

# Thèse de Doctorat

**Delphine SEHEDIC**

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

École doctorale : Biologie - Santé

Discipline : Sciences pharmaceutiques  
Spécialité : Pharmacologie clinique et expérimentale  
Unité de recherche : INSERM U1066 et INSERM U892

Soutenue le 3 décembre 2014  
Thèse N° : 1442

## Développement de nouvelles stratégies en nanomédecine pour le ciblage et la radiosensibilisation des cellules cancéreuses de type souche dans le glioblastome

### JURY

Rapporteurs : **Jérôme LEBEAU**, Docteur au CEA/DSV/iRCM/SREIT/LCE, Université de Paris XI  
**Pierre VERRELLE**, Professeur, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Examineurs : **François-Régis BATAILLE**, Professeur, Université d'Angers  
**Claire BILLOTEY**, Professeur, Université Jean Monnet, Lyon

Directeur de Thèse : **Emmanuel GARCION**, Chargé de Recherche Inserm, Université d'Angers

Co-directeur de Thèse : **François DAVODEAU**, Chargé de Recherche Inserm, Université de Nantes



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Jérôme Lebeau et le Professeur Pierre Verrelle pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie aussi le Professeur François-Régis Bataille pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et le Professeur Claire Billotey pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant qu'examinateur.

Je remercie le Professeur Jean-Pierre Benoît de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire depuis maintenant trois ans.

Je remercie le Docteur François Davodeau pour avoir encadré mon travail de thèse. Je te remercie ton soutien et tes précieux conseils.

Je remercie le Docteur Didier Wion pour m'avoir suivi tout au long de ma thèse et lors de mes comités de suivi de thèse. L'idée de la transfection par un lentivirus était de vous, merci beaucoup !

Je tiens à remercier plus particulièrement le Docteur Emmanuel Garcion, mon directeur de thèse, de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce travail de thèse. Je te remercie très sincèrement pour tous les conseils que tu as su m'apporter au cours de ces trois années de thèse. Je te remercie d'avoir apporté ton regard scientifique à mon travail tout en me laissant suffisamment de liberté dans mes décisions. Enfin, je te remercie pour ton soutien dans les moments plus difficiles. Je garderai un très bon souvenir de notre collaboration.

Je remercie la région Pays-de-la-Loire et les membres du projet NuCSAN (Nucléaire pour la Santé) sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. Je remercie aussi l'association La Ligue contre le Cancer sans le soutien de laquelle la réalisation de tous ces travaux n'aurait pas été possible. Je remercie aussi les plateformes de cytométrie (Pacem), de radioactivité (Primex), de microscopie (Sciam) et l'animalerie (Scahu) pour leur soutien technique. J'en profite pour remercier plus particulièrement Pierre Legras, Jérôme Roux, Catherine Guillet et Rodolphe Perrot pour leur conseil et leur contribution à certains résultats. Je remercie Magali Edouard et Damien Autret de l'ICO pour avoir pris de leur temps pour les irradiations externes. Je remercie aussi Igor Chourpa pour son travail et son analyse des résultats d'imagerie spectrale.

Je poursuis ces remerciements en remerciant l'ensemble des personnes qui m'ont apporté un soutien scientifique au cours de ces trois années. Tout d'abord Marie, merci pour tes conseils pour l'encapsulation de l'iode et pour le temps que tu as su m'accorder lorsque je suis venue à Nantes. Ça n'a pas toujours été simple de nous synchroniser mais tu as toujours trouvé du temps pour que nous puissions échanger ensemble sur mes résultats. Je t'en remercie.

Merci aussi François pour tes conseils en radioactivité mais aussi et surtout pour l'approvisionnement en « matériel » sans quoi la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible.

Merci Laurent pour tout le temps que tu as passé avec moi à l'IRM et pour ton œil d'expert. Merci beaucoup !

Je poursuis maintenant ces remerciements sur un ton plus léger. Je vais commencer, non sans une certaine émotion, par remercier toutes les personnes qui ont partagé mon « open space », le 4236 !!! Je commence par toi Gaël (ou Jean-No ou Gaillelle). Merci pour tes conseils pour les mimis, pour les courses chez carrefour, pour le voyage à Ikea, pour tes talents de dessinateurs qui nous ont surpris plus d'une fois (Figure 1), pour ton côté « DJ » à tes heures perdus. Merci de savoir apporter un peu de distraction dans ce bureau qui, il faut bien le dire, en a tant besoin ;). Plus sérieusement, merci pour tout et je te souhaite d'obtenir ton poste car tu le mérites sincèrement. Notre passion pour les rongeurs à longue queue scelle notre amitié à jamais !



Figure 1 : Illustration par Gaël Le Roux.

Leila, je te félicite tout d'abord pour ton poste chez Ipsen, toi aussi tu le méritais ! J'ai beaucoup apprécié notre colocation pendant deux ans et j'ai aussi beaucoup pensé à toi sur cette fin de thèse... Pour info, le trône de fer est entre de bonnes mains !

Comme un arabe en remplace un autre, je poursuis par toi Amin. Amin, merci de nous avoir fait découvrir la gastronomie orientale : les maamouls (prononcer ma moule), les falafels et autres feuilles de vigne farcies, c'était délicieux !!! Merci aussi pour la gastronomie moins orientale : mars, rocher, bownty, et snikers en tout genre, « ça c'est de la drogue » dixit Giovanna. Tu veux nous engraisser ou quoi ?! Je te souhaite plein de courage pour ta fin de thèse et pour la suite. A oui j'oubliais, je te remercie d'avoir tenté de relever ce défi impossible qui était de nous faire prononcer l'alphabet arabe.

Fabien, à toi aussi je souhaite plein de courage pour la fin de la thèse. Je te souhaite aussi d'être heureux et de prendre bien soin de ta petite famille. Merci d'avoir tenté de m'expliquer la théorie du trou noir (sans mauvais jeu de mot...), je crois que ça t'a fait plaisir mais je dois t'avouer que moi je n'ai rien compris ;). Merci aussi d'avoir gardé mes mimis et pour ta gentillesse.

Giovanna, quel personnage tu es ! Tu es arrivée dans notre bureau voici deux ans et nous apprenons un peu plus chaque jour à apprivoiser la Napolitaine qui sommeille toujours en toi. Merci d'avoir enrichi notre vocabulaire Italien (sans doute pas des plus beaux mots, mais des plus utiles tout de même). Merci aussi pour la recette des lasagnes.

Rogatien, Oh la vache, tu nous as manqués ! Les choses n'ont plus jamais été les mêmes après ton départ. Je te remercie néanmoins d'avoir transformé notre bureau en, je site, « ménagerie ». Pour ton information, sache que je retrouve encore des petits confettis dans quelques coins reculés de mon bureau.

Enfin je te remercie LaFrite pour ta bonne humeur quotidienne. De tous les membres passés ou présents de ce bureau, c'est toi qui me manqueras le plus.

Je poursuis mes remerciements par le bureau dit des filles ou des morues ou des TOPS et je commence par la plus filles d'entre toutes, Khaled ! Je te remercie pour les longues conversations que nous avons eues parfois, pour tes conseils, pour ton écoute et pour les précieux secrets que tu as su garder. Tu es quelqu'un de bien et j'espère que ça capte à Clermont pour que nous puissions rester en contact.

Audrey (Dédé !!) je pourrais écrire une page de remerciements sur toi mais je vais faire plus court pour ne pas susciter de jalousie. Je te remercie d'abord pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant ma thèse, la stéréo, la culture et surtout surtout, merci d'être restée avec moi cette nuit de manip' où on a fini à 6h du matin ... pour rien. On en a partagé des pizzas de chez domino's toutes les deux. Emmanuel nous a dit qu'après la thèse, on rigole en pensant aux manip's difficiles. Je ne sais pas si celle-là nous fera rire, je préfèrerai rigoler avec toi d'autre chose et pourquoi pas autour d'un bon vieux pichet du JJ ! ca n'a plus été pareil sans toi. Merci vraiment pour tout.

Angélique, le petit suppo! Je garderai un souvenir inébranlable des nombreux débats (de fond) que nous avons eu à la salle de pause. On t'avait conseillée il y a quelques années de ne pas suivre notre exemple et de rentrer dans le droit chemin. Je ne suis pas certaine que tu es suivie cette voie... Je te souhaite une très bonne fin de thèse (c'est déjà bien partie !) et de faire plein de petits suppos !!!

Anne-Claire, je te remercie pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble et les conseils que tu m'as donnés notamment en HPLC et pour la concentration des nanos. Je te souhaite bon courage pour la fin de ton post-doc et pour la suite.

Claire, je te remercie pour l'aide et les précieux conseils que tu m'as donnés pour les westerns blot, sincèrement, je ne sais pas trop comment j'aurais fait sans toi. Je te dis à toi aussi bon courage pour la suite et surtout, prends bien soin de Manu en mon absence ;).

Pauline, je te souhaite bonne chance pour la suite et que ton destin soit à la hauteur de tes espérances.

Une petite mention spéciale pour JP et Florian. Merci à vous deux pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble. Merci JP pour nos conversations et Foufouch pour le ski !

Je poursuis avec les habitants de Primex. Merci Annabelle pour tout ce que tu as mis en place sur la plate-forme, ça m'a bien aidée. Merci Elise pour m'avoir accompagnée dans les nocturnes, même si ce n'était pas le moment les plus drôles. Et merci Aurélien pour m'avoir donné un coup de main en *vivo* et pour tout ce que tu as fait à Primex, tu nous as bien aidées.

Je remercie plus particulièrement mes deux stagiaires Nada et Ellyn qui m'ont bien aidée pendant cette thèse. Je vous dis bonne chance et bon courage pour la suite de vos parcours respectifs.

Je remercie tout le personnel de MINT pour m'avoir accueilli et parfois supporté pendant ces trois années de thèse. Une mention spéciale tout de même pour Edith qui est toujours là quand nous avons besoin d'un conseil, à Sylvie, merci pour les westerns. Jérôme, merci de m'avoir accompagné et appris comment purifier et post-insérer les anticorps. Camille et Clément, merci pour l'organisation à Primex et les marquages histo. Je souhaite aussi plein de courage aux nouveaux (et moins nouveaux) doctorants pour leur (fin) de thèse.

Je remercie aussi le personnel du CRCNA pour m'avoir accompagné quand je venais à Nantes. Et merci surtout à Jérémie et JB pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble depuis tout ce temps....

Enfin, je remercie mes parents et toute ma famille pour m'avoir soutenue pendant ces 9 années d'étude !!! Et oui, c'est long et il s'en est passé des choses. Merci d'avoir toujours eu confiance en moi et de m'avoir encouragée dans mes choix.

J'en profite aussi pour remercier toute ma bande de potes de lycée ! Merci à vous aussi d'être toujours là après toutes ces années et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles.

Il m'est difficile de rédiger ce travail sans penser à toi.

J'aurais aimé que tu sois là pour partager ce moment avec nous, malheureusement la recherche progresse moins vite que la maladie.

Tu me manques Papa.

# SOMMAIRE

INTRODUCTION	P1
OBJECTIFS DE LA THESE	P71
CHAPITRE I : Développement d'un nouvel outil de radiothérapie interne vectorisée	P84
CHAPITRE II : Développement d'un nouveau vecteur pour une chimio-radiosensibilisation des GBMs	P114
DISCUSSION GENERALE	P193
CONCLUSION et PERSPECTIVES	P205

## Liste des abréviations

5-ALA	5-aminolevulinic acid
5-FU	5-fluorouracil
AA	d'astrocytome anaplasique
ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protein Kinase B
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ATM	ataxia-telangiectasia
ATP	adénosine-5'-triphosphate
ATR	ATM and RAD3-related
BCNU	Carmustine
BER	Base excision repair
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMDC	Bone Marrow-Derived Cells
BMP	Bone morphogenic protein
CD133	Prominin-1
CDB	Cassure double brin
CDKN2A/CDKN2C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2C
CDK/Cyclin	Cyclin-dependent kinase / Cyclin
Chk1	Checkpoint kinase 1
CED	Convection enhanced delivery
CHX-A-DTPA	C-function alized trans-cyclohexyldiethylenetriamine pentaacetic acid
CSB	Cassure simple brin
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
CT-scanner	Computed Tomography - scanner
CTV	Clinical Target Volume
CSC	Cellule souche cancéreuse
CSG	Cellules souches de gliome
CSN	Cellules souches neuronale
DAG	diacylglycérol
DSPE-PEG maléimide	1,2-distearoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyethylene glycol)-2000
DTPA	diethylenetriaminepentaacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor receptor
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EORTC	European Organization for the Research and Treatment of Cancer
EPC	Endothelial Progenitor Cells
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ERK	extracellular-signal-regulated kinases
FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2
FDA	Food and drug administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
GBM	Glioblastome
GPK	GPCR kinase
GTV	Gross Tumor Volume
HPV	Human papillomavirus

HIF	hypoxia-inducible factor
HRE	hypoxia-responsive element
ICD-O-3	International classification of disease - oncology
IP3	inosito 1,4,5 trisphosphate
IDH	Isocitrate deshydrogenase
IRM	Imagerie à resonance magnétique
L1CAM	L1 cell adhesion molecule
LAK	Lymphocyte-activated killer
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LNC	Nanocapsule lipidique
LOH	Loss of heterogeneity
mAb / AcM	Monoclonal antibody / Anticorps monoclonal
MDM1/MDM4	Mouse double minute 1/4
MEC	Matrice extra-cellulaire
MEK	MAP kinase kinase
MGMT	O <sup>6</sup> -methylguanine-DNA methyltransferase
MMP	Métalloprotéase
MMS	Minimal-mental status
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NER	Nucleotide excision repair
NF1	Neurofibrin-1
NFκB	Nuclear Factor κB
NHEJ	Non Homologous End-Joining
OMS	Organisation mondiale de la santé
P14ARF	14 kDa Alternate reading frame
P16/INK4a	16kb inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PEG	polyéthylène glycol
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PI3K	phosphoinositol-3 kinase
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PIP2 / PIP3	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate/ phosphatidylinositol 4,5-triphosphate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB	Retinoblastoma
RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
RE	Réticulum endoplasmique
RH	recombinaison homologue
RIT	Radio-immunothérapie
RT	Radiothérapie
RTK	Récepteur tyrosine kinase
SAB	N-succinimidyl 3-[ <sup>211</sup> At]astato-benzoate
SHH	Sonic Hedgehog
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SPECT	Single photon emission computed tomography
SPION	supermagnetic iron oxide nanoparticles
SRM	Spectroscopie à résonance magnétique
TDM	Tomodensitométrie
TEL	Transfert d'énergie linéique

TEM	TIE-2 expressing monocytes
TEP	Tomographie à émission de positon
TET	Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor
TKI	Tyrosine kinase inhibitor
TMZ	Temozolomide
UV	Ultra-violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHB/VHC	Virus de l'hépatite B / C
vHL	gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau
WHO	World Health Organization
Wnt	Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site
ZSV	zone sous-ventriculaire
ZSG	zone sub-granulaire

# INTRODUCTION

## Table des matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	6
1 Le cancer et les tumeurs solides .....	7
2 Organisation du système nerveux central (SNC), siège de notre conscience et du glioblastome	11
2.1 Le développement du SNC.....	11
2.1.1 Différentiation des neurones .....	12
2.1.2 Différentiation des cellules gliales.....	12
2.1.3 La suite du développement du système nerveux central .....	13
2.2 Structures du SNC.....	13
2.2.1 Les cellules du SNC .....	13
2.2.2 Les barrières du SNC.....	14
2.2.3 La vascularisation cérébrale .....	17
3 Tumeurs cérébrales gliales et glioblastome .....	17
3.1 Classification des tumeurs cérébrales.....	17
3.2 Epidémiologie des tumeurs gliales et glioblastome.....	19
3.3 Aspects moléculaires du glioblastome .....	20
3.3.1 Les glioblastomes primaires .....	21
3.3.2 Les glioblastomes secondaires .....	22
3.3.3 Classification des GBMs par leur « signature moléculaire » .....	22
3.4 Diagnostic et facteurs pronostics et prédictifs.....	23
3.4.1 Le diagnostic.....	23
3.4.2 Les facteurs pronostics .....	25
3.4.3 Les facteurs prédictifs.....	25
4 Les traitements du glioblastome .....	25
4.1 La chirurgie .....	26
4.2 La chimiothérapie.....	26
4.2.1 Le traitement standard.....	26
4.2.2 Stratégies thérapeutiques en développement.....	28
4.3 La radiothérapie .....	30
4.3.1 Les rayonnements ionisants.....	30

4.3.2	Les effets des rayonnements sur la matière .....	31
4.3.3	Pratique clinique.....	34
4.3.4	Méthodes permettant d’optimiser la radiothérapie externe .....	35
4.3.5	La radiothérapie interne.....	37
4.3.6	Les chimiothérapies radio-sensibilisantes.....	43
4.4	Les limites de ces traitements.....	45
5	Concept de radorésistance et de cellules souches cancéreuses dans le glioblastome.....	46
5.1	Caractéristiques des cellules souches cancéreuses dans le glioblastome .....	46
5.1.1	Les cellules souches neuronales.....	46
5.1.2	Les cellules souches cancéreuses dans le glioblastome (CSG) .....	47
5.2	Cellules souches cancéreuses et radorésistance.....	49
5.2.1	Conséquences cellulaires de l’irradiation sur les CSGs .....	49
5.2.2	Les mécanismes impliqués dans la radorésistance des CSGs.....	51
5.3	Le microenvironnement des CSGs dans le GBM .....	52
5.3.1	La vascularisation des tumeurs .....	52
5.3.2	Les niches périvasculaires.....	54
5.3.3	L’hypoxie.....	56
6	Les nouvelles cibles thérapeutiques.....	56
6.1	La signalisation induite par l’axe CXCL12/CXCR4 .....	57
6.2	Le rôle de CXCL12/CXCR4 dans le glioblastome.....	58
6.2.1	Rôle dans l’angiogénèse et la vasculogénèse.....	58
6.2.2	Rôle dans l’invasion tumoral .....	59
6.3	L’activité de CXCL12/CXCR4 dans les CSGs.....	59
6.3.1	Rôle dans les CSNs normales.....	59
6.3.2	Rôle dans les CSGs.....	60
7	Innovations thérapeutiques pour le ciblage et l’élimination des CSGs et leur modalités d’application.....	60
7.1	Intérêts des nanovecteurs.....	60
7.2	Les différents types de nanovecteurs .....	62
7.2.1	Les liposomes .....	62
7.2.2	Les micelles.....	62
7.2.3	Les nanoparticules polymériques.....	63
7.2.4	Les dendrimères .....	63
7.2.5	Les SPIONs ( <i>Supermagnetic iron oxide nanoparticles</i> ).....	64

---

7.2.6	Les nanoparticules lipidiques (LNC).....	64
7.3	Les modalités d'application dans le cadre du traitement du glioblastome .....	67
7.3.1	Administration par voie systémique .....	67
7.3.2	Administration locale .....	68
7.3.3	Les implants.....	70
8	Objectifs de la thèse .....	71
	Références.....	72

## Liste des figures

Figure 1 : Ciblage thérapeutique des hallmarks du cancer. [1].....	8
Figure 2 : Schéma de différenciation des cellules souches du tubes neural [2].....	11
Figure 3 : Différenciation des cellules souches neurales sous l'action de BMP4 et SHH. ....	12
Figure 4 : Les cellules de la névroglie et leur interaction avec les neurones.....	14
Figure 5 : Représentation des méninges [5].....	15
Figure 6 : Schéma de la barrière hémato-encéphalique. [7].....	16
Figure 7 : Coupe sagittale du crâne [5]......	17
Figure 8 : Diagnostic des gliomes par IRM. A gauche : T1 avec accumulation de produit de contraste et nécrose centrale. A droite : T2 avec œdème périlésionnel modéré. [36] .....	24
Figure 9 : Les tumeurs astrocytaires selon l'OMS. ....	24
Figure 10 : Schéma thérapeutique dans le glioblastome [36].....	27
Figure 11 : Effets des radiations ionisantes.....	33
Figure 12 : Accélérateur linéaire. ....	34
Figure 13 : Bistouri à rayon gamma (gamma knife) .....	36
Figure 14 : Système Cyberknife® .....	37
Figure 15 : Dispositif GliaSite. [101] .....	38
Figure 16 : complexe lipophile de rhénium.....	42
Figure 17 : Traitement par SI à J12 puis CED à J18 avec des LNC- <sup>188</sup> Re dans un modèle de gliome chez le rat. A gauche : image IRM T2 à J9, J63 et J140 après implantation des tumeur. On observe une régression de la masse tumorale. A droite : droites Kaplan-Meier des animaux traités avec ce protocoles. Cinq animaux sur six sont des longs survivants [114]. ....	43
Figure 18 : Les deux modèles expliquant l'hétérogénéité des cellules cancéreuses. [135].....	46
Figure 19 : A gauche, l'angiogénèse. Les cellules de gliome en hypoxie autour d'une zone de nécrose, sécrètent des facteurs proangiogéniques. Il en résulte la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. A droite, la vasculogénèse. Elle implique la mobilisation, la différenciation et le recrutement de BMDCs (bleu). La vasculogénèse est induite par des facteurs induits par l'hypoxie comme le SDF-1 $\alpha$ [165]. ....	54
Figure 20 : Le microenvironnement des cellules souches cancéreuses dans le glioblastome. [173] ...	55
Figure 21 : Diversité des nano-objets en fonction de leur taille. ....	61
Figure 22 : Représentation schématique des nanocapsules lipidiques. ....	64
Figure 23 : Mesure de la conductivité en fonction de la température. ....	65
Figure 24 : DSPE-PEG-maléimide.....	65
Figure 25 : Représentation schématique de la synthèse des immuno-LNC par la méthode 1 et la méthode 2 [224]......	66
Figure 26 : Extravasation de molécules de faibles poids moléculaires et de fort poids moléculaires dans l'espace interstitiel de tissus tumoraux. Les petites molécules sont rapidement éliminées par la circulation sanguine tandis que les macromolécules s'accumulent dans les tissus [228]......	68
Figure 27 : Profil de distribution d'une substance par convection ou diffusion [232]......	69

---

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification WHO selon la quatrième édition parue en 2007 [12]. .....	19
Tableau 2 : Thérapies ciblées dans le glioblastome. ....	29
Tableau 3 : Efficacité des chimiothérapies radio-sensibilisantes par rapport à une radiothérapie seule. .....	45

---

## 1 Le cancer et les tumeurs solides

A ce jour, il n'existe pas d'entité causale connue et commune à tous les cancers. Nous savons que certains cancers ont une origine infectieuse comme le cancer du col de l'utérus qui est lié à une infection par le papillomavirus (HPV, *Human papillomavirus*) ou l'hépatocarcinome qui peut avoir comme origine les virus de l'hépatite C ou B (VHC et VHB). Ils peuvent être hormono-dépendants comme le cancer du sein et le cancer de la prostate ou liés à des facteurs environnementaux comme l'exposition à des rayonnements ionisants ou des rayons ultra-violet (mélanome). Ils peuvent aussi être causés par le mode de vie comme le cancer du poumon.

Ces éléments ont en commun de générer des dysfonctionnements cellulaires et perturber les mécanismes qui, normalement, garantissent l'intégrité de la cellule. En effet, dans des conditions normales, la cellule est capable de réparer les dommages faits à l'ADN (confère paragraphe 5.2.1 Conséquences cellulaires de l'irradiation sur les CSGs). La réparation peut être complète, fautive mais n'empêchent pas la cellule de vivre et de se multiplier ou la lésion représente un trop grand dommage pour la cellule qui entre en apoptose. Les réparations fautives sont plus fréquentes dans le cas de la réparation par ligation non homologue.

Des anomalies génétiques peuvent donc persister et donner lieu à des mutations. Ces mutations peuvent être de différents types : soit elles sont récessives et ne présentent pas de risque direct pour l'organisme soit elles sont dominantes et peuvent générer un caractère nouveau. Dans le cas des mutations récessives, même si elles ne présentent pas de risque direct, la survenue d'autres mutations peuvent être complémentaires de la première et induire là aussi un nouveau caractère.

Ainsi, des agressions répétées par des rayonnements UV ou ionisant ou la présence de virus peut entraîner des mutations répétées qui conduisent à un processus de cancérisation qui va se caractériser par une prolifération anarchique de cellules. Une cellule normale va donc évoluer progressivement vers un état néoplasique en acquérant certaines capacités.

Mais la masse tumorale n'est pas une entité isolée. Elle est en connexion permanente avec le microenvironnement dont elle bénéficie et qu'elle peut corrompre. Il est composé de cellules stromales, de vaisseaux sanguins, de zone d'hypoxie qui vont sécréter des facteurs favorisant le maintien de la masse tumorale.

En 2000, Hanahan et Weinberg proposaient six points caractéristiques (*hallmarks*) de cancer permettant de comprendre la biologie des cancers. Ces *hallmarks* ont récemment été complétés par quatre autres *hallmarks* qui sont présentés sur la Figure 1.

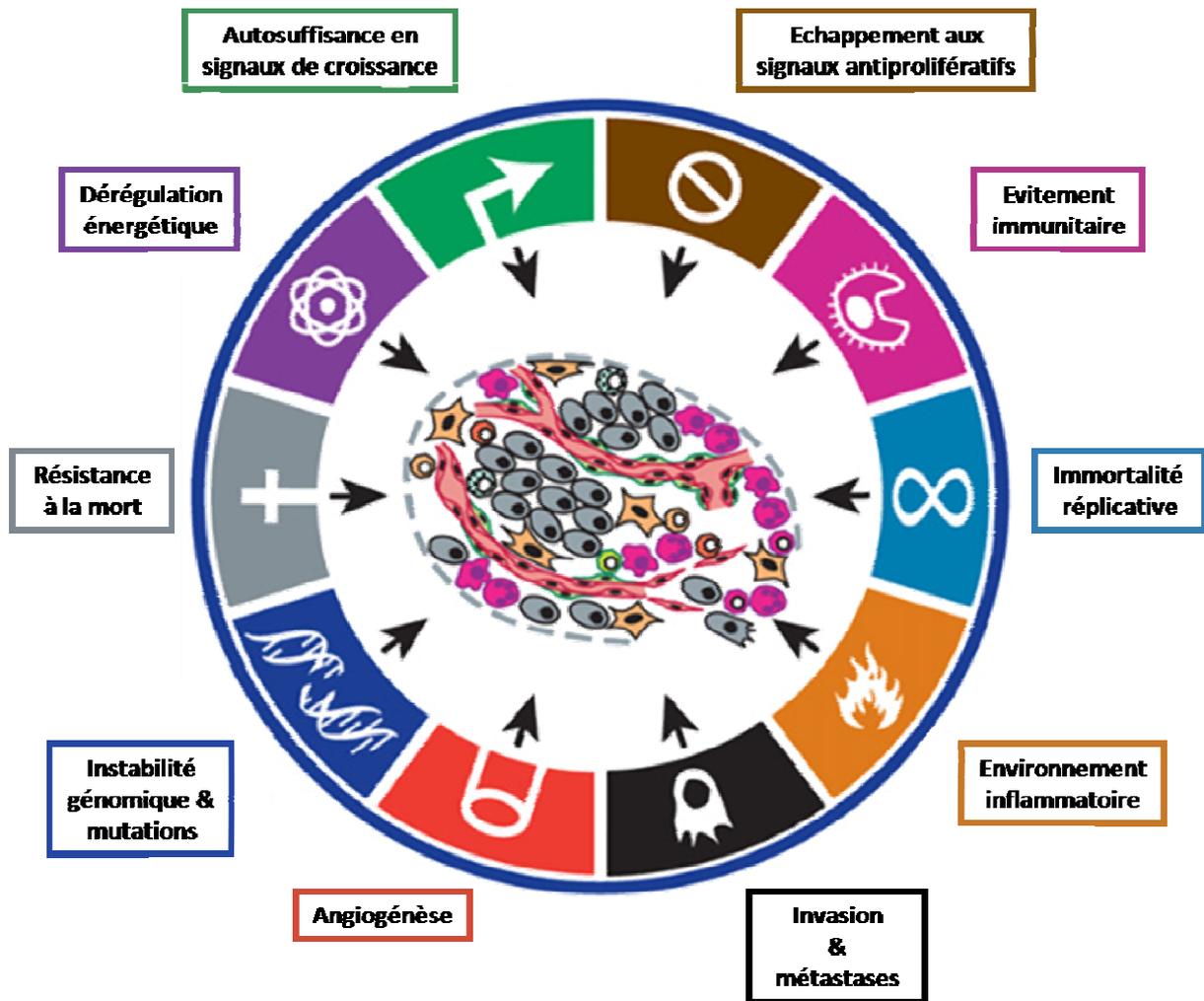


Figure 1 : Ciblage thérapeutique des hallmarks du cancer. [1]

- **Maintien des signaux de prolifération**

Le maintien d'une prolifération chronique est la caractéristique la plus fondamentale des cellules cancéreuses. Elles maintiennent des signaux de prolifération de différentes manières : elles peuvent produire elles-mêmes des facteurs de croissance qui se fixent sur leur récepteur et induire ainsi une boucle autocrine ou activée des cellules saines environnantes qui répondent en leur renvoyant des facteurs de croissance (boucle paracrine).

Par ailleurs, des mutations somatiques peuvent conduire à l'activation constitutive de voies de signalisation habituellement activée par des facteurs de croissance.

Ces mutations peuvent aussi concerner des mécanismes de rétrocontrôle négatif. Par exemple, sur la voie PI3K/Akt, la phosphatase PTEN agit en empêchant la phosphorylation de PIP2 en PIP3 et empêche ainsi une activation anormale de cette voie. La phosphatase PTEN est souvent mutée dans les cancers et notamment dans les gliomes ce qui conduit à une activation constitutive de PI3K/Akt.

---

- **Eviter les suppresseurs de croissance**

En plus d'activer la prolifération, les cellules cancéreuses peuvent contourner un certain nombre de mécanismes qui régulent la prolifération.

Ainsi les protéines RB (Retinoblastoma) et p53 agissent comme des régulateurs qui décident de laisser la cellule proliférer ou au contraire activent les programmes de sénescence et d'apoptose. Les protéines RB et p53 sont fréquemment mutées dans les cancers.

La croissance des cellules est aussi contrôlée par le contact des cellules entre elles. Ainsi dans les processus cancéreux, la prolifération des cellules est caractérisée par une perte « d'inhibition de contact », les cellules prolifèrent de manière anarchique.

- **Résistance à la mort cellulaire**

L'apoptose est régulée dans la cellule par des signaux pro- et anti-apoptotique. Les protéines de la famille Bcl-2 (Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1) sont des inhibiteurs de l'apoptose qui agissent en inhibant deux protéines pro-apoptotiques (Bax et Bak).

Les cellules cancéreuses mettent en place de nombreuses stratégies pour pouvoir contourner l'apoptose. L'une d'entre elle consiste en la perte de p53. Elles peuvent aussi augmenter l'expression de protéines anti-apoptotiques ou de signaux de survie (Igf1/2) en dérégulant les facteurs pro-apoptotiques (Bax, Bim, PUMA).

- **Immortalité**

Les cellules cancéreuses peuvent se répliquer à l'infini à la différence des cellules normales qui n'ont qu'un nombre limité de division cellulaire. Ce phénomène est contrôlé par deux mécanismes : la sénescence et l'induction de la mort cellulaire.

La durée de vie d'une cellule est contrôlée par les télomères, qui protègent les extrémités des chromosomes et raccourcissent après chaque division. Quand les télomères deviennent trop courts, ils ne remplissent plus leur fonction de protection ce qui conduit la cellule vers la mort. Les télomérases sont des ADN polymérases qui rallongent les télomères. Elles sont absentes dans les cellules « mortelles » et présentent dans 90% des cellules immortelles dont les cellules cancéreuses.

- **Capacité à induire l'angiogénèse**

L'angiogénèse permet à la tumeur de créer son propre réseau capillaire ce qui lui permet d'être approvisionnée en oxygène et en nutriments, nécessaires à son développement.

- **Pouvoir d'invasion et de métastases**

Pour pouvoir envahir le tissu environnant, les cellules cancéreuses vont modifier leur forme et développer des altérations dans les systèmes d'attachement aux autres cellules et à la matrice extracellulaire. Ceci est notamment caractérisé par la perte de la E-cadhérine, une molécule clé dans l'adhésion cellule-cellule.

