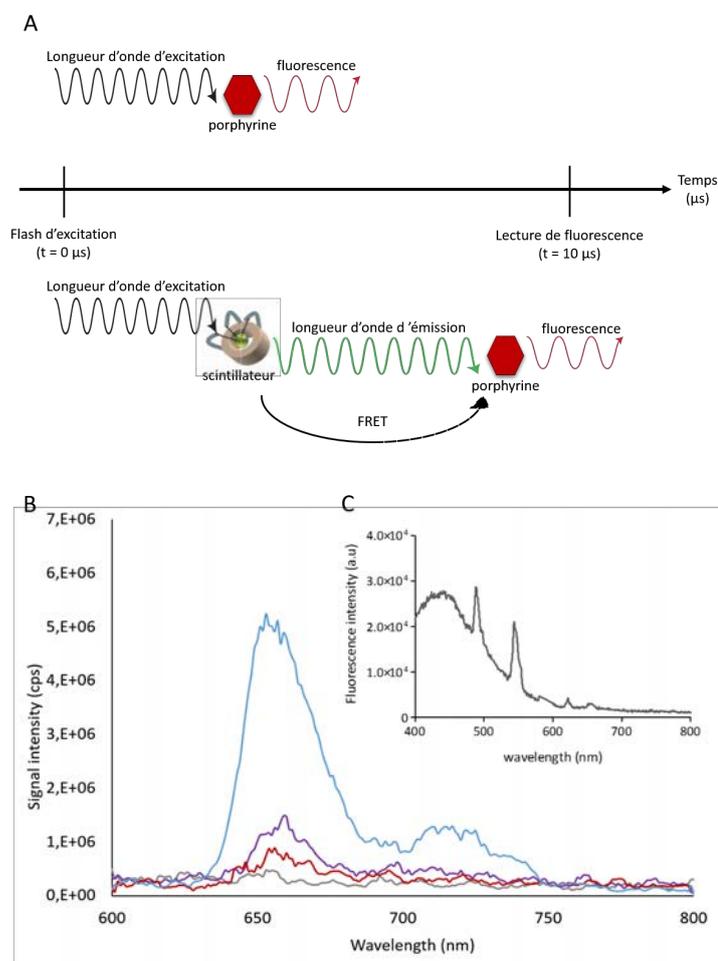


FIGURE 43 – Transfert d'énergie entre le Tb et la P1. **A.** Schéma du transfert d'énergie entre le Tb et la P1. Lorsque la P1 est excitée directement, la durée de vie de la fluorescence émise est courte ≈ 9 ns. 10 μ s plus tard, aucun signal de fluorescence ne sera donc visible. Lorsque le Tb est excité, la durée de vie de la fluorescence émise est plus longue ≈ 300 μ s. Cette émission de fluorescence, peut ensuite exciter la P1 et mener à sa fluorescence. 10 μ s après l'envoi de l'onde d'excitation une fluorescence rouge typique de la P1 pourra donc être visible. **B.** Spectres de fluorescence en temps décalé après excitation dans l'UV à 294 nm, et récupération de l'émission de fluorescence 10 μ s plus tard entre 600 et 800 nm. Emission de fluorescence du Tb seul, en gris, de la P1 seule (rouge), de la nanoparticule Tb@P1 (bleu), et du mélange Tb + P1, (violet). Seul le spectre de fluorescence de la nanoparticule Tb@P1 montre les deux pics d'émission à 650 et 720 nm typique des porphyrines, confirmant le transfert d'énergie. **C.** Spectre d'émission de fluorescence des nanoparticules de Tb dans l'eau (λ_{exc} : 294 nm).

3.2 Cytotoxicité des nanoparticules

Nous avons évalué la cytotoxicité des nanoparticules sur les cellules U87 par un test d'activité métabolique. La toxicité engendrée par 24 heures de contact avec les nanoparticules de Tb augmente avec la concentration de mise en contact. La porphyrine est cytotoxique dès 40 μ M. L'escalade de dose de 200 à 600 μ M de Tb (ou de 40 à 120 μ M de porphyrine) n'engendre quasiment pas d'effet

cytotoxique en ce qui concerne les nanoparticules Tb@P1. L'activité métabolique diminue légèrement (20%) (Figure 44). De manière intéressante, l'effet des nanoparticules Tb@P1 est différent de celui des nanoparticules Tb, faisant apparaître soit une différence d'activité entre ces deux nanoparticules, soit une différence d'incorporation cellulaire.

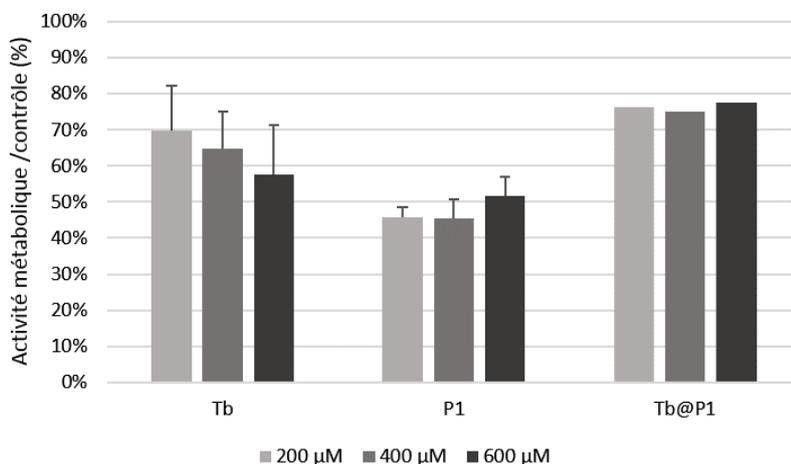


FIGURE 44 – Cytotoxicité à l'obscurité des nanoparticules Tb, Tb@P1 et P1 seule par dosage de l'activité métabolique réalisée après 24 heures de mise en contact à différentes concentrations : 200, 400 ou 600 μM de Tb équivalent à 40, 60 ou 120 μM de P1. Les écarts-types sont représentés sur le graphique, n=3.

3.3 Incorporation cellulaire des nanoparticules

Nous avons ensuite étudié l'incorporation des nanoparticules de Tb@P1 en fonction de leur concentration et du temps d'incubation avec les cellules U87. L'incorporation a été évaluée de deux manières : par la quantification de l'émission de fluorescence provenant de la porphyrine (P1) greffée, et par le dosage du terbium.

La quantification de l'émission de fluorescence provenant de la P1, montre pour les 3 concentrations testées que l'incorporation est 2 à 3 fois plus importante après 24 heures qu'après 1 heure d'incubation (Figure 45). Nous observons également que la quantité de nanoparticules Tb@P1 incorporées augmente avec l'élévation de la concentration. Ainsi après 24 heures d'incubation et une concentration de 600 μM de Tb, la quantité de nanoparticules incorporées a triplé comparée à 1 heure d'incubation ou comparé à une concentration de mise en contact de 200 μM de Tb. Nous avons donc choisi de travailler à une concentration de 600 μM de Tb et un temps de 24 heures de contact pour la suite des expériences.

La figure 46 montre que trois fois plus de nanoparticules Tb@P1 sont incorporées dans les cellules incubées à 37°C comparé à 4°C. D'après les images de MET (Microscopie Électronique à Transmission) de nanoparticules analogues (AGuIX, Gd@TPC) les nanoparticules seraient localisées dans des vésicules (Figure 47). L'étude de colocalisation a confirmé cette observation avec une importante colocalisation au niveau des vésicules lysosomales (Figure 47.E). Les images de MET montrent également la formation d'une vésicule de macropinocytose, appuyant l'hypothèse de l'incorporation

indépendante de la fluidité membranaire, et donc de la diffusion à travers la bicouche phospholipidique (Figure 47). Bien que les nanoparticules utilisées pour cette étude en microscopie soient proches photophysiquement des nanoparticules de Tb@P1 (édifice de type AGuIX, diamètre hydrodynamique proche, photosensibilisateur de type identique : noyau tétrapyrrolique), ces résultats nécessitent d'être confirmés avec les nanoparticules Tb@P1.

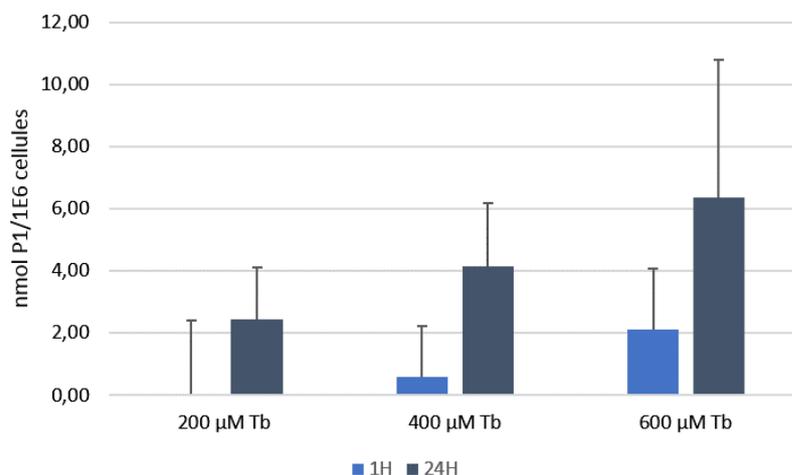


FIGURE 45 – Incorporation cellulaire des nanoparticules Tb@P1 par lecture de fluorescence réalisée après 1 heure ou 24 heures d'incubation. Les cellules sont mises en contact avec une concentration de 200, 400 ou 600 μM de Tb équivalent à 40, 60 ou 120 μM de P1. La fluorescence est ramenée à une quantité de P1 par l'intermédiaire d'une gamme étalon. Les écart-types sont représentés sur le graphique, $n=4$.

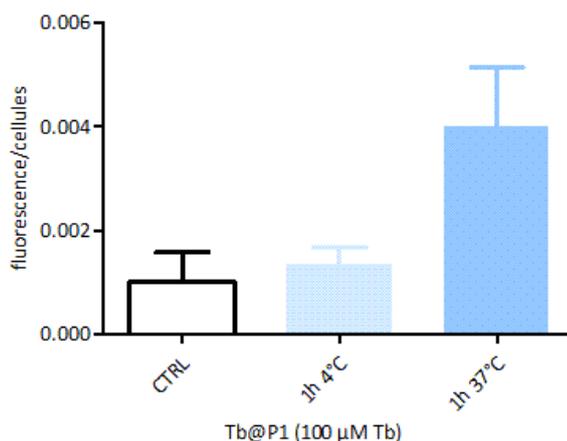


FIGURE 46 – Incorporation cellulaire des nanoparticules Tb@P1 à 100 μM après 1 heure d'incubation à 4°C (bleu clair) ou 37°C (bleu foncé). La lecture de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de P1 présente dans les cellules. Les écart-types sont représentés sur le graphique, $n=3$.

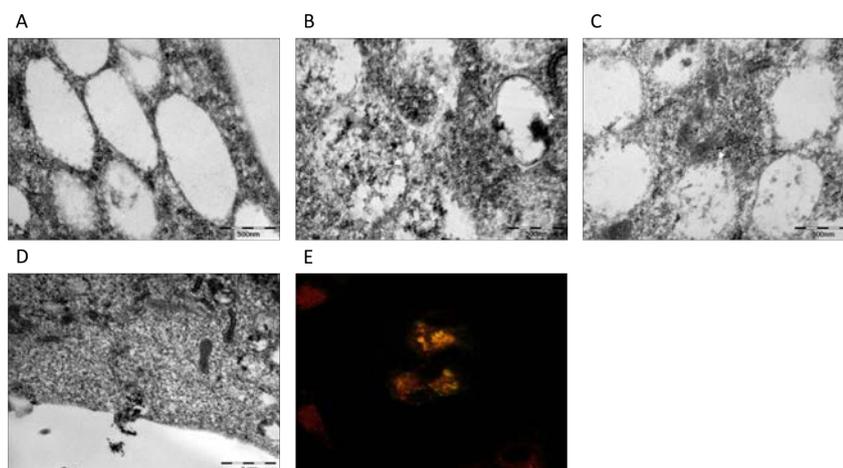


FIGURE 47 – Clichés de microscopie électronique à transmission de l’incorporation cellulaire de nanoparticule AGuIX-Photosensibilisateur après trois heures d’incubation. **A.** Observation de vésicules vides sur une cellule n’ayant pas été exposée aux nanoparticules. **B.** Observation de quelques nanoparticules disposées en *cluster* (flèche blanche). **C.** Observation de gros *cluster* de nanoparticules dans des vésicules (flèche blanche). **D.** Observation de la formation d’une vésicule de macropinocytose incorporant des nanoparticules. **E.** Observation en microscopie confocale de la superposition de la fluorescence de la nanoparticule (rouge) et des vésicules lysosomales (verte), donnant un signal orangé.

Pour finir, l’incorporation des nanoparticules de Tb@P1 a été comparée à celle des nanoparticules de Tb par un dosage ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry*) du terbium présent dans les cellules 24 heures post-incubation. Les nanoparticules de Tb sont retrouvées 2,5 fois plus dans les cellules comparées aux nanoparticules de Tb@P1 (Figure 48). Cet élément explique la toxicité plus marquée des nanoparticules de Tb comparées aux nanoparticules de Tb@P1, pour un même concentration de mise en contact.

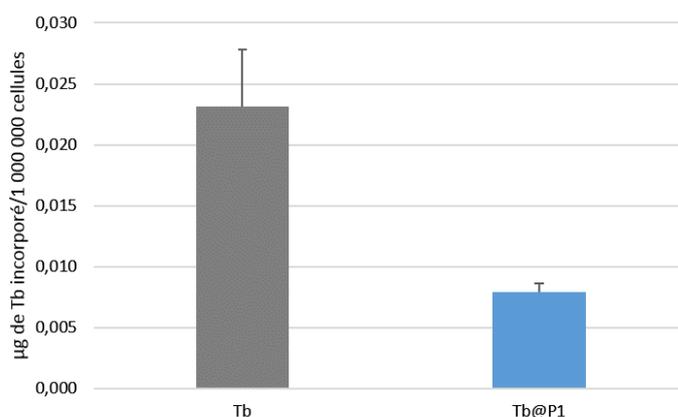


FIGURE 48 – Incorporation cellulaire des nanoparticules Tb@P1 (bleu) et de Tb (gris), par dosage ICP-OES du Tb réalisé après 24 heures d’incubation. Les cellules sont mises en contact avec une concentration de 600 µM de Tb. Les écart-types sont représentés sur le graphique, n=4.

Pour conclure, il semblerait donc que les nanoparticules d'intérêt Tb@P1, soient incorporées par un mécanisme qui reste à définir. Les nanoparticules de Tb@P1 induisent moins de cytotoxicité, que les éléments qui la composent pris individuellement. Ce résultat s'explique par la différence d'incorporation entre la nanoparticule de Tb@P1 et de Tb. Il suggère également, que le greffage de la P1 sur la nanoparticule de Tb@P1 en modifie les propriétés chimiques, la rendant moins cytotoxique sur les cellules.