---

La dissémination se fait en plusieurs étapes :

- Intravasation : les cellules entrent dans les capillaires sanguins et lymphatiques,
- Extravasation : les cellules sortent de la lumière des vaisseaux et gagnent le parenchyme de tissus éloignés du site primaire,
- Colonisation.

Ce phénomène est favorisé par la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) qui permet aux cellules endothéliales transformées d'acquérir des capacités d'invasion, de résistance à l'apoptose et de dissémination.

- **Instabilité génétique et mutation**

Les défauts dans la maintenance du génome et dans les mécanismes de réparation de l'ADN sont des avantages pour la tumeur notamment parce qu'ils augmentent la probabilité de chance que la tumeur développent des mutations favorables à sa survie.

L'instabilité génétique permet l'acquisition d'autres « hallmarks ».

- **Favoriser l'inflammation**

L'inflammation contribue à l'acquisition de hallmarks en apportant des molécules bioactives comme des facteurs de croissance, des signaux de survie, des facteurs proangiogéniques, des enzymes qui modifient la matrice extra-cellulaire et facilitent ainsi l'angiogénèse, l'invasion et les métastases.

- **Dérégulation du métabolisme énergétique**

Dans les conditions normales, l'énergie nécessaire est majoritairement générée par le cycle de Krebs. En condition d'hypoxie, comme c'est souvent le cas dans les tumeurs, la glycolyse intracytoplasmique est le mode de production d'énergie majoritaire.

- **Eviter le système immunitaire**

Les cellules cancéreuses sont capables de détourner la vigilance du système immunitaire en sécrétant des facteurs immunosuppresseurs comme le TGF- $\beta$ . Elles peuvent aussi recruter des cellules inflammatoires aux propriétés immunosuppressives comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) et les *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs).

C'est dans ce contexte, en sans cesse remaniement et dont la complexité rend difficile la possibilité de définir des solutions simples, chaque organe, chaque région de l'organisme possède son lot de processus de cancérisation dont le système nerveux central (SNC), siège de notre conscience et du glioblastome (GBM).

## 2 Organisation du système nerveux central (SNC), siège de notre conscience et du glioblastome

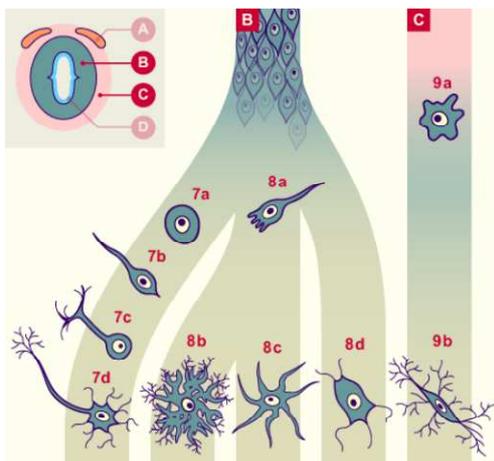
Le système nerveux est spécialisé dans la conduction, la transmission et le traitement de l'information nerveuse. Il est traditionnellement séparé en un système nerveux central (SNC) et un système nerveux périphérique (SNP).

Le **SNC** est composé par l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) prolongé par la moelle épinière et est concentré à l'intérieur du crâne et de la colonne vertébrale qui le protègent. Le **SNP** est formé de ganglions et de nerfs périphériques qui émergent de l'encéphale et de la moelle vers tous les points de l'organisme, assurant l'acheminement des informations sensibles vers le SNC et des ordres du SNC vers les effecteurs périphériques.

A noter que le nerf I (olfactif) et le nerf II (optique) sont des nerfs crâniens appartenant au SNC.

### 2.1 Le développement du SNC

Au cours de la quatrième semaine du développement embryonnaire, les deux bords de la gouttière neurale se réunissent pour former le tube neural, qui deviendra le système nerveux central. La paroi du tube neural est faite de cellules souches neurales. Après leur prolifération, celles-ci ainsi que les précurseurs qui en dérivent se différencient en neurones ou en cellules gliales. Les cellules microgliales, quant à elles, sont d'origine mésodermique (Figure 2).



**Figure 2 : Schéma de différenciation des cellules souches du tubes neural [2].**  
**A : crête neurale, B : tube neural, C : mésenchyme, D : couche épendymaire du tube neural.**  
**7a à d : évolution du neurone, a : neurone immature ou neuroblaste, d : neurone mature.**  
**8a : Glioblaste, 8b et c : 2 types d'astrocytes, 8d : oligodendrocyte.**  
**9a : monocyte et 9b : cellule gliale**

### 2.1.1 Différentiation des neurones

Les cellules souches qui constituent la paroi du tube neural s'auto-renouvellent en proliférant par mitoses. La différenciation de ces cellules est régie par deux types de signaux : *Bone morphogenic protein* (BMP) et *Sonic Hedgehog* (SHH). L'action antagoniste de ces signaux détermine l'axe dorsoventral de l'embryon. Les facteurs EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF8 et FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 8, 2*) ainsi que l'acide rétinoïque jouent également un rôle (Figure 3).

Ainsi le facteur **BMP4** est sécrété par le plafond du tube neural. Il diffuse selon un gradient le long de celui-ci pour agir différenciellement selon la dose et la position, sur l'identité dorsale des précurseurs neuronaux [3].

De la même manière, **SHH** est produit par la notocorde puis par le plancher du tube neural. Il diffuse selon un gradient de concentration dans la partie ventrale du tube neural pour permettre localement la différenciation de précurseurs ventraux [3].

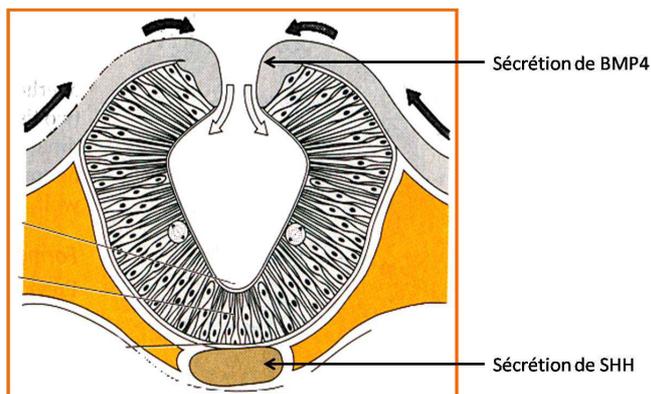


Figure 3 : Différentiation des cellules souches neurales sous l'action de BMP4 et SHH.

### 2.1.2 Différentiation des cellules gliales

La différenciation gliale apparaît après la différenciation neuronale dans les zones ventrales et dorsales du tube neurale. La division asymétrique des cellules souches neurales produit des glioblastes, précurseurs des cellules gliales, qui se différencient les uns en astrocytes et oligodendrocytes, les autres en cellules épendymaires. Il y a plusieurs étapes dans ces processus de différenciation. Ainsi pour les oligodendrocytes, on distingue successivement :

- Les progéniteurs bipotents donnant naissance aux astrocytes et aux oligodendrocytes,
- Les pré-progéniteurs d'oligodendrocytes,
- Les progéniteurs d'oligodendrocytes,
- Les préoligodendrocytes,
- Les oligodendrocytes immatures,
- Et les oligodendrocytes matures (myélinisants).

---

### 2.1.3 La suite du développement du système nerveux central

Le développement est différent selon les structures qui constituent le système nerveux. Interviennent essentiellement deux processus :

- Les migrations cellulaires qui sont d'autant plus importantes que l'on progresse vers l'extrémité crâniale du SNC. Elles sont quasi-inexistantes dans la moelle, prennent place dans le tronc cérébral et sont au maximum dans le cervelet et les hémisphères cérébraux.
- La colonisation des diverses structures du SNC par des axones myélinisés, issus de corps cellulaires neuronaux provenant de localisations différentes [2].

Ces signaux et progéniteurs sont importants car ils vont être réactivés de manière inappropriée lors de cancer (Cf. Chapitre 5.1 Caractéristiques des cellules souches cancéreuses dans le glioblastome).

## 2.2 Structures du SNC

Le SNC est composé de neurones, de cellules gliales aussi appelées glie (astrocytes, cellules épendymaires, oligodendrocytes et cellules microgliales) (Figure 4), de vaisseaux sanguins et de la matrice extracellulaire (MEC).

### 2.2.1 Les cellules du SNC

**Les neurones** ou cellules nerveuses ont pour rôle de recevoir, traiter et transmettre des informations sous forme de signaux ou d'influx nerveux. Ils sont généralement constitués d'un corps cellulaire dont sont issus un ou plusieurs prolongements. Ces prolongements peuvent être des dendrites qui reçoivent des signaux des autres neurones ou un axone qui transmet l'influx nerveux aux effecteurs musculaires et glandulaires par la sécrétion de neurotransmetteurs au niveau de la synapse. Il existe des axones myélinisés (enveloppé d'une gaine de myéline) qui conduisent les influx nerveux rapidement et des axones amyélinisés qui les acheminent l'information lentement [4].

**Les astrocytes** ont une forme caractéristique en étoile due à leurs nombreux prolongements qui s'attachent aux neurones au niveau de leur terminaison synaptique et recouvrent les capillaires avoisinants. Ils assurent ainsi la solidité et la cohérence de l'édifice cérébral et par leurs prolongements qui entourent complètement les capillaires sanguins, ils contribuent à la nutrition des neurones.

**Les cellules épendymaires** (ou épendymocytes) tapissent les cavités centrales de l'encéphale et de la moelle épinière et constituent une barrière perméable entre le liquide cérébro-spinal et le liquide interstitiel qui baigne les cellules du SNC.

Les **oligodendrocytes** sont alignés autour des axones épais du SNC et leur prolongement cytoplasmique s'enroule autour de ceux-ci afin de former une enveloppe isolante le long de l'axone appelée gaine de myéline.

Les **cellules microgliales** (ou microglie) sont de petites cellules ovoïdes avec des prolongements « épineux » relativement longs. Elles ont un rôle de contrôle et de maintien de l'intégrité des neurones. En effet, lorsqu'elles détectent que certains neurones sont endommagés et présentent des anomalies, elles migrent vers eux et vont se transformer en cellules phagocytaires capables de phagocyter les microorganismes et les débris de neurones morts. Le rôle protecteur des microglies est très important car les cellules immunitaires n'ont pas accès au SNC.

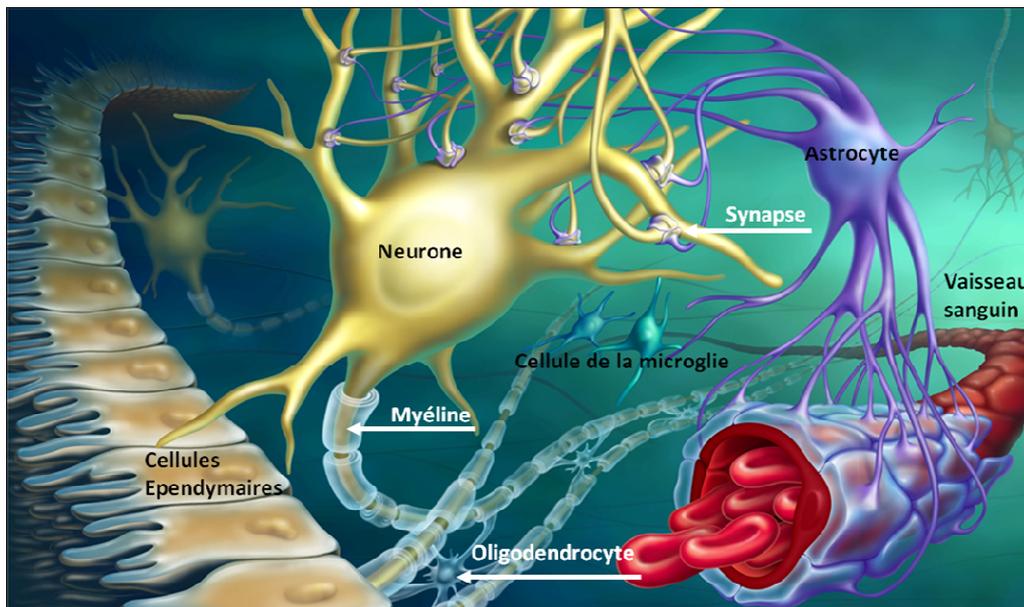


Figure 4 : Les cellules de la névroglie et leur interaction avec les neurones.

## 2.2.2 Les barrières du SNC

Le tissu nerveux est fragile, il est protégé et isolé de l'extérieur par l'os du crâne, des membranes (les méninges) et un coussin aqueux (le liquide cérébro-spinal). Il est aussi protégé contre les substances nuisibles potentiellement présentes dans le sang par la barrière hémato-encéphalique, la barrière méningo-céphalique et la barrière hémato-méningée.

### 2.2.2.1 Les méninges

Les **méninges** sont composées de trois membranes de tissu conjonctif qui sont de l'extérieur vers l'intérieur : la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère (Figure 5). Ces membranes recouvrent et protègent le SNC, elles protègent aussi les vaisseaux sanguins et délimitent les sinus de la dure-mère. La **dure-mère** est la méninge la plus dure et la plus résistante. Elle est composée de deux feuillets, le

feuillet externe et le feuillet interne. Les deux feuillets sont soudés sauf en quelques endroits où le feuillet interne pénètre entre les deux hémisphères cérébraux. Entre ces deux feuillets, au sommet de l'encéphale, se trouve le sinus veineux et le sinus sagittal.

L'**arachnoïde** est la méninge intermédiaire et constitue une enveloppe souple de l'encéphale.

La **pie-mère** est la seule méninge qui adhère fermement à l'encéphale. Elle est composée de tissu conjonctif et est parcourue par de nombreux capillaires sanguins [4].

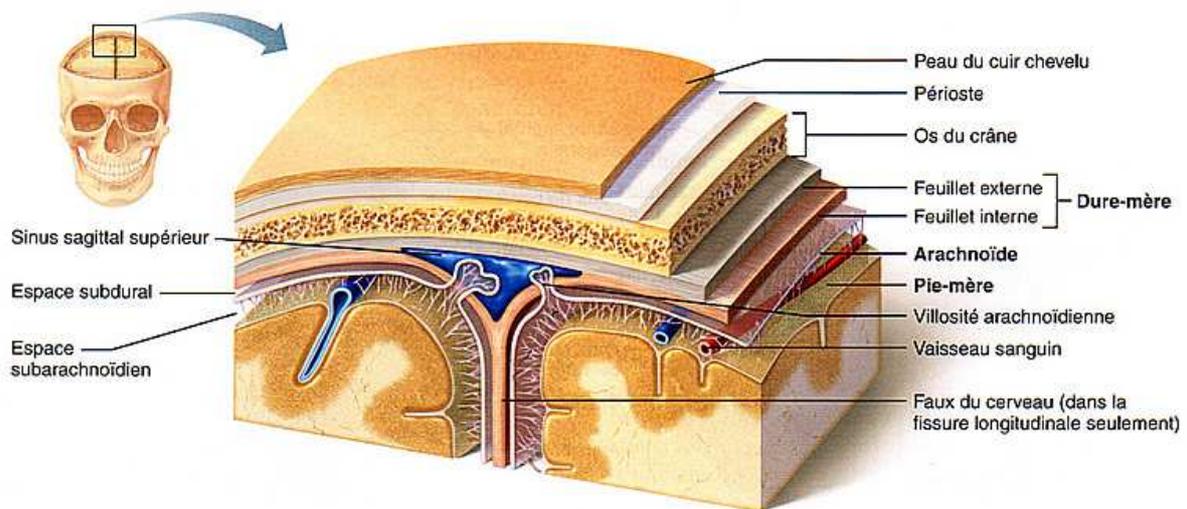


Figure 5 : Représentation des méninges [5].

L'espace entre la dure-mère et l'arachnoïde, l'**espace sub-dural**, est rempli de liquide séreux. L'espace entre l'arachnoïde et la pie-mère est l'**espace sub-arachnoïdien**. C'est dans cet espace que passent des vaisseaux sanguins à la surface de l'encéphale et où circule le liquide cérébro-spinal. Cette succession de membranes et de liquide permet d'absorber les vibrations et protège le SNC des chocs [5].

### 2.2.2.2 Les barrières

La **barrière hémato-encéphalique** (BHE) est un mécanisme de protection qui assure notamment la stabilité du milieu interne de l'encéphale. Le sang qui circule dans les capillaires de l'encéphale est séparé de l'espace extracellulaire et des neurones par :

- l'endothélium vasculaire,
- une lame basale épaisse qui entoure la face externe des capillaires et
- les pieds bulbeux des astrocytes fixés aux capillaires (Figure 6).

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont unies de manière quasi-parfaite par des jonctions serrées qui en font les capillaires les plus imperméables de l'organisme. La BHE ne fonctionne pas de manière absolue mais sélective.

Le glucose, les acides aminés essentiels et certains électrolytes la franchissent grâce à des transporteurs membranaires situés sur les cellules endothéliales.

Certaines substances ont une diffusion simple comme l'oxygène, le dioxyde de carbone, l'eau et les substances liposolubles (éthanol, nicotine, substance anesthésiques).

En revanche, les déchets du métabolisme, les protéines, les toxines et la plupart des médicaments ne peuvent diffuser du sang vers le tissu cérébral. Elle n'est pas présente partout dans l'encéphale. Elle est absente dans certaines régions comme l'hypothalamus, l'hypophyse et l'*area postrema* où l'épithélium vasculaire est perméable ce qui facilite le passage du sang vers l'encéphale au niveau de ces zones [4, 6].

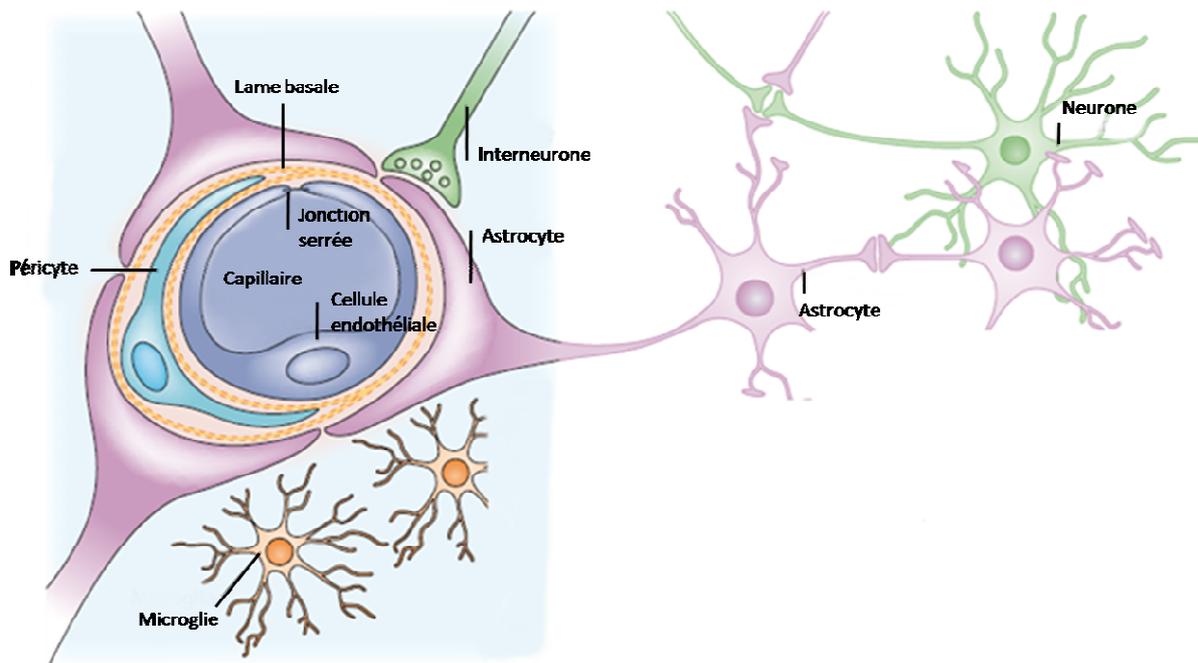


Figure 6 : Schéma de la barrière hémato-encéphalique. [7]

Il n'y a pas de substance contenue dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) qui ne soit pas contenue dans le sang, mais les échanges entre ces deux milieux sont régis par un système sélecteur appelé **barrière hémato-méningée**. Elle est située au niveau des plexus choroïdes. Sa perméabilité est faible dans le sens du sang vers le LCR mais grande dans le sens LCR vers le sang [6].

Enfin, la **barrière méningo-encéphalique** se situe au niveau de la paroi des ventricles de l'épendyme et du canal de l'épendyme. Les astrocytes y facilitent les échanges entre le LCR et le tissu nerveux. Elle assure une fonction d'épuration [6].

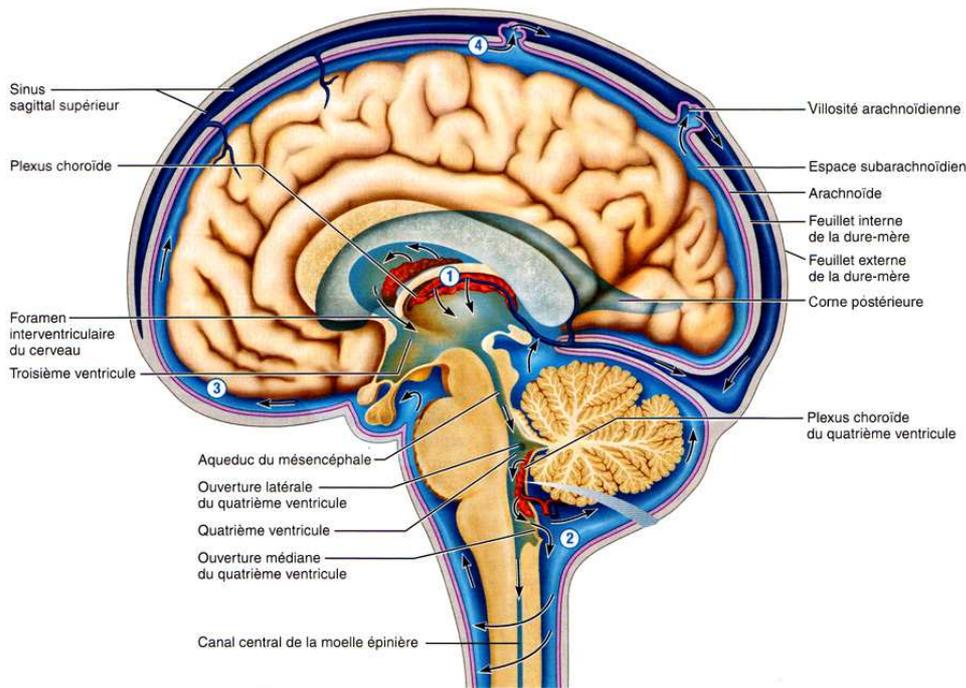


Figure 7 : Coupe sagittale du crâne [5].

### 2.2.3 La vascularisation cérébrale

Le cerveau est l'organe le plus vascularisé du corps humain. Il représente seulement 2% de la masse totale du corps mais consomme 20% des apports en oxygène. Un système vasculaire efficace et capable d'alimenter le cerveau en oxygène et en nutriments est donc nécessaire.

Il existe cinq niveaux de vaisseaux : les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules et les veines. Afin de maintenir un flux sanguin constant dans le cerveau, ces vaisseaux effectuent deux types d'auto-régulation : lorsque la pression sanguine diminue, ils augmentent de diamètre par vasodilatation et lorsque la pression sanguine augmente, ils réduisent leur diamètre par vasoconstriction. De plus, ces vaisseaux sont capables de créer entre eux des connexions appelées anastomoses, pour compenser certaines insuffisances. Ainsi, ces différents mécanismes permettent d'ajuster rapidement les flux sanguins régionaux afin de répondre à la demande lors de changement du métabolisme du glucose ou de l'oxygène qui font partie de l'activité normale du cerveau.

## 3 Tumeurs cérébrales gliales et glioblastome

### 3.1 Classification des tumeurs cérébrales

Les tumeurs cérébrales sont des tumeurs qui touchent le système nerveux central et sont définies selon deux classifications : l'*International Classification of Disease – Oncology*, version 3 (ICD-O-3) et le *World Health Organization (WHO) grade*.

---

La première édition de la *WHO classification*, éditée par Zülch et publiée en 1979, propose une classification basée sur l'aspect histologique des tumeurs [8]. La seconde édition, éditée par Kleihues *et al.* tient compte des avancées apportées par l'immunohistochimie [9] et la troisième édition, éditée par Kleihues et Cavenee et publiée en 2000, tient compte des profils génétiques pour définir les tumeurs cérébrales [10]. Enfin la quatrième édition parue en 2007, inclus de nouvelles entités tumorales et propose la classification présentée dans le Tableau 1.

Les tumeurs cérébrales sont ainsi classées d'un stade I à IV en fonction de leur degré de malignité, le stade IV étant le stade de plus mauvais pronostic.

- Le grade I (tumeurs bénignes) correspond à des tumeurs à croissance lente et normalement bien circonscrites, bien qu'elles puissent envahir de grandes régions du cerveau.
- Le grade II correspond à des tumeurs de croissance lente mais leurs limites sont imprécises.
- Le grade III (tumeurs malignes) correspond à des tumeurs anaplasiques c'est-à-dire qu'elles présentent des cellules anormales et elles ont un développement plus rapide que les tumeurs de bas grade.
- Le stade IV correspond à des tumeurs malignes. Ces dernières peuvent présenter différents types de cellules qui se multiplient rapidement et ayant une forte tendance nécrosante spontanée. Elles ne sont pas définies et s'infiltrent dans le cerveau.

Trois types de gliomes sont distingués : les astrocytomes, les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes. Les astrocytomes sont divisés en quatre grades (Tableau 1) :

- les astrocytomes pilocytaires (grade I),
- les astrocytomes diffus (grade II),
- les astrocytomes anaplasiques (grade III) et
- les glioblastomes multiformes (grade IV).

Le glioblastome constitue la tumeur gliale la plus maligne. Ces deux caractéristiques histologiques majeures sont la présence de plages de nécroses entourées de cellules proliférantes faisant un aspect en pseudo-pallissades et d'une prolifération endothélio-capillaire. Le glioblastome peut survenir *de novo* (glioblastome primaire) ou résulter de l'évolution d'une tumeur de grade inférieur (glioblastome secondaire). Bien qu'elle soit considérée par l'OMS comme une tumeur astrocytaire, la cellule d'origine du glioblastome est inconnue [11]. Le GBM peut être classé en quatre sous-types selon le profil d'expression des gènes : le sous-type classique, le sous-type mésenchymateux, le sous-type proneural et le sous-type neural. Ce point sera développé dans la partie 3.3 Aspects moléculaires du glioblastome.

	I	II	III	IV
<b>Tumeurs astrocytaires</b>				
Astrocytome subépendymaire à cellules géantes	*			
Astrocytome pilocytaire	*			
Astrocytome pilomyxoïdes		*		
Astrocytome diffus		*		
Xanthoastrocytome pleomorphique		*		
Astrocytome anaplasique			*	
<b>Glioblastome</b>				*
<b>Glioblastome à cellules géantes</b>				*
<b>Gliosarcome</b>				*
<b>Tumeurs oligodendrogiales</b>				
Oligodendrogliome		*		
Oligodendrogliome anaplasique			*	
<b>Tumeurs oligoastrocytaires</b>				
Oligoastrocytome		*		
Oligoastrocytome anaplasique			*	

**Tableau 1 : Classification WHO selon la quatrième édition parue en 2007 [12].**

L'inconvénient majeur de cette classification est son manque de reproductibilité inter- et intra-observateur expliquant les discordances : les problèmes de reproductibilité reposent sur plusieurs facteurs : la difficulté à distinguer les cellules tumorales du parenchyme résiduel infiltré, à reconnaître le type précis de cellules tumorales (astrocyte ou oligodendrocyte), et la possibilité que le prélèvement soit non représentatif de la tumeur [13]. De plus, cette classification repose sur les données histologiques et ne tient pas compte des données cliniques et de l'imagerie [14].

Pour pallier à ces problèmes de reproductibilité, une autre **classification** a été proposée par le Pr Daumas-Duport de l'hôpital **Sainte Anne**. Elle associe les données cliniques et de l'imagerie aux données histologiques [15].

### 3.2 Epidémiologie des tumeurs gliales et glioblastome

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus communes chez l'adulte. Ils peuvent survenir n'importe où dans le système nerveux central et peuvent être d'origine astrocytaire, oligodendrocytaire ou les deux.

L'incidence globale des gliomes est comprise entre 4,67 et 5,73 cas pour 100 000 habitants selon les régions [16]. Les glioblastomes sont la forme la plus sévère et la plus commune de gliome chez

l'adulte et leur incidence varie de 2,0 en Finlande à 3,3 en Amérique du Nord, Autriche et Israël et 4,96 cas pour 100 000 habitants en Gironde [17]. Il y a environ 2000 nouveaux cas recensés en France par an [18]. L'incidence augmente progressivement avec l'âge avec un pic entre 75 et 84 ans. Les glioblastomes sont prédominants chez les hommes plutôt que chez les femmes avec un rapport allant de 1,5 à 1,8/1 selon les études. Les GBMs sont majoritairement primaires (90%). Les patients avec des GBMs primaires sont généralement plus âgés (moyenne d'âge 55 ans) que les patients avec des GBMs secondaires (moyenne d'âge 40 ans). Les GBMs secondaires sont associés à un meilleur pronostic [19].

L'incidence des glioblastomes augmente d'environ 1% par an ce qui s'explique par le vieillissement de la population mais aussi par l'amélioration des techniques d'imagerie et le développement des biopsies stéréotaxiques.

### 3.3 Aspects moléculaires du glioblastome

La classification WHO permet de classer les tumeurs gliales selon des critères histologiques et attribue un grade selon la présence de mitose, la prolifération de l'endothélium vasculaire et la nécrose. Cette méthode permet de prendre en compte de nombreuses informations mais laisse cependant passer certaines variantes. Les avancées récentes dans les techniques d'analyse moléculaire permettent maintenant d'inclure des critères portant sur les anomalies moléculaires et les voies de signalisation impliquées dans la gliomagenèse.

Le glioblastome a été le premier cancer à être systématiquement étudié par le *Cancer Genome Atlas Research* qui a révélé des anomalies récurrentes au niveau de trois voies :

- la voie du rétinoblastome (RB) (délétion du *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2C* [CDKN2A/CDKN2C], mutation de RB, amplification du cluster de différenciation 4/6 [CD4/CD6]),
- la voie de la protéine 53 (TP53) (délétion de CDKN2A, mutation de TP53, amplification de *mouse double minute 1/4* [MDM1/MDM4]), et
- la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase (mutation de la *phosphatase and tensin homolog / neurofibrin 1 / phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha* [PTEN/NF1/PIK3CA], amplification de *l'epidermal growth b factor receptor / platelet derived growth factor receptor* [EGFR/PDGFR]) [20].

**La voie du rétinoblastome (RB)** joue un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire au stade G1. En effet, les complexes CDK2/Cyclin E et CDK4/Cyclin D phosphorylent la protéine Rb. Cette phosphorylation conduit à l'inactivation de pRb et sa dissociation du complexe pRb/E2F. La protéine E2F ainsi libérée peut induire l'expression de gène de la phase S. L'inactivation de pRb permet donc l'entrée en phase S et la synthèse de l'ADN. Rb est régulée positivement par le gène suppresseur de tumeur *16kb inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a* (p16INK4a). Ce gène est codé par le locus *cyclin-dependent kinase inhibitor 2α* (CDKN2A) situé sur le chromosome 9q21. Le gène p16/INK4a bloque l'entrée en phase S en empêchant la phosphorylation de pRb [21].

En présence d'un stress, la **protéine p53** induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'induction de l'apoptose ou de la sénescence. Ces stress peuvent être de nature oncogénique ce qui explique que la voie de p53 soit fréquemment mutée dans le cancer. La régulation de p53 est complexe. Dans les conditions normales, la durée de vie de cette protéine est très brève et elle est rapidement dégradée. Elle est liée à la protéine MDM2 dans sa partie N-terminale ce qui conduit à l'ubiquitination de p53 et à sa dégradation par le protéasome. La protéine p53 est régulée par p14ARF, codé lui aussi par le locus CDKN2A du chromosome 9q21. La protéine ARF va se lier à MDM2 (*murine double minute 2*), libérant ainsi p53 qui va pouvoir faire son activité transcriptionnelle.

Les voies de signalisation induites par activation de récepteurs à activité tyrosine kinase seront présentées dans la revue figurant au chapitre I de cette thèse.

L'étude des anomalies moléculaires les plus fréquemment rencontrées dans le glioblastome a permis d'identifier des altérations propres aux GBMs primaires (GBM I) survenant *de novo* et d'autres caractéristiques des GBMs secondaires (GBM II) dérivant d'un gliome de bas grade.

### 3.3.1 Les glioblastomes primaires

Parmi les altérations donnant lieu à l'apparition de GBM I, on observe une amplification/surexpression de la voie RTK/PI3K/RAS. L'amplification et la surexpression la plus fréquente dans les GBMs I (30% à 70%) est celle de l'EGFR. La **mutation EGFRvIII** (*Epidermal Growth Factor III*) est la mutation prédominante (35% des GBMs où l'EGFR est amplifié)[22]. Le récepteur tronqué obtenu conserve son activité tyrosine kinase intracellulaire et active de façon constitutive la voie de signalisation PI3K favorisant ainsi la survie cellulaire, la prolifération et l'invasion [23]. Les GBMs présentant une activation constitutive de l'EGFR sont plus invasifs et sont associés à une faible survie [24-25].

Ces anomalies semblent être associées à des pertes du chromosome 10q (70%), à des mutations de PTEN (40%) ainsi qu'à des pertes en 9p21 (p16INK4A/p14ARF) qui marqueraient l'apparition de GBM I. La perte des gènes suppresseurs de tumeurs p16INK4A et p14ARF est caractéristique du GBM I [19, 22, 26-28].

La perte d'hétérozygotie ou LOH (*Loss of Heterozygosity*) la plus fréquente dans les GBMs, aussi bien primaires que secondaires, est celle du **chromosome 10**. Elle est présente dans 60% à 90% des cas [27]. Un des gènes codé par le chromosome 10 est **PTEN**, localisé en 10q23. La protéine PTEN régule négativement la PI3K/AKT en inhibant la phosphorylation de PIP2 et PIP3. La perte de PTEN est présente dans 90% des GBMs I [22] et contribue à l'activation constitutive de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR (*mammalian target of rapamycin*).

### 3.3.2 Les glioblastomes secondaires

Les **mutations de p53** sont plus fréquentes dans les GBMs II (65%) que les GBMs I (30%) [19]. L'amplification ou la mutation de MDM2 est retrouvées dans 10% à 15% des GBMs [29-30].

La perte du chromosome 10q (70%), la perte du chromosome 19q [31], les mutations de PTEN (10%), ainsi qu'une amplification et/ou la surexpression de PDGFR (10%) et de PI3K (phosphoinositide 3-kinase) (10%) sont souvent retrouvées dans les GBMs II [19, 28].

Mais, pour les GBMs II, on retrouve essentiellement des mutations de ***l'isocitrate deshydrogenase-1 (IDH-1)*** [32]. Il existe deux isoformes principales pour le gène IDH, le gène IDH1 code pour l'enzyme cytosolique IDH1 et le gène IDH2 pour l'enzyme mitochondriale IDH2. L'isocitrate déshydrogénase permet la transformation de l'isocitrat en  $\alpha$ -cétoglutarate avec réduction du NADP<sup>+</sup> (*Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*) et NADPH. Lorsque l'enzyme IDH1 ou IDH2 est mutée, l'activité de conversion en  $\alpha$ -cétoglutarate diminue. D'autre part, l'enzyme mutée convertit l' $\alpha$ -cétoglutarate en D-2-hydroxyglutarate de manière NADPH-dépendante, activant ainsi la voie de l'hypoxie, un acteur clé de l'angiogénèse. De plus, l'accumulation du D-2-hydroxyglutarate dans la cellule entraîne l'inhibition des 5-méthyl-cytosine hydroxylases (TET1 et TET2, *Ten-Eleven Translocation methylcytosine dioxygenase 1*) donnant lieu à une modification épigénétique profonde avec une hyperméthylation de l'ADN et des histones [33]. Cette hyperméthylation concerne notamment la méthylation du gène MGMT.

### 3.3.3 Classification des GBMs par leur « signature moléculaire »

L'analyse de l'expression génomique des glioblastomes a permis d'identifier quatre sous-types de GBM possédant des altérations génétiques et un profil d'expression distincts [20, 34-35]:

**Le type classique**, est caractérisé par une activité aberrante de l'EGFR liée à une surexpression de ce récepteur [20, 22, 35]. De plus la perte du chromosome 10 est fréquemment observée. En revanche, il y a peu de mutation de TP53, NF1 et IDH1 [22]. L'activation des voies Notch et Sonic Hedgehog est aussi à noter dans ce groupe [22].

**Le type mésenchymateux**, est caractérisé par des délétions du codon 17q11 contenant le gène *NF1* ainsi que par des délétions de *PTEN* qui conduisent à une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR. La surexpression de l'EGFR est moins fréquente que dans les autres formes de glioblastome [22]. Comme décrit par Phillips, ce groupe exprime fortement des marqueurs mésenchymateux tels que *YKL-40/CHI3L1*, *CD44*, *MET* et *MERTK* [35].

**Le type proneural** est caractérisé par deux altérations majeures, l'amplification de *PDGFRA* et la mutation de *IDH1*. De plus, ce sous-type présente le plus fort taux de mutation de *TP53* (54%). Il exprime fortement les marqueurs d'oligoastrocytes (*OLIG2*, *PDGFRA*, *NKX2-2*) ainsi que les gènes impliqués dans le développement proneural (*DCX* (Doublecortin), *DLL3n* *ASCI1* (*achaete-scute family bHLH transcription factor 1*), *TCF4* (*transcription factor 4*) [35]. Ce groupe est aussi caractérisé par la surexpression des protéines PDGFRA, PTEN, MEK (MAP kinase kinase) et ERK (*extracellular-signal-*

*regulated kinases*), totale ou phosphorylée, mettant en évidence une activation de la voie de signalisation Ras [21, 34].

**Le type neural** a été identifié récemment. Il est caractérisé comme ayant une forte expression des marqueurs neuronaux tels que NEFL (*neurofilament, light polypeptide*), GABRA1 (*gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1*), SYT1 (*synaptotagmin I*) et SLC12A5 (*solute carrier family 12 (potassium/chloride transporter), member 5*) [22].

## 3.4 Diagnostic et facteurs pronostics et prédictifs

### 3.4.1 Le diagnostic

**Les symptômes** et tableaux cliniques des glioblastomes sont variables en fonction de la localisation de la tumeur et des fonctions des zones cérébrales touchées. Ainsi chez les patients atteints de tumeurs frontales, on peut observer des troubles de la personnalité, le plus souvent sous forme de dépression alors que chez les patients avec des tumeurs corticales, une crise d'épilepsie peut être un premier symptôme. Il est aussi possible d'observer des parésies/paralysies ou un hémisyndrome. Les céphalées sont rarement des symptômes inauguraux mais la survenue de céphalées violentes et persistantes doit amener à évoquer ce diagnostic [36].

**L'imagerie cérébrale** doit alors être réalisée pour confirmer ou infirmer un diagnostic de suspicion. Le **CT-scanner** (Computed Tomography) et **l'IRM** (Imagerie par résonance magnétique) sont les techniques d'imagerie utilisées. Ces techniques nécessitent l'utilisation de produits de contraste iodés ou hydrosolubles rendus visibles par rayons X pour le CT-scanner ou des produits aux propriétés magnétiques comme le gadolinium pour l'IRM. Le CT-scanner permet de mettre en évidence la localisation de la tumeur et d'en évaluer la taille. L'IRM permet de visualiser les tissus mous et de visualiser la tumeur avec plus de précision ce qui permet de mieux délimiter ces contours et son impact sur les structures environnantes (Figure 8). Les GBMs présentent une prise de contraste au gadolinium avec un centre nécrotique (zone hypodense), le plus souvent entouré d'un œdème péri-lésionnel. L'IRM permet de préciser si la tumeur est unique ou multifocale et de juger de son opérabilité.

L'imagerie peut être associée à la **SRM** (spectroscopie par résonance magnétique) qui permet d'estimer le taux de prolifération des cellules tumorales et de la nécrose. Les GBMs sont caractérisés par une augmentation du pic de choline (hyperplasie cellulaire et inflammatoire), du pic de lactate (hypoxie, pic non visible en conditions normales), des pics de lipides (altération des membranes, nécrose) ainsi qu'une diminution du pic de N-acetyl-aspartate (perte ou déplacement neuronal) et du pic de créatinine (régulation de l'oxygène) [37].

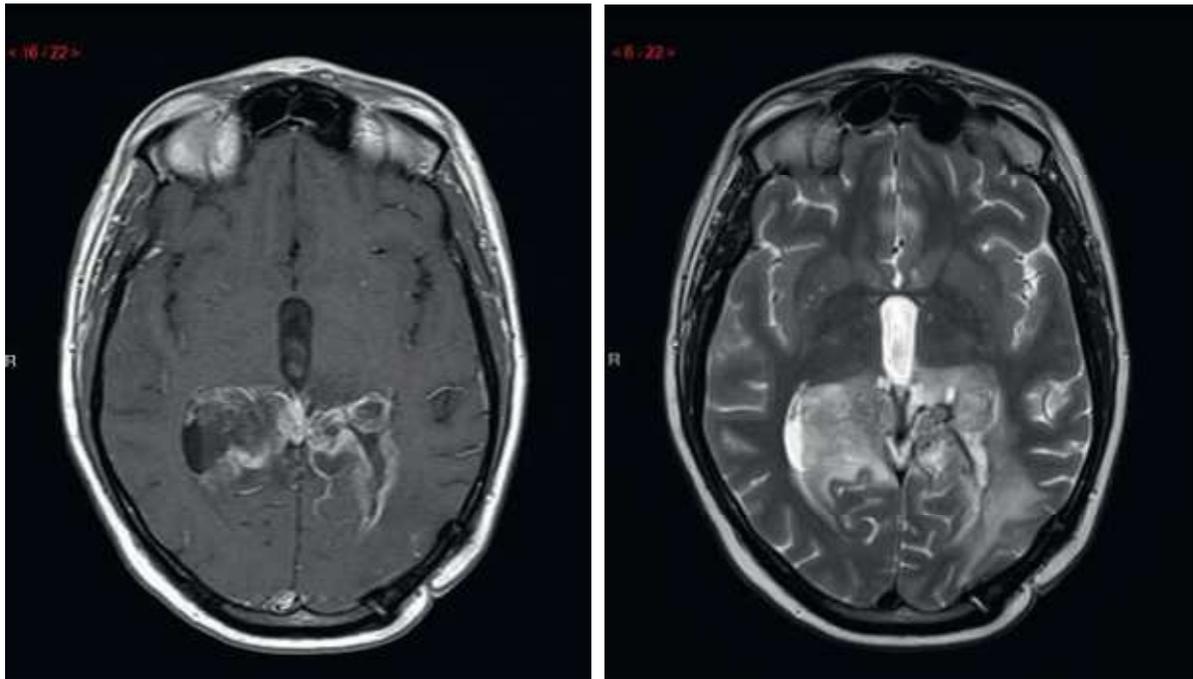


Figure 8 : Diagnostic des gliomes par IRM. A gauche : T1 avec accumulation de produit de contraste et nécrose centrale. A droite : T2 avec œdème périlésionnel modéré. [36]

Cependant, l'imagerie cérébrale n'est pas suffisante pour permettre un diagnostic précis, elle est donc obligatoirement associée à l'analyse anatomo-pathologique (Figure 9).

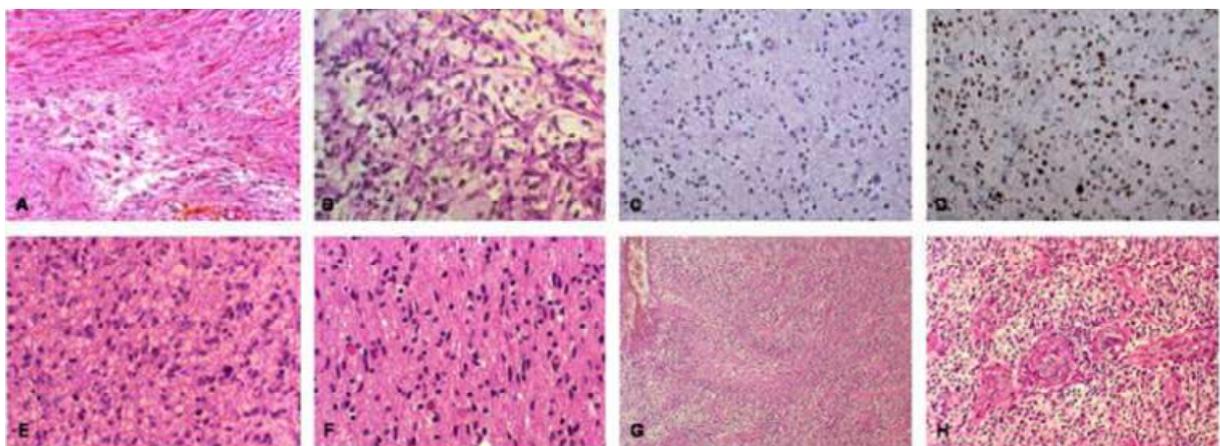


Figure 9 : Les tumeurs astrocytaires selon l'OMS.

A : Astrocytome pilocytique dans sa forme classique, biphasique (OMS, grade I), B : Astrocytome pilocytique de type pilomyxoïde (OMS grade II), C : astrocytome diffus de type fibrillaire (OMS, grade II), D : OLIG2 est exprimé dans de nombreuses cellules tumorales dans les astrocytomes fibrillaires (OMS grade II), E : astrocytome anaplasique, présence de mitoses et d'atypies nucléaires (OMS grade III), F : parenchyme cérébral infiltré par des cellules tumorales isolées (périphérie d'un glioblastome (OMS grade IV)), G et H : la présence de palissades périnécrotiques (G) et d'une prolifération microvasculaire (H) caractérisent la glioblastome (OMS grade IV). [38]

### 3.4.2 Les facteurs pronostics

Le glioblastome est la forme de tumeur gliale qui a le plus mauvais pronostic avec une survie à cinq ans comprise entre 0,05% et 4,7% [16]. Des études ont toutefois montré que **l'âge du patient, le performance status, le minimal-mental status (MMS), le type histologique et l'étendue de l'exérèse chirurgicale** sont les facteurs pronostics les plus importants [39].

Certaines études ont recherché s'il existait un lien entre le pronostic et la présence de certaines anomalies moléculaires. Ainsi la présence de mutations de **l'IDH1 et l'IDH2** est un facteur pronostic plutôt favorable et est retrouvée dans les glioblastomes secondaires et dans une plus faible proportion dans les glioblastomes primaires (5%-10%) [32, 40-41]. En revanche, l'expression du variant III de l'EGFR (**EGFRvIII**) retrouvé dans 25% à 33% des glioblastomes ne semble pas être un facteur pronostic majeur [39].

### 3.4.3 Les facteurs prédictifs

Le statut de la O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (**MGMT**) est un facteur prédictif important dans le glioblastome. Le gène de cette enzyme de réparation de l'ADN est situé sur le chromosome 10q26. Il peut être la cible de modifications épigénétiques au niveau de son promoteur par exemple la méthylation du promoteur de ce gène entraîne une perte d'expression du gène et de la protéine MGMT [39]. On estime que la MGMT n'est exprimée que dans 30% des gliomes [42]. Plusieurs études ont montré que les patients avec le gène de la MGMT méthylé vivent plus longtemps que les autres patients dans les cas où le protocole de chimiothérapie inclut des agents alkylants de type témozolomide [43-45].

Par ailleurs, l'étude de Mellinghoff *et al.* a montré que la coexpression de **l'EGFRvIII et de PTEN** est fortement associée à la réponse aux inhibiteurs de l'EGFR tel que l'erlotinib (Terceva®, OSI-774) et le gefitinib (Iressa®, ZD1839) [46].

## 4 Les traitements du glioblastome

Le traitement standard du GBM préconise une résection maximale de la tumeur suivie par de la radiothérapie au niveau de la cavité post-chirurgicale et de la chimiothérapie avec un agent alkylant, le témozolomide (Témodal®) (TMZ). L'acte chirurgical seul permet d'atteindre une médiane de survie d'environ six mois. L'action combinée de la chirurgie avec la radiothérapie prolonge la médiane de survie jusqu'à 12,1 mois. L'ajout de TMZ à ce protocole prolonge d'avantage la médiane de survie jusqu'à 14,6 mois [47].

---

## 4.1 La chirurgie

La chirurgie est un élément important dans le traitement du glioblastome. Le résidu tumoral post-opératoire étant très souvent à l'origine des rechutes, la résection chirurgicale doit être la plus large possible sans entraîner de risque fonctionnel majeur [48]. L'acte chirurgical n'est cependant pas toujours possible et sa faisabilité dépend de l'âge du patient, de son état général, de son état clinique et des données anatomiques et fonctionnelles, du type présumé de la tumeur et des supports techniques disponibles pour la chirurgie.

Si l'intervention chirurgicale est possible, des aides techniques peuvent optimiser l'exérèse chirurgicale comme l'IRM per-opératoire, l'IRM à tenseur de diffusion, la chirurgie éveillée, la cartographie per-opératoire, la stéréotaxie et la résection fluoroguidée qui permettent de délimiter plus facilement les bords de la tumeur et aident à réaliser une résection de manière la plus sûre possible [49-51]. La résection fluoroguidée utilise des agents pharmacologiques tel que le 5-*aminolevulinic acid* (5 ALA) qui s'accumulent au niveau de la tumeur mais pas au niveau du tissu sain environnant et fluorescent lorsqu'ils sont exposés à une certaine longueur d'onde. Cette fluorescence peut être utilisée pour guider la résection en faisant apparaître le tissu tumoral qui pouvait apparaître par ailleurs normal [49-50, 52-53]. La chirurgie éveillée avec cartographie de stimulation peut être discutée pour les GBMs situés en zone fonctionnelle. Comme pour les gliomes de grade moyen, elle diminue par deux le risque de déficit neurologique persistant sans compromettre l'extension de la résection [54].

## 4.2 La chimiothérapie

### 4.2.1 Le traitement standard

L'étude internationale EORTC (*European Organization for the Research and Treatment of Cancer*) a redéfini en 2005 le traitement standard dans le glioblastome. La radiothérapie fractionnée (30 fois 2 Gy, 60 Gy) est combinée à une chimiothérapie quotidienne simultanée au témozolomide (TMZ) pendant six semaines, puis suivie d'une thérapie adjuvante d'entretien durant six cycles de cinq jours à intervalles de quatre semaines [47].

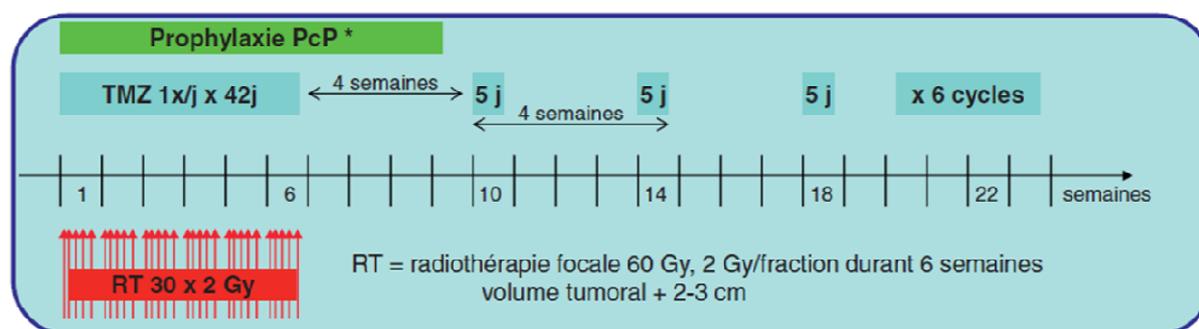


Figure 10 : Schéma thérapeutique dans le glioblastome [36].

**Concomitant :** pendant la RT : 75mg/m<sup>2</sup> par jour (y compris le week-end), max 49 jours, à jeun, *per os* 1-2 heures avant la RT ou l'après-midi des jours sans RT.

**Adjuvant :** 200 mg/m<sup>2</sup> (premier cycle 150 mg/m<sup>2</sup>) par jour pendant 5 jours sur 6 cycles.

La radiothérapie par rayon X est administrée au niveau de la cavité post-chirurgicale avec 2cm de marge au niveau du tissu sain environnant. Les radiations ionisantes vont induire des cassures simple brin et double brin au niveau de l'ADN des cellules en prolifération.

Le témozolomide est un agent alkylant qui génère des dommages à l'ADN ce qui va conduire à l'apoptose des cellules ciblées. L'intérêt de l'association TMZ+RT en complément de la chirurgie a été démontré dans un essai clinique réalisé en 2005. Stupp *et al.* ont démontré que la médiane de survie des patients traités par l'association TMZ+RT avec un traitement adjuvant au TMZ augmentait significativement par rapport aux patients traités par radiothérapie seule (14,6 mois versus 12,1 mois) [47].

Comme il a été dit précédemment, le statut MGMT méthylé est un facteur prédictif important dans le glioblastome. En effet, le TMZ cible en particulier la O6-méthylaguanine en y ajoutant un groupement méthyle ce qui conduit à des dommages à l'ADN. Ce groupement méthyle peut être enlevé par la MGMT qui est une protéine de réparation de l'ADN. Cette action conduit à une résistance cellulaire à la chimiothérapie par témozolomide ou les autres agents alkylants. Chez certains patients, le promoteur du gène MGMT est méthylé donc la protéine correspondante n'est pas exprimée ce qui conduit à une meilleure sensibilité au TMZ [44].

La mise place d'implant de carmustine (Gliadel®) dans la cavité post-chirurgicale a une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le traitement de première ligne et la récurrence. Tout comme le TMZ, la carmustine est un agent alkylant. Ces implants biodégradables imprégnés de carmustine permettent une libération prolongée de la chimiothérapie. Une analyse Cochrane [55] et une méta-analyse [56] ont conclu à une augmentation de la survie, sans augmentation des effets indésirables en première ligne. La combinaison d'un schéma Stupp et de Gliadel® est possible mais aucune étude randomisée n'a permis d'évaluer son apport par rapport au protocole Stupp seul [57].

Ces traitements sont accompagnés de traitements adjuvants comme les corticoïdes qui visent à réduire l'œdème péri-tumoral. La dexaméthasone (Fortecotin®) est prescrite à raison de 3-4 fois 4mg, une à deux fois par jour. Un traitement anti-émétique par sétron peut être proposé, au moins au début de la radiochimiothérapie, avec un relais secondaire par le métoclopramine ou la dompéridone. Enfin, un traitement anti-épileptique peut être proposé si la tumeur a été

diagnostiquée à la suite de crise d'épilepsie. Les molécules telles que la lévétiracétam (Keppra®) et la prégabaline (Lyrica®) sont habituellement utilisées en raison de leur bonne tolérance [36].

Malgré les progrès réalisés dans les traitements de première ligne, la plupart des patients souffrent à plus ou moins long terme de rechute. La stratégie thérapeutique à adopter va alors dépendre des traitements que le patient a reçus en première ligne, de la durée de l'intervalle sans traitement, de la taille et la localisation de la récurrence ainsi que du nombre de nouvelles lésions. Le choix des nouvelles options thérapeutiques est alors discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Une nouvelle intervention ou une nouvelle radiothérapie peut être indiquée selon le cas.

Une chimiothérapie de seconde ligne standardisée fait actuellement défaut. Pour les patients éligibles, l'inclusion dans un essai clinique est souhaitable. Hors essai et si l'état général et le statut neurologique du patient le permettent, un traitement de seconde ligne peut être proposé. Il peut consister en une reprise du TMZ s'il y a eu un intervalle libre entre le traitement adjuvant et la récurrence, en l'utilisation de nitroso-urée tels que la bélustine, la carmustine et la fotémustine (Muphoran®). Il a été montré que l'association carboplatine et étoposide donne 20% à 30% de réponses pour des gliomes de haut grade récidivants mais son impact sur la survie sans progression n'est pas démontré [58-60]. Enfin le bévaccinumab (Avastin®) peut être utilisé à raison de 10 mg/kg en intraveineuse sur 90 minutes tous les 15 jours. Cet anticorps monoclonal humanisé cible le VEGF circulant. Il permet d'obtenir 30% à 50% de réponses chez les patients atteints de GBM en rechute après radiochimiothérapie. La survie sans progression à six mois est de l'ordre de 40% [61-62]. Ce taux élevé de réponse a été confirmé par une méta-analyse [63]. Le bévaccinumab a été enregistré par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis, mais pas par l'agence européenne du médicament en raison du manque de preuve directe d'augmentation de la survie. Un essai EORTC est en cours pour répondre à cette question. L'association irinotécan/bévaccinumab n'apporte pas d'avantage en termes de survie par rapport au bévaccinumab seul et paraît plus mal tolérée [64].

#### 4.2.2 Stratégies thérapeutiques en développement

La principale contrainte pour les traitements à destination du SNC est le passage de la BHE, ils doivent donc avoir des propriétés lipophiles. Dans le glioblastome, la BHE est partiellement perméable mais uniquement au niveau de la masse tumorale et non dans la zone d'infiltration.

Afin d'optimiser la prise en charge des patients atteints de glioblastome et d'améliorer leur espérance de vie, de nombreux outils thérapeutiques ont été développés et sont résumés dans le Tableau 2. Le développement de thérapies ciblées dirigées contre les anomalies moléculaires des cellules de GBM. Elles peuvent être divisées en deux catégories : les petites molécules inhibitrices et les anticorps monoclonaux. Les petites molécules inhibitrices sont capables de traverser les membranes et cibler des composants intracellulaires. La plupart de ces petites molécules sont des inhibiteurs de tyrosine kinase (*tyrosine kinase inhibitor*, TKI) qui agissent en ciblant sélectivement le domaine intracellulaire de récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), ils bloquent ainsi leur activation et celle de la voie de signalisation qui en découle. A l'inverse, les anticorps monoclonaux (mAb) sont trop gros pour passer les membranes cellulaires et sont donc utilisés pour cibler les protéines de surface et les peptides extracellulaires [65].

L'immunothérapie est aussi développée dans le traitement contre le GBM. Elle peut être divisée en deux catégories : l'immunothérapie passive qui utilise des anticorps, des cellules immunitaires et d'autres composants du système immunitaire pour cibler les cellules cancéreuses et l'immunothérapie active a pour but de stimuler le système immunitaire du patient [65]. La première stratégie ne nécessite pas l'activation du système immunitaire du patient puisque les cellules immunitaires sont activées *ex vivo* puis réinjectées. Des *Lymphocyte-activated killer* (LAK) et des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) ont notamment été développés pour détruire les cellules de GBM. A ce jour, les CTLs semblent être mieux tolérés que les LAKs, sans doute en raison de leur plus grande spécificité pour les cellules cancéreuses. Les résultats d'essais cliniques n'ont cependant pas pu montrer de bénéfices cliniques [65]. L'immunité active est semblable au concept de vaccination. Le Rindopepimut est un peptide injectable formé pour stimuler la réponse immunitaire contre l'antigène EGFRvIII. Les premiers essais cliniques ont donné des résultats encourageants chez les patients exprimant ce variant de l'EGFR [65].

Thérapies ciblées				
Stratégies	Cible	Molécule	Effets	Références
Inhibition des voies de signalisation activée par les facteurs de croissance	EGFR	Gefitinib	Peu ou pas de bénéfices cliniques	[66-67]
		Erlotinib (TKIs)		
		Cetuximab (mAb)	Peu de bénéfices cliniques	[68]
	PDGFR	Imatinib (TKI)	Pas d'efficacité thérapeutique et peu de bénéfices cliniques	[69-70]
Inhibition de l'angiogénèse	VEGF	Bevacizumab (Avastin®) (mAb)	Bénéfices cliniques et amélioration de la survie sans progression. Cependant l'ajout du bévacizumab au TMZ+RT chez des patients nouvellement diagnostiqués n'améliore pas leur pronostic.	[51, 61-62, 71] [72-73]
		Cediranib, sunitinib, vatalanib (TKIs)	Pas de bénéfices cliniques	[74-76]
	Intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$	Cilengitide	En association avec le TMZ et RT, pas d'amélioration de la survie sans progression ni de la survie globale	[77]
Inhibition intracellulaire des voies de signalisation	AKT	Perifosine	Essai clinique en cours #NCT01051557	
	mTOR	Rapamycin, temsirolimus, sirolimus, everolimus	Bénéfices thérapeutiques limités	[78-80]
	Farnesyl transférase	Tipifarnib, lonafarnib	Pas de bénéfices cliniques	[80-81]

**Tableau 2 : Thérapies ciblées dans le glioblastome.**

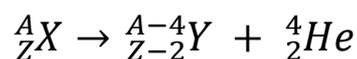
## 4.3 La radiothérapie

### 4.3.1 Les rayonnements ionisants

La radiothérapie utilise les rayonnements ionisants pour induire des dommages à l'ADN, empêcher la prolifération et induire l'apoptose des cellules ciblées. Pour cela, le patient est soumis à des rayonnements ionisants qui focalisent au niveau de la zone tumorale. Plusieurs types de rayonnements existent en fonction des particules émises, et sont utilisés en clinique pour de la radiothérapie ou de l'imagerie.

Il existe deux types de rayonnements : les rayonnements avec des particules chargées (électrons, protons, particules alpha) et les rayonnements avec des particules non chargées (photons, neutrons, rayons X et rayons gamma).

**Le rayonnement alpha** (ou rayonnement  $\alpha$ ) survient lors de la désintégration d'un noyau lourd présentant un excès de protons (nombre de masse supérieur à 200). Un noyau père  $X$  éjecte une particule  $\alpha$  (particule d'hélium  ${}^4_2\text{He}$ ) et se transforme en un noyau fils  $Y$  selon l'équation :

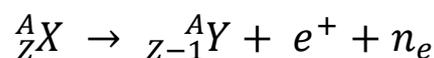


(A représente le nombre de masse et Z le numéro atomique)

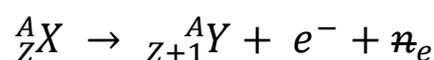
Le rayonnement  $\alpha$  étant constitué d'une particule lourde, il est très peu pénétrant et peut être arrêté par une simple feuille de papier. En revanche, il est très ionisant.

**Le rayonnement bêta** (ou rayonnement  $\beta$ ) provient de l'émission d'un positon (rayonnement  $\beta^+$ ) ou d'un électron (rayonnement  $\beta^-$ ). L'électron et le positon étant des particules légères, le rayonnement  $\beta$  est beaucoup plus pénétrant que le rayonnement  $\alpha$  mais moins ionisant. Il faut une feuille métallique de quelques centimètres d'épaisseur pour arrêter ce rayonnement.

La radioactivité  $\beta^+$  concerne les nucléides avec un excès de protons. Elle se manifeste par la transformation, dans le noyau, d'un proton en neutron, qui aboutit à l'émission d'un positon et d'un neutrino électronique  $n_e$  :



La radioactivité  $\beta^-$  concerne les nucléides avec un excès de neutrons. Elle se manifeste par la transformation dans le noyau, d'un neutron en proton, qui aboutit à l'émission d'un électron et d'un antineutrino électronique  $\bar{n}_e$  :



Les rayonnements  $\beta^-$  sont utilisés en radiothérapie et en imagerie (*Single photon emission computed tomography* SPECT) alors que les rayonnements  $\beta^+$  ne sont utilisés qu'en imagerie (Tomographie à émission de positon TEP).

**Le rayonnement gamma** (ou rayonnement  $\gamma$ ) est une émission de photons produits par la désintégration de noyaux atomiques ou par des phénomènes subatomiques comme l'annihilation d'un couple électron-positon. Les rayons  $\gamma$  sont plus pénétrants que les rayons  $\alpha$  et  $\beta$ , mais sont moins ionisants. Ils sont de même nature que les rayons X mais d'origine différente. Les rayons  $\gamma$  sont produits par des transitions nucléaires tandis que les rayons X sont produits par des transitions électroniques provoquées en général par la collision d'un électron avec un atome.

**Les rayons X** sont aussi des émissions de photons. Ils peuvent être produits de deux manières : par transition électronique et par accélération des électrons.