3.4 Formation d'espèces réactives de l'oxygène

Le mode d'action de la radiothérapie peut être découpé en deux grands mécanismes : les interactions directes avec l'ADN et les interactions indirectes *via* la radiolyse de l'eau avec les éléments de la cellule. La réaction physique consiste en l'arrachement d'un électron aux atomes de la matière traversée par les rayonnements ionisants. Cette réaction peut déstabiliser l'ADN directement, mais le composant principal du milieu vivant étant l'eau, la réaction principale est la radiolyse de l'eau. La radiolyse de l'eau fait appel à une cascade d'événements qui par excitation ou ionisation de la molécule d'eau mène à la formation de radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion hydroxyle (OH^-), le radical hydroxyle ($OH\cdot$), l'ion superoxyde (O_2^-) qui génèrent ensuite des dégâts oxydatifs.

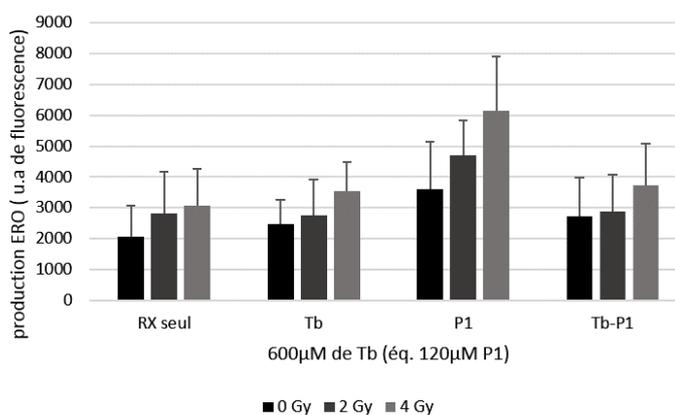


FIGURE 49 – Production d'ERO pendant l'irradiation à 160 keV, quantifiée par la fluorescence émise par la sonde H2-DCFDA lors de son oxydation par les ERO, en présence ou non de nanoparticules Tb, Tb@P1 et P1 seule (à 600 μ M de Tb). En noir, la production basale d'ERO par les cellules U87, en gris foncé la production d'ERO à 2 Gy et en gris clair la production d'ERO à 4 Gy.

Avec l'utilisation de nos nanoparticules qui ont une localisation cytoplasmique, potentiellement vésiculaire, nous nous attendons à générer des effets complémentaires de la radiothérapie seule en augmentant les dégâts indirects causés par la radiolyse de l'eau plutôt qu'en augmentant les effets directs à l'ADN. De plus, la génération d'un effet photodynamique, pourrait également être complémentaire de la radiothérapie par le type d'espèces réactives de l'oxygène produites, comme l'oxygène singulet, ainsi que leur cible cellulaire, dépendant de la localisation de la nanoparticule.

Pour suivre l'efficacité du principe de PDTX nous avons détecté les ERO formées au cours de la radiothérapie à 160 keV en présence ou non des nanoparticules de Tb@P1, de Tb, et de P1 seule.

La figure 49 montre que les nanoparticules de Tb@P1, Tb et P1 induisent une légère augmentation de la formation d'ERO par rapport à l'état basal des cellules U87. Les rayonnements seuls induisent une augmentation légère de la production d'ERO. Cette augmentation est observée aussi en présence des nanoparticules de Tb@P1 et Tb mais ne sont pas significatives comparées aux rayonnements seuls. La P1 quant à elle induit la plus importante augmentation de production d'ERO par les cellules. Celle-ci pourrait expliquer sa cytotoxicité importante (cf. Figure 44).

3.5 Interaction rayonnement-nanoparticule-photosensibilisateur

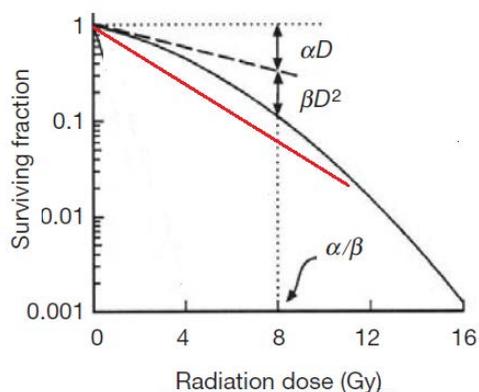


FIGURE 50 – Exemple de profil de courbe de survie aux rayonnements. En rouge le profil majeur que nous obtenons lors de nos expérimentations, en noir le profil commun. Tiré de [213].

L'effet ajouté des nanoparticules aux rayonnements X a été étudié en comparant les courbes de survie des cellules U87 en présence ou non des nanoparticules. Les courbes de survie ont généralement un profil biphasique avec deux pentes distinctes. Ce profil est caractérisé par deux paramètres : α et β qui sont deux coefficients représentant respectivement la première partie de la courbe et la seconde partie de la courbe (Figure 50). Cependant, dans notre cas, les courbes de survie sont plutôt monophasiques induisant une valeur de 0 du paramètre β .

L'originalité de notre travail repose sur la comparaison des effets induits par les nanoparticules à différentes énergies d'irradiation. Notre première initiative a été de tester l'influence des nanoparticules sur la radiosensibilité des cellules à des faibles (160 keV) et des hautes (6 MV) énergies, par des essais clonogéniques ensemencés 16 heures après l'irradiation. Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre de cette partie, l'effet des éléments lourds est prépondérant dans le domaine du keV (100 à 300 keV). C'est donc à ces énergies théoriquement que l'on a le plus de chance d'observer un effet radiosensibilisant des éléments à numéro atomique élevé. Cependant, le but final est d'utiliser ces nanoparticules chez le patient et donc dans des conditions cliniques, nous avons donc évalué l'efficacité de nos nanoparticules à plusieurs niveaux d'énergies de rayonnements X, 160 keV sur un appareil préclinique et 6 MV sur un appareil clinique.

Notre seconde initiative a été de s'intéresser à la dynamique des effets induits en présence ou non des nanoparticules, en réalisant un ensemencement des essais clonogéniques soit 1 heure soit 16 heures après irradiation. Cette comparaison n'a été réalisée que pour l'irradiation à 160 keV pour des raisons techniques. L'irradiateur clinique se trouvant à Metz-Thionville il n'a pas été envisageable de réaliser les essais clonogéniques 1 heure après le traitement à cette énergie.

3.5.1 Irradiation à une forte énergie (6 MV)

La figure 51 présente les courbes de survie des cellules U87 aux rayonnements X d'énergie élevée (6 MV) en présence ou non des différents composés. Les paramètres du modèle sont exposés en dessous (Figure 51.B). Les courbes de survie proviennent des données expérimentales acquises lors des essais clonogéniques (Figure 51.C). Le nombre de clones *i.e.* de cellules ayant conservées leur capacité de division sur plusieurs générations après une exposition aux radiations ionisantes sont dénombrées et permettent ensuite d'établir des courbes dose-réponse d'après l'équation suivante : $FS = \exp-(\alpha D + \beta D^2)$ (voir le chapitre "matériel et méthodes").

Les fractions de survie calculées d'abord expérimentalement pour 5 points : 0, 2, 4, 6 et 10 Gy ne tiennent pas compte de la cytotoxicité basale exprimée par certaines nanoparticules. En effet, la fraction de survie pour chaque condition est normalisée au point 0 Gy en présence de la nanoparticule afin de n'observer que l'effet couplé de la radiothérapie et de la nanoparticule.

A partir de ces fractions de survie, les coefficients α et β sont déterminés permettant de représenter la courbe de survie en utilisant le modèle linéaire-quadratique.

Le résultat de cette modélisation montre des courbes monophasiques, donc une valeur de zéro du paramètre β (Figure 51.A). La seule courbe de survie présentant une SF2 (Fraction de Survie à 2 Gy) plus faible que la condition RX seuls (en noir) est la condition nanoparticule de Tb (0,72 vs 0,70).

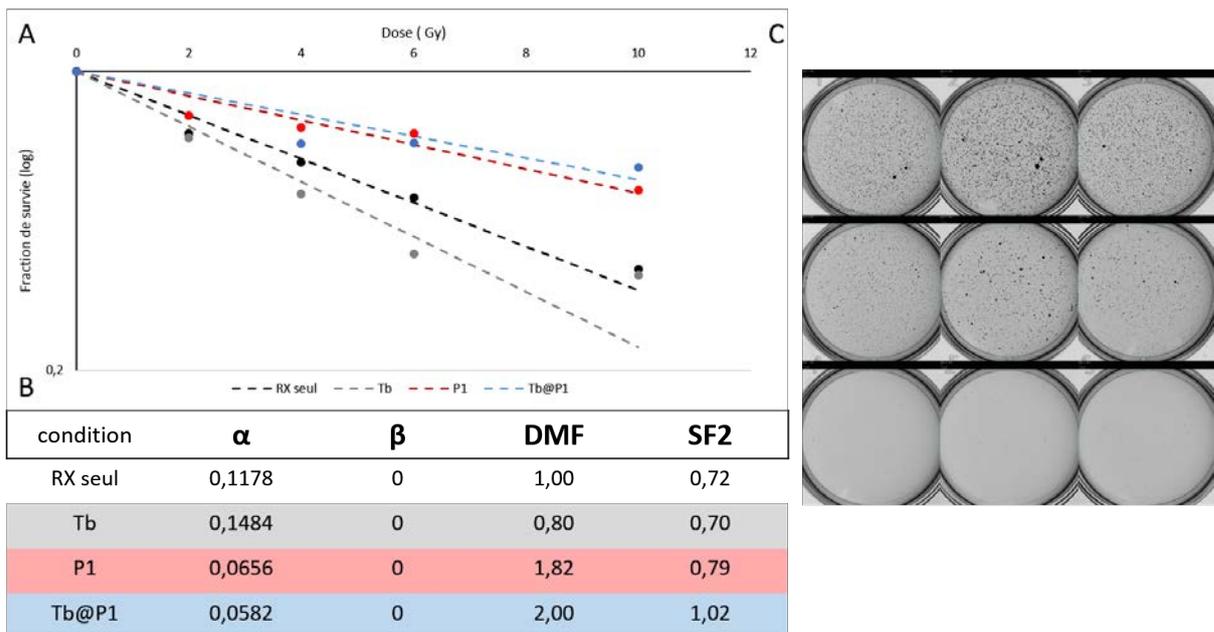


FIGURE 51 – A. Courbes de survie des cellules U87 après exposition à des rayonnements X à 6 MV et ensemencement des cellules 16 heures post-irradiation (pointillé noir) en présence de nanoparticules de Tb (pointillé gris), de P1 (pointillé rouge) et de nanoparticules Tb@P1 (pointillé bleu). Les ronds de couleur représentent les points expérimentaux de chaque courbe (n=4). B. Valeurs des coefficients α et β , de la DMF et de la SF2 (Fraction de Survie à 2 Gy) pour chaque condition de traitement. C. Illustration des essais clonogéniques de la condition Tb irradiées à 0, 2 et 10 Gy.

Le calcul de la DMF (*Dose Modifying Factor*) qui, en radiobiologie, permet de comparer l'amélioration apportée par un agent radiosensibilisant ou radioprotecteur, montre que seule la condition Tb permet de faire chuter cet indice (0,80) alors que la P1 et la nanoparticule Tb@P1 l'accroissent (1,82 et 2,00 respectivement) comparé aux RX seuls (1,00). Dans ces conditions expérimentales où les

cellules ont été exposées aux nanoparticules 24 heures avant l'irradiation à 6 MV et où les essais clonogéniques sont ensemencés 16 heures post-irradiation, seules les nanoparticules de Tb présentent un pouvoir radiosensibilisant. Étonnamment, les nanoparticules de Tb@P1 qui contiennent la même quantité de Tb n'ont pas ce pouvoir radiosensibilisant. Plusieurs explications prenant en compte la physico-chimie des nanoparticules, leur incorporation et leur localisation sont sûrement à l'origine de cette différence de réponse entre les nanoparticules de Tb et de Tb@P1. Le dosage de terbium par ICP-OES a montré que les nanoparticules de Tb s'incorporaient beaucoup plus que celles de Tb@P1. Leur présence en plus grand nombre pourrait expliquer un meilleur effet radiosensibilisant par un meilleur dépôt de la dose au niveau des cellules tumorales.

3.5.2 Irradiation à une faible énergie (160 keV)

L'effet des nanoparticules a également été évalué à une énergie de rayonnements plus faible, afin d'étudier la réelle participation de l'effet photoélectrique à l'effet PDTX. La figure 52 présente les courbes de survie des cellules U87 aux rayonnements X de 160 keV en présence des différentes nanoparticules. Ces courbes de survie ne prennent en compte que les morts différées (*i.e.* par pertes de capacité clonogénique) car l'ensemencement des essais clonogéniques a lieu 16 heures post-irradiation. Les paramètres α et β et la DMF pour chaque condition sont exposés également dans la figure 52.B. Nous constatons que la modélisation par le modèle linéaire quadratique est proche des points expérimentaux sauf pour la condition Tb@P1 où le point à 10 Gy semble aberrant.

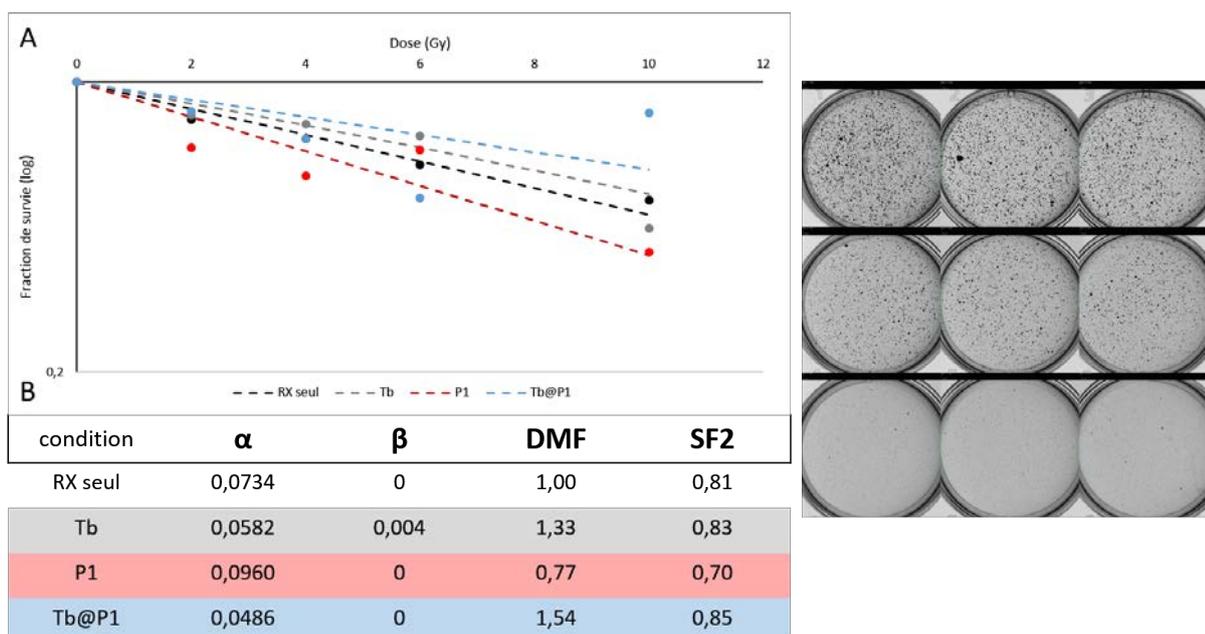


FIGURE 52 – **A.** Courbes de survie après exposition à des rayonnements X à 160 keV et ensemencement des cellules 16 heures post-irradiation (pointillé noir) en présence de nanoparticules de Tb (pointillé gris), de P1 (pointillé rouge) et de nanoparticules Tb@P1 (pointillé bleu). Les ronds de couleur représentent les points expérimentaux de chaque courbe (n=4). **B.** Valeurs des coefficients α et β , de la DMF et de la SF2 (Fraction de Survie à 2 Gy) pour chaque condition de traitement. **C.** Illustration des essais clonogéniques de la condition Tb@P1 irradiées à 0, 2 et 10 Gy.