Dans la transition électronique, un électron du niveau  $E_0$  passe au niveau supérieur  $E_1$  après excitation. Cette excitation peut être provoquée par des rayons X ou par un bombardement d'électrons. Dans l'accélération des électrons, tout électron soumis à une accélération émet des ondes électromagnétiques.

## 4.3.2 Les effets des rayonnements sur la matière

### 4.3.2.1 Le transfert d'énergie linéique (TEL)

Il reflète directement les dommages biologiques d'un rayonnement. C'est la quantité d'énergie libérée par une particule radioactive le long de son parcours de désintégration. Ainsi, les particules à TEL élevé (particules  $\alpha$  et  $\beta$ ) vont ioniser des atomes sur un parcours très court tandis que celles avec un TEL faible (rayons X et  $\gamma$ ) vont pouvoir faire des ionisations sur un parcours plus important.

En traversant la matière, les particules  $\alpha$  interagissent avec le cortège électronique des atomes du matériau traversé, ce qui les excite et les ionise. Ce phénomène se produit sur une courte distance (TEL très élevé) et par conséquent le dépôt d'énergie par unité de longueur traversée sera élevé. Cette énergie dissipée dans la matière se traduira par des excitations et des ionisations et donne lieu à des rayonnements secondaires.

Le rayonnement  $\beta^-$  interagit avec la matière en provoquant des excitations et des ionisations par diffusion. Le parcours des électrons dans la matière est plus important que celui des particules  $\alpha$ . La perte d'énergie du rayonnement du rayonnement  $\beta^-$  par unité de longueur sera moindre que celle du rayonnement  $\alpha$ . Il en sera de même du nombre d'excitation et d'ionisation.

Au cours de l'interaction des photons (X ou  $\gamma$ ) avec la matière, des électrons peuvent être libérés par effet photoélectrique, effet Compton ou par production de paires. Au moment de l'interaction, l'atome cible perd un électron et devient un ion positif. Les électrons ainsi libérés rencontrent d'autres atomes le long de leur trajet et sont responsables d'ionisation et d'excitation. On dit que les rayons X et  $\gamma$  sont des rayonnements ionisants indirects car leur effets sont d'avantages liés aux électrons émis qu'aux photons eux-mêmes.

#### 4.3.2.2 Les effets biologiques des rayonnements ionisants

Les effets biologiques des rayonnements ionisants sont la résultante de plusieurs phénomènes qui peuvent être résumés en quatre étapes : physique, chimique, cellulaire et tissulaire.

**La phase physique** correspond aux évènements physiques initiaux (ionisation, excitation) déclenchés par l'interaction des rayonnements incidents avec les atomes des molécules cellulaires. Ces évènements se produisent avec une extrême rapidité (de l'ordre de  $10^{-15}$  à  $10^{-16}$  secondes) et vont différer en fonction de la nature de la particule incidente :

- **Interaction photons-matière** : dans la gamme d'énergie des photons utilisés en radiothérapie, deux effets prédominent largement : **l'effet Compton** (l'énergie d'un photon incident transmise à un électron arraché à une couche périphérique d'un atome et à un photon dit diffusé) et **l'effet photoélectrique** (l'intégralité de l'énergie du photon incident est transférée à un électron arraché à une couche interne d'un atome, le réarrangement électronique qui s'ensuit entraîne l'émission soit d'un photon dit de « fluorescence » soit d'un électron Auger).
- **Interaction électrons-matière** : en radiothérapie, il peut s'agir soit des électrons « primaires » soit d'électrons « secondaires » produits au cours de l'interaction photon-matière. Deux types de phénomènes prédominent : des **interactions électrons-électrons**, appelées collisions, entraînant un transfert d'énergie qui s'épuise progressivement dans la matière et des **interactions électrons-noyau** ou phénomènes de freinage (l'électron est freiné lors d'un passage à proximité d'un noyau chargé positivement, et l'énergie perdue lors du freinage de l'électron est à l'origine de la production de photons X dits de freinage).

**La phase chimique** correspond aux réactions chimiques consécutives aux réarrangements moléculaires produits lors de la phase physique. Cette étape se situe de  $10^{-5}$  à une seconde après l'irradiation.

Les réactions chimiques en cause vont conduire essentiellement à la rupture des liaisons covalentes et donc à des scissions au sein des molécules. Chaque fragment moléculaire emporte avec lui l'un des électrons de la liaison covalente : cet électron « célibataire » sur une couche périphérique donne au fragment une réactivité chimique élevée. Ces radicaux libres vont réagir entre eux avec les molécules du milieu. Dans ce contexte, la **radiolyse de l'eau** joue un rôle majeur. L'ionisation d'une molécule d'eau va générer différents radicaux :  $e^-_{aq}$ ,  $HO^\bullet$ ,  $H^\bullet$ ,  $HO_2^\bullet$ ,  $H_3O^+$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $H_2$  [82].

L'irradiation agit au niveau de la membrane cellulaire, elle modifie sa perméabilité en induisant des chaînes de réactions, encore incomplètement connues, par l'intermédiaire de la dégradation des phospholipides (peroxydation lipidique). L'irradiation agit aussi dans le cytoplasme, au niveau des ribosomes et des mitochondries mais ce sont les lésions à l'ADN du noyau qui vont être responsables des effets biologiques des radiations ionisantes.

Ces lésions peuvent être :

- **Directes**, liées à l'interaction d'un électron d'ionisation avec la molécule d'ADN,
- Ou le plus souvent **indirectes**, par l'intermédiaire des radicaux libres créés par la radiolyse de l'eau.

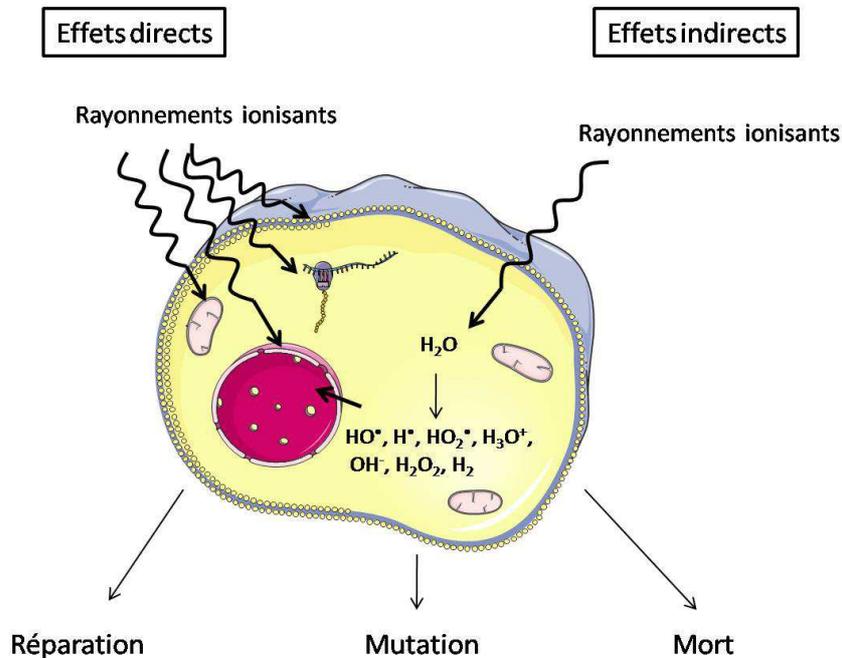


Figure 11 : Effets des radiations ionisantes.

**La phase cellulaire** se situe dans les heures qui suivent l'irradiation. Les lésions cellulaires sont la conséquence principale des lésions de l'ADN du noyau qui a subi des lésions simple-brin et/ou des lésions double-brin. Ces dernières sont les plus graves et les plus difficiles à réparer pour la cellule.

La cellule active alors les mécanismes de réparation de l'ADN qui peuvent entraîner :

- Des **réparations complètes** : les lésions, même double-brin sont réparées intégralement permettant une restitution *ad integrum* du génome de la cellule irradiée, et la suite normale de la vie et de la division cellulaire.
- Des **réparations fautives** : malgré les performances des enzymes de réparation de l'ADN, celles-ci peuvent commettre des erreurs. Certaines de ces altérations (mutation) n'empêchent pas la cellule de vivre et de se multiplier. La plupart de ces mutations sont récessives et n'ont donc pas d'impact biologique. Le danger survient lorsque la mutation est dominante ou si une autre mutation survient par la suite et, en s'ajoutant à la mutation radio-induite, entraîne la cellule vers un processus de cancérisation.
- La **mort cellulaire** : c'est le but recherché en radiothérapie. Elle survient lorsque la cellule ne peut pas réparer les lésions créées.

**La phase tissulaire** correspond aux conséquences des lésions cellulaires au niveau des tissus et des organes. Ces conséquences peuvent s'observer de plusieurs à plusieurs années après l'irradiation.

L'efficacité d'une irradiation peut dépendre de différents facteurs :

- La **radiosensibilité intrinsèque** d'une cellule,
- Le **cycle cellulaire** : la radiosensibilité est maximale en phase G2/M et minimale en phase S.
- **L'effet de l'oxygène** : la présence de l'oxygène est indispensable à l'action biologique des radiations ionisantes afin de former du peroxyde, responsable de cassures de l'ADN. En absence d'oxygène (hypoxie), les cellules sont moins sensibles aux radiations. La dose nécessaire pour détruire une cellule en hypoxie est 2,5 à 3 fois plus importante que pour détruire une cellule bien oxygénée.
- Le facteur temps : il comprend le fractionnement et l'étalement d'une irradiation. Le **fractionnement** consiste à administrer des doses faibles d'irradiation de manière répétée (tous les jours voire plusieurs fois par jour) afin de laisser le temps aux cellules saines de réparer leur ADN tout en administrant une dose finale élevée. L'étalement est la durée totale du traitement. En réduisant l'étalement, il est possible de dépasser le temps de doublement des cellules tumorales et d'augmenter leur destruction.
- **L'effet dose** prend en compte l'organe cible pour calculer la dose maximale administrable.[83]

### 4.3.3 Pratique clinique

Dans le cadre du protocole Stupp, il est prévu une irradiation de 60 Gy en fractionné (30 séances de 2 Gy par jour). Cette irradiation est classiquement réalisée au moyen d'un accélérateur de particules (Figure 12).



Figure 12 : Accélérateur linéaire.

La radiothérapie externe par rayon X doit être débutée dans un délai de quatre à six semaines après l'intervention chirurgicale sous réserve que la cicatrisation du scalp soit faite.

Les difficultés du traitement par radiothérapie des tumeurs cérébrales, outre leur radiorésistance, provient aussi de la définition du volume à traiter. La définition du volume tumoral macroscopique (*Gross Tumor Volume* GTV) et du volume cible anatomo-clinique (*Clinical Target Volume* CTV) des tumeurs gliales repose sur l'analyse des images TDM-IRM. Le GTV correspond à la tumeur rendue visible par le produit de contraste (séquence T1 gadolinium) et/ou au lit opératoire. Le CTV correspond au GTV auquel on ajoute une marge pour prendre en compte les éventuelles extensions microscopiques de la tumeur. Ce volume est adapté pour chaque patient en fonction de la position de la tumeur par rapport aux organes à risque et aux structures voisines. Pour les glioblastomes, le CTV est souvent défini comme le GTV + 10 mm [84]. Certaines précautions doivent être prises, notamment un tiers de l'encéphale ne doit pas recevoir plus de 60 Gy et deux tiers de l'encéphale ne peuvent pas recevoir plus de 50 Gy. Enfin, l'ensemble de l'encéphale ne peut pas recevoir plus de 45 Gy [85-86]. De plus il y a un risque de neuropathie optique de 3% à 7% à partir de 55 Gy. Ce risque augmente jusqu'à 7% à 20% au-delà d'une dose maximale de 60 Gy sur le chiasma [85].

Comme nous l'avons vu précédemment, le protocole Stupp prévoit, en association avec du TMZ, une dose d'irradiation de 60 Gy en trente fractions de 2 Gy par jour, cinq jours par semaine [47]. Chez les patients âgés de plus de 70 ans, une dose de 40,5 Gy en quinze fractions de 2,7 Gy par jour, cinq jours par semaine [87] ou une dose de 34 Gy en dix fractions de 3,4 Gy par jour, cinq jours par semaine [88]. L'utilisation de protocole d'irradiation fractionnée, comme c'est le cas ici, permet d'atteindre des doses totales d'irradiation élevées en délivrant des doses réduites tous les jours. Ceci permet d'accroître le différentiel thérapeutique entre l'effet thérapeutique sur le tissu tumoral et les effets délétères sur les tissus sains.

D'autres méthodes ont été développées pour améliorer encore ce différentiel comme la radiothérapie en conditions stéréotaxique, la curiethérapie ou encore la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité.

#### 4.3.4 Méthodes permettant d'optimiser la radiothérapie externe

##### 4.3.4.1 La radiothérapie hyperfractionnée et accélérée

La radiothérapie hyperfractionnée est une administration fréquente de RT pour éviter que la population de cellules tumorales ne se régénère entre deux traitements [89]. De plus, l'administration de petites doses de RT plus de une fois par jour peut entraîner une redistribution des cellules tumorales en prolifération ce qui conduit certaines cellules à être plus radiosensibles. En résumé, la radiothérapie hyperfractionnée permet d'administrer des doses de RT élevées tout en limitant la toxicité [89].

Dans une étude menée par l'EORTC les patients ont reçu par radiothérapie accélérée et hyperfractionnée une dose totale de 42 – 60 Gy en fractions de 2 Gy trois fois par jour. Une médiane de survie globale de 8,7 a été observée sans différences significatives entre les différentes doses administrées [90]. Plus récemment dans une étude de phase III les patients ont reçu soit de la RT hyperfractionnée (1,2 Gy deux fois par jour jusqu'à 72 Gy) en association avec la carmustine ou une RT conventionnelle (60 Gy) plus carmustine. Aucun avantage de survie n'a pu être observé et la

médiane de survie des patients traités avec la RT conventionnelle est même meilleure pour les patients de plus de 50 ans (21,9 mois pour la RT versus 19,8 mois pour l'hyperfractionnée) [91-92].

#### 4.3.4.2 La radiothérapie en condition stéréotaxique

La radiochirurgie permet de délivrer une forte dose d'irradiation le plus souvent en un seul traitement. Elle est habituellement administrée au moyen d'un bistouri à rayon gamma (*gamma knife*®) qui délivre des rayons ionisants grâce à des faisceaux focalisés de rayons gamma, eux-mêmes émis par 201 sources de Cobalt 60 convergentes fixées à un bouclier hémisphérique en acier. La tumeur se trouve au point de convergence de tous ces rayons.

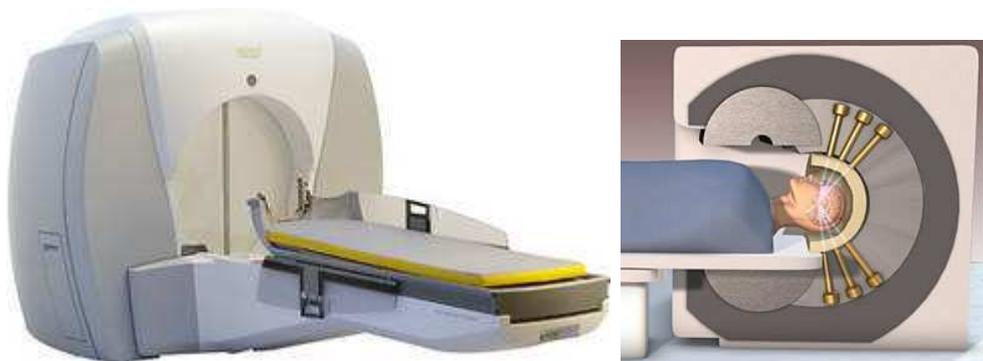


Figure 13 : Bistouri à rayon gamma (*gamma knife*)

La radiochirurgie peut aussi être pratiquée au moyen d'un accélérateur linéaire de particules. Cette appareil est traditionnellement utilisé pour la radiothérapie mais il peut être aussi utilisé pour de la radiochirurgie grâce à des moyen de contention et de collimation. Ces accélérateurs vont permettre l'émission d'électrons ou de faisceaux de photons, selon les caractéristiques de la tumeur, qui seront ensuite placés de manière à irradier la zone voulue sans endommager les tissus sains avoisinants.

C'est le cas du système CyberKnife® qui utilise deux caméras à rayons X installées au plafond pour guider l'imagerie en « temps réel » et ajuster instantanément les rayons en fonctions des légers mouvements du patient.



Figure 14 : Système Cyberknife ®

Cette irradiation a tout d'abord été utilisée comme traitement de rattrapage pour des récives de glioblastomes [93] avant d'être testée dans un essai de phase III pour apporter un complément de dose à une irradiation classique [94]. Cet essai a inclus 203 patients atteints d'un glioblastome de taille inférieure à 4 cm, pour être randomisés dans un bras chirurgie, radiothérapie externe (60Gy) et chimiothérapie par carmustine ou un bras avec le même protocole thérapeutique mais précédé d'une radiochirurgie en condition stéréotaxique (*Stereotactic radiosurgery SRS*) délivrant 15 Gy à 24 Gy. L'essai a conclu à des probabilités de survie similaires entre les deux groupes (médianes de survie de 13,6 mois et 13,5 mois respectivement) et les auteurs n'ont pas constaté de différence significative en termes de risque de récive, de qualité de vie, ou de dégradation des fonctions cognitives selon que les patients avaient reçu ou non un complément d'irradiation stéréotaxique.

#### 4.3.5 La radiothérapie interne

##### 4.3.5.1 La curiethérapie ou brachythérapie

La curiethérapie est une technique de radiothérapie interne qui consiste en l'implantation d'un matériel radioactif au sein de la tumeur afin de délivrer 50 Gy à 60 Gy au niveau du volume tumoral. Elle est utilisée depuis les années 1980 pour traiter les récives locales de glioblastomes [95-96]. Les résultats observés, relativement satisfaisants, ont conduit à mener un essai clinique de phase III dans lequel la curiethérapie est utilisée pour apporter une dose d'irradiation supplémentaire après une radiothérapie classique [97]. Cet essai a inclus 270 patients atteints de glioblastome et les a randomisés dans un bras chirurgie, radiothérapie externe (60 Gy) et chimiothérapie par carmustine ou un bras avec le même protocole thérapeutique plus la curiethérapie avec de l'iode 125. Ici aussi, les auteurs n'ont pas observé de différence significative en terme de survie qu'ils aient reçu ou non un complément d'irradiation par curiethérapie (médianes de survie de 13 mois et 15 mois respectivement).

Il faut aussi noter que des complications peuvent survenir lors de la pause ou du retrait de l'isotope et celui-ci peut aussi bouger ce qui nécessite une intervention chirurgicale [98]. Etant donné le manque d'efficacité clinique de la curiethérapie sur les GBMs nouvellement diagnostiqués, son utilisation, en dehors des essais cliniques, est limitée au traitement des rechutes.

Le système de radiothérapie Gliasite (Cytac) est un dérivé de la brachythérapie. Le dispositif Gliasite est placé au moment de la résection tumorale, c'est un ballon extensible placé dans la cavité post-chirurgicale, qui peut se remplir de liquide contenant de l'iode-125 au travers d'un réservoir sous-cutané. Le ballon tapisse la paroi de la cavité post-chirurgicale ce qui permet une irradiation homogène du tissu environnant [99]. Une étude multicentrique réalisée par le NABTT (*New Approaches to Brain Tumor Therapy*) a évalué le dispositif Gliasite dans les gliomes récurrents afin de déterminer si ce système était sûr et efficace. Les patients ont reçu 40 Gy à 60 Gy via le système Gliasite et leur médiane de survie a atteint 12,7 mois [100]. Sur la base de ces résultats, de nouvelles études ont été lancées pour évaluer l'efficacité de ce dispositif sur les gliomes nouvellement diagnostiqués et les récives de gliomes de haut grade.



Figure 15 : Dispositif Gliasite. [101]

#### 4.3.5.2 La radiothérapie vectorisée

Les avancées dans la connaissance des caractéristiques moléculaires des cancers ont permis le développement de la radiothérapie vectorisée. Elle utilise des vecteurs comme des anticorps (c'est la radio-immunothérapie RIT), des fragments d'anticorps ou des peptides.

En parallèle de ces outils ont été développés des vecteurs de taille micrométrique et nanométrique. L'objectif de la radiothérapie vectorisée est de focaliser les rayonnements ionisants au plus près de leur cible afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique et réduire les dommages faits au tissu sain environnant. Cet objectif est d'autant plus important dans le cas de la radiothérapie alpha où le périmètre d'ionisation autour de l'émetteur est réduit et l'énergie émise importante.

#### 4.3.5.2.1 Radiothérapie alpha

La radiothérapie alpha utilise des radio-éléments émetteurs de particules d'hélium ( ${}^4_2\text{He}$ ). Comme il a été vu précédemment, ces particules sont très peu pénétrantes mais très ionisantes. Elles ont un TEL élevé pouvant aller jusqu'à 100 keV/ $\mu\text{m}$  (kilo électronvolt par micromètre) sur un périmètre de 40 à 80 $\mu\text{m}$ , ce qui rend l'émetteur alpha efficace à l'échelle d'une cellule mais avec un fort pouvoir cytotoxique et une plus grande capacité à induire des cassures double-brin. En effet, à la dose de 100 à 200cGy, les radiations  $\alpha$  sont cinq à dix fois plus toxiques que des rayonnements  $\gamma$  ou  $\beta$ . De plus, les rayonnements  $\alpha$  restent efficaces en conditions d'hypoxie, ce qui est plus difficilement le cas pour les rayonnements avec un TEL faible [102].

Il existe environ une centaine de radionucléides émetteurs de particules  $\alpha$  (surtout des éléments lourds avec  $Z \geq 82$ ), seulement quelques uns ont un intérêt clinique, c'est le cas de l'astate-211, le bismuth-212, l'actinium-225 et le bismuth-213. Les rayonnements  $\alpha$  pénètrent très peu dans les tissus, il est donc nécessaire de les vectoriser afin qu'ils puissent atteindre efficacement leur cible sans risque de léser le tissu sain.

**L'astate-211 ( ${}^{211}\text{At}$ )** a une demi-vie de 7,2 heures et décroît en bismuth-207 (42%) par émission de particules  $\alpha$  ou en polonium-211 (58%) par capture électronique, lequel décroît en plomb-207 par émission de particules  $\alpha$ . L' ${}^{211}\text{At}$  comme le  ${}^{211}\text{Po}$  ont une énergie moyenne de 6,8 MeV avec un taux de pénétration dans les tissus de 55 à 80  $\mu\text{m}$  et un TEL moyen de 99 keV/ $\mu\text{m}$ . L' ${}^{211}\text{At}$  peut être couplé à des anticorps ou des fragments d'anticorps après synthèse de N-succinimidyl 3- ${}^{211}\text{At}$ astato-benzoate (SAB).

**Le bismuth-212 ( ${}^{212}\text{Bi}$ )** est obtenu par décroissance du thorium-228. Il a une demi-vie de 60,6 minutes et une énergie de 7,8 MeV. Il peut être lié à un anticorps par l'intermédiaire d'un agent chélatant, le diéthylentriaminepentaacetic acid (DTPA).

**L'actinium-225 ( ${}^{225}\text{Ac}$ )** est obtenu par décroissance de l'uranium-233. Lors de sa décroissance, l' ${}^{225}\text{Ac}$  produit six radionucléides fils jusqu'au  ${}^{209}\text{Bi}$ , en cinq désintégration  $\alpha$  et trois désintégration  $\beta^-$ . Entant donné que l' ${}^{225}\text{Ac}$  a une demi-vie de 10 jours et une forte énergie d'émission de particules  $\alpha$ , il est un bon candidat pour le développement de générateur *in vivo*.

**Le bismuth-213 ( ${}^{213}\text{Bi}$ )** provient de la décroissance de l' ${}^{225}\text{Ac}$  et a une demi-vie de 45,6 minutes. Il peut être couplé à un anticorps greffé avec une cage chélatante de C-fonction alized trans-cyclohexyldiéthylentriamine pentaacetic acid (CHX-A-DTPA). Le  ${}^{213}\text{Bi}$  a notamment été couplé par cette méthode à un anticorps anti-CD33 utilisé dans le traitement des leucémies myéloïdes [103].

L'utilisation de radionucléides émetteurs de particules alpha dans le traitement du glioblastome est encore au stade de développement. Néanmoins, une première étude a évalué la distribution et l'efficacité d'une radio-immunothérapie alpha (RIT  $\alpha$ ) sur 18 patients atteints de tumeur cérébrale récidivante. Le traitement consistait en l'administration d'un anticorps chimérique anti-tenascin (mAb 81C6) marqué à l' ${}^{211}\text{At}$  ( ${}^{211}\text{At}$ -81C6) dans la cavité post-chirurgicale. La ténascine est une

glycoprotéine de la matrice extracellulaire exprimée dans de nombreux cancer et notamment les gliomes de haut grade mais pas par le tissu sain cérébral. L' $^{211}\text{At}$  est couplé à l'anticorps avec du SAB. L'analyse des résultats a montré que le traitement était bien toléré et les taux de survies encourageants [104].

Une autre stratégie que la RIT consiste à encapsuler le radionucléide dans un vecteur. Une étude a utilisé l' $^{225}\text{Ac}$  comme générateur *in vivo* de particules  $\alpha$  pour le traitement de cancer métastatique. Une quantité importante d' $^{225}\text{Ac}$  a été encapsulée dans des liposomes et décroît *in situ* en émettant des particules alpha qui traverse la paroi de phospholipide du liposome sans perte d'énergie. Cette stratégie reste encore à développer, notamment pour des problèmes de stabilité et de rétention des radionucléides fils de l' $^{225}\text{Ac}$  [105].

#### 4.3.5.2.2 Radiothérapie bêta -

La radiothérapie bêta – fait intervenir des radionucléides émetteurs de particules chargées, les électrons. Les rayonnements  $\beta$ - ont un TEL relativement élevé, variable en fonction du radionucléide, ils sont pénétrants et ionisants.

Ils existent de nombreux émetteurs  $\beta$ - mais les plus utilisés en radiothérapie dans le gliome sont l'iode-131 ( $^{131}\text{I}$ ), l'yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), le rhénium-186 ( $^{186}\text{Re}$ ) et le rhénium-188 ( $^{188}\text{Re}$ ). Tout comme les émetteurs alpha, des radioimmunothérapies  $\beta$ - (RIT  $\beta$ -) et des radiothérapies vectorisées ont été développées avec ces radionucléides afin de cibler les cellules cancéreuses et épargner le tissu sain.

**L'iode-131 ( $^{131}\text{I}$ )** est un émetteur  $\beta$ - et  $\gamma$  avec une demi-vie est de 8,02 jours. Il émet des électrons  $\beta$  dont les plus fréquents, 90% des désintégrations, ont une énergie moyenne de 606 keV. Ces désintégrations sont accompagnées de l'émission de rayons X et  $\gamma$  dont la principale est celle de gamma de 364,89 keV dans 81% des cas. L' $^{131}\text{I}$  est un radionucléide artificiel issu de la fission de noyaux lourds (uranium, plutonium...). Il est produit industriellement en réacteur nucléaire.

Comme l' $^{211}\text{At}$ , l' $^{131}\text{I}$  a été couplé à l'anticorps anti-tenascin ( **$^{131}\text{I}$ -81C6**). Une étude de phase II sur des patients atteints de gliome nouvellement diagnostiqué et traités avec  $^{131}\text{I}$ -m81C6, suivi d'une irradiation et d'une chimiothérapie, ont atteint une médiane de 20 mois avec une médiane de survie de 18 mois dans le sous-groupe de patients atteints de GBM [106]. Une étude de phase II plus récente a testé ce même anticorps dans des cas de gliomes récurrents et les auteurs ont obtenu une médiane de survie de 15 mois dans le groupe de GBM [107]. Cette étude de phase II permet d'atteindre des taux de survie comparables voire meilleurs que ceux obtenus avec d'autres traitements tels que le TMZ, la radio-chirurgie stéréotaxique ou la brachythérapie. De plus, le taux de radionécrose avec l' $^{131}\text{I}$ -m81C6 est inférieur à celui obtenu avec d'autres méthodes de radiothérapie. Les résultats obtenus avec la radio-immunothérapie sont donc prometteurs et ont conduit à lancer une étude de phase III chez des patients avec des gliomes nouvellement diagnostiqués ou récurrents.

**L'Yttrium-90 ( $^{90}\text{Y}$ )** est un émetteur  $\beta^-$  avec une demi-vie de 2,7 jours. Il émet des électrons  $\beta^-$  avec une énergie moyenne de 933 keV, pouvant aller jusqu'à 2280 keV. Il n'existe pas à l'état naturel et est produit par désintégration du strontium-90 ou par réaction de capture. L' $^{90}\text{Y}$  est un émetteur  $\beta^-$  quasi pur, les rayonnements X et  $\gamma$  qui accompagnent sa désintégration sont faibles.

L' $^{90}\text{Y}$  a été couplé à l'Abegrin, un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , une molécule d'adhésion cellulaire fortement exprimée par l'endothélium angiogénique et les cellules de GBM. L'efficacité du  $^{90}\text{Y}$ -Abegrin a été recherchée dans un modèle de xénogreffe de GBM chez la souris. L'analyse des résultats montre une réduction de la masse tumorale chez les animaux traités avec cet anticorps radiomarqué[108].

**Le rhénium-186 ( $^{186}\text{Re}$ )** est un émetteur  $\beta^-$  et  $\gamma$  avec une demi-vie de 90 heures. Il décroît en émettant des particules  $\beta^-$  avec une énergie maximale de 1,08 MeV et des photons  $\gamma$  de 135 keV (9%) ce qui permet son suivi par imagerie.

Ce radionucléide a été encapsulé dans des liposomes et sa cinétique de libération, sa toxicité et son efficacité ont été recherchés dans un modèle orthotopique de gliome chez le rat. Le  $^{186}\text{Re}$ -liposome a été injecté par CED et il a été observé que les animaux traités avec le liposome radiomarqué (1850 Gy) survivent significativement plus longtemps que les animaux contrôles (126 jours versus 49 jours) sans présenter de signes de toxicité [109].

**Le rhénium-188 ( $^{188}\text{Re}$ )** est aussi un émetteur  $\beta^-$  et  $\gamma$  avec une demi-vie de 16,9 heures. Il décroît en émettant des particules  $\beta^-$  d'énergie plus élevée que le  $^{186}\text{Re}$ , avec une énergie maximale de 2,12 MeV et 155 keV pour les photons  $\gamma$  (15%).

Son temps de demi-vie relativement court et sa très forte énergie  $\beta^-$  émise en font un candidat très intéressant pour la radiothérapie. Il a donc logiquement fait l'objet de développement dans le cadre de RIT $\beta^-$  et de radiothérapie vectorisée au moyen de nano-objets.

Une première étude clinique de phase I a été réalisée avec du  $^{188}\text{Re}$  couplé à un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR, le nimotuzumab ( $^{188}\text{Re}$ -nimotuzumab). Trois patients atteints d'astrocytome anaplasique (AA) et huit patients avec des GBMs ont été traités avec 3mg d'anticorps radiomarqué de 10 ou 15 mCi. Les patients traités avec 10 mCi ne présentent pas de signes de toxicité à la différence de ceux traités avec 15 mCi. Chez les patients traités avec 10 mCi, un patient GBM meurt six mois après le traitement, deux patients (1 GBM et 1AA) présentent une stabilisation de la maladie pendant trois mois, un patient GBM a une réponse partielle pendant plus de un an et deux patients (1 GBM et 1 AA) sont asymptomatiques et en réponse complète trois ans après de traitement. Ce radio-immunoconjugué semble donc être une approche thérapeutique intéressante pour le traitement des gliomes de haut grade [110].

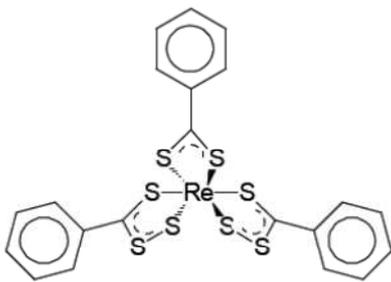
Une autre étude a réalisé l'encapsulation de  $^{188}\text{Re}$  dans des nanoliposomes pegylés ( $^{188}\text{Re}$ -liposomes). Le rhénium est encapsulé après formation d'un complexe  $^{188}\text{Re}$ -BMEDA, et le  $^{188}\text{Re}$ -liposome est administré par voie veineuse dans un modèle orthotopique de gliome chez le rat. Les

résultats montrent que le  $^{188}\text{Re}$ -liposome s'accumule dans le cerveau des animaux avec un pic 24 heures post-injection [111].