Il est à noter que pour la condition Tb@P1, même sans prendre en compte le point 10 Gy dans la modélisation de la courbe de survie, la DMF reste supérieure à 1 avec une valeur de 1,11. Seule la condition P1 présente une DMF inférieure à celle des RX seuls (0,77 vs 1,00) donc un effet radiosensibilisant, alors que les conditions Tb et Tb@P1 présentent des DMF respectivement à 1,33 et 1,54.

La P1 semble donc pouvoir être excitée directement par les rayonnements X. Des résultats similaires ont déjà été démontrés, mais les recherches dans ce sens sont peu abondantes, du fait de la trop faible spécificité de l'interaction rayons X - Porphyrine menant à un effet ajouté minime [187] [202]. De plus, la quantité de P1 nécessaire pour atteindre cet effet radiosensibilisant est déjà trop cytotoxique sans irradiation, pour avoir un intérêt thérapeutique.

La nanoparticule de Tb ($Z=65$) n'est pas radiosensibilisante à 160 keV, qui est pourtant dans la gamme d'énergie où l'augmentation du numéro atomique (Z) de la matière favorise les interactions par effet photoélectrique, et devrait donc améliorer l'effet thérapeutique (Figure 35). Les faisceaux d'irradiation ionisante étant polyénergétiques, il est possible que l'apport en rayonnements de l'ordre de la centaine de keV ne soit pas suffisant pour créer un effet radiosensibilisant.

Les nanoparticules de Tb@P1 ne présentent pas non plus d'efficacité thérapeutique ajoutée comparées aux RX seuls, bien qu'elles contiennent de la porphyrine. La localisation des nanoparticules de Tb@P1 est peut-être différente de celle de la P1, ce qui ne lui permet pas d'endommager des cibles cellulaires importantes et de mener aux mêmes effets biologiques. Il est également possible que la P1 seule de par sa localisation ou sa cytotoxicité initiale endommage les systèmes de défense de la cellule (comme le système anti-oxydant), augmentant l'effet des RX par une voie détournée.

L'effet photodynamique, est un effet qui consiste plutôt en une destruction cellulaire précoce par nécrose/apoptose (cf. partie I, chapitre 2). Les pertes cellulaires apparaissent donc tôt après le traitement. Afin de contrôler si l'effet additif à la radiothérapie induit par les nanoparticules est de type direct (précoce) ou différé (effet prépondérant en radiothérapie) nous avons réalisé des irradiations à 160 keV, puis les essais clonogéniques ont été ensemencés 1 heure après irradiation. La fraction de survie calculée suite aux 12 jours d'incubation tient donc compte des pertes cellulaires directes, induites dans les 16 premières heures, et les différées (plutôt induites par les rayonnements eux-mêmes).

En effet, nous observons que, dans ces conditions expérimentales, les nanoparticules de Tb@P1 présentent une DMF plus faible que les RX seuls et même que la P1 seule, respectivement 0,65 vs 1,00 vs 0,90 (Figure 53). L'hypothèse que l'effet radiosensibilisant induit par les nanoparticules Tb@P1 est un effet précoce provenant de la composante photodynamique du traitement semble confirmée ici puisque la DMF des nanoparticules Tb@P1 diminue de 1,54 à 0,65 lorsque les morts précoces sont intégrées.

L'appréciation de l'effet du Tb et de la P1 en tant que composés séparés sur la capacité clonogénique des cellules, démontre que ceux-ci ne sont pas capables d'induire les mêmes effets que la nanoparticule de Tb@P1, *i.e.* le même effet que lorsqu'ils sont liés covalamment.

La DMF du mélange Tb + P1 est très proche de celle de la porphyrine seule (0,87 vs 0,90), la porphyrine étant manifestement le seul des deux composés à avoir un effet thérapeutique. Cette observation confirme la nécessité de l'édifice nanoscintillant pour induire l'effet photodynamique généré par radiothérapie.

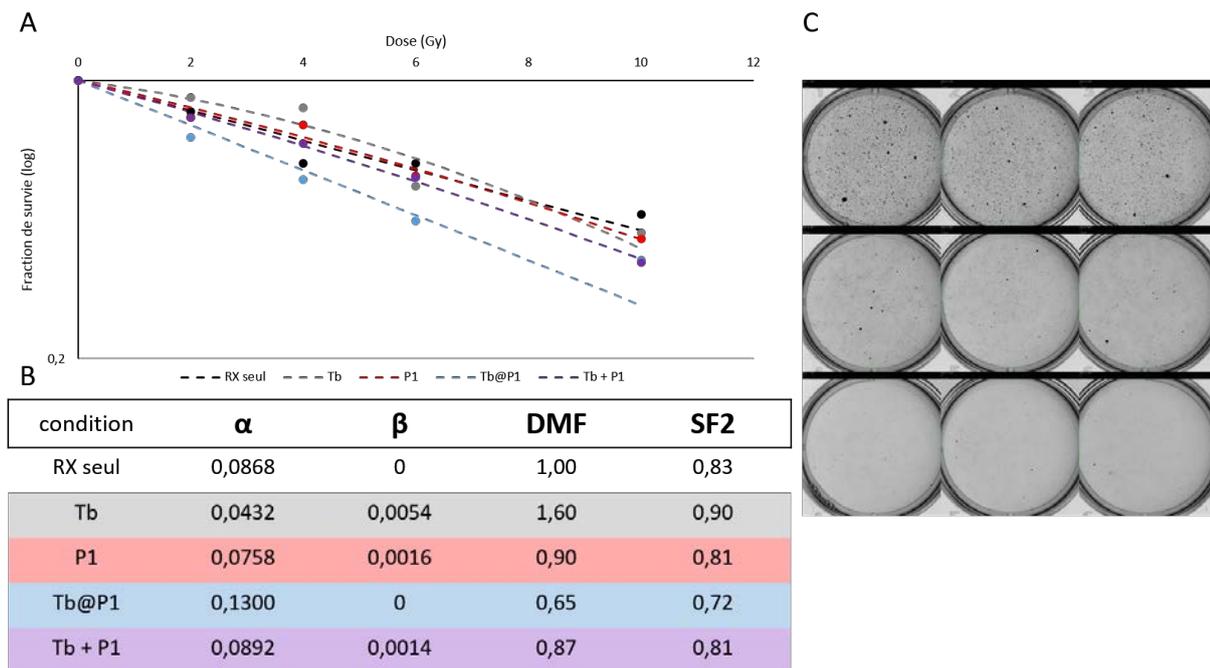


FIGURE 53 – **A.** Courbes de survie après exposition à des rayonnements X à 160 keV et ensemencement des cellules 1 heure post-irradiation (pointillé noir) en présence de nanoparticules de Tb (pointillé gris), de P1 (pointillé rouge), de nanoparticules Tb@P1 (pointillé bleu), et du mélange Tb + P1 (pointillé violet). Les ronds de couleur représentent les points expérimentaux de chaque courbe (n=4). **B.** Valeurs des coefficients α et β , de la DMF et de la SF2 (Fraction de Survie à 2 Gy) pour chaque condition de traitement. **C.** Illustration des essais clonogéniques de la condition Tb@P1 irradiées à 0, 2 et 10 Gy.

4

Discussion

L'action des rayonnements ionisants est divisée en deux types de dommages : les dommages directs à l'ADN et les dommages indirects par interaction avec d'autres molécules (principalement l'eau) produisant des radicaux libres. Ces radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène produits en grande quantité altèrent les macromolécules dans leur environnement proche créant des dommages létaux ou sublétaux. Avec des sources de rayonnement type rayons X, l'effet indirect représente plus de la moitié des dommages infligés à la cellule. Cette action indirecte peut être améliorée par la présence de radiosensibilisateurs tels que les nanoparticules à numéro atomique élevé qui favorisent les effets photoélectriques et Compton, et donc le dépôt de dose local.

Beaucoup d'études sont actuellement menées sur la radiothérapie améliorée par les nanoparticules à numéro atomique élevé. Elles visent à élucider les mécanismes d'action et les modalités d'utilisation de nanoparticules organo-métalliques, principalement l'or ($Z=79$), permettant d'améliorer la radiothérapie [214] [215] [216]. Les nanoparticules de gadolinium ($Z=64$) appelées AGuIX se sont également développées dans ce domaine, car elles présentent plusieurs avantages, elles sont ultra-fines, utilisables en IRM, et possèdent aussi un Z élevé pour augmenter la radiothérapie [217] [212] [218] [219]. Ces études ont permis d'approfondir divers aspects ayant une influence sur l'efficacité des nanoparticules : composition, incorporation, localisation, énergies de rayonnements incidents. Comme les nanoparticules de Tb que nous utilisons sont de type AGuIX (*i.e* même type de synthèse), ces études nous permettent de situer les résultats obtenus avec la nanoparticule de terbium seule.

Notre stratégie d'amélioration de l'efficacité thérapeutique, repose sur le couplage des effets de deux thérapies : la radiothérapie et la thérapie photodynamique. L'augmentation des effets thérapeutiques dépend ici de la complémentarité d'action des deux stratégies. De nouvelles contraintes sont donc à prendre en considération dans l'élaboration d'un nano-objet fonctionnel et efficace, puisque il s'agit de concevoir une nanoparticule capable de scintiller et de transférer efficacement cette énergie à l'agent actif, le photosensibilisateur.

L'utilisation de terbium en PDTX est beaucoup plus répandue qu'en radiothérapie augmentée par les nanoparticules, car le terbium en plus d'avoir un Z élevé, a des propriétés de nanoscintillation compatibles avec les caractéristiques spectrales de différents photosensibilisateurs. C'est pourquoi plusieurs équipes différentes ont choisi de doper leur nanoparticule scintillante avec des atomes de terbium pour améliorer leur rendement de transfert d'énergie au photosensibilisateur [200] [189] [202] [203].

Bulin *et al.* sont les seuls à avoir utilisé une nanoparticule d'oxyde de terbium couplée à une porphy-

rine et se rapproche en cela de notre étude où le terbium n'a pas été utilisé comme un dopant mais bien comme un scintillateur. Leur article visait à faire la preuve de concept du transfert d'énergie entre le coeur d'oxyde de terbium et la porphyrine en surface [203]. Ils ont donc montré que celui-ci était possible après une excitation dans l'UV (300 nm), et qu'il était majoritairement de type non-radiatif (FRET), bien qu'une partie minime du transfert puisse se faire par transfert radiatif.

La caractérisation des nanoparticules de Tb@P1 que nous avons utilisé, a également montré cette capacité de transfert d'énergie entre le Tb et la P1 après une excitation dans l'UV, mais n'a pas pu être prouvée en irradiation X (travaux en cours). La comparaison entre des nanoparticules de Tb@P1 et un mélange de nanoparticules de Tb et de P1 non greffées, a mis en évidence la nécessité de la proximité entre le photosensibilisateur et le scintillateur pour que le transfert d'énergie soit effectif. Il semble que le transfert d'énergie soit de type non radiatif, car il requiert une distance inférieure à 10 nm entre le donneur et l'accepteur. Généralement, des nanoparticules de petites tailles sont préférées, car une petite taille améliore le rendement de luminescence, et favorise le FRET, donc le transfert d'énergie [220]. La taille de la nanoparticule est donc un élément important à prendre en compte au même titre que la compatibilité photophysique entre le scintillateur et le photosensibilisateur, pour favoriser le rendement de luminescence et de transfert d'énergie.

La taille est également décisive dans les mécanismes d'incorporation. Chitrani *et al.* ont montré que des nanoparticules d'or sphériques étaient mieux internalisées que sous forme de bâtonnets. De même, l'incorporation d'un plus grand nombre de nano-objets, taux qui dépend de leur taille, améliorerait l'effet radiosensibilisant. Plus la quantité incorporée était grande, meilleur était l'effet sensibilisant jusqu'à un seuil de saturation [221] [215]. Retif *et al.* concluent également que l'amélioration de l'efficacité thérapeutique dépend de la quantité de nanoparticules incorporées [222]. En effet, la comparaison de nanoparticules d'or de 20 et 50 nm montre que bien que les nanoparticules de 50 nm comptent plus d'atomes d'or, elles sont internalisées en moins grand nombre que les plus petites de 20 nm. Lors d'essais biologiques, les nanoparticules de 20 nm avaient effectivement un meilleur potentiel radiosensibilisant confirmant que la quantité de nanoparticules incorporées est plus importante que leur taille initiale.

Lechtman *et al.* proposent une explication. A nombre de nanoparticules par cellule équivalent, les grosses nanoparticules produisent la plus grande amélioration de dose déposée, car elles possèdent un plus grand nombre d'atomes de Z élevé. En revanche, à quantité d'or par cellule équivalente, les petites nanoparticules sont plus nombreuses, et produisent une plus forte augmentation de dose car il y'a plus d'électrons de moindres énergies qui sont déposés à leur proximité [195].

C'est pourquoi nous avons cherché à travailler avec une concentration maximale de nanoparticules, afin d'atteindre des quantités incorporées susceptibles de fournir un effet radiosensibilisant. Celle-ci a été définie d'après un test d'activité métabolique (MTT), qui a révélé, qu'à dose équivalente de Tb ou de P1, les différentes nanoparticules utilisées ne présentaient pas les mêmes seuils de toxicité. Ainsi, les éléments composants la nanoparticule de Tb@P1 pris séparément, affichaient une cytotoxicité plus importante que l'édifice complet. Le greffage de la porphyrine, dans la nanoparticule diminue l'hydrophobicité de cette première, ce qui est peut-être à l'origine d'une internalisation, puis d'une localisation différente, n'impliquant pas les mêmes effets cellulaires [58]. La quantification des nanoparticules montrent, que deux fois plus de nanoparticules de Tb sont retrouvées dans les cellules, différence potentiellement à l'origine de leur cytotoxicité plus élevée. Néanmoins, à faible énergie, les nanoparticules Tb@P1 sont radiosensibilisantes.

L'incorporation des nanoparticules de Tb@P1 semble être médiée par des vésicules d'endocytose,

d'après les résultats obtenus par suivi de la fluorescence à 4 et 37°C, après trois heures d'incubation sur les cellules. Plusieurs études appuyent ce résultat, elles observent également une incorporation par macropinocytose dans des vésicules d'endocytose, de différentes nanoparticules, or ou gadolinium [219] [222] [223].

La radiosensibilisation dépend donc de la conception du nano-objet (taille, composition, fonctionnalisation) dont découle la quantité incorporée et la localisation, et aussi la capacité à générer des espèces secondaires (électrons Auger, photo-électrons, et ensuite ERO), mais elle dépend aussi de l'énergie des rayonnements utilisés (Figure 35). Théoriquement, d'après des simulations de Monte Carlo, la radiosensibilisation par des éléments à numéro atomique lourd ne peut pas fonctionner avec des concentrations massiques en radiosensibilisateur inférieures à 1%, et des énergies supérieures à la 10 aine de keV [191].