Par ailleurs, les travaux réalisés par l'unité U1066 s'intègrent dans la problématique de vectorisation de radionucléides. Il a récemment été mis au point l'encapsulation de  $^{188}\text{Re}$  dans des nanocapsules lipidiques (LNC- $^{188}\text{Re}$ ). Afin de permettre son encapsulation dans le cœur lipidique de la LNC, il faut former un complexe lipophile de rhénium (Figure 16) selon les deux réactions [112]:

Etape 1 :  $^{188}\text{Re}$ -perrhenate ( $^{188}\text{ReO}_4^-$ ) + sodium gluconate  $\rightarrow$  [ $^{188}\text{ReO}(\text{gluc})_2$ ] réactif intermédiaire

Etape 2 : [ $^{188}\text{ReO}(\text{gluc})_2$ ] +  $\text{PhCS}_2\text{H} \rightarrow$  [ $^{188}\text{Re}(\text{PhCS}_3)_2(\text{PhCS}_2)$ ]

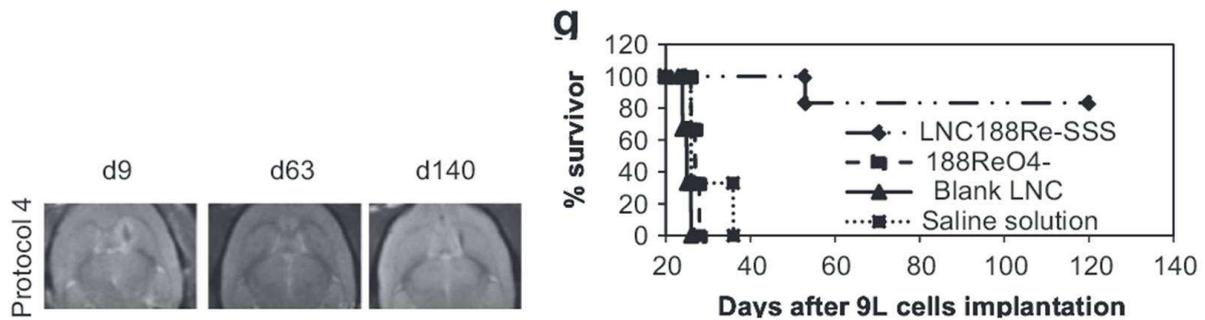


**Figure 16 : complexe lipophile de rhénium.**

Ce complexe lipophile est ensuite encapsulé en suivant un processus d'inversion de phase décrit au paragraphe 7.2.6 Les nanoparticules lipidiques (LNC).

Les premières études ont été réalisées dans des modèles orthotopiques de gliome chez le rat. Une première étude a consisté à évaluer la distribution des LNC- $^{188}\text{Re}$  après injection par CED de doses croissantes, allant de 3 à 12 Gy, et en comparaison à une injection de 4Gy de perrhenate non encapsulé. Les résultats ont montré que, s'il n'était pas encapsulé, le complexe lipophile de  $^{188}\text{Re}$  était rapidement éliminé (demi-vie de 7h). En revanche, lorsqu'il se trouve dans le cœur de la LNC, le  $^{188}\text{Re}$  est beaucoup plus maintenu dans les tissus avec seulement 10% de la dose administrée éliminée au bout de 72 heures. De plus, la médiane de survie des animaux traités avec 8 Gy de LNC- $^{188}\text{Re}$  est significativement plus élevée que celles des groupes contrôles : elle augmente de 80% et 33% des animaux sont des longs survivants [113].

Une étude plus récente a recherché l'intérêt d'une radiothérapie fractionnée avec les LNC- $^{188}\text{Re}$  et l'impact du mode d'administration intracrânienne : injection directe ou par CED. Les résultats ont permis de montrer que le mode d'administration associant une injection simple puis de la CED permettait d'augmenter l'efficacité de l'irradiation. En effet, avec ce mode de radiothérapie fractionnée, le taux de réponse au traitement était de 83%. Cette étude a aussi permis de montrer que la radiothérapie interne nanovectorisée stimulait la réponse immunitaire [114].



**Figure 17 : Traitement par SI à J12 puis CED à J18 avec des LNC-<sup>188</sup>Re dans un modèle de gliome chez le rat. A gauche : image IRM T2 à J9, J63 et J140 après implantation des tumeur. On observe une régression de la masse tumorale. A droite : droites Kaplan-Meier des animaux traités avec ce protocoles. Cinq animaux sur six sont des longs survivants [114].**

#### 4.3.6 Les chimiothérapies radio-sensibilisantes

Une autre stratégie pour accroître localement les effets de l'irradiation est l'utilisation d'agents pharmacologiques. Ils peuvent être classés en différentes catégories, comme présenté dans la revue de Chang et al. :

- les radio-sensibilisants de l'hypoxie,
- les radio-sensibilisants de la phase S,
- les agents cytotoxiques et
- les agents de thérapies ciblées [115].

Les bénéfices thérapeutiques de ces différents composés par rapport à une RT conventionnelle ou en association avec celle-ci sont présentés dans le Tableau 3.

**Les radio-sensibilisants de l'hypoxie** regroupent les composés nitro-imidazolés, le RSR13 et la tirapazamine. Les composés nitro-imidazolés tels que le metronidazole et le misonidazole sont réduits en conditions hypoxiques en un composé cytotoxique. Ainsi les cellules tumorales en hypoxie vont être spécifiquement détruites par ces composés. Le RSR13 (efaproxiral) se lie de manière non-covalente à l'hémoglobine et réduit l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène ce qui contribue à augmenter la pression partielle en oxygène. Enfin, la tirapazamine est un agent réducteur qui accroît la toxicité des cellules en hypoxie.

**Les radio-sensibilisants de la phase S** sont des pyrimidines halogénées qui s'incorporent dans l'ADN des cellules en division. Une fois incorporées, ces cellules sont plus sensibles aux cassures simple-brin induits par les radicaux libres produits lors de l'irradiation et ont de moins bonnes capacités à réparer leur ADN.

**Les agents cytotoxiques** de chimiothérapie utilisés pour la radiosensibilisation sont le topotecan, les sels de platine, les taxanes et le témozolomide. Le topotecan agit en limitant les réparations de l'ADN par l'inhibition de la topoisomérase I. Les sels de platine limitent aussi les réparations des dommages à l'ADN causés par l'irradiation et exercent un effet cytotoxique direct sur les cellules de gliome. Les

taxanes comme le paclitaxel sont des poisons du fuseau mitotique et le témozolomide est un agent alkylant de l'ADN. Ils sont tous deux reconnus pour être radio-sensibilisants dans le gliome.

D'autres agents peuvent être utilisés comme le motéxafine de gadolinum qui est une métallotexaphyrine qui catalyse l'oxydation de certains composés intra-cytoplasmiques et génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS vont se concentrer spécifiquement dans les cellules tumorales et induire l'apoptose.

L'utilisation **d'agents anti-angiogénique** comme le thalidomide ou les anti-VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) a donné des premiers résultats prometteurs.

Enfin des **thérapies ciblées** ont été développées pour essayer de radiosensibiliser les GBMs. Ainsi, les bénéfiques cliniques du tamoxifène (inhibiteur de la protéine kinase C (PKC)), du gefitinb et l'erlotinib (inhibiteurs de l'EGFR), du temsirolimus (inhibiteur de mTOR), du tipifarnib et du lonafarnib (inhibiteurs de la farnésyl transférase) et de l'imatinib (inhibiteur du PDGFR).

Agent	Activité supérieure à la RT ?	Commentaires	Références
Radio-sensibilisants de l'hypoxie			
Imidazole	Non	Défavorable dans une étude randomisée, double-aveugle, contre placebo	[116]
RSR13	Non	Etude de phase II avec RSR13+RT dans le GBM donne des résultats favorables mais phase III défavorable sur les métastases cérébrales	[117]
Tirapazamine	Non	Données de phase II non supérieures à la base de données RTOG de référence	[118-119]
Radio-sensibilisants de la phase S			
Pyrimidines halogénées	Non	La comparaison avec la base de données RTOG plutôt favorable mais aucunes études randomisées ne montrent de bénéfices.	[120]
Agents cytotoxiques			
Topotécan	Non	Les données avec le topotécan ne sont pas meilleurs qu'une RT seule	[121-122]
Les sels de platine	Non	Les données de phase III avec cisplatine/RT versus RT seule ne montrent pas de différences	[123]
Les taxanes	Non	Les données de phase II ne sont pas meilleurs que les contrôles historiques	[124]
Témzolomide	Oui	Les données de phase III montrent un avantage pour TMZ + RT suivi de TMZ en traitement adjuvant	[47]
Agents nouveaux			
Motexafine de gadolinum	Potentiel	Premières données de phase II dans le GBM encourageantes	[125]
Agents anti-angiogénique	Potentiel	Phase II en cours avec l'association RT + bevacizumab et thalidomide	[126]
Thérapies ciblées			
Tamoxifène	Non	Données de phase II pas meilleurs que les contrôles historiques	[127]
Anti-EGFR (gefitinb, erlotinib)	Non	Le gefitinb n'est pas mieux qu'une RT seule ; étude en cours sur erlotinib + RT + TMZ	[128]

Inhibiteurs de mTOR (temsirolimus, RAD001)	Potentiel	Résultats encourageants	[129-130]
Inhibiteurs de la farnésyl transférase	Potentiel	Activité modeste dans le GBM récurrent	[131-132]
Imatinib	Potentiel	Données de phase II dans le GBM récurrents montrent peu de bénéfices	[133-134]

**Tableau 3 : Efficacité des chimiothérapies radio-sensibilisantes par rapport à une radiothérapie seule.**

#### 4.4 Les limites de ces traitements

En dépit des nombreuses avancées thérapeutiques réalisées ces deux dernières décennies, la médiane de survie des patients atteints de GBM n'excède pas 15 mois et aucun traitement curatif n'a pour le moment été trouvé.

La chirurgie reste le traitement le plus efficace dans le cancer mais le caractère invasif du glioblastome et sa localisation dans le cerveau font que l'exérèse totale est difficilement réalisée avec des marges d'exérèse limitées. Les avancées récentes telles que la chirurgie fluoro-guidée permettent de mieux visualiser la zone tumorale et facilite l'exérèse cependant la plupart des foyers de récurrences surviennent dans la zone péri-tumorale.

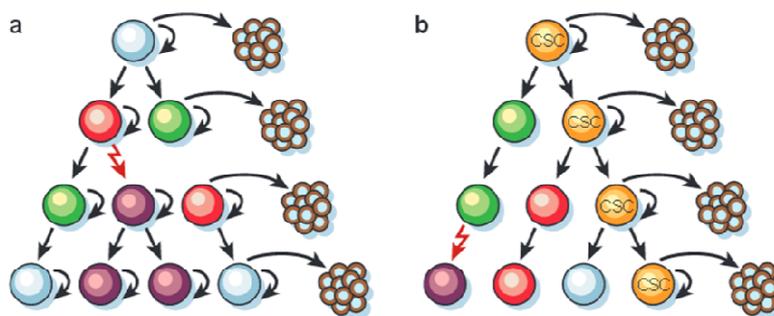
Par ailleurs, les traitements de chimiothérapie ont évolué par rapport aux chimiothérapies classiques de manière à cibler spécifiquement les anomalies moléculaires rencontrées dans le glioblastome. Ces nouvelles molécules ne ciblent plus l'ADN, le fuseau mitotique ou des enzymes ubiquitaires comme la topoisomérase mais vont cibler l'EGFR, le VEGFR ou des voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie des cellules de glioblastome. Ces nouvelles molécules sont des inhibiteurs de kinase et des anticorps monoclonaux.

De la même manière, les techniques de radiothérapie ont évolué d'une part, pour permettre de cibler spécifiquement le tissu tumoral et d'autre part, pour augmenter les effets de l'irradiation sur les cellules cancéreuses et limiter son impact sur les tissus sains environnants.

Malheureusement, malgré des résultats cliniques prometteurs pour certaines alternatives thérapeutiques, la chimiothérapie comme la radiothérapie se sont heurtées à des phénomènes de résistance. Ces résistances peuvent être d'origine moléculaire, comme c'est le cas pour la résistance aux agents alkylants comme le témozolomide et la méthylation du promoteur de la MGMT. Elles peuvent être aussi et surtout liées au caractère hétérogène du glioblastome et à son micro-environnement.

En effet, il a été décrit, d'abord dans les leucémies et les cancers du sein puis dans d'autres types de cancer, qu'il existait une hiérarchie cellulaire au sein de tumeurs et que certaines cellules étaient capables de s'auto-renouveler et de former des tumeurs similaires à la tumeur-mère. Ainsi le manque d'efficacité des traitements contre le GBM peut s'expliquer par cette hétérogénéité cellulaire qui peut s'expliquer par deux modèles, un modèle stochastique ou d'évolution clonale et

un modèle hiérarchique ou de cellules souches cancéreuses (*cancer stem cell* CSC) [135]. Dans le modèle de l'évolution clonale, toutes les cellules ont la capacité de proliférer, de s'auto-renouveler et de régénérer une tumeur après avoir subies des mutations. Dans le modèle de cellule souche cancéreuse, il y a une sous-population de cellule dans la tumeur qui a des propriétés de type souches, elles sont capables de s'auto-renouveler et de donner différents type cellulaire et de proliférer. Ces deux modèles ne sont pas exclusifs et restent débattus. Le concept de cellule souche reste controversé mais l'importance de ces cellules a été mise en avant par de nombreuses équipes qui ont démontré que les tumeurs cérébrales ont une hétérogénéité cellulaire avec une hiérarchie de différenciation. Les CSC, comparées aux cellules non-souches, ont un meilleur pouvoir tumorigène lorsqu'elles sont injectées chez des animaux immunodéprimés.



#### **Modèle de l'évolution clonale**

Les cellules tumorales sont hétérogènes, mais elles peuvent proliférer et former de nouvelles tumeurs.

#### **Modèle de cellules souches cancéreuses**

Les cellules tumorales sont hétérogènes et seules les cellules souches cancéreuses (CSC) ont la capacité de proliférer et de former une nouvelle tumeur.

Figure 18 : Les deux modèles expliquant l'hétérogénéité des cellules cancéreuses. [135]

## 5 Concept de radio-résistance et de cellules souches cancéreuses dans le glioblastome

### 5.1 Caractéristiques des cellules souches cancéreuses dans le glioblastome

#### 5.1.1 Les cellules souches neuronales

Les cellules souches sont initialement présentes dans l'embryon et permettent de générer un organisme entier, dans toute sa diversité. Elles sont indifférenciées, capables d'auto-renouvellement et de se diviser de manière asymétrique pour donner des cellules filles dont l'une maintient ses capacités de cellule souche et l'autre se différencie.

---

Il existe différents type de cellules souches :

- Les **cellules souches totipotentes** peuvent donner un organisme entier. L'œuf fécondé est donc la première cellule souche totipotente. Les cellules issues des toutes premières divisions mitotiques du zygote sont également totipotentes.
- A partir du stade « seize cellules », la totipotence disparaît et les cellules deviennent **pluripotentes**. Elles peuvent générer toutes les variétés cellulaires de l'organisme (nerveuses, musculaires, ...) sans pouvoir donner un organisme entier.
- Enfin les **cellules souches multipotentes** sont capables de donner naissance à plusieurs types cellulaires mais de la même variété. Par exemple, les cellules souches neurales donnent des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes.

Comme il a été décrit dans le second paragraphe de cette introduction, les cellules souches neurales forment la paroi du tube neural et sous l'impulsion de certains facteurs, BMP et SHH en particulier, elles vont se différencier en neurone, astrocytes ou oligodendrocytes.

La neurogénèse a lieu au moment du développement de l'embryon puis du fœtus. Mais un grand nombre de neurones meurent rapidement après la naissance, et certains d'entre eux survivent et s'intègrent au réseau neuronal. Cependant, il existe encore à l'âge adulte des zones du cerveau qui abritent des cellules souches : c'est le cas de la zone sous-ventriculaire (ZSV) situées sur les parois des ventricules latéraux et de la zone sub-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe. L'existence de ces zones germinatives permet d'émettre une hypothèse selon laquelle l'origine des gliomes proviendrait d'une cellule souche cancéreuse de gliome (CSG). En effet, de nombreux gliomes se développent soit au niveau périventriculaire soit au niveau de la ZSV. L'hypothèse de la CSGs est aussi appuyée par le fait que les CSNs sont régulées par les mêmes voies cellulaires que celles activées dans les GBMs. Cependant, le processus oncogénique nécessaire à la transformation des CSNs n'est pas encore totalement élucidé.

## 5.1.2 Les cellules souches cancéreuses dans le glioblastome (CSG)

### 5.1.2.1 Caractéristiques des CSGs

Les cellules souches cancéreuses partagent certaines caractéristiques avec les cellules souches neurales (CSNs) comme l'expression de marqueurs, la capacité à s'auto-renouveler, à former des neurosphères en culture et à se différencier en trois lignages neuronaux : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes.

Elles diffèrent notamment des CSNs par leur capacité à former des tumeurs *in vivo* [136-138]. En effet, une fois injectées chez des souris immunodéficientes, elles ont la capacité de former une tumeur phénotypiquement identique à la tumeur d'origine.

Pour qu'une cellule puisse être définie comme une cellule souche, il faut qu'elle ait les caractéristiques suivantes :

- **Capacité d'auto-renouvellement et expression de marqueur « souches »** : Les CSGs comme les cellules souches neurales ou embryonnaires, expriment de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'auto-renouvellement et dans le maintien du phénotype souche. Ces facteurs de transcription sont Sox2 (*SRY(sex determining region Y)-box 2*), Oct4, Nanog [139], c-Myc, Olig2 ou Bmi-1 (*B cell-specific Moloney murine leukaemia virus Interaction site*) et jouent un rôle critique dans l'auto-renouvellement, la prolifération, la survie des CSGs [140].  
A leur surface, les CSGs expriment des marqueurs « souches » associés aux CSNs tels que Nestin [141], CD133, L1CAM (*L1 cell adhesion molecule*) [142], CD15 (SSEA1) [143] et l'intégrine  $\alpha 6$  (CD49f) [144].
- **Capacité de différenciation** : La multipotence des CSGs se traduit par leur capacité à se différencier en neurones, astrocytes et oligodendrocytes. Ces cellules vont alors exprimer les marqueurs de différenciation associés aux différents types neuraux. Par exemple, les CSGs différenciées en astrocytes vont exprimer le GFAP, le S100, en neurones la  $\beta$ -tubuline III et en oligodendrocytes l'O4 et la galactocérobroside-C (Galc).
- **Capacité à initier des tumeurs**. Cette caractéristique a été mise en évidence par les travaux de Singh *et al.*. Ils ont montré que l'injection de cellules isolées à partir de GBM et triées de manière à sélectionner les cellules CD133 positives, permet de former des tumeurs chez des souris immunodéprimée. En effet, l'injection intracrânienne de cent cellules CD133+ permet de générer une tumeur identique à la tumeur d'origine chez le patient. En revanche, l'injection de 50000 à 100000 cellules CD133-, considérées comme non souches, ne permet pas de développement tumoral [137].

### 5.1.2.2 Marqueurs des CSGs

**Le marqueur CD133** (prominin-1) est une glycoprotéine de surface à cinq domaines transmembranaires, considéré initialement comme un marqueur spécifique de cellules souches cancéreuses dans le glioblastome. Mais l'utilisation de CD133 comme marqueur des CSGs est largement controversée. De nombreuses études ont montré que les cellules CD133- partagent les caractéristiques souches et tumorigènes des cellules CD133+. Les cellules CD133- ont la capacité de s'auto-renouveler, de se différencier et d'induire une tumeur *in vivo* lorsqu'elles sont injectées chez l'animal [145-147]. Par ailleurs, Chen *et al.* ont montré l'existence d'une hiérarchie au sein des CSGs. Ils ont distingué trois types de cellules clonogéniques : les cellules de type I CD133- générant des cellules CD133+ et CD133-, les cellules de type II CD133+ générant des cellules CD133- et CD133+ et les cellules de type III CD133- qui génèrent des cellules CD133-. Ces cellules sont toutes capables de générer des tumeurs mais les tumeurs issues du type III poussent plus lentement et sont moins infiltrantes que les tumeurs issues des types I et II [148].

Le marqueur CD133 est le plus documenté mais, à ce jour, l'identification d'un ou plusieurs marqueurs universels et spécifiques de ces CSGs dans le GBM n'est pas encore établie et la recherche de nouveaux marqueurs de CSGs est importante pour identifier et cibler ces cellules.

D'autres marqueurs ont pu être mis en évidence, c'est le cas de l'A2B5 [149], CD44 [150], CD171, Musashi [151].

### 5.1.2.3 Les voies de signalisation impliquées dans la régulation des CSGs

Les voies de signalisation impliquées dans la régulation des CSGs et dans les mécanismes de radiorésistance seront détaillées dans la revue figurant au chapitre II de cette thèse.

Elles peuvent toutefois être classées de la manière suivante :

- **Les voies de signalisation régulant l'auto-renouvellement.** On retrouve principalement les voies Notch, Wnt (*Wingless-type mouse mammary tumor virus integration site*) et Hedgehog (HH).
- **Les voies impliquées dans la différenciation cellulaire.** Les protéines BMP (Bone morphogenetic protein).
- **Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération, l'invasion et la résistance à l'apoptose :** ce sont principalement les voies induites par les récepteurs à activité tyrosine kinase comme la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt et MAPK.

## 5.2 Cellules souches cancéreuses et radiorésistance

### 5.2.1 Conséquences cellulaires de l'irradiation sur les CSGs

Comme il a été vu précédemment, la radiothérapie est un outil thérapeutique important dans le GBM. Cependant, la localisation particulière de ce cancer interdit l'utilisation de dose d'irradiation importantes ce qui nécessite de bien comprendre les mécanismes de radiorésistance afin d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie.

#### 5.2.1.1 Les dommages faits à l'ADN

L'irradiation entraîne des dommages moléculaires directs ou indirects, notamment sur la molécule d'ADN, en induisant des cassures simple-brin (**CSB**) et/ou double-brin (**CDB**). Il a pu être constaté que dans les gliomes primaires, l'irradiation entraîne un enrichissement important de la population cellulaire en CSG et affecte peu le potentiel tumorigène de ces cellules [152]. De plus, les CSGs sont plus résistantes à l'apoptose induite par l'irradiation car elles activent des mécanismes de réparation de l'ADN. Comparées aux cellules non-souches, les CSGs récupèrent plus vite et sont capables de réparer leur ADN plus efficacement. Ceci est dû à une activation efficace des mécanismes de réparation de l'ADN.

En effet, après une irradiation, des protéines senseurs qui se lient aux cassures radio-induites de l'ADN comme le complexe RAD50/NSB1/MRE11 dans le cas des CDBs. Ensuite, la transmission du signal est réalisée par les kinases **ATM** (*ataxia-telangiectasia*) et **ATR** (*ATM and RAD3-related*). ATM et ATR activent des protéines effectrices qui contrôlent le cycle cellulaire et l'apoptose telles que **Chk1** (*Checkpoint kinase 1*), **Chk2**, **p53** et **FANCD2** (*Fanconi anemia, complementation group D2*). Ces protéines induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M ou G1/S permettant aux mécanismes de réparation de se mettre en place ou de conduire la cellule vers la mort programmée ou non programmée : apoptose, mort mitotique ou nécrose lorsque la cellule n'est pas capable de corriger les erreurs de réparation de l'ADN [153].

Les mécanismes de réparation induits vont être différents en fonction des dommages causés. Ainsi les CSBs sont réparées principalement par deux mécanismes : par excision de nucléotide (*Nucleotide excision repair*, **NER**) ou par excision de base (*Base excision repair*, **BER**). Les CDBs sont corrigées par deux types de mécanismes : la recombinaison homologue (**RH**) et la ligation non homologue (*Non Homologous End-Joining*, **NHEJ**) [154]. Il est à noter que les CDBs radio-induites dans les cellules en phase G1 du cycle sont réparées par la voie NHEJ. Contrairement à la RH, la voie de réparation NHEJ relie les extrémités d'un double brin d'ADN cassé sans l'aide de la séquence homologue. Ce mécanisme est le principal mécanisme de réparation des CDBs dans les cellules. Cependant, ce système de réparation est générateur d'erreurs car il entraîne parfois la liaison aberrante de portions de chromosomes différents.

#### 5.2.1.2 Les dommages faits aux organites cellulaires et à la membrane plasmique

Les dommages causés à la membrane plasmique ou aux autres organites cellulaires ont des conséquences moins dommageables pour la cellule mais sont toutefois à prendre en considération [155].

L'altération radio-induite principale de la **membrane plasmique** est la modification de l'organisation et/ou de la composition du glycocalyx, manifestée par la modification de la quantité et/ou de la distribution des composés membranaires chargés négativement (*i.e.* acide sialique), et des sites de liaison du calcium et des lectines. Il a aussi été rapporté que les radiations ionisantes sont suivies d'une diminution réversible de la charge négative de surface dans plusieurs types cellulaires. Elles peuvent aussi modifier le fonctionnement de certains récepteurs membranaires et la liaison de certaines enzymes comme l'adényl cyclase et la calcium ATPase. Au niveau morphologique, l'irradiation peut entraîner une rapide rétractation des protrusions cellulaires et entraîner l'apparition de cellules « géantes ». Les cellules irradiées présentent aussi une altération des fonctions de communication intercellulaire avec une modification des *GAP-junctions* qui peut conduire à une transformation tumorale des cellules [155].

Au niveau du **cytosquelette**, une désorganisation du réseau d'actine et la destruction de filaments intermédiaires ont été observées dans différents types cellulaires après irradiation [155].

Les **mitochondries** sont considérées comme des cibles directes des radiations ionisantes. Les espèces réactives de l'oxygène sont continuellement produites en quantité relativement élevée par la

mitochondrie en conditions physiologiques, cependant, leur concentration augmente après irradiation et avec l'accumulation des produits de peroxydation des lipides. Ceci a pour conséquence l'altération de la structure et de la fonction des mitochondries [155].

Les effets de l'irradiation se manifestent aussi par la dilatation, la formation de vésicules et la fragmentation du **réticulum endoplasmique** (RE). De plus, l'irradiation induit la dégranulation du RE rugueux. La fragmentation et le réarrangement de l'**appareil de Golgi** est aussi observé [155].

Enfin, après irradiation, le nombre et le volume des **lysosomes** augmentent dans la cellule [155].

## 5.2.2 Les mécanismes impliqués dans la radiorésistance des CSGs

Les GBMs sont considérés comme des tumeurs très radiorésistantes. Ce phénomène peut être expliqué par l'activation des mécanismes de réparation et par l'activation de certaines voies de signalisation.

### 5.2.2.1 Mécanismes impliquant les voies de réparation de l'ADN

Ainsi Bao *et al.* montraient que l'augmentation de la survie de cellules CD133+ était due à une augmentation de l'activité protéines kinases Chk1 et Chk2 responsables de l'arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation de cassures radio-induites [152]. Ces résultats ont été renforcés par les travaux de Ropolo *et al.* qui ont montré que les CSGs comparés aux lignées de GBM non-souches, ont une activation plus importante de Chk1 et Chk2 [156]. De plus, Lim *et al.* ont montré une résistance plus importante des CSGs par rapport aux progéniteurs neuraux en augmentant leur prolifération plutôt qu'une résistance à l'apoptose [157].

Les mécanismes de réparation de l'ADN sont rapidement mis en place dans les CSGs [152, 156]. Plusieurs équipes ont montré que les CSGs activent préférentiellement la voie RH plutôt que la NHEJ pour la réparation des CDBs. Ainsi Welsh *et al.* montraient que RAD51, impliquée dans la recherche d'homologie durant la recombinaison homologue des CDBs de l'ADN est surexprimée dans 50% des GBMs [158].

La protéine d'adhésion L1CAM (CD71) augmente l'activation des checkpoints et la réparation de l'ADN en induisant la phosphorylation d'ATM, Rad17, Chk1 et Chk2 en réponse à l'irradiation [159]. L1CAM régule directement NSB1, un composé du complexe MRN, important pour l'activation des checkpoint en réponse à des CDBs [160].

Un autre mécanisme de radiorésistance fait intervenir le groupe de protéine polycomb, BMI1, qui est un oncogène connu des gliomes et qui est fortement présent dans les CSCs. Après une irradiation, BMI1 se lie à la chromatine et colocalise avec les protéines ATM et  $\gamma$ H2AX nécessaires aux réparations double-brin [161].

### 5.2.2.2 Les voies de signalisation impliquées dans la radiorésistance

Certaines voies de signalisation sont aussi impliquées dans la radiorésistance. Ainsi une activation de la voie Notch dans les CSCs confère une radioprotection et le blocage de cette voie par des inhibiteurs de la  $\gamma$ -sécrétase combiné avec de la radiothérapie impacte sur la survie des CSCs et accroît la mort induite par l'irradiation [162-163]. Notch favorise la radiorésistance par l'activation de la voie PI3K/Akt et la régulation positive de la protéine pro-survie Mcl-1. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine, impliquée dans l'oncogénèse et le développement embryonnaire, joue aussi un rôle dans la radiorésistance. Il a notamment été montré les protéines Wnt comme WISP et la  $\beta$ -caténine activée ont un taux plus élevé dans les cellules de GBM Sox2 positives après irradiation [164].

Les voies de signalisation impliquées dans des processus de radiorésistance seront plus précisément présentées dans la revue figurant au second chapitre de cette thèse.

## 5.3 Le microenvironnement des CSGs dans le GBM

Le microenvironnement tumoral est un élément important à prendre en compte pour comprendre les mécanismes de résistance et améliorer l'efficacité thérapeutique de la radiothérapie. En effet, le microenvironnement joue un rôle dans le maintien du caractère souche des CSGs.

Les CSGs sont localisées dans des zones anatomiques et fonctionnelles spécifiques aussi appelées niches. Elles y sont en contact direct avec certaines cellules, la matrice extracellulaire et des facteurs qui jouent un rôle dans le maintien de leurs propriétés de cellules souches (Figure 20). Deux types de niches ont été mis en évidence : une niche périvasculaire et une niche hypoxique.

Une niche de cellules souches regroupe plusieurs critères :

- Elle est composée d'un groupe de cellules situé dans un endroit spécifique favorisant le maintien de leur statut souche,
- Elle est un site d'ancrage physique pour les cellules souches, les molécules d'adhésion sont impliquées dans l'interaction des cellules souches avec la matrice extra-cellulaire (MEC).
- Elle génère des facteurs extrinsèques contrôlant le nombre, la prolifération, l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches.
- La niche contrôle la division asymétrique normale des cellules souches.

### 5.3.1 La vascularisation des tumeurs

#### 5.3.1.1 La vasculogénèse

La vasculogénèse se définit comme la formation *de novo* de nouveaux vaisseaux à partir de précurseurs : les hémangioblastes et les angioblastes. Elle survient aux environs du vingt-troisième

jour du développement embryonnaire. C'est le moment où les angioblastes voisins se réunissent et délimitent la lumière d'un vaisseau.