Mais nos résultats obtenus lors d'expérimentations sur cellules, comme beaucoup dans la littérature, ne correspondent pas à la théorie et soulèvent de nouvelles questions quant aux mécanismes impliqués dans la radiosensibilisation.

Les nanoparticules de Tb présentent un effet radiosensibilisant lors d'irradiation à fortes énergies (6 MV) mais n'engendrent pas d'effet à faibles énergies (160 keV). Retif *et al.* avancent l'idée que le spectre du tube à rayons X à 6 MV comprend également une composante autour de la 100aine de keV, capable d'interagir avec la nanoparticule. De plus, la génération d'espèces secondaires par interaction avec la matière (effet photoélectrique, effet Compton) crée de nouveaux photons de moindre énergie (électron Auger, électron delta, photoélectron) de l'ordre de la centaine de keV aussi, pouvant réagir à nouveau avec la nanoparticule, augmentant ainsi le dépôt de dose [224].

Mc Mahon *et al.* réalisent des simulations de Monte Carlo de dépôt de dose à proximité de la nanoparticule et avancent l'hypothèse, que l'augmentation de l'efficacité de traitement par de petites nanoparticules proviendrait de leur capacité à libérer des cascades d'électron Auger dans leur voisinage proche, augmentant très localement ce dépôt de dose [191].

En revanche, le fait que la nanoparticule de Tb n'engendre pas d'effet supplémentaire lors d'irradiation à 160 keV qui devrait pourtant favoriser les interactions par effet photoélectrique, est plus complexe à comprendre. Le spectre de l'appareil préclinique dont les rayonnements maximums sont à 160 keV, présente un spectre décalé, avec la majorité des rayonnements émis à des énergies plus faibles que 100 keV, qui pourraient être insuffisantes pour interagir avec le Tb et augmenter les espèces secondaires générées.

La présence de P1 engendre une perte cellulaire additionnelle à 160 keV mais pas à 6 MV. Bistolfi *et al.* émettent l'hypothèse que la source de radiation ionisante incidente peut, après interaction avec la matière, créer des photons de moindres énergies, produisant ainsi une radioluminescence rouge, capable d'exciter la porphyrine. Ce phénomène aurait plus de chance de se produire lors de la création d'électrons Auger d'une énergie très faible (1 à 5 eV) [225]. Une seconde hypothèse, évoque la possibilité d'interactions entre les ERO créées par la radiothérapie et la porphyrine, menant à de nouvelles chaînes d'oxydation, et à une augmentation des dégâts cellulaires [202]. Les effets induits par la porphyrine sont à manipuler avec précaution, car la concentration de travail a été choisie afin de servir de témoin à la nanoparticule de Tb@P1. Cette concentration n'est pas toxique quand la P1 est couplée, mais le devient quand elle ne l'est plus.

Les effets induits par les nanoparticules de Tb@P1 ne sont observables que lorsque que l'irradiation incidente est de faible énergie (160 keV) et que les essais clonogéniques sont ensemencés immédiatement après irradiation, *i.e.* lorsqu'on prend en compte les morts précoces et différées. Nos résultats, montrent que la radiosensibilisation induite par la nanoparticule de Tb, la porphyrine et la nanoparticule de Tb@P1 passent par des mécanismes différents. Les nanoparticules de Tb@P1

semblent produire à 160 keV un effet photodynamique additif à l'effet des rayonnements X puisque l'effet induit survient dans les premières heures post-traitement, et que l'effet des rayonnements X seuls n'y est pas sensible (SF2 de 0,83 lors de l'intégration des effets précoces et différés, et de 0,81 pour la prise en compte des effets différés uniquement). Cet effet précoce sur les dommages aux cellules, semble spécifique de l'édifice Tb conjugué à la P1, car l'utilisation d'un mélange de Tb et de P1 (respectant les concentrations de chaque élément dans la nanoparticule) ne permet pas d'atteindre le même niveau d'efficacité. Le transfert d'énergie du scintillateur au photosensibilisateur est donc requis pour générer un effet photodynamique additionnel de l'effet radiothérapie.

Des travaux en cours sont menés sur l'évaluation de la production d'oxygène singulet lors de la PDTX. Nous utilisons une sonde fluorescente sensible à la présence de plusieurs ERO (OH[•] principalement, et ¹O₂ également) en présence et en absence d'un quencher de l'oxygène singulet, l'azide de sodium (NaN₃), pour mettre en évidence sa formation. Des essais préliminaires réalisés en PDT présentent des résultats prometteurs. Leur réalisation après excitation en X est en cours.

Il semblerait que l'effet PDTX soit plutôt optimal à des énergies d'excitation de l'ordre de la centaine de keV, car cette énergie favorise les événements menant à la luminescence des scintillateurs [198] [226]. Cependant, quelques études ont examiné cette possibilité, en menant leur étude à 6 MV. Rossi *et al.* ont testé l'efficacité d'une nanoparticule de SiC/SiOx conjuguée à une porphyrine sur une lignée d'adénocarcinome pulmonaire radiorésistante, et ont montré un effet ajouté des nanoparticules. Cependant, le protocole ne renseigne pas sur le moment de l'ensemencement des essais clonogéniques, ne permettant pas de juger de la dynamique des effets induits. Les résultats ne comparent pas la nanoparticule seule à la nanoparticule conjuguée, ne permettant pas d'assigner l'amélioration de l'effet thérapeutique à la combinaison scintillateur-photosensibilisateur, ou juste au scintillateur [207]. Yang *et al.* ont quant à eux réalisé des essais clonogéniques après irradiation de cellules exposées à des QD (Quantum Dots) conjugués ou non à des porphyrines. Les courbes de survie, montrent une amélioration de la radiosensibilisation uniquement avec les Qd conjugués, prouvant la capacité de la PDTX à être appliquée à des énergies cliniques.

La complémentarité d'action entre l'effet photodynamique et la radiothérapie, nécessiterait d'examiner plus attentivement les ERO produites lors de la PDTX. Bulin *et al.* l'ont fait sur leur nanoparticules de Tb₂O₃ conjuguées à une porphyrine, mais ne l'ont pas réalisé sur cellules. Ils ont constaté une génération d'oxygène singulet spécifique de la PDT après une excitation en X.

L'analyse plus approfondie de la localisation des nanoparticules de Tb et Tb@P1 permettrait d'obtenir des informations détaillées de leur biodistribution afin de simuler, à partir des données expérimentales, les interactions entre les rayonnements incidents et les nanoparticules, pour nous fournir des éléments de réponses sur les différences d'activité entre la nanoparticule de Tb et de Tb@P1.

Quatrième partie

Conclusion et perspectives

Le traitement des GBM souffre d'un manque crucial de contrôle local de la tumeur, menant à des récurrences systématiques apparaissant, dans plus de 80% des cas, dans le volume cible de radiothérapie. Dans ce contexte, la PDT se présente comme une arme complémentaire dans l'amélioration du contrôle local.

Ce travail de thèse a d'abord porté sur la caractérisation des effets biologiques induits et de l'efficacité de la iPDT appliquée au GBM sur un modèle préclinique de rat *nude* porteur de GBM humain.

Le but de cette étude était de :

- faire un suivi longitudinal par IRM fournissant des informations morphologiques, vasculaires, métaboliques et inflammatoires,
- de caractériser les réponses directes et indirectes mise en jeu lors de la iPDT,
- et d'extraire de ces données un indicateur précoce d'efficacité du traitement.

La iPDT a été réalisée *via* l'injection intraveineuse d'une solution de nanoparticules de gadolinium conjuguées à une porphyrine, permettant la visualisation par IRM de sa biodistribution intratumorale, puis le traitement photodynamique.

Les résultats ont montré que la iPDT n'engendrait pas les mêmes réactions chez tous les rats traités. Un groupe dit répondeur, présentait une réponse caractérisée par la formation d'un œdème vasogénique (objectivé par l'augmentation de l'ADC), et d'un œdème cytotoxique (objectivé par une baisse d'ADC) un jour post-iPDT. Une baisse de la prolifération et une augmentation de la nécrose, étaient également observées d'après la baisse respective de la choline et du myo-inositol et l'augmentation des lipides/lactate, en concordance avec une augmentation d'ADC au niveau intratumoral.

Un groupe dit non-répondeur ne présentait pas un jour post-iPDT de réponse inflammatoire forte, donc pas d'œdème, ni de diminution de la prolifération. Ce groupe présentait un profil hémorragique différent du groupe répondeur, avec formation de microhémorragies plus importantes autour de la tumeur.

Le suivi longitudinal nous a donc permis de caractériser le type de réponses induites par le traitement, et leur évolution dans le temps. L'évolution de ces paramètres pendant une durée de sept jours, a montré un effet transitoire du traitement dans le groupe répondeur, qui engendre un arrêt de croissance de quelques jours (3-4 jours) avant que celle-ci ne reprenne. Dans le groupe non-répondeur aucun arrêt de croissance n'est observé.

La compréhension de cet effet différentiel a été étudié du point de vue de la répartition de la dose lumineuse. Une simulation de Monte Carlo, modélisant la dose de lumière distribuée à la tumeur d'après des paramètres expérimentaux, met en avant une répartition de la lumière différente au sein du volume tumoral, à l'origine de la formation des deux groupes de réponse.

Enfin, les variations dans l'expression des indicateurs provenant de l'IRM, *i.e.* ADC, taux de choline, lipides, étaient précurseurs du profil de croissance.

Cette étude nous a permis de montrer que des séquences IRM pas encore utilisées comme standard clinique, pourraient y trouver leur place.

Bien que le suivi longitudinal de la réponse tumorale à la iPDT soit informatif, certains effets restent à améliorer. La présence d'un œdème vasogénique ainsi que la mort par nécrose induits uniquement dans le groupe répondeur, montrent que ces effets sont nécessaires pour induire une réponse tumorale, mais ils peuvent aussi être délétères en générant une réponse inflammatoire et immunitaire trop forte.

L'induction de l'œdème cytotoxique qui touche en partie des cellules "saines" adjacentes à la tumeur, peut provenir d'un manque de sélectivité de la nanoparticule. En effet comme celle-ci n'est

pas adressée et entre par effet EPR dans la tumeur, l'induction d'œdème peut augmenter sa distribution interstitielle aléatoire et engendrer des effets non désirés au tissu adjacent [227]. La iPDT, nécessiterait une augmentation de sa sélectivité pour le tissu tumoral cible. La fonctionnalisation des nanoparticules par un peptide d'adressage permettrait d'améliorer ce point.

La limitation de notre effet thérapeutique est également dû au faible diamètre de notre fibre optique, ne permettant pas de couvrir toute la tumeur. Ce point est moins limitant en clinique car plusieurs fibres peuvent-être insérées au sein de la zone traitée.

La deuxième partie de ce travail a porté sur une nouvelle stratégie pour améliorer le rayon d'action de la PDT sur des tumeurs profondes. Le concept consiste à utiliser des nanoparticules contenant dans leur cœur un scintillateur qui, excité par des rayons X à forte pénétration tissulaire, peut émettre des photons à leur tour réabsorbés par le photosensibilisateur lui-même greffé à la nanoparticule.

Les objectifs de ce travail qui en est à ses débuts, ont été de :

- faire la preuve de concept du transfert d'énergie entre le scintillateur et le photosensibilisateur de la nanoparticule,
- valider *in vitro* l'efficacité de la nanoparticule à augmenter la génération d'ERO lors d'irradiation ionisante,
- et définir la gamme d'énergie de rayonnements X permettant de déclencher un effet photodynamique optimal.

La preuve de concept de la capacité de transfert d'énergie par FRET entre le scintillateur et le photosensibilisateur a été réalisée en fluorescence en temps décalée par excitation dans l'UV. Celle-ci a montré la nécessité de greffer covalamment le photosensibilisateur sans quoi le transfert d'énergie n'est pas effectif.

La production d'ERO par les cellules en présence des nanoparticules et légèrement plus élevée, montrant que la présence seule des nanoparticules est déjà source de production d'ERO. Les rayonnements ionisants induisent également une génération d'ERO dans les cellules qui est augmentée par la présence des nanoparticules. Cependant, la sonde utilisée est spécifique d'ERO préférentiellement produites par les rayonnements X (OH^\cdot , ONOO^-). Or, les ERO produites par les nanoparticules sont plutôt des ERO spécifiques de la PDT *i.e.* l'oxygène singulet. La caractérisation de l'effet photodynamique induit par les nanoparticules nécessiterait donc l'utilisation d'une sonde y étant spécifique. Cependant, peu le sont, rendant la technique difficile à mettre en œuvre. Ces travaux sont en cours, et permettront de mettre en avant l'apport de l'effet photodynamique dans la génération d'ERO.

L'étude de l'impact de la gamme d'énergie utilisée pour activer les nanoparticules a été menée par mesure de la perte de capacité clonogénique *in vitro* sur les cellules radiorésistantes de la lignée U87. Les résultats ont montré que la perte de capacité clonogénique était augmentée uniquement par les nanoparticules de terbium lorsque des fortes énergies étaient utilisées (6 MV). Le mécanisme d'action était donc un mécanisme d'amélioration du dépôt de dose par augmentation locale de la densité du milieu grâce au numéro atomique élevé des nanoparticules. En revanche, l'apport d'un effet photodynamique a été observé lorsque les effets précoces et tardifs des thérapies ont été cumulés. L'amélioration de la thérapie dans ce cas, était due à l'addition des effets précoces induits par la PDT et des effets tardifs induits par la radiothérapie.

D'après ces résultats, les faibles énergies favoriseraient l'excitation du scintillateur, augmentant les chances de générer un effet photodynamique.

Ce travail montre donc que la PDT sous forme iPDT ou PDTX se présente comme une stratégie complémentaire utile pour l'amélioration du contrôle local de la croissance tumorale des GBM.

Bibliographie

- [1] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system," *Acta Neuropathol.*, vol. 114, pp. 97–109, 2007.
- [2] D. N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues, and D. W. Ellison, "The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system : a summary," *Acta Neuropathol. (Berl.)*, vol. 131, pp. 803–20, 2016.
- [3] D. Figarella-Branger, C. Colin, B. Coulibaly, B. Quilichini, A. M. D. Paula, C. Fernandez, and C. Bouvier, "Histological and molecular classification of gliomas," *Revue Neurologique*, vol. 164, pp. 505–515, 2008.
- [4] C. Daumas-Duport, F. Beuvon, P. Varlet, and C. Fallet-Bianco, "Gliomas : WHO and Sainte-Anne hospital classifications," *Annales de Pathologie*, vol. 20, pp. 413–28, 2000.
- [5] H. Duffau and L. Capelle, "Preferential brain locations of low-grade gliomas : Comparison with glioblastomas and review of hypothesis," *American Cancer Society*, vol. 100, pp. 2622–26, 2004.
- [6] M. Savasta, "access.ens-lyon.fr," <http://access.ens-lyon.fr/acces/ressources/neurosciences/maladies-et-traitements/parkinson/causes>, 2010, [Online ; accessed 21-aout-2016].
- [7] Q. T. Ostrom and J. S. Barnholtz-Sloan, "Current state of our knowledge on brain tumor epidemiology," *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, vol. 11, pp. 329–35, 2011.
- [8] L. Bauchet, S. Zouaoui, A. Darlix, N. M. de Champfleury, E. Ferreira, M. Fabbro, C. Kerr, and L. Taillandier, "Assessment and treatment relevance in elderly glioblastoma patients," *Neuro-Oncology*, vol. 16, p. 1459–1468, 2014.
- [9] L. Bauchet, H. Mathieu-Daudé, P. Fabbro-Peray, V. Rigau, M. Fabbro, O. Chinot, L. Pallusseau, C. Carnin, K. Lainé, A. Schlama, A. Thiebaut, M. C. Patru, F. Bauchet, M. Lionnet, M. Wager, T. Faillot, L. Taillandier, D. Figarella-Branger, L. Capelle, H. Loiseau, D. Frappaz, C. Campello, C. Kerr, H. Duffau, M. Reme-Saumont, B. Trétarre, J.-P. Daures, D. Henin, F. Labrousse, P. Menei, J. Honnorat, with the participation of Société Française de Neurochirurgie (SFNC), S. F. d. N. S. the Club de Neuro-Oncologie of the Société Française de Neurochirurgie (CNO-SFNC), and A. des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF), "Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004," *Neuro-Oncology*, vol. 12, pp. 725–735, 2010.
- [10] S. Zouaoui, V. Rigau, H. Mathieu-Daude, A. Darlix, F. Bessaoud, P. Fabbro-Peray, F. Bauchet, C. Kerr, M. Fabbro, D. Figarella-Branger, L. Taillandier, H. Duffau, B. Trétarre, and L. Bauchet, "Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central : résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives," *Neurochirurgie*, vol. 58, pp. 4–13, 2012.

- [11] Q. T. Ostrom, H. Gittleman, J. Fulop, M. Liu, R. Blanda, C. Kromer, Y. Wolinsky, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan, "Cbtrus statistical report : Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2008-2012," *Neuro Oncol*, vol. 17, pp. 1–62, 2015.
- [12] F. B. Furnari, 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, "Malignant astrocytic glioma : genetics, biology, and paths to treatment," *Genes and Development*, vol. 21, pp. 2683–2710, 2007.
- [13] A. P. Kyritsis, M. L. Bondy, J. S. Rao, and C. Sioka, "Inherited predisposition to glioma," *Neuro-Oncology*, vol. 12, pp. 104–113, 2010.
- [14] R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, J. P. Mesirov, G. Alexe, M. Lawrence, M. O'Kelly, P. Tamayo, B. A. Weir, S. Gabriel, W. Winckler, S. Gupta, L. Jakkula, H. S. Feiler, J. G. Hodgson, C. D. James, J. N. Sarkaria, C. Brennan, A. Kahn, P. T. Spellman, R. K. Wilson, T. P. Speed, J. W. Gray, M. Meyerson, G. Getz, C. M. Perou, D. N. Hayes, and T. C. G. A. R. Network, "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in pdgfra, idh1, egfr, and nf1," *Cancer Cell*, vol. 17, pp. 98–110, 2010.
- [15] R. St-Jacques, "Corpshumain.ca," <http://www.corpshumain.ca/Cerveau3.php>, 2015, [Online ; accessed 21-aout-2016].
- [16] N. J. Abbott, A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof, and D. J. Begley, "Structure and function of the blood brain barrier," *Neurobiology of Disease*, vol. 37, pp. 13–25, 2010.
- [17] R. Karim, C. Palazzo, B. Evrard, and G. Piel, "Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme : Current state o -the art," *J. Controlled Release*, vol. 227, pp. 23–37, 2016.
- [18] K. El-Alaoui-Lasmali, "Caracterisation des effets vasculaires du bevacizumab, vers une optimisation de son utilisation en therapie anti-cancereuse," Ph.D. dissertation, Universite de Lorraine, 2016.
- [19] K. E. Schlageter, P. Molnar, G. D. Lapin, and D. R. Groothuis, "Microvessel organization and structure in experimental brain tumors : Microvessel populations with distinctive structural and functional properties," *Microvasc. Res.*, vol. 58, pp. 318–28, 1999.
- [20] H. Wolburg, K. Wolburg-Buchholz, J. Kraus, G. Rascher-Eggstein, S. Liebner, S. Hamm, F. Duffner, E.-H. Grote, W. Risau, and B. Engelhardt, "Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme." *Acta Neuropathol (Berl)*, vol. 105, pp. 586–92, 2003.
- [21] N. H. On, R. Mitchell, S. D. Savant, C. J. Bachmeier, G. M. Hatch, and D. W. Miller, "Examination of blood brain barrier integrity in a mouse brain tumor model," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 111, pp. 133–43, 2012.
- [22] H. F. Dvorak, J. A. Nagy, J. T. Dvorak, and A. M. Dvorak, "Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules," *American Journal of Pathology*, vol. 133, pp. 95–109, 1988.
- [23] C. P. Haar, P. Hebbar, G. C. Wallace, A. Das, W. A. V. III, J. A. Smith, P. Giglio, S. J. Patel, S. K. Ray, and N. L. Banik, "Drug resistance in glioblastoma : A mini review," *Neurochem. Res.*, vol. 37, pp. 1192–1200, 2012.
- [24] P. Domingues, M. Gonzalez-Tablas, A. Otero, D. Pascual, D. Miranda, L. Ruiz, P. Sousa, J. Ciudad, J. M. Goncalves, M. C. Lopes, A. Orfao, and M. D. Taberner, "Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas," *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 53, pp. 1–15, 2016.

-
- [25] D. Hanahan and R. Weinberg, "Hallmarks of cancer : the next generation," *Cell*, vol. 144, pp. 646–74, 2011.
- [26] D. Wainwright, P. Nigam, B. Thaci, M. Dey, and M. S. Lesniak, "Recent developments on immunotherapy for brain cancer," *Expert Opin. Emerg. Drugs*, vol. 17, pp. 181–20, 2012.
- [27] A. Zisakis, C. Piperi, M. S. Themistocleous, P. Korkolopoulou, E. I. Boviatsis, D. E. Sakas, E. Patsouris, R. W. Lea, and A. Kalofoutis, "Comparative analysis of peripheral and localised cytokine secretion in glioblastoma patients," *Cytokine*, vol. 39, pp. 99–105, 2007.
- [28] A. E. Andaloussi and M. S. Lesniak, "An increase in cd4+cd25+foxp3+ regulatory t cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme," *Neuro-Oncology*, vol. 8, pp. 234–43, 2006.
- [29] D. Bechet, S. Mordon, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Photodynamic therapy of malignant brain tumours : a complementary approach to conventional therapies." *Cancer Treat Rev*, vol. 40, pp. 229–41, 2014.
- [30] S. Taillibert, M. Pedretti, and M. Sanson, "Strategies et perspectives therapeutiques des gliomes," *Presse Medicale*, vol. 33, pp. 1278–83, 2004.
- [31] P. Y. Wen, D. R. Macdonald, D. A. Reardon, T. F. Cloughesy, A. G. Sorensen, E. Galanis, J. DeGroot, W. Wick, M. R. Gilbert, A. B. Lassman, C. Tsien, T. Mikkelsen, E. T. Wong, M. C. Chamberlain, R. Stupp, K. R. Lamborn, M. A. Vogelbaum, M. J. van den Bent, and S. M. Chang, "Updated response assessment criteria for high-grade gliomas : Response assessment in neuro-oncology working group," *J Clin Oncol*, vol. 28, pp. 1963–72, 2010.
- [32] W. Stummer, M. J. van den Bent, and M. Westphal, "Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies : new arguments in an old discussion." *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 153, pp. 1211–8, 2011.
- [33] M. J. McGirt, K. L. Chaichana, M. Gathinji, F. J. Attenell, K. Than, A. Olivi, J. D. Weingart, H. Brem, and A. redo Quinones-Hinojosa, "Independant association of extent of resection with survival in patients with malignant brain astrocytoma," *Journal of Neurosurgery*, vol. 110, pp. 156–62, 2009.
- [34] A. Carpentier, "Surgical rescetion of gliomas in 2008," *Cancer/radiotherapie*, vol. 12, pp. 676–86, 2008.
- [35] C. Watts and N. Sanai, "Surgical approaches for the gliomas," *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 134, pp. 51–69, 2016.
- [36] H. Duffau, "Lessons from brain mapping in surgery for low-grade glioma : insights into associations between tumour and brain plasticity," *Lancet Neurol*, vol. 4, pp. 476–86, 2005.
- [37] Y. Tanaka, T. Nariai, T. Momose, M. Aoyagi, T. Maehara, T. Tomori, Y. Yoshino, T. Nagaoka, K. I. wata, K. Ishii, and K. Ohno, "Glioma surgery using a multimodal navigation system with integrated metabolic images," *J Neurosurg*, vol. 110, pp. 163–172, 2009.
- [38] W. Stummer, U. Pichlmeier, T. Meinel, O. Wiestler, F. Zanella, and H. Reulen, "Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma : a randomised controlled multicentre phase iii trial." *Lancet Oncol.*, vol. 7, pp. 392–401, 2006.
- [39] G. Kantor and H. Loiseau, "Volumes-cibles anatomocliniques (gtv et ctv) des tumeurs gliales analysis of target volumes for gliomas," *Cancer/Radiotherapie*, vol. 9, pp. 230–9, 2005.
- [40] W. Roa, P. Brasher, G. Bauman, M. Anthes, E. Bruera, A. Chan, B. Fisher, D. Fulton, S. Gulavita, C. Hao, S. Husain, A. Murtha, K. Petruk, D. Stewart, P. Tai, R. Urtasun, J. Cairncross, and P. Forsyth, "Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma

- multiforme : A prospective randomized clinical trial,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 22, pp. 1583–88, 2004.
- [41] C. Schwartz, A. Romagna, N. Thon, M. Niyazi, J. Watson, C. Belka, J.-C. Tonn, F.-W. Kreth, and S. B. Nachbichler, “Outcome and toxicity profile of salvage low-dose-rate iodine-125 stereotactic brachytherapy in recurrent high-grade gliomas,” *Acta Neurochir*, vol. 157, pp. 1757–64, 2015.
- [42] R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R. O. Mirimanoff, “Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 352, pp. 987–96, 2005.
- [43] M. J. van den Bent, A. A. Brandes, R. Rampling, M. C. Kouwenhoven, J. M. Kros, A. F. Carpentier, P. M. Clement, M. Frenay, M. Campone, J.-F. Baurain, J.-P. Armand, M. J. Taphoorn, A. Tosoni, H. Kletzl, B. Klughammer, D. Lacombe, and T. Gorlia, “Randomized phase ii trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma : Eortc brain tumor group study 26034,” *J Clin Oncol*, vol. 27, pp. 1268–74, 2009.
- [44] T. N. Kreisl, A. B. Lassman, P. S. Mischel, N. Rosen, H. I. Scher, J. Teruya-Feldstein, D. Shaffer, E. Lis, and L. E. Abrey, “A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (gbm),” *J. Neurooncol.*, vol. 92, pp. 99–105, 2009.
- [45] K. Seystahl, D. Gramatzki, P. Roth, and M. Weller, “Pharmacotherapies for the treatment of glioblastoma - current evidence and perspectives,” *Expert Opin Pharmacother*, vol. 17, pp. 1259–72, 2016.
- [46] O. L. Chinot, W. Wick, W. Mason, R. Henriksson, F. Saran, R. Nishikawa, A. F. Carpentier, K. Hoang-Xuan, P. Kavan, D. Cernea, A. A. Brandes, M. Hilton, L. Abrey, and T. Cloughesy, “Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, pp. 709–22, 2014.
- [47] M. R. Gilbert, J. J. Dignam, T. S. Armstrong, J. S. Wefel, D. T. Blumenthal, M. A. Vogelbaum, H. Colman, A. Chakravarti, S. Pugh, M. Won, R. Jeraj, P. D. Brown, K. A. Jaeckle, D. Schiff, V. W. Stieber, D. G. Brachman, M. Werner-Wasik, I. W. Tremont-Lukats, E. P. Sulman, K. D. Aldape, J. Walter J. Curran, and M. P. Mehta, “A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma,” *N Engl J Med*, vol. 370, pp. 699–708, 2014.
- [48] U. Herrlinger, N. Schafer, J. Steinbach, A. Weyerbrock, P. Hau, R. Goldbrunner, B. Leutgeb, H. Urbach, W. Stummer, and M. Glas, “The randomized, multicenter glioblastoma trial investigating bevacizumab-irinotecan vs standard temozolomide in newly diagnosed, mgmt-non-methylated glioblastoma patients : final survival results and quality of life,” *Neuro-oncol.*, vol. 16, pp. 23–24, 2014.
- [49] S. Valable, B. Lemasson, R. Farion, M. Beaumont, C. Segebarth, C. Remy, and E. L. Barbier, “Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models : a longitudinal in vivo and ex vivo study,” *NMR in Biomedicine*, vol. 21, pp. 1043–56, 2008.
- [50] P. Wen, D. Reardon, S. Phuphanich, R. Aiken, J. Landolfi, W. Curry, J.-J. Zhu, M. Glantz, D. Peereboom, J. Markert, R. Larocca, D. O’Rourke, K. Fink, L. Kim, M. Gruber, G. Lesser, E. Pan, R. Santos, C. Pinilla, and J. Yu, “Association of survival and progression-free survival with immune response in hla-2 newly-diagnosed gbm patients in randomized double-blind placebo-controlled phase 2 trial of dendritic cell (dc) immunotherapy with ict-107,” *Neuro-oncol*, vol. 17, p. 112, 2015.

-
- [51] R. Stupp, S. Taillibert, A. A. Kanner, S. Kesari, D. M. Steinberg, S. A. Toms, L. P. Taylor, F. Lieberman, A. Silvani, K. L. Fink, G. H. Barnett, J.-J. Zhu, J. W. Henson, H. H. Engelhard, T. C. Chen, D. D. Tran, J. Sroubek, N. D. Tran, A. F. Hottinger, J. Landolfi, R. Desai, M. Caroli, Y. Kew, J. Honnorat, A. Idbaih, E. D. Kirson, U. Weinberg, Y. Palti, M. E. Hegi, and Z. Ram, "Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma. a randomized clinical trial," *JAMA*, vol. 214, pp. 2535–43, 2015.
- [52] T. J. Dougherty, "Photodynamic therapy (pdt) of malignant tumors," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 2, pp. 83–116, 1984.
- [53] B. C. Wilson and M. S. Patterson, "The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 53, pp. 61–109, 2008.
- [54] J. Moan and K. Berg, "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen," *Photochem Photobiol*, vol. 53, pp. 549–53, 1991.
- [55] M. Davies, "Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen," *Photochem Photobiol Sci*, vol. 3, pp. 17–25, 2004.
- [56] M. Korbelik and I. Cecic, "Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy," *Cancer Lett*, vol. 137, pp. 91–8, 1999.
- [57] M. Korbelik, G. Kros, J. Kros, and G. Dougherty, "The role of host lymphoid populations in the response of mouse emt6 tumor to photodynamic therapy," *Cancer Res*, vol. 56, pp. 5647–62, 1996.
- [58] A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy : Part three photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction," *Photodiagnosis Photodynamic Therapy*, vol. 2, pp. 91–106, 2005.
- [59] A. Chakraborty, K. D. Held, K. M. Prise, H. L. Liber, and R. W. Redmond, "Bystander effects induced by diffusing mediators after photodynamic stress," *Radiat Res*, vol. 172, pp. 74–81, 2009.
- [60] N. Oleinick and H. Evans, "The photobiology of photodynamic therapy : cellular targets and mechanisms," *Radiation Research*, vol. 150, pp. 146–56, 1998.
- [61] S. Nagata, A. Obana, Y. Gohto, and S. Nakajima, "Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, atx-s10(na)," *Lasers Surg Med*, vol. 33, pp. 64–70, 2003.
- [62] D. Kessel and R. Poretz, "Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (came)," *Photochem Photobiol*, vol. 71, pp. 94–6, 2000.
- [63] G. Lavie, C. Kaplinsky, A. Toren, I. Aizman, D. Meruelo, Y. Mazur, and M. Mandel, "A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthron and hypericin in leukaemic cells : possible relevance to photodynamic therapy," *Br. J. Cancer*, vol. 79, pp. 423–32, 1999.
- [64] X. Chen, P. Zhao, F. Chen, L. Li, and R. Luo, "Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer," *Lasers in Medical Science*, vol. 26, pp. 69–78, 2011.
- [65] L. Xue, S. Chiu, and N. L. Oleinick, "Photochemical destruction of the bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer pc 4," *Oncogene*, vol. 20, pp. 3420–7, 2001.