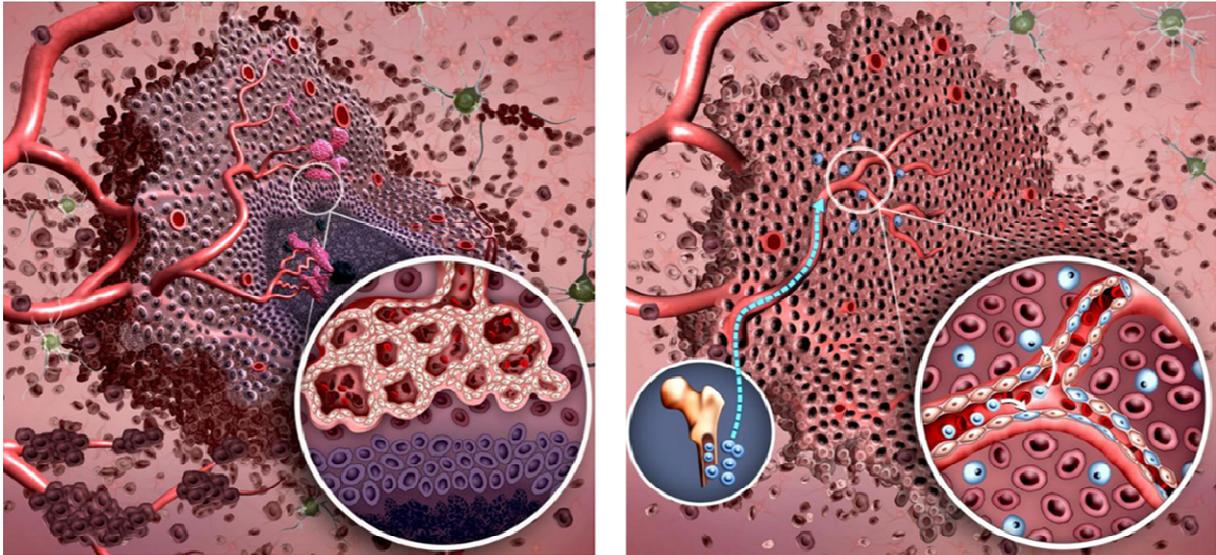
Ce mécanisme peut être réactivé dans les tumeurs par induction de la différenciation de certaines cellules dérivées de la moelle osseuse (*Bone Marrow-Derived Cells* BMDCs), les progéniteurs des cellules endothéliales (*Endothelial Progenitor Cells* EPCs). Sous l'impulsion de certains facteurs comme le VEGF, les EPCs migrent de la moelle osseuse vers le site tumoral où elles prolifèrent. Elles sont associées à des macrophages infiltrant la tumeur, les *TIE-2 expressing monocytes* (TEMs) CD11b positifs, qui circulent dans le sang jusqu'au site de néovascularisation où ils se différencient en cellules endothéliales ou macrophages. Les EPCs et les TEMs expriment le récepteur à chimiokine CXCR4 et migrent en réponse à un stimulus par SDF-1 $\alpha$ . De même, la voie ANG-2/TIE-2 est importante pour la vasculogénèse puisque ANG-2 (*angiopoietin-2*) est aussi associée au recrutement des EPCs et des TEMs dans la tumeur [165] (Figure 19).

### 5.3.1.2 L'angiogénèse et la néo-angiogénèse

L'angiogénèse est le développement du réseau vasculaire à partir de vaisseaux préexistants. La néoangiogénèse est le développement anarchique de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux, permettant un apport en oxygène et en nutriments de façon importante et rapide à la tumeur (Figure 19).

Au niveau d'un gliome, la surexpression d'ANG-2 et TIE-2 par les cellules endothéliales et les cellules de gliome favorise le délitement des jonctions endothéliales et périvasculaires entraînant le délitement des vaisseaux. En parallèle, les métalloprotéases (MMPs) entraînent le délitement de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. En présence d'ANG-2, le VEGF favorise la migration et la prolifération des cellules endothéliales et stimule la pousse de nouveaux vaisseaux. La dernière étape de l'angiogénèse implique la morphogénèse des capillaires médiée par les intégrines  $\alpha_3\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  et CD44. Les cellules endothéliales activées sécrètent du *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), qui recrute des péricytes [165].

Une croissance rapide de la tumeur nécessite une production importante de capillaires sanguins. Lorsque la vascularisation ne se développe pas assez rapidement, il y a apparition de zone de nécrose où les cellules sont en hypoxie (souvent au centre de la tumeur). Du fait de cette croissance rapide, les capillaires sont souvent plus perméables et hémorragiques que des capillaires « normaux ». Le facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) joue un rôle important dans ce développement anarchique et est souvent surexprimé dans les gliomes. La taille des capillaires est également plus importante dans les tumeurs, d'un facteur quatre à cinq, par rapport au tissu sain [166].



**Figure 19 :** A gauche, l'angiogénèse. Les cellules de gliome en hypoxie autour d'une zone de nécrose, sécrètent des facteurs proangiogéniques. Il en résulte la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. A droite, la vasculogénèse. Elle implique la mobilisation, la différenciation et le recrutement de BMDCs (bleu). La vasculogénèse est induite par des facteurs induits par l'hypoxie comme le SDF-1 $\alpha$  [165].

### 5.3.2 Les niches périvasculaires

L'auto-renouvellement et le maintien des cellules souches neurales se fait par adhésion au niveau de la niche vasculaire il n'est donc pas surprenant que les CSGs soient souvent retrouvées au contact des vaisseaux tumoraux. Ainsi il a été montré que les cellules CD133-positives recevaient des facteurs des cellules endothéliales ce qui favorise leur auto-renouvellement et le maintien dans un état non-différentié [167]. Différents types de facteurs ont ainsi été identifiés, aussi bien des facteurs sécrétés agissant à distance, que des molécules de contact nécessitant une interaction cellule-cellule ou cellule-MEC et agissant à faible distance. Un exemple de signal local nécessitant un contact cellule-cellule est celui de la voie Notch. Ainsi, Zhu *et al.* ont montré sur des coupes de tissu de GBM que les CSGs expriment les récepteurs Notch1 et Notch2 et présentent une activité élevée de cette voie. De plus, sur ces mêmes coupes, les cellules endothéliales adjacentes aux CSGs expriment les ligands DLL4 et JAG-1 [168].

Mais les CSCs n'ont pas qu'un rôle passif au sein de la niche périvasculaire, elles peuvent aussi stimuler l'angiogénèse par la sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques [169-170]. Les tumeurs dérivées de cellules CD133 positives sont plus vascularisées, nécrotiques et hémorragiques que celles dérivées de cellules CD133 négatives. Les CSCs induisent aussi la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes grâce à la surexpression de VEGF par les CSCs ce qui induit l'expansion de la niche vasculaire [169]. Les CSGs sécrètent des facteurs pro-angiogéniques, en particulier du VEGF induisant l'expression du ligand DLL4 dans les cellules endothéliales [171]. Une autre molécule, l'intégrine  $\alpha 6$ , joue un rôle au sein de la niche périvasculaire. La laminine, une des protéines de la MEC, transmet directement ses signaux via l'intégrine  $\alpha 6$ . Lathia *et al.* ont montré que les CSGs sont enrichies en intégrines  $\alpha 6$  et que les populations de cellules exprimant l'intégrine  $\alpha 6$  sont localisées au niveau des vaisseaux des GBMs [144].

Enfin, les CSCs sont capables de se différencier en péricytes. Au cours de leur différenciation, une fraction de CSCs exprime des marqueurs de péricytes *in vitro* tels que *l'alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA), NG2, CD248 et CD146 [172]. De plus, les CSCs sont recrutées au niveau des cellules endothéliales via le signal médié par SDF-1/CXCR4 avec une différenciation de ces CSCs en péricytes via la sécrétion de *transforming growth factor-beta* (TGF- $\beta$ ) par les cellules endothéliales [172].

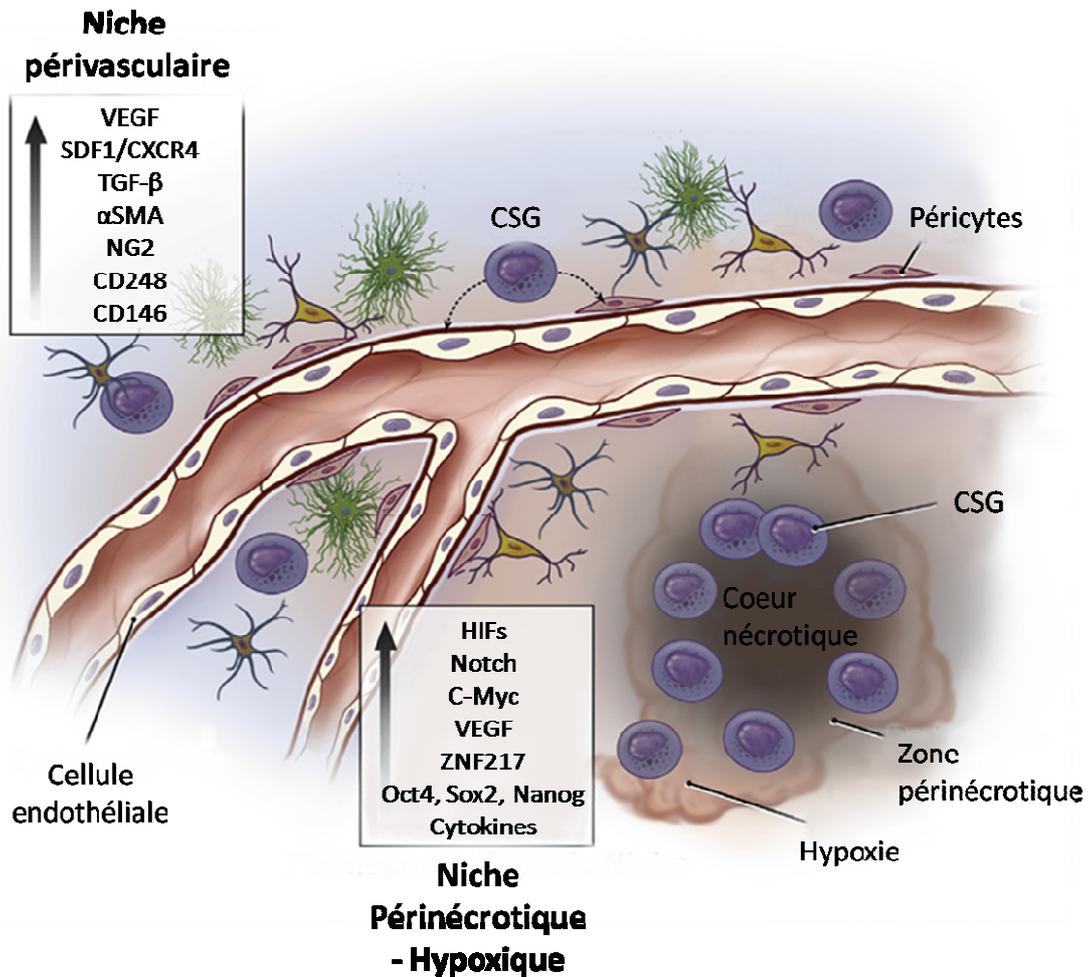


Figure 20 : Le microenvironnement des cellules souches cancéreuses dans le glioblastome. [173]

Ainsi, la niche périvasculaire permet le maintien de l'état indifférencié et l'auto-renouvellement des CSGs. Mais celles-ci sont aussi actives dans ce microenvironnement en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux. Cependant, la néo-angiogénèse est moins rapide que le développement de la masse tumorale ce qui conduit à la formation de zone d'hypoxie au centre de la tumeur.

### 5.3.3 L'hypoxie

La tumeur favorise le recrutement de vaisseaux sanguins pour sa propre alimentation mais ceux-ci sont souvent désorganisés et fragiles en raison d'une expansion rapide de la tumeur. Les gliomes possèdent ainsi des zones au sein de la tumeur où le flux sanguin est irrégulier et l'apport en oxygène insuffisant ce qui conduit à de l'hypoxie. Dans le glioblastome, l'hypoxie est un facteur pronostic négatif et est associée à l'agressivité de la tumeur.

La réponse cellulaire à l'hypoxie est principalement médiée par les facteurs de transcription de la famille des *hypoxia-inducible factor* (HIF). En conditions normoxiques, HIFs sont hydroxylés par les HIF prolyl-hydroxylases ce qui permet leur ubiquitination par le gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (vHL) et la dégradation par le protéasome. En condition d'hypoxie, la HIF prolyl-hydroxylase est inhibée. Les protéines HIF sont stabilisées, se dimérisent et se lient au *hypoxia-responsive element* (HRE) sur le promoteur de leurs gènes cibles souvent impliqués dans la modulation de la survie, la mobilité, le métabolisme et l'angiogénèse [174-175].

L'hypoxie peut avoir deux conséquences sur la radiosensibilité : d'une part, la faible quantité d'oxygène diminue la production de radicaux libres qui ont une toxicité indirecte sur l'ADN et d'autre part, l'hypoxie induit des signaux intracellulaires qui favorisent la survie de la cellule.

Une étude a montré que HIF1 $\alpha$  gère l'expansion et l'auto-renouvellement des cellules CD133 positives et régule aussi l'expression des marqueurs de surface CXCR4, CD144<sup>low</sup> et A2B5 via les voies PI3K/Akt et ERK1/2 [176]. Cependant HIF1 $\alpha$  favorise la prolifération et la survie des cellules cancéreuse mais aussi des progéniteurs neuraux ce qui limite son intérêt thérapeutique. En revanche, la transcription de HIF2 $\alpha$  est accrue dans les CSCs du GBM même dans de faible condition d'hypoxie alors que les cellules non-souches ne l'expriment pas ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante [177]. D'autre part, les travaux de Heddleston *et al.* ont montré qu'une exposition prolongée des cellules à l'hypoxie induit un changement phénotypique des cellules vers un état souche [178]. En effet l'hypoxie, et surtout HIF2 $\alpha$ , induit l'expression des gènes clés (*OCT4*, *NANOG*, *c-MYC*) impliqués dans le maintien de l'état de pluripotence des cellules souches [171].

## 6 Les nouvelles cibles thérapeutiques

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques vise à cibler des anomalies spécifiques des CSGs. La plupart de ces stratégies vont cibler des éléments impliqués dans l'auto-renouvellement et la prolifération cellulaire autour de trois voies de signalisation principales que sont Notch, Hedgehog, Wnt/ $\beta$ -caténine. Cet aspect sera traité dans la revue figurant au chapitre II de cette thèse.

D'autres stratégies visent à induire la différenciation des CSGs. Les facteurs solubles BMP2 et BMP4 induisent une différenciation neuronale et astrocytaire des CSNs associée à une augmentation de l'expression du récepteur BMPRI1B [179]. Pour cette raison, les BMPs ont été utilisés comme facteurs induisant la différenciation dans le traitement des GBMs [180-181].

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi de nous intéresser au récepteur de chimiokine CXCR4. C'est le récepteur de la chimiokine CXCL12, autrement appelée SDF-1 $\alpha$  (*Stromal-cell Derived Factor-alpha*). Il a été démontré que CXCR4 est exprimé par les CSGs et que l'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle dans la prolifération, migration et l'auto-renouvellement des CSGs et dans la régulation du microenvironnement tumoral.

## 6.1 La signalisation induite par l'axe CXCL12/CXCR4

La chimiokine CXCL12 est naturellement présente au sein du SNC et peut se lier à deux récepteurs : le CXCR4 et le CXCR7. L'activation de ces récepteurs régule le développement du SNC et est impliquée dans la neuromodulation, la neuroprotection et le contrôle des interactions entre les neurones, la microglie et les astrocytes.

CXCR4 est un récepteur à sept hélices transmembranaires couplé à une protéine G. D'un point de vue mécanistique, CXCL12 se lie à CXCR4 qui s'homodimérise ou s'hétérodimérise avec CXCR7. La liaison du ligand entraîne un changement conformationnel de CXCR4 ce qui provoque la dissociation de la protéine G en ses trois sous-unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  qui à leur actif déclenchent différentes voies [182] :

- La sous-unité  $\alpha_i$  inhibe l'AMP cyclique (cAMP) via la modulation de l'activité de l'adényl cyclase. Cette sous-unité active aussi l'activation de facteurs de transcription comme le NF $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B), la tyrosine kinase PYK2 Ca<sup>2+</sup>-dépendante, JAK/STAT et la voie phosphoinositol-3 kinase (PI3K)-Akt impliquée dans la survie et la prolifération.
- La sous-unité  $\alpha_q$  active la phospholipase C (PLC)  $\beta$  laquelle hydrolyse PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) générant ainsi du DAG (diacylglycérol) et du IP3 (inosito 1,4,5 trisphosphate) qui contrôle le relargage du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire contenu dans le réticulum endoplasmique et l'activation de la protéine kinase C.
- Le dimère  $\beta\gamma$  est impliqué dans l'activation de la cascade ERK1/2 MAPK impliqué dans l'expression de certains gènes et la progression du cycle cellulaire. Ce dimère interagit aussi avec les canaux ioniques et active PI3K modulant ainsi le chimiotactisme SDF-1 $\alpha$ -dépendant.

Le récepteur CXCR4 peut aussi interagir avec la GPCR kinase (GPK) ce qui permet son interaction avec la  $\beta$ -arrestine ce qui entraîne l'internalisation du récepteur [183].

La formation d'hétérodimères CXCR4-CXCR7 augmente la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracytoplasmique et la phosphorylation de ERK 1/2 [184] alors que le chimiotactisme induit par la liaison de CXCL12 à CXCR4 est inhibé par CXCR7 lorsqu'ils se trouvent sur la même cellule [185]. L'hétérodimère CXCR4-CXCR7 favorise le recrutement de  $\beta$ -arrestine ce qui va conférer un avantage de survie, de croissance et de migration aux cellules exprimant ces deux récepteurs. En effet, la  $\beta$ -arrestine recrutée par l'hétérodimère va activer ERK1/2, p38 et SAPK/JNK qui induisent la migration cellulaire [183, 186].

Le monomère CXCR7 active aussi la phosphorylation de ERK1/2 [185].

---

## 6.2 Le rôle de CXCL12/CXCR4 dans le glioblastome

CXCL12/CXCR4 joue un rôle central dans le développement et la prolifération tumorale, notamment grâce par un mécanisme paracrine/autocrine, et contribue à la dissémination et l'invasion des cellules cancéreuses. Dans le GBM, CXCR4 et CXCL12 sont surexprimés dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain et le degré d'expression est corrélé au grade de la tumeur et à un mauvais pronostic [187-188].

### 6.2.1 Rôle dans l'angiogénèse et la vasculogénèse

Des études immunohistochimiques ont montré que dans les GBMs, CXCR4 et CXCL12 ne colocalisaient pas dans les zones en prolifération mais ils étaient tous les deux présents dans les zones en hypoxie et nécrosées [187]. L'hypoxie favorise l'**angiogénèse** dans les GBMs, non seulement via HIF-1 $\alpha$  qui active directement la transcription de VEGF et de cytokines telle que le TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor*), et stimule l'expression de CXCL12, mais aussi par l'augmentation de l'expression de CXCR4 dans les zones nécrotiques. De plus, CXCR4 a été identifié comme un activateur de HIF-1. La colocalisation de CXCR4 et de VEGF a été associée à une augmentation de HIF dans les gliomes, spécialement au niveau des zones hypoxiques [189]. D'autres études ont montré que l'expression de CXCR4 est significativement augmentée dans les cellules de gliome exposées à l'hypoxie *in vitro* mais aussi par les cellules endothéliales après exposition au VEGF. A partir de ces données, il est possible de dire que CXCR4 est régulé dans les GBM via deux mécanismes induits par l'hypoxie : HIF-1 entraîne une augmentation de l'expression de CXCR4 dans les cellules de GBM et le VEGF entraîne une expression de ce récepteur dans les cellules endothéliales [190].

Cependant, les travaux de Kioi *et al.* ont montré que l'inhibition de la **vasculogénèse** plus que de l'angiogénèse permettait de prévenir des rechute après une irradiation chez la souris [191]. Ils ont notamment démontré que l'irradiation empêchait la pousse et la prolifération des cellules endothéliales ce qui oblige la tumeur à fabriquer des vaisseaux *de novo*, c'est-à-dire faire de la vasculogénèse, à partir de cellules circulantes. Ils montrent ainsi que la vasculogénèse serait un mécanisme plus important que l'angiogénèse dans la résistance aux radiations. Ils ont identifié deux facteurs clés dans la vasculogénèse :

- Premièrement, les tumeurs solides développent des zones d'hypoxie, ce qui conduit à l'induction du facteur HIF-1 qui va induire le recrutement à la tumeur de cellules dérivées de la moelle osseuse (*Bone Marrow Derived Cells* BMDC).
- Deuxièmement, les BMDCs sont recrutées et retenues dans les zones hypoxiques par la sécrétion de CXCL12 dépendante de l'hypoxie, qui se lie à son récepteur CXCR4 sur les BMDCs.

Après une irradiation, la tumeur devient encore plus hypoxique du fait de la destruction collatérale de vaisseaux sanguins. L'angiogénèse devient alors un mécanisme minoritaire par rapport à la vasculogénèse. Le facteur de transcription HIF-1 va induire l'expression de CXCL12 qui va permettre le recrutement et le maintien de BMDCs au niveau du site tumoral. Ces BMDCs sont majoritairement

---

des myéломocytes CD11b+ et 50% d'entre eux sont Tie2 positifs et sont capables de produire la métalloprotéinase-9 (MMP9) [191-193].

### 6.2.2 Rôle dans l'invasion tumorale

Par ailleurs, l'axe CXCR4/CXCL12 va permettre aux cellules de GBMs d'envahir le parenchyme cérébral. En effet, sous la dépendance du VEGF, CXCL12 va être sécrétée par les neurones et les cellules endothéliales et attirer les cellules de GBM CXCR4-positives [194]. De plus, des études *in vivo* ont permis de montrer que dans les cellules de GBM implantées *in situ* chez l'animal, l'axe CXCR4/CXCL12 permettait d'activer les métalloprotéinases (MMPs) ce qui favorise l'infiltration des cellules de GBM dans le parenchyme [195]. Les MMPs sont surexprimées dans le GBM et leur production, particulièrement de MMP9, favorise l'invasion des cellules tumorales. Cette MMP est surexprimée dans les gliomes qui surexpriment le CXCR4 ce qui suggère que le CXCR4 provoque l'invasion des gliomes par l'augmentation de l'expression de MMP9 [194]. De même, MT2-MMP est sur-régulée dans les gliomes après activation de CXCR4 [195].

## 6.3 L'activité de CXCL12/CXCR4 dans les CSGs

### 6.3.1 Rôle dans les CSNs normales

Les chimiokines ont un rôle majeur dans la migration cellulaire, l'adhésion et la prolifération au cours du développement du SNC. L'importance de la chimiokine CXCL12 dans le développement neural a été mise en évidence par le phénotype létal de souris *knockout* pour CXCR4 et CXCL12 qui présentaient une migration anormale des neurones au niveau du cervelet, du gyrus dentel et des ganglions rachidiens [196-197]. Ainsi CXCL12/CXCR4 régule le développement de nombreuses structures du système nerveux central et périphérique comme le cervelet, le cortex, l'hippocampe, les ganglions rachidiens et sympathiques.

Chez l'adulte, CXCL12/CXCR4 régulent aussi les cellules souches situées dans les niches neurogéniques. Comme nous l'avons vu, il existe deux niches neurogéniques, l'une au niveau de la zone sous-ventriculaire (ZSV) située sur les parois des ventricules latéraux et une autre au niveau de la zone sub-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe. Après la naissance, l'expression de CXCR4 continue dans les CSNs de la ZSV et de la ZSG alors que CXCL12 est exprimé par les cellules épendymales et épithéliales. Le CXCL12 cible les CSNs présentes dans la ZSV pour les amener de la niche épendymaire vers la niche vasculaire. La migration de certaines cellules vers la niche vasculaire est régulée par un gradient de CXCL12 dans le micro-environnement [198].

Ainsi, que ce soit dans le cerveau adulte ou chez l'embryon, l'un des principaux rôles physiologiques de CXCL12/CXCR4 est de positionner les CSNs près des vaisseaux sanguins ce qui permet un approvisionnement en facteurs de prolifération et de différenciation.

### 6.3.2 Rôle dans les CSGs

La surexpression de CXCR4 a été retrouvée dans de nombreuses CSGs dérivant de nombreux types de cancer comme le pancréas, le colon, le poumon et le glioblastome [137]. L'équipe d'Ehtesham a notamment montré la coexpression par des cellules de GBMs humains, de marqueurs de cellules souches tels que Sox-2 et Musashi avec le récepteur CXCR4 [199]. Dans les CSGs, l'axe CXCL12-CXCR4 va jouer un rôle dans : l'auto-renouvellement, la prolifération, la migration, l'angiogénèse et la résistance à la radio-, chimiothérapie.

*In vitro*, la prolifération des CSGs est induite par un traitement exogène de CXCL12 [200]. Cet effet est médié par CXCR4 car qu'il est complètement abrogé par l'utilisation d'un antagoniste de CXCR4 tel que l'AMD3100 [169, 199].

A côté de la survie et de la prolifération, CXCL12/CXCR4 joue un rôle dans le maintien des capacités d'auto-renouvellement des CSGs. Ceci a été démontré dans l'étude de Lee *et al.* qui montre que l'interruption du signal CXCR4 entraîne une baisse d'expression des marqueurs associés à l'auto-renouvellement comme Oct4 et Nanog [201].

Par ailleurs, il a été montré que CXCL12 stimule la migration des CSGs *in vitro* de manière dose-dépendante et que l'administration l'AMD3100 inhibe la réponse chimiotactique. En revanche, ce même traitement a peu d'effet sur des lignées de GBM « non souche » [202].

Enfin les CSGs contribuent à l'angiogénèse par la formation de microvaisseaux. Il a été démontré que les CSGs favorisent l'angiogénèse des tumeurs en induisant l'expression du VEGF [169, 199]. Certains rapports ont montré que les CSGs étaient capables de se transformer en cellules endothéliales [170] mais ces résultats restent controversés. Par ailleurs, Cheng *et al.* ont démontré que les CSGs peuvent se différencier en péricytes et ainsi participer à l'architecture des vaisseaux. Les CSGs sont recrutés près des cellules endothéliales grâce à l'axe CXCL12/CXCR4 et sont différenciés en péricytes par l'action du TGF  $\beta$  [172].

## 7 Innovations thérapeutiques pour le ciblage et l'élimination des CSGs et leur modalités d'application

### 7.1 Intérêts des nanovecteurs

Comme il a été dit précédemment, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées ces dernières décennies incluant des inhibiteurs de kinases ou des anticorps monoclonaux (AcM) qui ciblent les anomalies spécifiques des cellules de GBM. Malheureusement, ces nouveaux traitements ont montré peu de bénéfices en clinique. En plus de cette faible efficacité, le passage des médicaments de la circulation sanguine au cerveau, est limité par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ainsi, il a pu être montré que l'injection en systémique d'AcM dirigés contre l'EGFRvIII entraîne une réduction de la tumeur dans un modèle de mélanome sous-cutané mais pas des métastases intra-cranienne [203]. De la même manière le cetuximab, l'Ac anti-EGFR, est inefficace

dans un modèle orthotopique de GBM humain lorsqu'il est administré en systémique mais bloque la croissance tumorale quand il est administré via une minipompe osmotique [204]. Ainsi, une administration en systémique nécessite souvent de forte concentration en médicament ce qui peut entraîner des effets secondaires.

Dans ce contexte, les nanotechnologies apparaissent comme un procédé de formulation intéressant puisqu'elles permettent (Figure 21) :

- De nouvelles interactions avec les éléments du vivant, de part leur taille de 5 nm à 300 nm,
- Elles possèdent de nouvelles propriétés physico-chimiques avec des compositions et des structures diverses. Il existe des nano-objets de forme sphérique aussi bien que des nanotubes qui vont agir de manière différente avec les éléments du vivant (Figure 21).

En d'autres termes, les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques incluant la distribution, la métabolisation et l'élimination du principe actif, ne dépendent plus du principe actif lui-même mais des propriétés du vecteur.

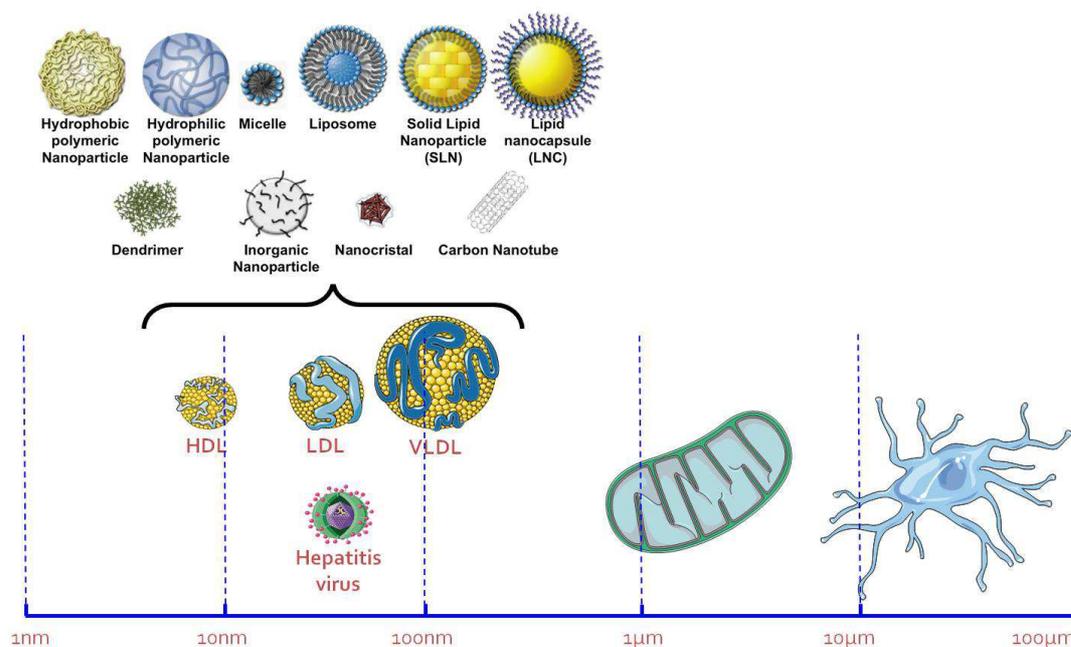


Figure 21 : Diversité des nano-objets en fonction de leur taille.

Les nanovecteurs permettent d'encapsuler une grande variété de molécules, qu'elles soient lipophiles ou hydrophiles, et constituent une barrière physique vis-à-vis des processus de métabolisation ce qui permet, dans la plupart des cas, de réduire les doses administrées chez le patient et de limiter les effets secondaires. L'encapsulation dans des nanovecteurs permet d'accroître la solubilité et la stabilité des médicaments encapsulés [205]. Il est possible aussi d'encapsuler des agents de chimiothérapie aussi bien que des radionucléides et des agents métalliques qui peuvent être utilisés en imagerie, pour focaliser les rayonnements ionisants ou permettre un ciblage par magnétisme.

Enfin, il existe des nano-objets de « seconde génération » sur lesquels il est possible de greffer des peptides ou des anticorps qui vont permettre un ciblage spécifique de certaines cellules.

Des nanomédecines ont déjà reçu des autorisations de mise sur le marché c'est le cas de l'Alveofact<sup>®</sup>, le DaunoXome<sup>®</sup>, l'AmBisome<sup>®</sup>, le Doxil<sup>®</sup>, le Myocet<sup>®</sup> ou encore l'Abraxane<sup>®</sup>.

## 7.2 Les différents types de nanovecteurs

### 7.2.1 Les liposomes

Les liposomes sont préparés artificiellement et sont constitués de bicouche lipidique. Ils sont sphériques, formés d'une ou plusieurs bicouches lipidiques renfermant une phase aqueuse [206]. La bicouche lipidique est composée de phospholipides et de cholestérol et il est possible de modifier la cinétique de libération en modifiant le ratio entre ces deux composés [207]. La taille des liposomes varie du nanomètre jusqu'à une dizaine de micromètre, et présentent l'avantage de pouvoir encapsuler des substances hydrophiles dans leur cœur, et lipophile dans leur bicouche. Leur inconvénient majeur est leur élimination rapide par le système réticulo-endoplasmique (monocytes / macrophages). Pour éviter ce phénomène, des polymères hydrophiles comme le polyéthylène glycol (PEG) sont ajoutés dans la bicouche lipidique. Afin d'améliorer la spécificité et la biodisponibilité des liposomes PEGylés, des anticorps peuvent être ajoutés à leur surface [208].

Ainsi, pour améliorer le passage des liposomes à travers la BHE en recouvrant le PEG avec de la glutathione, un anti-oxydant endogène qui est spécifiquement capté par des transporteurs exprimés par les cellules endothéliales du cerveau [209]. Une étude clinique de phase I/II est actuellement en cours pour rechercher l'efficacité de ce liposome chargé en doxorubicine chez des patients avec des tumeurs cérébrales (essai NCT01386580).

Un certain nombre de problèmes techniques et biologiques doivent encore être résolus avant que les liposomes puissent être considérés comme des traitements de référence notamment la capacité d'encapsulation limitée, une faible stabilité et un coût de production élevé [210].

### 7.2.2 Les micelles

Les micelles se forment naturellement lorsqu'une substance amphiphile est mise dans de l'eau. Ainsi, une fois dans l'eau la partie hydrophile de la substance se trouve vers l'extérieur et la partie hydrophobe est repoussée vers l'intérieur du micelle. Le cœur hydrophobe peut donc contenir des substances faiblement solubles dans l'eau alors que la coque hydrophile la protège et prolonge sa circulation dans le sang [211].