- [66] S. Karmakar, N. L. Banik, S. J. Patel, and S. K. Ray, "5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy suppressed survival factors and activated proteases for apoptosis in human glioblastoma u87mg cells," *Neuroscience Letters*, vol. 415, pp. 242–7, 2007.
- [67] N. Mizushima, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori, "Autophagosome formation in mammalian cells," *Cell Struct Funct*, vol. 27, pp. 421–9, 2002.
- [68] M. C. Maiuri, A. Criollo, and G. Kroemer, "Crosstalk between apoptosis and autophagy within the beclin 1 interactome," *EMBO J*, vol. 29, pp. 515–16, 2010.
- [69] E. Buytaert, G. Callewaer, N. Hendrickx, L. Scorrano, D. Hartmann, L. Missiaen, J. R. Vandenhede, I. Heirman, J. Grooten, and P. Agostinis, "Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic bax and bak proteins in shaping cell death after hypericin mediated photodynamic therapy," *FASEB Journal*, vol. 20, pp. 756–8, 2006.
- [70] L. Xue, S. Chiu, K. Azizuddin, S. Joseph, and N. Oleinick, "The death of human cancer cells following photodynamic therapy : apoptosis competence is necessary for bcl-2 protection but not for induction of autophagy." *Photochem Photobiol.*, vol. 83, pp. 1016–23, 2007.
- [71] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, and M. R. Hamblin, "Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer," *Cancers*, vol. 3, pp. 2516–39, 2011.
- [72] S. Gollnick, S. Evans, H. Baumann, B. Owczarczak, P. Maier, L. Vaughan, W. Wang, E. Unger, and B. Henderson, "Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation," *Br J Cancer*, vol. 88, pp. 1772–9, 2003.
- [73] B. Chen, B. W. Pogue, I. A. Goodwin, J. A. O'Hara, C. M. Wilmot, J. E. Hutchins, P. J. Hoopes, and T. Hasan, "Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the rif-1 tumor," *Radiat Res*, vol. 160, pp. 452–9, 2003.
- [74] V. H. Fingar, K. A. Siegel, T. J. Wieman, and K. W. Doa, "The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy," *Photochem Photobiol*, vol. 58, pp. 393–9, 1993.
- [75] V. Fingar, S. Taber, P. Haydon, L. Harrison, S. Kempf, and T. Wieman, "Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors : a view and comparison of effect in preclinical and clinical models at the university of louisville," *In Vivo*, vol. 14, pp. 93–100, 2000.
- [76] B. Chen, B. Pogue, J. Luna, R. Hardman, P. H. T, and Hasan, "Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization : effects, mechanism, and therapeutic implications," *Clin Cancer Res*, vol. 12, pp. 917–23, 2006.
- [77] D. Bechet, L. Tirand, B. Faivre, F. Plenat, C. Bonnet, T. Bastogne, C. Frochot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release," *Pharm. Res.*, vol. 27, pp. 468–79, 2010.
- [78] B. Krammer, "Vascular effects of photodynamic therapy," *Anticancer Res*, vol. 21, pp. 4271–7, 2001.
- [79] A. Scherz and Y. Salomon, "Vascular-targeted photodynamic therapy (vtp) with tookad : from laboratory bench to clinical trials," 2006.
- [80] E. Maugain, S. Sasnouski, V. Zorin, J.-L. Merlin, F. Guillemin, and L. Bezdetnaya, "Foscan-based photodynamic treatment in vivo : correlation between efficacy and foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes," *Oncol. Rep.*, vol. 12, pp. 639–45, 2004.
- [81] M. Trisscheijn, M. Ruevekamp, M. Aalders, P. Baas, and F. A. Stewart, "Outcome of mthpc mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response," *Photochem Photobiol*, vol. 81, pp. 1161–7, 2005.

-
- [82] J. Leveckis, N. J. Brown, and M. W. Reed, "The effect of aminolaevulinic acid-induced, protoporphyrin ix mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle microcirculation in vivo," *Br. J. Cancer*, vol. 75, pp. 1113–9, 1995.
- [83] B. Henderson, T. Sitnik-Bush, and L. Vaughan, "Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent," *Photochem Photobiol*, vol. 70, pp. 64–71, 1999.
- [84] K. S. McMahan, T. J. Wieman, P. H. Moore, and V. H. Fingar, "Effects of photodynamic therapy using mono l aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response," *Cancer Research*, vol. 54, pp. 5374–9, 1994.
- [85] G. Kick, G. Messer, A. Goetz, G. Plewig, and P. Kind, "Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of ap-1 but not nf-kappa b dna binding," *Cancer Res*, vol. 55, pp. 2373–9, 1995.
- [86] J. Matroule, C. Volanti, and J. Piette, "Nf-kappab in photodynamic therapy : Discrepancies of a master regulator," *Photochem Photobiol*, vol. 82, pp. 1241–6, 2006.
- [87] J. Piette, "Signalling pathway activation by photodynamic therapy : NF-kB at the crossroad between oncology and immunology," *Photochem Photobiol*, vol. 14, pp. 1510–7, 2015.
- [88] W. D. Vree, M. Essers, J. Koster, and W. Sluiter, "Role of interleukin 1 and granulocyte colonystimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors," *Cancer Res*, vol. 57, pp. 2555–8, 1997.
- [89] S. . Gollnick, X. Liu, B. Owczarczak, D. A. Musser, and B. W. Henderson, "Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo," *Cancer Research*, vol. 57, pp. 3904–3909, 1997.
- [90] F. Li, Y. Cheng, J. Lu, R. Hu, Q. Wan, and H. Feng, "Photodynamic therapy boosts anti-glioma immunity in mice : a dependence on the activities of t cells and complement c3." *J Cell Biochem.*, vol. 112, pp. 3035–43, 2011.
- [91] S. S. Lucky, K. C. Soo, and Y. Zhang, "Nanoparticles in photodynamic therapy," *Chemical Reviews*, vol. 115, pp. 1990–2042, 2015.
- [92] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M. Viriot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents," *Trends Biotechnol*, vol. 26, pp. 612–21, 2008.
- [93] T. Foster, R. Murant, R. Bryant, R. Knox, S. Gibson, and R. Hilf, "Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy," *Radiation Research*, vol. 126, pp. 296–303, 1991.
- [94] T. Middelburg, H. de Bruijn, A. van der Ploeg-van den Heuvel, H. Neumann, and D. Robinson, "The effect of light fractionation with a 2hdark interval on the efficacy of topical hexyl aminolevulinate photodynamic therapy in normal mouse skin," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 10, pp. 703–9, 2013.
- [95] Z. Xiao, S. Halls, D. Dickey, J. Tulip, and R. B. Moore, "Fractionated versus standard continuous light delivery in interstitial photodynamic therapy of dunning prostate carcinomas," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, pp. 7496–505, 2007.
- [96] M. Ascencio, J. P. Estevez, M. Delemer, M. O. Farine, P. Collinet, and S. Mordon, "Comparison of continuous and fractionated illumination during hexaminolaevulinate photodynamic therapy," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 5, pp. 210–6, 2008.
- [97] P. Babilas, V. Schacht, G. Liebsch, O. Wolfbeis, M. Landthaler, R. Szeimies, and C. Abels, "Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5 aminolaevulinic acid in vivo," *British Journal of Cancer*, vol. 88, pp. 1462–9, 2003.

- [98] M. S. Mathews, E. Angell-Petersen, R. Sanchez, C.-H. Sun, V. Vo, H. Hirschberg, and S. J. Madsen, "The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 41, pp. 578–84, 2009.
- [99] G. Zilidis, F. Aziz, S. Telara, and M. S. Eljamel, "Fluorescence image-guided surgery and repetitive photodynamic therapy in brain metastatic malignant melanoma," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 5, pp. 264–6, 2008.
- [100] M. S. Eljamel, C. Goodman, and H. Moseley, "Ala and photofrin fluorescence guided resection and repetitive pdt in glioblastoma multiforme : a single centre phase iii randomised controlled trial," *Lasers Med Sci*, vol. 23, pp. 361–7, 2008.
- [101] R. Chouikrat, "Nanoparticules multifonctionnelles excitables par les rayons x pour la thérapie photodynamique," Ph.D. dissertation, Université de Lorraine, 2015.
- [102] T. S. Mang, "Lasers and light sources for pdt : past, present and future," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 1, pp. 43–8, 2004.
- [103] S. Eljamel, "Photodynamic assisted surgical resection and treatment of malignant brain tumours : technique, technology and clinical application." *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 1, pp. 93–8, 2004.
- [104] T. Origitano and O. Reichman, "Photodynamic therapy for intracranial neoplasms : development of an image-based computer-assisted protocol for photodynamic therapy of intracranial neoplasms," *Neurosurgery*, vol. 32, pp. 587–96, 1993.
- [105] W. Stummer, H. Stepp, G. Moller, A. Ehrhard, M. Leonhard, and H. Reulen, "Technical principles for protoporphyrin ix fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue," *Acta Neurochir. (Wien)*, vol. 140, pp. 995–1000, 1998.
- [106] S. Eljamel, "Brain pdd and pdt unlocking the mystery of malignant gliomas," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 1, pp. 303–10, 2004.
- [107] H. A. de Sante, "Commission de la transparence : GLIOLAN 30 mg/ml," 19 mai 2010, [Online ; accessed 24-aout-2016].
- [108] M. Lyons, I. Phang, and S. Eljamel, "The effects of pdt in primary malignant brain tumours could be improved by intraoperative radiotherapy," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 9, pp. 40–45, 2012.
- [109] P. J. Muller and B. C. Wilson, "Photodynamic therapy of malignant brain tumours," *Canadian Journal of Neurological Sciences*, vol. 17, pp. 193–8, 1990.
- [110] W. Stummer, T. Beck, W. Beyer, J. Mehrkens, A. Obermeier, N. Etminan, H. Stepp, J. Tonn, R. Baumgartner, J. Herms, and F. Kreth, "Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ala : case report." *J Neurooncol.*, vol. 87, pp. 103–9, 2008.
- [111] A. Johansson, F. Faber, G. Kniebuhler, H. Stepp, R. Sroka, R. Egensperger, W. Beyer, and F.-W. Kreth, "Protoporphyrin ix fluorescence and photobleaching during interstitial photodynamic therapy of malignant gliomas for early treatment prognosis," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 45, pp. 225–32, 2013.
- [112] T. J. Beck, F. W. Kreth, W. Beyer, J. H. Mehrkens, A. Obermeier, H. Stepp, W. Stummer, and R. Baumgartner, "Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5 aminolevulinic acid induced protoporphyrin ix," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 39, pp. 386–93, 2007.

-
- [113] S. Powers, S. Cush, D. Walstad, and L. Kwock, "Stereotactic intratumoral photodynamic therapy for recurrent malignant brain tumors," *Neurosurgery*, vol. 29, pp. 688–96, 1991.
- [114] G. Hennig, H. Stepp, and A. Johansson, "Photobleaching-based method to individualize irradiation time during interstitial 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 8, pp. 275–281, 2011.
- [115] E. Angell-Petersen, S. Spetalen, S. J. Madsen, C.-H. Sun, Q. Peng, S. W. Carper, M. Sioud, and H. Hirschberg, "Influence of light fluence rate on the effects of photodynamic therapy in an orthotopic rat glioma model," *J Neurosurg*, vol. 104, pp. 109–117, 2006.
- [116] M.-C. Tetard, M. Vermandel, H.-A. Leroy, B. Leroux, C.-A. Maurage, J.-P. Lejeune, S. Mordon, and N. Reyns, "Interstitial 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy and glioblastoma : Preclinical model development and preliminary results," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 13, pp. 218–24, 2016.
- [117] D. Bechet, F. Auger, P. Couleaud, E. Marty, L. Ravasi, N. Durieux, C. Bonnet, F. Plenat, C. Frochot, S. Mordon, O. Tillement, R. Vanderesse, F. Lux, P. Perriat, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Multifunctional ultrasmall nanoplateforms for vascular targeted interstitial photodynamic therapy of brain tumors by real time mri," *Nanomedicine*, vol. 11, pp. 657–70, 2015.
- [118] B. W. Pogue, J. T. Elliott, S. C. Kanick, S. C. Davis, K. S. Samkoe, E. V. Maytin, S. P. Pereira, and T. Hasan, "Revisiting photodynamic therapy dosimetry : reductionist and surrogate approaches to facilitate clinical success," *Phys. Med. Biol.*, vol. 61, pp. 57–89, 2016.
- [119] A. Amelink, A. van der Ploeg van den Heuvel, W. de Wolf, D. Robinson, and H. Sterenberg, "Monitoring pdt by means of superficial reflectance spectroscopy," *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, vol. 79, pp. 243–251, 2005.
- [120] V. X. Yang, P. J. Muller, P. Herman, and B. C. Wilson, "A multispectral fluorescence imaging system : Design and initial clinical tests in intra operative photofrin photodynamic therapy of brain tumors," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 32, pp. 224–32, 2003.
- [121] N. Lopez, R. Mulet, and R. Rodriguez, "Tumor reactive singlet oxygen approach for monte carlo modeling of photodynamic therapy dosimetry," *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology*, vol. 160, pp. 383–91, 2016.
- [122] A. Rendon, J. C. Beck, and L. Lilge, "Treatment planning using tailored and standard cylindrical light diffusers for photodynamic therapy of the prostate," *Phys Med Biol.*, vol. 53, pp. 1131–49, 2008.
- [123] J. Swartling, O. V. H. abd Kerstin Hansson, F. Sodersten, J. Axelsson, and A.-S. Lagerstedt, "Online dosimetry for temoporfin mediated interstitial photodynamic therapy using the canine prostate as model," *J Biomed Opt.*, vol. 21, p. 28002, 2016.
- [124] B. J. Quirk, G. Brandal, S. Donlon, J. C. Vera, T. S. Mang, A. B. Foy, S. M. Lew, A. W. Girotti, S. Jogal, P. S. LaViolette, J. M. Connelly, and H. T. Whelan, "Photodynamic therapy (pdt) for malignant brain tumors. where do we stand ?" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 12, pp. 530–44, 2015.
- [125] J. Akimoto, J. Haraoka, and K. Aizawa, "Preliminary clinical report on safety and efficacy of photodynamic therapy using talaporfin sodium for malignant gliomas," *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 9, pp. 91–9, 2012.
- [126] Y. Muragaki, J. Akimoto, T. Maruyama, H. Iseki, S. Ikuta, M. Nitta, K. Maebayashi, T. Saito, Y. Okada, S. Kaneko, A. Matsumura, T. Kuroiwa, K. Karasawa, Y. Nakazato, and T. Kayama,