Les micelles polymériques sont généralement composés de block de copolymères comprenant deux ou plusieurs polymères reliés par des liaisons covalentes, avec une unité hydrophile et une unité hydrophobe qui s'assemblent d'eux-mêmes en micelles une fois dans un environnement aqueux [212]. Le PEG est généralement le polymère hydrophile. Les polymères hydrophobes sont

habituellement des polyesters, polyéthers et des polyamino-acids comme le poly(propylène oxide) (PPO), le poly(D,L-lactic acid) (PDLLA), le poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), le poly(L-aspartate) et les poloxamères [212].

Ces micelles peuvent notamment permettre l'encapsulation d'agents anti-cancéreux faiblement solubles comme la lomustine, la carmustine, le TMZ et le 5-fluorouracil [213]. Ils peuvent cibler la tumeur par effet EPR et diffuser de manière passive à travers la BHE [214].

Les micelles n'ont pas été testés à ce jour pour le traitement des gliomes mais les résultats obtenus dans d'autres types de cancer solides sont encourageants. Les principaux inconvénients de ces vecteurs sont leur faible stabilité, la difficulté de synthétiser des polymères, l'encapsulation de substances hydrophobes uniquement, une extravasation lente et une possible toxicité hépatique à long terme due à une métabolisation lente [215].

### 7.2.3 Les nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques sont des vecteurs de très petite taille, comprise entre 10 et 1000 nm. Ils sont faits de différents types de polymères naturels ou synthétiques, généralement biodégradables. Les polymères naturels peuvent être de la cellulose, de la gélatine, de l'alginate et du chitosan [216]. Les polymères synthétiques biodégradables sont le polylactide (PLA), le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), les polyanhydrides, le poly- $\epsilon$ -caprolactone et le polyphosphazène. Les médicaments peuvent être adsorbés, dissous, piégés, encapsulés ou liés de manière covalente à la nanoparticule [217]. Elles peuvent être classées en deux catégories : les nanosphères et les nanocapsules. Dans les nanosphères, la substance peut être adsorbée ou piégée dans la matrice polymérique alors que dans la nanocapsule, la substance est contenue dans le corps et une membrane polymérique recouvre l'extérieur de la particule [217].

En administration systémique, les nanoparticules sont plus stables que les liposomes et les micelles, néanmoins nombre d'entre elles sont phagocytées. De plus, elles sont relativement complexes à fabriquer, la fabrication coûte cher et il y a un risque de réaction du système immunitaire.

### 7.2.4 Les dendrimères

Les dendrimères sont des polymères synthétiques composés d'une molécule centrale associée à des unités répétées et des groupements réactifs en surface. Ils sont de très petites tailles, 7 à 10 nm, capables de prendre en charge un agent de chimiothérapie et de passer la BHE. Il a été montré que le dendrimère gadolinium (Gd)-diethyltriaminepentaacetic acid (DTPA) chelated generation 5 (G5) polyaminoamine (PAMAM) était capable de se lier de manière covalente à la doxorubicine. Ce dendrimère Gd-G5-doxorubicin a été étudié dans un modèle orthotopique chez le rongeur et il a été montré qu'une dose de ce vecteur était plus efficace qu'une dose de doxorubicine libre [218-219].

## 7.2.5 Les SPIONs (*Supermagnetic iron oxide nanoparticles*)

Les SPIONs ou *supermagnetic iron oxide nanoparticles* avec un diamètre inférieur à 50nm présentent un intérêt en tant qu'agent de contraste pour l'IRM dans le diagnostic des tumeurs cérébrales. Ils peuvent aussi être utilisés en thérapeutique par la génération d'une hyperthermie lorsqu'ils sont traversés par un champ électromagnétique. Les SPIONs peuvent générer un contraste plus grand que le gadolinum habituellement utilisé, ce qui pourrait permettre une détection plus précoce des tumeurs. Il est aussi possible de les coupler avec des ligands comme l'EGF (EGFR étant très fortement exprimé dans les gliomes) [220] ou la protéine Hsp70 (cible le CD40 présent sur les cellules de gliome) [221] ce qui permet de mieux cibler la tumeur. Les SPIONs peuvent aussi servir à encapsuler les agents de chimiothérapie comme la doxorubicine [222]. Ces objets constituent donc des outils « théragnostic » intéressants.

## 7.2.6 Les nanoparticules lipidiques (LNC)

### 7.2.6.1 LNC de première génération

Les nanocapsules lipidiques (LNC *lipidic nanocapsules*) sont des nanovecteurs constitués d'un cœur lipidique stabilisé par une coque tensioactive [223]. Leur taille varie entre 20 et 100 nm en fonction de la proportion des excipients. Elles sont formées selon un processus d'inversion de phase (Figure 23) qui conduit à une émulsion huile/eau contenant une phase huileuse (triglycérides: Labrafac® WL 1349), un surfactant non ionique hydrophilique (polyéthylène glycol hydroxystéarate: Solutol® HS15) et un surfactant lipophile (lecithins: Lipoïd® S75-3) (Figure 22).

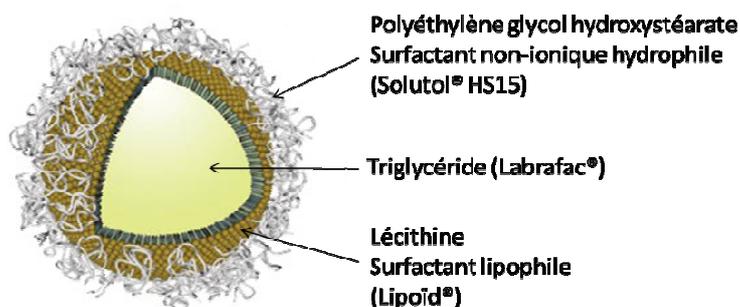


Figure 22 : Représentation schématique des nanocapsules lipidiques.

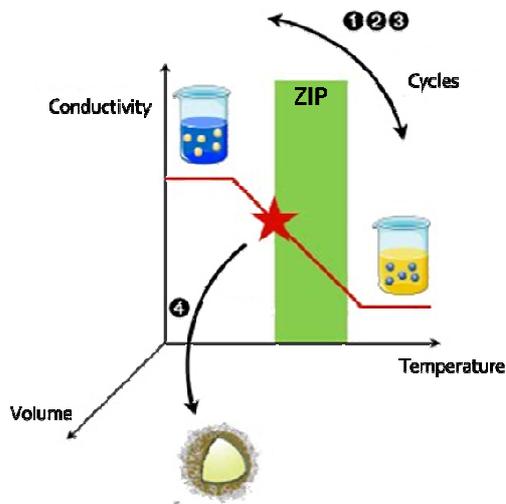


Figure 23 : Mesure de la conductivité en fonction de la température.

#### 7.2.6.2 LNC de seconde génération

Afin de fonctionnaliser les LNCs, deux méthodes de greffage ont initialement été développées. Dans la première méthode, une chaîne de DSPE-PEG maléimide (1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[maleimide(polyéthylène glycol)-2000] (Figure 24) est post-insérée dans la coque des LNCs via les chaînes de DSPE.

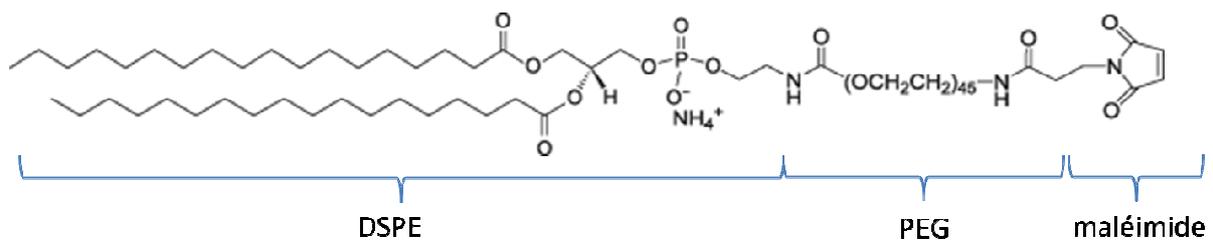
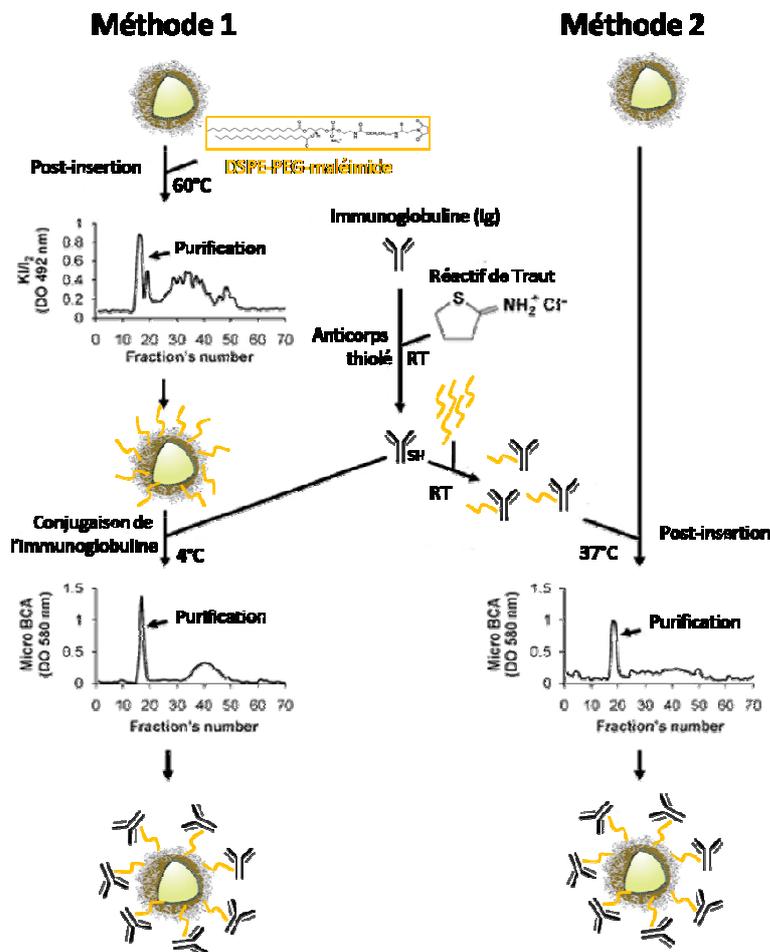


Figure 24 : DSPE-PEG-maléimide.

D'autre part, l'anticorps est thiolé par réaction avec le réactif de Traut. Le groupement thiol (-SH) permet de coupler l'anticorps au maléimide et donc à la LNC par réaction covalente. Les LNCs post-insérées avec l'anticorps sont ensuite purifiées sur colonne de sépharose (30cm) qui est un procédé d'exclusion stérique qui permet de séparer les anticorps libres, de petites tailles, des LNCs plus grosses.

Dans la seconde méthode, l'anticorps est thiolé puis couplé au DSPE-PEG maléimide dans une première étape. C'est ensuite le complexe Anticorps / DSPE-PEG maléimide qui est post-inséré dans la coque de la LNC. A la différence de la première méthode où la post-insertion était réalisée à 60°C,

la présence de l'anticorps dans la seconde méthode nécessite d'utiliser des températures plus basses. La post-insertion est donc réalisée ici à 37°C mais pendant 4 heures (Figure 25) [224].



**Figure 25 : Représentation schématique de la synthèse des immuno-LNC par la méthode 1 et la méthode 2 [224].**

Il a été montré que les immuno-LNCs obtenues par la méthode 1 possédaient à leur surface un grand nombre de fonctions maléimide libres susceptibles de réagir avec les fonctions suhydriyles présentes sur les biomolécules et donc de générer des effets secondaires.

Dans ce travail de thèse, nous avons privilégié la méthode 2 pour la synthèse de nos immuno-LNC.

Les premiers résultats obtenus avec des immuno-LNCs dirigées contre l'épitope AC133 et chargées en Nile Red ont permis de montrer que ces LNCs fonctionnalisées sont capables de reconnaître efficacement leur épitope [224].

Comme il a été dit précédemment, de nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées ces dernières décennies incluant des inhibiteurs de kinases ou des anticorps monoclonaux (AcM) qui ciblent les anomalies spécifiques des cellules de GBM. Malheureusement, ces nouveaux traitements ont montré peu de bénéfices en clinique. En plus de cette faible efficacité, le passage des

médicaments de la circulation sanguine au cerveau est limité par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ainsi, il a pu être montré que l'injection en systémique d'AcM dirigés contre l'EGFRvIII entraîne une réduction de la tumeur dans un modèle de mélanome sous-cutané mais pas des métastases intra-cranienne [203]. De la même manière le cetuximab, l'Ac anti-EGFR, est inefficace dans un modèle orthotopique de GBM humain lorsqu'il est administré en systémique mais bloque la croissance tumorale quand il est administré via une minipompe osmotique [204]. En ce qui concerne les inhibiteurs de kinase comme l'erlotinib, ils ne peuvent pas atteindre les cellules tumorales à cause des transporteurs à efflux *ATP-binding cassette* (ABC) situés sur les cellules endothéliales [225].

Ainsi, une administration en systémique nécessite souvent de forte concentration en médicament ce qui peut entraîner des effets secondaires.

Afin d'améliorer la délivrance des médicaments au niveau du cerveau, de nouvelles formes et voies d'administration ont été développées : elles regroupent vecteurs nanométriques et des vecteurs cellulaires.

### 7.3 Les modalités d'application dans le cadre du traitement du glioblastome

L'encapsulation dans des nanovecteurs permet d'accroître la solubilité et la stabilité des médicaments encapsulés [205]. Leur petite taille permet de passer des barrières biologiques et d'être internalisés par les cellules. Ils peuvent effectuer un ciblage passif (effet de perméabilité et de rétention accru *enhanced permeability and retention effect* (EPR) ou un ciblage actif avec un ligand à leur surface ce qui permet d'augmenter la dose délivrée au niveau de la tumeur et de réduire les effets secondaires [226]. En plus d'une administration systémique, ils peuvent aussi être administrés localement dans le cerveau par injection ou diffusion avec une minipompe implantable (MiniMed®), par *convection enhance delivery* (CED), par administration trans-nasale ou avec des implants polymériques (Wafers-Gliadel®) [227].

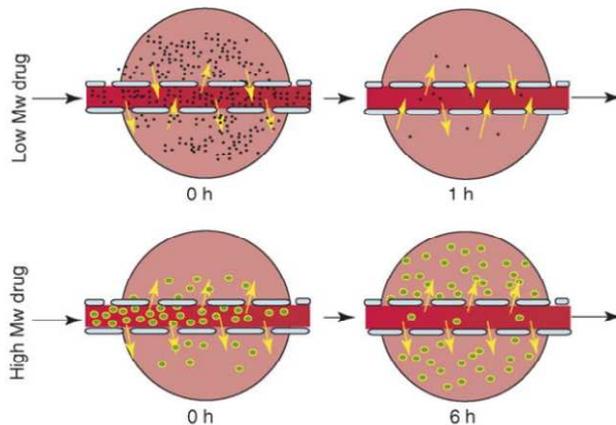
#### 7.3.1 Administration par voie systémique

##### 7.3.1.1 L'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*)

Du fait de la croissance rapide et anarchique des capillaires sanguins de la tumeur, les jonctions entre les cellules endothéliales ne sont pas aussi serrées que celles des capillaires sains. Les vaisseaux peuvent donc laisser passer les constituants du sang dans l'espace interstitiel. Ce phénomène est appelé extravasation.

La rupture de la BHE peut être utilisée pour cibler de manière passive la région tumorale. Ce phénomène est utilisé à la fois en imagerie et en thérapie. Les produits de contraste ou les agents de chimiothérapies sont administrés par voie veineuse et vont s'accumuler de manière passive au niveau de la tumeur, où la BHE est lésée.

Les molécules de fort poids moléculaires (macromolécules, nanoparticules, particules lipidiques) se concentrent de manière plus importante dans la tumeur que les molécules de faible poids moléculaires. En effet, les petites molécules circulent facilement à travers les pores des vaisseaux sanguins et sont rapidement éliminés. A l'inverse, les macromolécules sont retenues dans les tissus lésés, où le drainage lymphatique est faible et le retour veineux est lent [228].



**Figure 26 : Extravasation de molécules de faibles poids moléculaires et de fort poids moléculaires dans l'espace interstitiel de tissus tumoraux. Les petites molécules sont rapidement éliminées par la circulation sanguine tandis que les macromolécules s'accumulent dans les tissus [228].**

### 7.3.1.2 La rupture temporaire de la BHE

Elle est obtenue par l'administration de substance ou l'application de certaines techniques. Par exemples, l'administration d'une solution de mannitol hyperosmolaire, d'analogue de la bradykinine comme le RMP-7, de surfactant comme le SDS ou le Tween 80 ou des cytokines ou l'utilisation d'ultrasons. Cette rupture temporaire de la BHE a pour conséquence d'augmenter sa perméabilité ce qui permet d'atteindre de plus forte concentration de médicament dans le cerveau et au niveau du site tumoral. Cependant, cette technique permet le passage de molécules actives mais aussi d'autres substances habituellement arrêtées par la BHE comme les agents pathogènes.

## 7.3.2 Administration locale

### 7.3.2.1 Injections directes

Elle consiste généralement en l'injection de chimiothérapie dans la cavité post-chirurgicale ou au niveau de la tumeur dans le cas où celle-ci est inopérable. Ainsi différentes études ont été menées chez la souris avec des nitrosourées, la vincristine et le BCU, dans des modèles de gliome. Elles ont montré l'intérêt de cette voie d'administration. Cependant, l'injection directe est généralement associée à un grand risque d'infection, d'œdème, et de reflux de la solution le long du cathéter [227].

### 7.3.2.2 Infusion et Convection-Enhanced Delivery (CED)

Le développement de **pompe implantable** a permis de réduire le risque d'infection pendant le traitement. Plusieurs modèles ont été développés : MiniMed®, Infusaid® et Medtronic®. Elles permettent l'injection du médicament à un flux constant. Le système MiniMed® permet des administrations en intraveineuse, intraartérielle, intrathécale et intrapéritonéale. Les pompes Infusaid® sont plus adaptées à une injection intraartérielle, intraventriculaire et intratumorale. Ces systèmes ont rencontré un certain succès mais ont toutefois une efficacité limitée qui compromet leur utilisation en traitement standard du GBM. Un grand progrès a été réalisé dans les techniques d'infusion par le développement de la CED [227].

La **méthode de CED** (*convection enhanced delivery*) consiste à introduire un cathéter par chirurgie stéréotaxique, au niveau de la zone à traiter et à administrer une solution à faible débit pour permettre la distribution, par convection, de fortes concentrations en médicament dans le milieu interstitiel. Cette technique permet de réduire la toxicité systémique [229], d'augmenter le volume de distribution par rapport à une simple diffusion (cinq à dix fois plus important) et d'éviter les gradients de concentrations trop élevées [230]. Elle permet également de s'affranchir du passage de la BHE. La Figure 27 représente la différence de distribution d'un médicament administré par diffusion ou par convection. La convection permet d'obtenir une concentration dans les tissus élevée dans un large volume tandis que la diffusion est associée à une décroissance exponentielle [231].

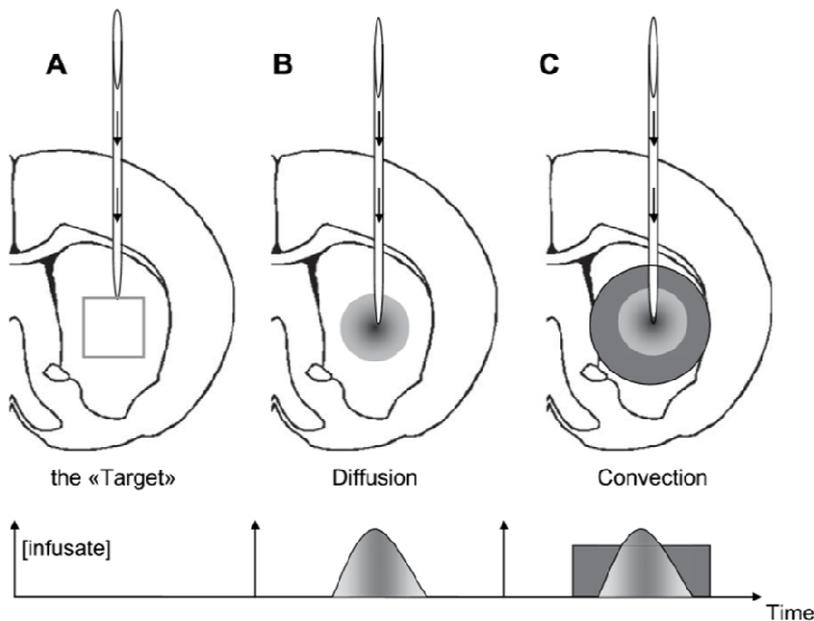


Figure 27 : Profil de distribution d'une substance par convection ou diffusion [232].

La distribution d'une solution dans un tissu biologique dépend du débit d'injection, du diamètre de l'aiguille, de la concentration du composé, du volume injecté et de la nature de l'agent injecté.

La CED a été utilisée pour administrer de nombreux agents thérapeutiques et des nanovecteurs comme des nanosphères, des liposomes, des micelles et des dendrimères [232-236]. Cette méthode

---

est toutefois limitée ses effets secondaires comme l'œdème et l'infection et une distribution du médicament difficile à déterminer.

### 7.3.3 Les implants

Durant ces deux dernières décennies, de nombreux systèmes de libération polymériques ont été développés incluant les systèmes de pastille, des microsphères, des nanosphères et des gels.

Les **pastilles polymériques** sont implantées dans la cavité post-chirurgicale après la résection de la tumeur et constituent un réservoir du médicament qui sera libéré progressivement et selon une cinétique variable en fonction du polymère utilisé. Le principal inconvénient de ces objets sont qu'ils nécessitent une nouvelle intervention chirurgicale pour être retirés. De plus, les molécules encapsulées ont généralement un faible degré de pénétration dans les tissus et ne peuvent être actives qu'à quelques millimètres du site d'injection. Cependant, des résultats cliniques ont montré que des pastilles chargées en BCNU (Gliadel®) étaient bien tolérées et pouvaient être efficaces en association avec une radiothérapie. L'utilisation du Gliadel® a notamment reçu une autorisation de mise sur le marché par la FDA pour le traitement des rechutes et des gliomes nouvellement diagnostiqués [227].

Les **gels** permettent aussi l'incorporation de principes actifs pour permettre leur libération continue. Regel® est un surfactant non-ionique qui a la capacité de former spontanément des micelles à cœur hydrophobe. Ces micelles ont la capacité de dissoudre les substances peu solubles et peuvent être utilisés pour libérer des peptides, des agents de chimiothérapie et des protéines. Oncogel®, une formulation de Regel® chargée en paclitaxel, a montré son efficacité mais doit encore faire l'objet d'études complémentaires [227].

Par leur petite taille, les **micro- et nanosphères** sont plus faciles à manipuler que les pastilles et risquent de générer moins de lésions tissulaires. Plusieurs formulations ont été testées chez l'animal et/ou cliniquement c'est le cas notamment des microsphères de PLGA chargées en paclitaxel [237] ou en 5-fluorouracil [238]. Ces dernières ont été testées cliniquement en association avec une radiothérapie ce qui a permis tout d'abord de montrer, dans une étude pilote réalisée sur 8 patients après opération, une amélioration de la médiane de survie de 98 semaines [239]. Malheureusement, l'étude de phase I réalisée ensuite chez 10 patients présentant des tumeurs non-opérables n'a pas permis de montrer une amélioration de la médiane de survie par rapport au groupe témoin [240]. Enfin il a été démontré, dans un modèle de gliome de rat, que des nanocapsules lipidiques contenant du paclitaxel étaient plus efficaces de la formulation commerciale du paclitaxel [241].

---

## 8 Objectifs de la thèse

Le glioblastome touche près de 5 personnes sur 100 000 habitants chaque année. La radiothérapie fait partie des traitements de référence de ce cancer mais son efficacité se heurte à des phénomènes de radorésistance. Mes travaux de thèse s'inscrivent donc dans une logique d'amélioration de la radiothérapie et de la radiosensibilisation des glioblastomes en associant un agent pharmacologique ou un radionucléide aux nanocapsules lipidiques, vecteur performant pour la délivrance de principes actifs. Les trois objectifs principaux sont :

- La compréhension des mécanismes mis en place par les cellules de GBM pour résister aux irradiations.
- L'amélioration de la radiothérapie interne effectuée avec des LNCs contenant du  $^{188}\text{Re}$  par le ciblage de cellules de GBM CXCR4 positives.
- Le développement d'un outil de radiosensibilisation par l'encapsulation d'un agent pharmacologique.

Ce manuscrit rapporte les résultats de ces travaux, organisés en deux chapitres.

Le premier chapitre de cette thèse s'intitule « Développement d'un nouvel outil de radiothérapie interne vectorisée ». Dans cette étude présentée dans la publication n°1, nous avons développé des nanocapsules lipidiques de  $^{188}\text{Re}$  fonctionnalisée avec un anticorps bloquant, le 12G5, dirigé contre le récepteur CXCR4. L'étude rapporte des résultats des expérimentations *in vivo* et les différentes analyses qui en ont découlé afin de comprendre la réponse de la tumeur vis-à-vis de ce vecteur.

Le second chapitre s'intitule « Développement d'un nouveau vecteur pour une chimio-radiosensibilisation des GBMs ». En préambule de ce chapitre figure une revue de la littérature présentant les mécanismes mis en place par les CSGs pour résister aux irradiations et comment les nanotechnologies sont des outils intéressants dans le développement de nouvelles stratégies de radiosensibilisation (publication n°2). Cette revue est suivie d'une publication (publication n°3) présentant les résultats *in vitro* de l'utilisation de LNC contenant de la rapamycine sur la sensibilisation aux irradiations des GBMs.

## Références

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-674.
2. Poirier, J., *Le système nerveux, central et périphérique: formation, fonction et rôle*.
3. Cazillis, M., V. Lelièvre, and P. Gressens, *Différentiation neurale des cellules souches embryonnaires*. Médecine Sciences, 2005. **21**: p. 484-490.
4. Marieb, E., *Anatomie et physiologie humaines (adaptation de la 6ème édition américaine)*. 2005.
5. <http://www.corpshumain.ca/Cerveau3.php#Cerebrospinal>.
6. Vibert, J.-F., *Le liquide céphalo-rachidien*. Département de Physiologie, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie.
7. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nature Reviews Neuroscience, 2006. **7**(1): p. 41-53.
8. Zülch, K., *Histological typing of tumours of the central nervous system*. World Health Organization, Geneva. 1979.
9. Kleihues, P., P.C. Burger, and B.W. Scheithauer, *Histological typing of tumours of the central nervous system*. World Health Organization international histological classification of tumours. Springer, Heidelberg. 1993.
10. Kleihues, P. and W.K. Cavenee, *World Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of nervous system*. IARC Press, Lyon. 2000.
11. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system (vol 114, pg 97, 2007)*. Acta Neuropathologica, 2007. **114**(5): p. 547-547.
12. Louis, D.N., et al., *WHO Classification of tumours of the central nervous system*. IARC, Lyon. 2007.
13. Figarella-Branger, D., et al., *Guidelines for adult diffuse gliomas WHO grade II, III and IV: pathology and biology*. Annales de pathologie, 2012. **32**: p. 318-327.
14. Figarella-Branger, D. and C. Bouvier, *Histological classification of human gliomas: state of art and controversies*. Bulletin du Cancer, 2005. **92**: p. 301-309.
15. Daumas-Duport, C., et al., *Gliomas WHO and Sainte-Anne hospital classifications*. Annales de pathologie, 2000. **20**(5): p. 413-428.
16. Ostrom, Q.T., *CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2006-2010 (vol 15, pg 1, 2013)*. Neuro-Oncology, 2014. **16**(5): p. 760-760.
17. Baldi, I., et al., *Epidemiology of glioblastoma*. Neurochirurgie, 2010. **56**(6): p. 433-440.
18. Zouaoui, S., et al., *French brain tumor database: General results on 40,000 cases, main current applications and future prospects*. Neurochirurgie, 2012. **58**(1): p. 4-13.
19. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma*. Clinical Cancer Research, 2013. **19**(4): p. 764-772.
20. Chin, L., et al., *Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1061-1068.
21. Brennan, C.W., et al., *The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-477.
22. Verhaak, R.G.W., et al., *Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
23. Masui, K., T.F. Cloughesy, and P.S. Mischel, *Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 2012. **38**(3): p. 271-291.
24. Barker, F.G., et al., *EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2001. **51**(2): p. 410-418.

25. Shinojima, N., et al., *Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme*. *Cancer Research*, 2003. **63**(20): p. 6962-6970.
26. Fujisawa, H., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas*. *Laboratory Investigation*, 2000. **80**(1): p. 65-72.
27. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: A population-based study*. *Cancer Research*, 2004. **64**(19): p. 6892-6899.
28. Ohgaki, H. and P. Kleihues, *Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma*. *American Journal of Pathology*, 2007. **170**(5): p. 1445-1453.
29. Gladson, C.L., R.A. Prayson, and W.M. Liu, *The Pathobiology of Glioma Tumors*, in *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*. 2010, Annual Reviews: Palo Alto. p. 33-50.
30. Meir, E.G.V., *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets, and Therapeutic Approaches* Central Nervous System cancer: Humana Press, 2009.
31. Nakamura, M., et al., *Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 2000. **59**(6): p. 539-543.
32. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma Multiforme*. *Science*, 2008. **321**(5897): p. 1807-1812.
33. Koivunen, P., et al., *Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation*. *Nature*, 2012. **483**(7390): p. 485-U144.
34. Brennan, C., et al., *Glioblastoma Subclasses Can Be Defined by Activity among Signal Transduction Pathways and Associated Genomic Alterations*. *Plos One*, 2009. **4**(11).
35. Phillips, H.S., et al., *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(3): p. 157-173.
36. Stupp, R., et al., *Diagnostic et traitement des gliomes*. *Forum Med Suisse*, 2013. **13**(22): p. 421-426.
37. Galanaud, D., et al., *MR spectroscopy of brain tumors*. *Journal De Radiologie*, 2006. **87**(6): p. 822-832.
38. Figarella-Branger, D., et al., *Classification histologique et moléculaire des gliomes*. *Revue neurologique*, 2008. **164**(6-7): p. 505-515.
39. Frenel, J.S., et al., *Facteurs pronostiques et prédictifs de réponse des gliomes cérébraux de l'adulte*. *Bulletin du Cancer*, 2009. **96**(4): p. 357-367.
40. Hartmann, C., et al., *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas*. *Acta Neuropathologica*, 2010. **120**(6): p. 707-718.
41. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas*. *New England Journal of Medicine*, 2009. **360**(8): p. 765-773.
42. Silber, J.R., et al., *COMPARISON OF O6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE ACTIVITY IN BRAIN-TUMORS AND ADJACENT NORMAL BRAIN*. *Cancer Research*, 1993. **53**(14): p. 3416-3420.
43. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. *New England Journal of Medicine*, 2000. **343**(19): p. 1350-1354.
44. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
45. Chen, Y., et al., *MGMT Promoter Methylation and Glioblastoma Prognosis: A Systematic Review and Meta-analysis*. *Archives of Medical Research*, 2013. **44**(4): p. 281-290.
46. Mellinghoff, I.K., et al., *Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **353**(19): p. 2012-2024.
47. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(10): p. 987-996.