- “Phase ii clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors,” *J. Neurosurg.*, vol. 119, pp. 845–52, 2013.
- [127] S. S. Stylli, A. H. Kaye, L. MacGregor, M. Howes, and P. Rajendra, “Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival,” *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 12, pp. 389–398, 2005.
- [128] M. Rosenthal, B. Kavar, J. Hill, D. Morgan, R. Nation, S. Stylli, R. Basser, S. Uren, H. Geldard, M. Green, S. Kahl, and A. Kaye, “Phase i and pharmacokinetic study of photodynamic therapy for high-grade gliomas using a novel boronated porphyrin,” *J Clin Oncol*, vol. 19, pp. 519–24, 2001.
- [129] M. Schmidt, G. Meyer, K. Reichert, J. Cheng, H. Krouwer, K. Ozker, and H. Whelan, “Evaluation of photodynamic therapy near functional brain tissue in patients with recurrent brain tumors,” *J Neurooncol*, vol. 67, pp. 201–7, 2004.
- [130] P. Muller and B. Wilson, “A randomized two arm clinical trial of photofrin pdt and standard therapy in high grade gliomas. phase iii trial,” *Proceedings of the 6th International PDT Symposium 2006*, 2006.
- [131] S. Eljamel, “Photodynamic applications in brain tumors : A comprehensive review of the literature,” *Photodiagnosis Photodyn Ther*, vol. 7, pp. 76–85, 2010.
- [132] J. Akimoto, “Photodynamic therapy for malignant brain tumors,” *Neurol Med Chir (Tokyo)*, vol. 56, pp. 151–7, 2016.
- [133] M. C. Mabray, R. F. Barajas, and S. Cha, “Modern brain tumor imaging,” *Brain Tumor Res Treat*, vol. 3, pp. 8–23, 2015.
- [134] J. Bittoun, *Formation de l'image en imagerie par Resonance magnetique*. EMC, 2008, ch. Radiodiagnostic, pp. 1–18.
- [135] G. H. Jajamovich, C. R. Valiathan, R. Cristescu, and S. Somayajula, “Integrative analysis of diffusion weighted mri and genomic data to inform treatment of glioblastoma,” *J Neurooncol*, vol. 0, pp. 1–12, 2016.
- [136] P. Zinn, S. Singh, A. Kotrotsou, F. Zandi, G. Thomas, M. H. andMM Luedi, A. Elakkad, I. Hassan, J. Gumin, E. Sulman, F. Lang, and R. Colen, “Clinically applicable and biologically validated mri radiomic test method predicts glioblastoma genomic landscape and survival,” *Neurosurgery*, vol. 63, pp. 156–7, 2016.
- [137] M. Castillo, J. K. Smith, and L. Kwock, “Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas,” *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 21, pp. 1645–1649, 2000.
- [138] Y. Kang, S. H. Choi, Y.-J. Kim, K. G. Kim, C.-H. Sohn, J.-H. Kim, T. J. Yun, and K.-H. Chang, “Gliomas : Histogram analysis of apparent diffusion coefficient maps with standard or high b value diffusion-weighted mr imaging correlation with tumor grade,” *Radiology*, vol. 261, pp. 882–90, 2011.
- [139] L. Kwock, J. K. Smith, M. Castillo, M. G. Ewend, F. Collichio, D. E. Morris, T. W. Bouldin, and S. Cush, “Clinical role of proton magnetic resonance spectroscopy in oncology : brain, breast, and prostate cancer,” *Lancet Oncol*, vol. 7, pp. 859–68, 2006.
- [140] J. H. Chang, C.-Y. Kim, B. S. Choi, Y. J. Kim, J. S. Kim, and I. A. Kim, “Pseudoprogression and pseudoresponse in the management of high-grade glioma : Optimal decision timing according to the response assessment of the neuro-oncology working group,” *J Korean Neurosurg Soc*, vol. 55, pp. 5–11, 2014.

-
- [141] L. HyginodaCruz, I. Rodriguez, R. Domingues, E. Gasparetto, and A. Sorensen, "Pseudo-progression and pseudoresponse : Imaging challenges in the assessment of posttreatment glioma," *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 32, pp. 1978–85, 2011.
- [142] K. Warren, J. Frank, J. Black, R. Hill, J. Duyn, A. Aikin, B. Lewis, P. Adamson, and F. Balis, "Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in children with recurrent primary brain tumors," *J Clin Oncol*, vol. 18, pp. 1020–6, 2008.
- [143] R. Hernandez-Alcoceba, L. Saniger, J. Campos, M. C. Nunez, F. Khaless, M. A. Gallo, A. Espinosa, and J. C. Lacal, "Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design," *Oncogene*, vol. 15, pp. 2289–2301, 1997.
- [144] H. Shimizu, T. Kumabe, R. Shirane, and T. Yoshimoto, "Correlation between choline level measured by proton mr spectroscopy and ki-67 labeling index in gliomas," *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 21, pp. 659–665, 2000.
- [145] B. S. Y. Li, H. Wang, and O. Gonen, "Metabolite ratios to assumed stable creatine level may confound the quantification of proton brain mr spectroscopy," *Magn Reson Imaging*, vol. 21, pp. 923–928, 2003.
- [146] M. Meyerand, J. Pipas, A. Mamourian, T. Tosteson, and J. Dunn, "Classification of biopsy-confirmed brain tumors using single-voxel mr spectroscopy," *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 20, pp. 117–23, 1999.
- [147] M. F. Chernov, Y. Muragaki, T. Ochiai, T. Taira, Y. Ono, M. Usukura, T. Maruyama, K. Nakaya, R. Nakamura, H. Iseki, O. Kubo, T. Hori, and K. Takakura, "Spectroscopy supported frame based image guided stereotactic biopsy of parenchymal brain lesions : Comparative evaluation of diagnostic yield and diagnostic accuracy," *Clin Neurol Neurosurg*, vol. 111, pp. 527–35, 2009.
- [148] I. Caroline and M. Rosenthal, "Imaging modalities in high-grade gliomas : Pseudoprogression, recurrence, or necrosis ?" *J Clin Neurosci*, vol. 19, pp. 633–7, 2012.
- [149] T. Nakajima, T. Kumabe, M. Kanamori, R. Saito, M. Tashiro, M. Watanabe, and T. Tominaga, "Differential diagnosis between radiation necrosis and glioma progression using sequential proton magnetic resonance spectroscopy and methionine positron emission tomography," *Neurol Med Chir (Tokyo)*, vol. 49, pp. 394–401, 2009.
- [150] W. Hollingworth, L. Medina, R. Lenkinski, D. Shibata, B. Bernal, D. Zurakowski, B. Comstock, and J. Jarvik, "A systematic literature review of magnetic resonance spectroscopy for the characterization of brain tumors," *AJNR Am J Neuroradiol*, vol. 27, pp. 1404–11, 2006.
- [151] M. Plotkin, J. Eisenacher, H. Bruhn, R. Wurm, R. Michel, F. Stockhammer, A. Feussner, O. Dudeck, P. Wust, R. Felix, and H. Amthauer, "Spect and 1h mr-spectroscopy at 3.0 t in the differential diagnosis of recurrent or residual gliomas : a comparative study." *J Neurooncol.*, vol. 70, pp. 49–58, 2004.
- [152] D. Le-Bihan, "Diffusion mri : what water tells us about the brain," *EMBO Molecular Medicine*, vol. 6, pp. 569–73, 2014.
- [153] P. W. Schaefer, P. E. Grant, and R. G. Gonzalez, "Diffusion weighted mr imaging of the brain," *Radiology*, vol. 217, pp. 331–45, 2000.
- [154] D. M. Patterson, A. R. Padhani, and D. J. Collins, "Technology insight : water diffusion mri a potential new biomarker of response to cancer therapy," *Nat Clin Pract Oncol.*, vol. 5, pp. 220–33, 2008.
- [155] H. Wang and B. Fei, "Diffusion weighted mri for monitoring tumor response to photodynamic therapy," *J Magn Reson Imaging*, vol. 32, pp. 409–17, 2010.

- [156] Y. Roth, T. Tichler, G. Kostenich, J. Ruiz-Cabello, S. E. Maier, J. S. Cohen, A. Orenstein, and Y. Mardor, "High-b-value diffusion-weighted mr imaging for pretreatment prediction and early monitoring of tumor response to therapy in mice," *Radiology*, vol. 232, pp. 685–692, 2004.
- [157] A. R. Padhani, G. Liu, D. Mu-Koh, T. L. Chenevert, H. C. Thoeny, T. Takahara, A. Dzik-Jurasz, B. D. Ross, M. V. Cauteren, D. Collins, D. A. Hammoud, G. J. Rustin, B. Taouli, and P. L. Choyke, "Diffusion weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker : Consensus and recommendations," *Neoplasia*, vol. 11, pp. 102–25, 2009.
- [158] M. Cercignani and M. A. Horsfield, "The physical basis of diffusion weighted mri," *J Neurol Sci*, vol. 186, pp. 11–4, 2001.
- [159] B. A. Moffat, T. L. Chenevert, T. S. Lawrence, C. R. Meyer, T. D. Johnson, Q. Dong, C. Tsien, S. Mukherji, D. J. Quint, S. S. Gebarski, P. L. Robertson, L. R. Junck, A. Rehemtulla, and B. D. Ross, "Functional diffusion map : A noninvasive mri biomarker for early stratification of clinical brain tumor response," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, pp. 5524–29, 2005.
- [160] T. L. Chenevert, L. D. Stegman, J. M. G. Taylor, P. L. Robertson, H. S. Greenberg, A. Rehemtulla, and B. D. Ross, "Diffusion magnetic resonance imaging : an early surrogate marker of therapeutic efficacy in brain tumors," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 92, pp. 2029–36, 2000.
- [161] E. Matsusue, J. R. Fink, J. K. Rockhill, T. Ogawa, and K. R. Maravilla, "Distinction between glioma progression and post-radiation change by combined physiologic mr imaging," *Neuroradiology*, vol. 52, pp. 297–306, 2010.
- [162] V. N. Harry, S. I. Semple, D. E. Parkin, and F. J. Gilbert, "Use of new imaging techniques to predict tumour response to therapy," *Lancet Oncol*, vol. 11, pp. 92–102, 2010.
- [163] L. Tirand, T. Bastogne, D. Bechet, M. Linder, N. Thomas, C. Frochot, F. Guillemin, and M. Barberi-Heyob, "Response surface methodology : an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions," *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, vol. 75, pp. 244–52, 2009.
- [164] D. Bechet, "Traitement photodynamique interstitiel vasculaire stereotaxique des tumeurs cerebrales guide par imagerie : Interet des nanoparticules multifonctionnelles ciblant neuropiline-1," Ph.D. dissertation, Universite Henri Poincare Nancy I, 2011.
- [165] M. Consortium, "jMRUI Software," <http://www.jmrui.eu/>, 2016, [Online ; accessed 24-aout-2016].
- [166] A. Naressi, C. Couturier, I. Castang, R. de Beer, and D. Graveron-Demilly, "Java-based graphical user interface for mrui, a software package for quantitation of in vivo/medical magnetic resonance spectroscopy signals," *Comput Biol Med*, vol. 31, pp. 269–86, 2001.
- [167] D. Stefan, F. D. Cesare, A. Andrasescu, E. Popa, A. Lazariev, E. Vescovo, O. Strbak, S. Williams, Z. Starcuk, M. Cabanas, D. van Ormondt, and D. Graveron-Demilly, "Quantitation of magnetic resonance spectroscopy signals : the jmrui software package," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 20, p. 104035, 2009.
- [168] J. Kalpathy-Cramer, E. R. Gerstner, K. E. Emblem, O. Andronesi, and B. Rosen, "Advanced magnetic resonance imaging of the physical processes in human glioblastoma," *Cancer Res*, vol. 74, pp. 4622–37, 2014.
- [169] J. S. Smith, S. Cha, M. C. Mayo, M. W. Mcdermott, A. T. Parsa, S. M. Chang, W. P. Dillon, and M. S. Berger, "Serial diffusion-weighted magnetic resonance imaging in cases of glioma : distinguishing tumor recurrence from postresection injury," *J. Neurosurg.*, vol. 103, pp. 428–38, 2005.

-
- [170] D.-M. Koh, E. Scurr, D. Collins, B. Kanber, A. Norman, M. O. Leach, and J. E. Husband, "Predicting response of colorectal hepatic metastasis : Value of pretreatment apparent diffusion coefficients," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 188, pp. 1001–8, 2007.
- [171] B. Bobek-Billewicz, G. Stasik-Pres, H. Majchrzak, and ukasz Zarudzki, "Differentiation between brain tumor recurrence and radiation injury using perfusion, diffusion-weighted imaging and mr spectroscopy," *Folia Neuropathol*, vol. 48, pp. 81–92, 2010.
- [172] V. Plaks, N. Koudinova, U. Nevo, J. H. Pinthus, H. Kanety, Z. Eshhar, J. Ramon, A. Scherz, M. Neeman, and Y. Salomon, "Photodynamic therapy of established prostatic adenocarcinoma with tookad : A biphasic apparent diffusion coefficient change as potential early mri response marker1," *Neoplasia*, vol. 6, pp. 224–233, 2004.
- [173] G. Barbarella, R. Ricci, G. Pirini, V. Tugnoli, M. Tosi, A. Bertoluzza, F. Calbucci, M. Leonardi, C. Trevisan, and V. Eusebi, "In vivo single voxel 1h mrs of glial brain tumors : Correlation with tissue histology and in vitro mrs," *Int. J. Oncol.*, vol. 12, pp. 461–8, 1998.
- [174] V. H. Fingar, P. K. Kik, S. Haydon, P. B. Cerrito, M. Tseng, E. Abang, and T. J. Wieman, "Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (bpd)," *Br. J. Cancer*, vol. 79, pp. 1702–8, 1999.
- [175] F. Jiang, X. Zhang, S. N. Kalkanis, Z. Zhang, H. Yang, M. Katakowski, X. Hong, X. Zheng, Z. Zhu, and M. Chopp, "Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing u87 glioblastoma," *Photochem Photobiol.*, vol. 84, pp. 128–137, 2008.
- [176] F. Jiang, Z. G. Zhang, M. Katakowski, A. M. Robin, M. Faber, F. Zhang, and M. Chopp, "Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brain," *Photochem. Photobiol.*, vol. 79, pp. 494–98, 2004.
- [177] R. Bhuvanewari, G. Yuen, S. Chee, and M. Olivo, "Hypericin-mediated photodynamic therapy in combination with avastin (bevacizumab) improves tumor response by downregulating angiogenic proteins," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 6, pp. 1275–83, 2007.
- [178] R. Bhuvanewari, Y. Y. Gan, K. C. Soo, and M. Olivo, "The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis," *Cell Mol Life Sci*, vol. 66, pp. 2275–83, 2009.
- [179] D. Quail and J. Joyce, "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis," *Nat. Med.*, vol. 19, pp. 1423–37, 2013.
- [180] M. De-Palma and C. E. Lewis, "Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies," *Cancer Cell*, vol. 18, pp. 273–86, 2013.
- [181] J. Petaja, "Inflammation and coagulation. an overview," *Thromb. Res.*, vol. 127, pp. 34–7, 2011.
- [182] G. S. He, L.-S. Tan, Q. Zheng, and P. N. Prasad, "Multiphoton absorbing materials : Molecular designs, characterizations, and applications," *Chem. Rev. 2008, 108, 1245-1330*, vol. 108, pp. 1245–1330, 2008.
- [183] G. Chen, H. Qiu, P. N. Prasad, and X. Chen, "Upconversion nanoparticles : Design, nanotechnology, and applications in theranostics," *Chem Rev*, vol. 114, pp. 5161–5214, 2014.
- [184] S. Kokotov, A. Lewis, R. Neumann, and S. Armusi, "X ray induced visible luminescence of porphyrin," *Photochemistry and Photobiology*, vol. 59, pp. 85–87, 1994.
- [185] F. Figge and R. Wichterman, "Effect of hemotoporphyrin on x radiation sensitivity in paramecium," *Science*, vol. 122, pp. 468–9, 1955.

- [186] M. Loken, "Porphyrins as modifiers of the effects of roentgen rays," *Radiology*, vol. 69, pp. 201–3, 1957.
- [187] U. Kulka, M. Schaffer, A. Siefert, P. M. Schaffer, A. Olsner, K. Kasse, A. Hofstetter, E. Duhmke, and G. Jori, "Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 311, pp. 98–103, 2003.
- [188] M. Schaffer, P. Schaffer, Corti, M. Gardiman, G. Sotti, A. Hofstetter, G. Jori, and E. Duhmke, "Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors : studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model," *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, vol. 66, pp. 157–64, 2002.
- [189] Y. Liu, W. Chen, S. Wang, and A. G. Joly, "Investigation of water-soluble x ray luminescence nanoparticles for photodynamic activation," *Applied Physics Letters*, vol. 92, p. 043901, 2008.
- [190] P. A. Rodnyi, *Physical Processes in Inorganic Scintillators*, P. A. Rodnyi, Ed. CRC Press LLC, 1997.
- [191] S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, G. Schettino, G. R. Dickson, A. R. Hounsell, J. M. O'Sullivan, K. M. Prise, D. G. Hirst, and F. J. Currell, "Biological consequences of nanoscale energy deposition near irradiated heavy atom nanoparticles," *Scientific Reports*, vol. 1, pp. 1–9, 2011.
- [192] M. Misawa and J. Takahashi, "Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and uv irradiations," *Nanomedicine*, vol. 7, pp. 604–14, 2011.
- [193] S. Klein, M. L. Arciprete, M. Wegmann, L. V.R. Distel, W. Neuhuber, M. C. Gonzalez, and C. Krysch, "Oxidized silicon nanoparticles for radiosensitization of cancer and tissue cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 434, pp. 217–22, 2013.
- [194] N. Chattopadhyay, Z. Cai, Y. L. Kwon, E. Lechtman, J.-P. Pignol, and R. M. Reilly, "Molecularly targeted gold nanoparticles enhance the radiation response of breast cancer cells and tumor xenografts to x-radiation," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 137, pp. 81–91, 2013.
- [195] E. Lechtman, N. Chattopadhyay, Z. Cai, S. Mashouf, R. Reilly, and J. P. Pignol, "Implications on clinical scenario of gold nanoparticle radiosensitization in regards to photon energy, nanoparticle size, concentration and location," *Phys Med Biol*, vol. 56, pp. 4631–47, 2011.
- [196] W. Rima, L. Sancey, M.-T. Aloy, E. Armandy, G. B. Alcantara, T. Epicier, A. Malchere, L. Joly-Pottuz, P. Mowat, F. Lux, and C. B. d. I. A.-B. e. J. P. f. M. C. g. S. R. h. C. R.-L. c. P. P. a. . Olivier Tillement Béatrice Burdin d, Annie Rivoire d, "Internalization pathways into cancer cells of gadolinium-based radiosensitizing nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 34, pp. 181–95, 2013.
- [197] M. Nikl, "Scintillation detectors for x rays," *Measurement Science and Technology*, vol. 17, pp. 37–54, 2006.
- [198] B. Viana, "Cristaux et ceramiques transparentes comme materiaux scintillateurs pour l'imagerie medicale," *UVX 2010*, vol. 2011, pp. 153–9, 2011.
- [199] W. Chen and J. Zhang, "Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 6, pp. 1159–66, 2006.
- [200] A. H. Elmenoufy, Y. an Tang, J. Hu, H. Xua, and X. Yang, "A novel deep photodynamic therapy modality combined with ct imaging established via x ray stimulated silica-modified lanthanide scintillating nanoparticles," *Chemical Communications*, vol. 51, pp. 12 247–50, 2015.
- [201] J. Hu, Y. Tang, A. H. Elmenoufy, H. Xu, Z. Cheng, and X. Yang, "Nanocomposite based photodynamic therapy strategies for deep tumor treatment," *Small*, vol. 11, pp. 5860–87, 2015.

-
- [202] E. Abliz, J. E. Collins, H. Bell, and D. B. Tata, "Novel applications of diagnostic x rays in activating a clinical photodynamic drug photofrin ii through x-ray induced visible luminescence from rare earth formulated particles," *Journal of X-Ray Science and Technology*, vol. 19, pp. 521–530, 2011.
- [203] A.-L. Bulin, C. Truillet, R. Chouikrat, F. Lux, C. Frochot, D. Amans, G. Ledoux, O. Tillement, P. Perriat, M. Baberi-Heyob, and C. Dujardin, "X ray induced singlet oxygen activation with nanoscintillator coupled porphyrins," *J. Phys. Chem.*, vol. 117, pp. 21 583–89, 2013.
- [204] X. Zou, M. Yao, L. Ma, M. Hossu, X. Han, P. Juzenas, and W. Chen, "X-ray-induced nanoparticle-based photodynamic therapy of cancer," *Nanomedicine*, vol. 9, pp. 2339–51, 2014.
- [205] L. Ma, X. Zou, and W. Chen, "A new x-ray activated nanoparticle photosensitizer for cancer treatment," *J Biomed Nanotechnol*, vol. 10, pp. 1501–8, 2014.
- [206] H. Chen, G. D. Wang, Y.-J. Chuang, Z. Zhen, X. Chen, P. Biddinger, Z. Hao, F. Liu, B. Shen, Z. Pan, and J. Xie, "Nanoscintillator mediated x ray inducible photodynamic therapy for in vivo cancer treatment," *Nano Letters*, vol. 15, pp. 2249–56, 2015.
- [207] F. Rossi, E. Bedogni, F. Bigi, T. Rimoldi, L. Cristofolini, S. Pinelli, R. Alinovi, M. Negri, S. C. Dhanabalan, G. Attolini, F. Fabbri, M. Goldoni, A. Mutti, G. Benecchi, C. Ghetti, S. Iannotta, and G. Salviati, "Porphyrin conjugated sic/siox nanowires for x ray excited photodynamic therapy," *Scientific Reports*, vol. 5, p. 7606, 2015.
- [208] C. Zhang, K. Zhao, W. Bu, D. Ni, Y. Liu, J. Feng, and J. Shi, "Marriage of scintillator and semiconductor for synchronous radiotherapy and deep photodynamic therapy with diminished oxygen dependence," *Angew Chem Int Ed*, vol. 54, pp. 1770–4, 2015.
- [209] Y. Liu, Y. Zhang, S. Wang, C. Pope, and W. Chen, "Optical behaviors of zno porphyrin conjugates and their potential applications for cancer treatment," *Applied Physics Letters*, vol. 92, p. 143901, 2008.
- [210] L. Ma, X. Zou, B. Bui, W. Chen, K. H. Song, and T. Solberg, "X-ray excited zns :cu,co afterglow nanoparticles for photodynamic activation," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 105, p. 013702, 2014.
- [211] N. Y. Morgan, G. Kramer-Marek, P. D. Smith, K. Camphausen, and J. Capala, "Nanoscintillator conjugates as photodynamic therapy based radiosensitizers : Calculation of required physical parameters," *Radiation Research*, vol. 171, pp. 236–44, 2009.
- [212] F. Lux, A. Detappe, S. Dufort, L. Sancey, C. Louis, S. Carme, and O. Tillement, "Nanoparticules ultrafines en radiotherapie : le cas des aiguix," *Cancer/Radiotherapie*, vol. 19, pp. 508–14, 2015.
- [213] I. A. E. Agency, *Radiation Oncology Physics. A handbook for teachers and students*, E. Podgorsak, Ed. Agency IAE, 2005.
- [214] K. Butterworth, S. McMahon, F. Currell, and K. Prise, "Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization," *Nanoscale*, vol. 4, pp. 4830–8, 2012.
- [215] D. B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, M. van Prooijen, C. Allen, R. P. H. Robert G. Bristow, and D. A. Jaffray, "Gold nanoparticles as radiation sensitizers in cancer therapy," *Radiation Research*, vol. 173, pp. 719–28, 2010.
- [216] J. F. Hainfeld, F. A. Dilmanian, D. N. Slatkin, and H. M. Smilowitz, "Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 60, pp. 977–85, 2008.
- [217] A. Detappe, S. Kunjachan, J. Rottmann, J. Robar, P. Tsiamas, H. Korideck, O. Tillement, and R. Berbeco, "Aguix nanoparticles as a promising platform for image guided radiation therapy," *Cancer Nanotechnol.*, vol. 6, pp. 1–9, 2015.

- [218] G. Le-Duc, S. Roux, A. Paruta-Tuarez, S. Dufort, E. Brauer, A. Marais, C. Truillet, L. Sancey, P. Perriat, F. Lux, and . Tillement, “Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by mri for glioma treatment.” *Cancer Nanotechnol.*, vol. 5, p. Epub, 2014.
- [219] L. Stefancikova, E. Porcel, P. Eustache, S. Li, D. Salado, S. Marco, J.-L. Guerquin-Kern, M. Refregiers, O. Tillement, F. Lux, and S. Lacombe, “Cell localisation of gadolinium-based nanoparticles and related radiosensitising efficacy in glioblastoma cells,” *Cancer Nanotechnol.*, vol. 5, pp. 1–15, 2014.
- [220] J. Z. Zhang, “Ultra fast studies of electron dynamics in semiconductor and metal colloidal nanoparticle effects of size and surface,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 30, pp. 423–9, 1997.
- [221] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, and W. C. W. Chan, “Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells,” *Nano Letters*, vol. 6, pp. 662–8, 2006.
- [222] P. Retif, A. Reinhard, H. Paquot, V. Jouan-Hureau, A. Chateau, L. Sancey, M. Barberi-Heyob, S. Pinel, and T. Bastogne, “Monte carlo simulations guided by imaging to predict the in vitro ranking of radiosensitizing nanoparticles,” *Nano Research*, 2016.
- [223] B. D. Chithrani, J. Stewart, C. Allen, and D. A. Jaffray, “Intracellular uptake, transport, and processing of nanostructures in cancer cells,” *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 5, pp. 118–27, 2009.
- [224] P. Retif, S. Pinel, M. Toussaint, C. Frochot, R. Chouikrat, T. Bastogne, and M. Barberi-Heyob, “Nanoparticles for radiation therapy enhancement : the key parameters,” *Theranostics*, vol. 5, pp. 1030–45, 2015.
- [225] F. Bistolfi, “Red radioluminescence and red radiochemiluminescence : premises for a phototherapy tumor therapy with x rays and haematoporphyrin derivatives,” *Panminerva Medica*, vol. 42, pp. 69–75, 2000.
- [226] A. Kamkaew, F. Chen, Y. Zhan, R. L. Majewski, and W. Cai, “Scintillating nanoparticles as energy mediators for enhanced photodynamic therapy,” *ACS Nano*, vol. 10, pp. 3918–35, 2016.
- [227] R. K. Jain and T. Stylianopoulos, “Delivering nanomedicine to solid tumors,” *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, pp. 653–64, 2010.

Résumé

Les limitations rencontrées aujourd'hui dans le traitement du glioblastome (GBM) concernent notamment la qualité de l'exérèse dont dépend le pronostic et le manque de contrôle local de la croissance tumorale, sachant que les récives apparaissent dans plus de 80% des cas dans le volume cible de radiothérapie. Dans ce contexte, la thérapie photodynamique interstitielle (iPDT) se présente comme un outil complémentaire prometteur qui permettrait d'améliorer le contrôle local de la tumeur. La première partie de ce travail de thèse a porté sur le suivi longitudinal par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) de la réponse tumorale post-iPDT sur un modèle de rat nude xenogreffé en orthotopique par un modèle de GBM humain. Le suivi par IRM et Spectroscopie par Résonance Magnétique (SRM) a fourni des indicateurs précoces de l'efficacité du traitement, permettant de discriminer dès un jour post-iPDT les animaux répondeurs des non-répondeurs. Cependant, une des limitations de la PDT, demeure la faible profondeur de pénétration de la lumière visible utilisée pour activer le photosensibilisateur et induire les réactions de photo-oxydations. La seconde partie de ce travail a porté sur l'évaluation d'un nouveau concept appelé "PDTX" permettant de coupler l'effet photodynamique à celui de la radiothérapie pour une radiothérapie photodynamique, en jouant notamment sur la complémentarité des espèces réactives de l'oxygène générées et des effets RX-induits. Pour cela, nous avons validé l'intérêt d'une nanoparticule hybride de type AGuIX® composée de terbium et de porphyrine, le terbium étant le scintillateur capable d'être excité par les rayons X et d'émettre des photons à une longueur d'onde appropriée pour activer le photosensibilisateur. Le transfert d'énergie par FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) entre le terbium et la porphyrine a été mis en exergue. Les résultats *in vitro* démontrent le potentiel thérapeutique de ce nouveau nano-objet à basse énergie.

Mots-clés: Thérapie Photodynamique interstitielle, Glioblastome, Nanoparticules multifonctionnelles, Imagerie par Résonance Magnétique, Radiothérapie.

Abstract

The limitations encountered today in the treatment of glioblastoma (GBM) involve the quality of the resection on which depends prognosis and the lack of local control of the tumor, knowing that relapses occur in 80% of cases in the radiotherapy target tumor volume. In this context, interstitial photodynamic therapy (iPDT) is a promising additional tool that would allow to improve local control of the tumor. The first part of this thesis focused on the longitudinal follow-up by Magnetic Resonance Imaging (MRI) of the post-iPDT tumor response in a nude rat model of orthotopic xenograft of human GBM cell line. MRI and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) monitoring provided early indicators of the effectiveness of treatment, for discriminate from one day post-IPDT non-responders from responders animals. However, one of the limitations of PDT remains the low penetration of visible light used to activate the photosensitizer and induce reactions of photo-oxidation. This is why the second part of this research focused on the evaluation of a new concept called "PDTX" for coupling the photodynamic effect with radiotherapy effect for a photodynamic radiotherapy, playing especially on the complementarity of reactive species of oxygen generated and RX-induced effects. For this, we validated the interest of an AGuIX®-type hybrid nanoparticle composed of terbium and porphyrin, terbium being the scintillator capable of being excited by X-rays and emits photons at an appropriate wavelength in order to activate the photosensitizer. The energy transfer FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*) between terbium and porphyrin was highlighted. *In vitro* results demonstrate the therapeutic potential of this new nano-object at low-energy.

Keywords: interstitial Photodynamic therapy, Glioblastoma, Multifunctional nanoparticles, Magnetic Resonance Imaging, Radiation therapy.