48. Stummer, W., 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 Neurochirurgica, 2011. **153**(6): p. 1211-1218.
49. Anton, K., J.M. Baehring, and T. Mayer, *Glioblastoma Multiforme Overview of Current Treatment and Future Perspectives*. Hematology-Oncology Clinics of North America, 2012. **26**(4): p. 825-+.
50. Hoover, J.M., S.M. Chang, and I.F. Parney, *Clinical Trials in Brain Tumor Surgery*. Neuroimaging Clinics of North America, 2010. **20**(3): p. 409-+.
51. Perry, J., et al., *Novel therapies in glioblastoma*. Neurol Res Int, 2012. **2012**: p. 428565.
52. Stummer, W., et al., *Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial*. Lancet Oncology, 2006. **7**(5): p. 392-401.
53. Pichlmeier, U., et al., *Resection and survival in glioblastoma multiforme: An RTOG recursive partitioning analysis of ALA study patients*. Neuro-Oncology, 2008. **10**(6): p. 1025-1034.
54. Hamer, P.C.D., et al., *Impact of Intraoperative Stimulation Brain Mapping on Glioma Surgery Outcome: A Meta-Analysis*. Journal of Clinical Oncology, 2012. **30**(20): p. 2559-2565.
55. Hart, M.G., et al., *Chemotherapy wafers for high grade glioma*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2011(3).
56. Spiegel, B.M.R., et al., *Clinical impact of adjuvant chemotherapy in glioblastoma multiforme - A meta-analysis*. Cns Drugs, 2007. **21**(9): p. 775-787.
57. McGirt, M.J., et al., *Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme*. Journal of Neurosurgery, 2009. **110**(3): p. 583-588.
58. Watanabe, K., et al., *Combination chemotherapy using carboplatin (JM-8) and etoposide (JET therapy) for recurrent malignant gliomas: A phase II study*. Acta Neurochirurgica, 2002. **144**(12): p. 1265-1270.
59. Jeremic, B., et al., *CARBOPLATIN AND ETOPOSIDE CHEMOTHERAPY REGIMEN FOR RECURRENT MALIGNANT GLIOMA - A PHASE-II STUDY*. Journal of Clinical Oncology, 1992. **10**(7): p. 1074-1077.
60. Franceschi, E., et al., *Phase II trial of carboplatin and etoposide for patients with recurrent high-grade glioma*. British Journal of Cancer, 2004. **91**(6): p. 1038-1044.
61. Vredenburgh, J.J., et al., *Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(4): p. 1253-1259.
62. Vredenburgh, J.J., et al., *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(30): p. 4722-4729.
63. Wong, E.T., et al., *Bevacizumab for Recurrent Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis*. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2011. **9**(4): p. 403-407.
64. Friedman, H.S., et al., *Bevacizumab Alone and in Combination With Irinotecan in Recurrent Glioblastoma*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(28): p. 4733-4740.
65. Wilson, T.A., M.A. Karajannis, and D.H. Harter, *Glioblastoma multiforme: state of art and future therapeutics*. Surg Neurol Int, 2014. **5**: p. 64.
66. Rich, J.N., et al., *Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma*. Journal of Clinical Oncology, 2004. **22**(1): p. 133-142.
67. van den Bent, M.J., et al., *Randomized Phase II Trial of Erlotinib Versus Temozolomide or Carmustine in Recurrent Glioblastoma: EORTC Brain Tumor Group Study 26034*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(8): p. 1268-1274.
68. Neyns, B., et al., *Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma*. Annals of Oncology, 2009. **20**(9): p. 1596-1603.
69. Raymond, E., et al., *Phase II study of imatinib in patients with recurrent gliomas of various histologies: A European organisation for research and treatment of cancer brain tumor group study*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(28): p. 4659-4665.

70. Wen, P.Y., et al., *Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08*. *Clinical Cancer Research*, 2006. **12**(16): p. 4899-4907.
71. Vredenburgh, J.J., et al., *ADDITION OF BEVACIZUMAB TO STANDARD RADIATION THERAPY AND DAILY TEMOZOLOMIDE IS ASSOCIATED WITH MINIMAL TOXICITY IN NEWLY DIAGNOSED GLIOBLASTOMA MULTIFORME*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2012. **82**(1): p. 58-66.
72. Gilbert, M.R., et al., *RTOG 0825: Phase III double-blind placebo-controlled trial evaluating bevacizumab (Bev) in patients (Pts) with newly diagnosed glioblastoma (GBM)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. **31**(18).
73. Rahmathulla, G., et al., *Bevacizumab in high-grade gliomas: a review of its uses, toxicity assessment, and future treatment challenges*. *Oncotargets and Therapy*, 2013. **6**: p. 371-389.
74. Batchelor, T.T., et al., *Phase II Study of Cediranib, an Oral Pan-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Recurrent Glioblastoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2010. **28**(17): p. 2817-2823.
75. Neyns, B., et al., *Phase II study of sunitinib malate in patients with recurrent high-grade glioma*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2011. **103**(3): p. 491-501.
76. Reardon, D.A., et al., *Phase I Pharmacokinetic Study of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Vatalanib (PTK787) Plus Imatinib and Hydroxyurea for Malignant Glioma*. *Cancer*, 2009. **115**(10): p. 2188-2198.
77. Stupp, R., et al., *Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma and methylated O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene promoter: Key results of the multicenter, randomized, open-label, controlled, phase III CENTRIC study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2013. **31**(18).
78. Cloughesy, T.F., et al., *Antitumor activity of rapamycin in a phase I trial for patients with recurrent PTEN-Deficient glioblastoma*. *Plos Medicine*, 2008. **5**(1): p. 139-151.
79. Galanis, E., et al., *Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: A north central cancer treatment group study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(23): p. 5294-5304.
80. Sebolt-Leopold, J.S. and R. Herrera, *Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2004. **4**(12): p. 937-947.
81. Cloughesy, T.F., et al., *Phase II trial of tipifarnib in patients with recurrent malignant glioma either receiving or not receiving enzyme-inducing antiepileptic drugs: A North American Brain Tumor Consortium study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(22): p. 3651-3656.
82. Le Caer, S., *Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H-2 Production under Ionizing Radiation*. *Water*, 2011. **3**(1): p. 235-253.
83. Azria, D., J.-B. Dubois, and F.d.M. Montpellier-Nîmes, *Notions radiobiologiques; Principaux effets secondaires*. 2006.
84. Taillandier, L. and L. Bauchet, *Référentiel de l'ANOCEF pour les gliomes de l'adulte*. 2012.
85. Haberer, S., A. Assouline, and J.J. Mazon, *Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: Brain and hypophysis*. *Cancer Radiothérapie*, 2010. **14**(4-5): p. 263-268.
86. Lawrence, Y.R., et al., *RADIATION DOSE-VOLUME EFFECTS IN THE BRAIN*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2010. **76**(3): p. S20-S27.
87. Roa, W., et al., *Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: A prospective randomized clinical trial*. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. **22**(9): p. 1583-1588.
88. Malmstrom, A., et al., *Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncology*, 2012. **13**(9): p. 916-926.
89. Thames, H.D., et al., *CHANGES IN EARLY AND LATE RADIATION RESPONSES WITH ALTERED DOSE FRACTIONATION - IMPLICATIONS FOR DOSE-SURVIVAL RELATIONSHIPS*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1982. **8**(2): p. 219-226.

90. Gonzalez, D.G., et al., *ACCELERATED RADIOTHERAPY IN GLIOBLASTOMA-MULTIFORME - A DOSE SEARCHING PROSPECTIVE-STUDY*. Radiotherapy and Oncology, 1994. **32**(2): p. 98-105.
91. Curran, W.J., C. Scott, and W.K. Yung, *No survival benefit of hyperfractionated (HFX) radiotherapy (RT) to 72.0 Gy and carmustine versus standard RT and carmustine for malignant gliomas patients: preliminary results for RTOG 90-06*. Proc Amer Soc Clin Oncol, 1996.
92. Scott, C., W.J. Curran, and W.K. Yung, *Long term results of RTOG 90-06: a randomized trial of hyperfractionated radiotherapy (RT) to 72.0 Gy and carmustine versus standard RT and carmustine for malignant gliomas patients, with emphasis on anaplastic astrocytoma (AA) patients*. Proc Amer Soc Clin Oncol, 1998.
93. Hall, W.A., et al., *STEREOTAXIC RADIOSURGERY FOR RECURRENT MALIGNANT GLIOMAS*. Journal of Clinical Oncology, 1995. **13**(7): p. 1642-1648.
94. Souhami, L., et al., *Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: Report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2004. **60**(3): p. 853-860.
95. Simon, J.M., et al., *Brachytherapy of glioblastoma recurring in previously irradiated territory: Predictive value of tumor volume*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2002. **53**(1): p. 67-74.
96. Bernstein, M., et al., *BRACHYTHERAPY FOR RECURRENT MALIGNANT ASTROCYTOMA*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 1994. **30**(5): p. 1213-1217.
97. Selker, R.G., et al., *The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: A randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine*. Neurosurgery, 2002. **51**(2): p. 343-355.
98. Laperriere, N.J., et al., *Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 1998. **41**(5): p. 1005-1011.
99. Stubbs, J.B., et al., *Preclinical evaluation of a novel device for delivering brachytherapy to the margins of resected brain tumor cavities*. Journal of Neurosurgery, 2002. **96**(2): p. 335-343.
100. Tatter, S.B., et al., *An inflatable balloon catheter and liquid I-125 radiation source (GliaSite Radiation Therapy System) for treatment of recurrent malignant glioma: multicenter safety and feasibility trial*. Journal of Neurosurgery, 2003. **99**(2): p. 297-303.
101. Isoray, *Dispositif GliaSite*.
102. Macklis, R.M., et al., *RADIOIMMUNOTHERAPY WITH ALPHA-PARTICLE EMITTING IMMUNOCONJUGATES*. Science, 1988. **240**(4855): p. 1024-1026.
103. McDevitt, M.R., et al., *Radioimmunotherapy with alpha-emitting nuclides*. European Journal of Nuclear Medicine, 1998. **25**(9): p. 1341-1351.
104. Zalutsky, M.R., et al., *Clinical experience with alpha-particle-emitting At-211: Treatment of recurrent brain tumor patients with At-211-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6*. Journal of Nuclear Medicine, 2008. **49**(1): p. 30-38.
105. Sofou, S., et al., *Engineered Liposomes for potential alpha-particle therapy of metastatic cancer*. Journal of Nuclear Medicine, 2004. **45**(2): p. 253-260.
106. Reardon, D.A., et al., *Phase II trial of murine I-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas*. Journal of Clinical Oncology, 2002. **20**(5): p. 1389-1397.
107. Reardon, *Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: Phase II study results (vol 24, pg 115, 2006)*. Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(9): p. 1484-1484.

108. Veeravagu, A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Radioimmunotherapy of Glioblastoma Multiforme*. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**(22): p. 7330-7339.
109. Phillips, W.T., et al., *Rhenium-186 liposomes as convection-enhanced nanoparticle brachytherapy for treatment of glioblastoma*. *Neuro-Oncology*, 2012. **14**(4): p. 416-425.
110. Casaco, A., et al., *Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with (188)Re in adult recurrent high-grade glioma*. *Cancer Biology & Therapy*, 2008. **7**(3): p. 333-339.
111. Huang, F.Y.J., et al., *Imaging, Autoradiography, and Biodistribution of Re-188-Labeled PEGylated Nanoliposome in Orthotopic Glioma Bearing Rat Model*. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2011. **26**(6): p. 717-725.
112. Lepareur, N., et al., *A kit formulation for the labelling of lipiodol with generator-produced Re-188*. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, 2004. **47**(12): p. 857-867.
113. Allard, E., et al., *Re-188-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas*. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2008. **35**(10): p. 1838-1846.
114. Vanpouille-Box, C., et al., *Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with Re-188-lipid nanocapsules*. *Biomaterials*, 2011. **32**(28): p. 6781-6790.
115. Chang, J.E., et al., *Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2007. **5**(11): p. 894-915.
116. *A study of the effect of misonidazole in conjunction with radiotherapy for the treatment of grades 3 and 4 astrocytomas. A report from the MRC Working Party on misonidazole in gliomas*. *The British journal of radiology*, 1983. **56**(669): p. 673-82.
117. Kleinberg, L., et al., *Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with RSR13 and radiotherapy: Results of a phase II New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium safety and efficacy study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2002. **20**(14): p. 3149-3155.
118. Curran, W.J., et al., *RECURSIVE PARTITIONING ANALYSIS OF PROGNOSTIC FACTORS IN 3 RADIATION-THERAPY ONCOLOGY GROUP MALIGNANT GLIOMA TRIALS*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1993. **85**(9): p. 704-710.
119. Del Rowe, J., et al., *Single-arm, open-label phase II study of intravenously administered tirapazamine and radiation therapy for glioblastoma multiforme*. *Journal of Clinical Oncology*, 2000. **18**(6): p. 1254-1259.
120. Phillips, T.L., et al., *EVALUATION OF BROMODEOXYURIDINE IN GLIOBLASTOMA-MULTIFORME - A NORTHERN CALIFORNIA CANCER CENTER PHASE-II STUDY*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1991. **21**(3): p. 709-714.
121. Fisher, B., et al., *Phase II study of topotecan plus cranial radiation for glioblastoma multiforme: Results of Radiation Therapy Oncology Group 9513*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2002. **53**(4): p. 980-986.
122. Friedman, H.S., et al., *Schedule-dependent activity of irinotecan plus BCNU against malignant glioma xenografts (vol 45, pg 345, 1999)*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2000. **46**(1): p. 84-84.
123. Grossman, S., A. O'Neill, and M. Grunnet, *Phase III study comparing three cycles of infusional BCNU/Cisplatin followed by radiation with radiation and concurrent BCNU for patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme (ECOG 2394-SWOG 9508)*. *Proc Amer Soc Clin Oncol*, 2000.
124. Langer, C.J., et al., *Phase II radiation therapy oncology group trial of weekly paclitaxel and conventional external beam radiation therapy for supratentorial glioblastoma multiforme*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2001. **51**(1): p. 113-119.
125. Suh, J., M. Mehta, and E. Chang, *Phase II trial of motexafin gadolinium (MGd, Xcycin) and cranial radiation in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM)*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2002. **54**.

126. Baumann, F., et al., *Combined thalidomide and temozolomide treatment in patients with glioblastoma multiforme*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2004. **67**(1-2): p. 191-200.
127. Robins, H.I., et al., *Phase 2 trial of radiation plus high-dose tamoxifen for glioblastoma multiforme: RTOG protocol BR-0021*. *Neuro-Oncology*, 2006. **8**(1): p. 47-52.
128. Chakravarti, A., et al., *An update of phase II results from RTOG 0211: A phase I/II study of gefitinib with radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(18): p. 64S-64S.
129. Chang, S.M., et al., *Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme*. *Investigational New Drugs*, 2005. **23**(4): p. 357-361.
130. Nguyen, T.D., et al., *A pilot study to assess the tolerability and efficacy of RAD-001 (everolimus) with gefitinib in patients with recurrent glioblastoma multiforme (GBM)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(18): p. 59S-59S.
131. Lustig, R.A., et al., *Pre-radiation R115777 in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme and residual enhancing disease*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(16): p. 118S-118S.
132. Gilbert, M.R., et al., *A phase I study of temozolomide (TMZ) and the farnesyltransferase inhibitor (FTI), lonafarnib (Sarazar, SCH66336) in recurrent glioblastoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(18): p. 72S-72S.
133. Wen, P.Y., W. Yung, and K. Lamborn, *Phase I/II study of imatinib mesylate (ST1571) for patients with recurrent malignant gliomas (NABTC 99-08)*. *Neurooncology*, 2004. **6**.
134. Raymond, E., et al., *Multicentre phase II study of imatinib mesylate in patients with recurrent glioblastoma: An EORTC: NODG/BTG Intergroup Study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. **22**(14): p. 107S-107S.
135. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-111.
136. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. *Cancer Research*, 2003. **63**(18): p. 5821-5828.
137. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
138. Vescovi, A.L., R. Galli, and B.A. Reynolds, *Brain tumour stem cells*. *Nature Reviews Cancer*, 2006. **6**(6): p. 425-436.
139. Guo, Y., et al., *Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas*. *Histopathology*, 2011. **59**(4): p. 763-775.
140. Huang, Z., et al., *Cancer stem cells in glioblastoma-molecular signaling and therapeutic targeting*. *Protein & Cell*, 2010. **1**(7): p. 638-655.
141. Zhang, M.Y., et al., *Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2008. **27**.
142. Bao, S.D., et al., *Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth*. *Cancer Research*, 2008. **68**(15): p. 6043-6048.
143. Son, M.J., et al., *SSEA-1 Is an Enrichment Marker for Tumor-Initiating Cells in Human Glioblastoma*. *Cell Stem Cell*, 2009. **4**(5): p. 440-452.
144. Lathia, J.D., et al., *Integrin Alpha 6 Regulates Glioblastoma Stem Cells*. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(5): p. 421-432.
145. Beier, D., et al., *CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles*. *Cancer Research*, 2007. **67**(9): p. 4010-4015.
146. Wang, J., et al., *CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells*. *International Journal of Cancer*, 2008. **122**(4): p. 761-768.
147. Joo, K.M., et al., *Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas*. *Laboratory Investigation*, 2008. **88**(8): p. 808-815.

148. Chen, R.H., et al., *A Hierarchy of Self-Renewing Tumor-Initiating Cell Types in Glioblastoma*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(4): p. 362-375.
149. Ogden, A.T., et al., *Identification of A2B5(+)/CD133-tumor-initiating cells in adult human gliomas*. *Neurosurgery*, 2008. **62**(2): p. 505-514.
150. Anido, J., et al., *TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(6): p. 655-668.
151. Thon, N., et al., *Presence of pluripotent CD133(+) cells correlates with malignancy of gliomas*. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2010. **43**(1): p. 51-59.
152. Bao, S.D., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 756-760.
153. Tubiana, M., *Radiobiologie, radiothérapie et radioprotection (Hermann)*. 2008.
154. Helleday, T., et al., *DNA repair pathways as targets for cancer therapy*. *Nature Reviews Cancer*, 2008. **8**(3): p. 193-204.
155. Somosy, Z., *Radiation response of cell organelles*. *Micron*, 2000. **31**(2): p. 165-181.
156. Ropolo, M., et al., *Comparative Analysis of DNA Repair in Stem and Nonstem Glioma Cell Cultures*. *Molecular Cancer Research*, 2009. **7**(3): p. 383-392.
157. Lim, Y.C., et al., *A Role for Homologous Recombination and Abnormal Cell-Cycle Progression in Radioresistance of Glioma-Initiating Cells*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012. **11**(9): p. 1863-1872.
158. Welsh, J.W., et al., *RAD51 PROTEIN EXPRESSION AND SURVIVAL IN PATIENTS WITH GLIOBLASTOMA MULTIFORME*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2009. **74**(4): p. 1251-1255.
159. Cheng, L., et al., *L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1*. *Embo Journal*, 2011. **30**(5): p. 800-813.
160. Cheng, L., et al., *L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1*. *Embo Journal*, 2011. **30**(5): p. 800-813.
161. Facchino, S., et al., *BMI1 Confers Radioresistance to Normal and Cancerous Neural Stem Cells through Recruitment of the DNA Damage Response Machinery*. *Journal of Neuroscience*, 2010. **30**(30): p. 10096-10111.
162. Wang, J.L., et al., *Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells*. *Stem Cells*, 2010. **28**(1): p. 17-28.
163. Wang, R., et al., *Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium*. *Nature*, 2010. **468**(7325): p. 829-U128.
164. Kim, Y., et al., *Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance*. *Laboratory Investigation*, 2012. **92**(3): p. 466-473.
165. Hardee, M.E. and D. Zagzag, *Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization*. *American Journal of Pathology*, 2012. **181**(4): p. 1126-1141.
166. Beaumont, M., et al., *Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using iron-based vessel size index MRI in combination with gadolinium-based dynamic contrast-enhanced MRI*. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2009. **29**(10): p. 1714-1726.
167. Calabrese, C., et al., *A perivascular niche for brain tumor stem cells*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(1): p. 69-82.
168. Zhu, T.S., et al., *Endothelial Cells Create a Stem Cell Niche in Glioblastoma by Providing NOTCH Ligands That Nurture Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells*. *Cancer Research*, 2011. **71**(18): p. 6061-6072.
169. Bao, S.D., et al., *Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor*. *Cancer Research*, 2006. **66**(16): p. 7843-7848.
170. Ricci-Vitiani, L., et al., *Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells*. *Nature*, 2010. **468**(7325): p. 824-U121.
171. Filatova, A., T. Acker, and B.K. Garvalov, *The cancer stem cell niche(s): The crosstalk between glioma stem cells and their microenvironment*. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 2013. **1830**(2): p. 2496-2508.

172. Cheng, L., et al., *Glioblastoma Stem Cells Generate Vascular Pericytes to Support Vessel Function and Tumor Growth*. *Cell*, 2013. **153**(1): p. 139-152.
173. Schonberg, D.L., et al., *Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy*. *Molecular aspects of medicine*, 2013.
174. Harris, A.L., *Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth*. *Nature Reviews Cancer*, 2002. **2**(1): p. 38-47.
175. Keith, B. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer*. *Cell*, 2007. **129**(3): p. 465-472.
176. Soeda, A., et al., *Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 alpha*. *Oncogene*, 2009. **28**(45): p. 3949-3959.
177. Li, Z., et al., *Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells*. *Cancer Cell*, 2009. **15**(6): p. 501-513.
178. Heddleston, J.M., et al., *The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(20): p. 3274-3284.
179. Chen, H.-L. and D.M. Panchision, *Concise review: Bone morphogenetic protein pleiotropism in neural stem cells and their derivatives - Alternative pathways, convergent signals*. *Stem Cells*, 2007. **25**(1): p. 63-68.
180. Chirasani, S.R., et al., *Bone morphogenetic protein-7 release from endogenous neural precursor cells suppresses the tumorigenicity of stem-like glioblastoma cells*. *Brain*, 2010. **133**: p. 1961-1972.
181. Piccirillo, S.G.M., et al., *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells*. *Nature*, 2006. **444**(7120): p. 761-765.
182. Bajetto, A., et al., *Chemokines and their receptors in the central nervous system*. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2001. **22**(3): p. 147-184.
183. Cheng, Z.J., et al., *beta-arrestin differentially regulates the chemokine receptor CXCR4-mediated signaling and receptor internalization, and this implicates multiple interaction sites between beta-arrestin and CXCR4*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(4): p. 2479-2485.
184. Sierro, F., et al., *Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(37): p. 14759-14764.
185. Decaillet, F.M., et al., *CXCR7/CXCR4 Heterodimer Constitutively Recruits beta-Arrestin to Enhance Cell Migration*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. **286**(37): p. 32188-32197.
186. Singh, A.K., et al., *Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2013. **24**(1): p. 41-49.
187. Salmaggi, A., et al., *CXCL12 expression is predictive of a shorter time to tumor progression in low-grade glioma: A single-institution study in 50 patients*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2005. **74**(3): p. 287-293.
188. Bian, X.W., et al., *Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival*. *Neurosurgery*, 2007. **61**(3): p. 570-578.
189. Zagzag, D., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in brain tumors - Association with angiogenesis, invasion, and progression*. *Cancer*, 2000. **88**(11): p. 2606-2618.
190. Zagzag, D., et al., *Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion*. *Laboratory Investigation*, 2006. **86**(12): p. 1221-1232.
191. Kioi, M., et al., *Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 2010. **120**(3): p. 694-705.
192. Duda, D.G., et al., *CXCL12 (SDF1 alpha)-CXCR4/CXCR7 Pathway Inhibition: An Emerging Sensitizer for Anticancer Therapies?* *Clinical Cancer Research*, 2011. **17**(8): p. 2074-2080.

193. Greenfield, J.P., W.S. Cobb, and D. Lyden, *Resisting arrest: a switch from angiogenesis to vasculogenesis in recurrent malignant gliomas*. Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(3): p. 663-667.
194. Ehtesham, M., et al., *CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness*. Oncogene, 2006. **25**(19): p. 2801-2806.
195. Zhang, J., S. Sarkar, and V.W. Yong, *The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase*. Carcinogenesis, 2005. **26**(12): p. 2069-2077.
196. Ma, Q., et al., *Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(16): p. 9448-9453.
197. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-599.
198. Miller, F.D. and A. Gauthier-Fisher, *Home at Last: Neural Stem Cell Niches Defined*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 507-510.
199. Ehtesham, M., et al., *CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells*. Cancer Letters, 2009. **274**(2): p. 305-312.
200. Liu, C., et al., *Expression and Functional Heterogeneity of Chemokine Receptors CXCR4 and CXCR7 in Primary Patient-Derived Glioblastoma Cells*. Plos One, 2013. **8**(3).
201. Lee, C.C., et al., *Disrupting the CXCL12/CXCR4 axis disturbs the characteristics of glioblastoma stem-like cells of rat RG2 glioblastoma*. Cancer Cell International, 2013. **13**.
202. Schulte, A., et al., *A Distinct Subset of Glioma Cell Lines with Stem Cell-like Properties Reflects the Transcriptional Phenotype of Glioblastomas and Overexpresses CXCR4 as Therapeutic Target*. Glia, 2011. **59**(4): p. 590-602.
203. Sampson, J.H., et al., *Unarmed, tumor-specific monoclonal antibody effectively treats brain tumors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(13): p. 7503-7508.
204. Talasila, K.M., et al., *EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis*. Acta Neuropathologica, 2013. **125**(5): p. 683-698.
205. Langer, R., *Drug delivery and targeting*. Nature, 1998. **392**(6679): p. 5-10.
206. Gregoriadis, G. and A.T. Florence, *LIPOSOMES IN DRUG DELIVERY - CLINICAL, DIAGNOSTIC AND OPHTHALMIC POTENTIAL*. Drugs, 1993. **45**(1): p. 15-28.
207. Allen, T.M., C.B. Hansen, and D.E.L. Demenezes, *PHARMACOKINETICS OF LONG-CIRCULATING LIPOSOMES*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995. **16**(2-3): p. 267-284.
208. Mastrobattista, E., G.A. Koning, and G. Storm, *Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **40**(1-2): p. 103-127.
209. Kannan, R., et al., *EVIDENCE FOR CARRIER-MEDIATED TRANSPORT OF GLUTATHIONE ACROSS THE BLOOD-BRAIN-BARRIER IN THE RAT*. Journal of Clinical Investigation, 1990. **85**(6): p. 2009-2013.
210. Sharma, A. and U.S. Sharma, *Liposomes in drug delivery: progress and limitations*. International Journal of Pharmaceutics, 1997. **154**(2): p. 123-140.
211. Kataoka, K., A. Harada, and Y. Nagasaki, *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **47**(1): p. 113-131.
212. Gaucher, G., et al., *Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery*. Journal of Controlled Release, 2005. **109**(1-3): p. 169-188.
213. Knox, C., et al., *DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'Omics' research on drugs*. Nucleic Acids Research, 2011. **39**: p. D1035-D1041.
214. Morshed, R.A., et al., *The potential of polymeric micelles in the context of glioblastoma therapy*. Front Pharmacol, 2013. **4**(157).

- 
215. Yokoyama, M., *Polymeric micelles as a new drug carrier system and their required considerations for clinical trials*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010. **7**(2): p. 145-158.
  216. Chakravarthi, S.S., D.H. Robinson, and S. De, *Nanoparticles prepared using natural and synthetic polymers*. *Nanoparticulate drug deliv syst*, 2007: p. 51-60.
  217. Lockman, P.R., et al., *Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2002. **28**(1): p. 1-13.
  218. Wang, K., et al., *Tumor penetrability and anti-angiogenesis using iRGD-mediated delivery of doxorubicin-polymer conjugates*. *Biomaterials*, 2014. **35**(30): p. 8735-8747.
  219. Sarin, H., *Recent progress towards development of effective systemic chemotherapy for the treatment of malignant brain tumors*. *Journal of Translational Medicine*, 2009. **7**.
  220. Shevtsov, M.A., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles conjugated with epidermal growth factor (SPION-EGF) for targeting brain tumors*. *International Journal of Nanomedicine*, 2014. **9**: p. 273-287.
  221. Shevtsov, M.A., et al., *Tumor targeting using magnetic nanoparticle Hsp70 conjugate in a model of C6 glioma*. *Neuro-Oncology*, 2014. **16**(1): p. 38-49.
  222. Fang, C., et al., *Fabrication of magnetic nanoparticles with controllable drug loading and release through a simple assembly approach*. *Journal of Controlled Release*, 2012. **162**(1): p. 233-241.
  223. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. *Pharmaceutical Research*, 2002. **19**(6): p. 875-880.
  224. Bourseau-Guilmain, E., et al., *Development and characterization of immuno-nanocarriers targeting the cancer stem cell marker AC133*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **423**(1): p. 93-101.
  225. Li, L., S. Agarwal, and W.F. Elmquist, *Brain Efflux Index To Investigate the Influence of Active Efflux on Brain Distribution of Pemetrexed and Methotrexate*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2013. **41**(3): p. 659-667.
  226. Lammers, T., et al., *Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress*. *Journal of Controlled Release*, 2012. **161**(2): p. 175-187.
  227. Allhenn, D., M.A.S. Boushehri, and A. Lamprecht, *Drug delivery strategies for the treatment of malignant gliomas*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **436**(1-2): p. 299-310.
  228. Iyer, A.K., et al., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting*. *Drug Discovery Today*, 2006. **11**(17-18): p. 812-818.
  229. Bobo, R.H., et al., *CONVECTION-ENHANCED DELIVERY OF MACROMOLECULES IN THE BRAIN*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994. **91**(6): p. 2076-2080.
  230. Morrison, P.F., et al., *HIGH-FLOW MICROINFUSION - TISSUE PENETRATION AND PHARMACODYNAMICS*. *American Journal of Physiology*, 1994. **266**(1): p. R292-R305.
  231. Rousseau, J., *Chimio-radiothérapie des tumeurs cérébrales: intérêt de l'injection intratumorale de drogues antinéoplasiques*. PhD thesis, 2007.
  232. Allard, E., C. Passirani, and J.-P. Benoit, *Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors*. *Biomaterials*, 2009. **30**(12): p. 2302-2318.
  233. Cirpanli, Y., et al., *Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. **403**(1-2): p. 201-206.
  234. Grahn, A.Y., et al., *Non-PEGylated liposomes for convection-enhanced delivery of topotecan and gadodiamide in malignant glioma: initial experience*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2009. **95**(2): p. 185-197.
  235. Yang, W., et al., *Convection enhanced delivery of boronated EGF as a molecular targeting agent for neutron capture therapy of brain tumors*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2009. **95**(3): p. 355-365.
  236. Yokosawa, M., et al., *Convection-Enhanced Delivery of a Synthetic Retinoid Am80, Loaded into Polymeric Micelles, Prolongs the Survival of Rats Bearing Intracranial Glioblastoma Xenografts*. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2010. **221**(4): p. 257-264.

- 
237. Li, K.W., et al., *Polylactofate microspheres for paclitaxel delivery to central nervous system malignancies*. *Clinical Cancer Research*, 2003. **9**(9): p. 3441-3447.
  238. Menei, P., et al., *Effect of stereotactic implantation of biodegradable 5-fluorouracil-loaded microspheres in healthy and C6 glioma-bearing rats*. *Neurosurgery*, 1996. **39**(1): p. 117-123.
  239. Menei, P., et al., *Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma - A pilot study*. *Cancer*, 1999. **86**(2): p. 325-330.
  240. Menei, P., et al., *Stereotaxic implantation of 5-fluorouracil-releasing microspheres in malignant glioma - A phase I study*. *Cancer*, 2004. **100**(2): p. 405-410.
  241. Garcion, E., et al., *A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2006. **5**(7): p. 1710-1722.

# CHAPITRE I

# Chapitre I

## Développement d'un nouvel outil de radiothérapie interne vectorisée

Dans ce travail, nous avons choisi de cibler le récepteur à chimiokine CXCR4 en raison de son expression par les cellules souches de GBM. De plus, l'axe CXCL12/CXCR4 est impliqué à la fois dans des mécanismes de radiorésistance au niveau de la cellule de GBM elle-même mais aussi dans la vasculogénèse ce qui permet le maintien et le développement de la tumeur. Nous avons donc développé des nanocapsules lipidiques de  $^{188}\text{Re}$  fonctionnalisées avec un anticorps bloquant, le 12G5, dirigé contre ce récepteur afin de concentrer l'irradiation au niveau de ces cellules CXCR4-positives.

Afin de tester l'efficacité de notre nanovecteur, nous avons développé notre propre modèle animal de glioblastome humain.

Nous avons d'abord travaillé sur la lignée de GBM A172. Cette lignée a été cultivée dans différentes conditions d'oxygénation : 21%, 3% et 0,4% et irradiée par des rayonnements externes à des doses croissantes comprises entre 2Gy et 32Gy. Nous avons ensuite recherché l'expression de CXCR4 après irradiation par cytométrie en flux et on constate que l'expression de ce récepteur augmente avec la dose d'irradiation (Figure 1). La même expérience a été réalisée sur la primo-culture ChaGu cultivée à 3% d'oxygène et présente les mêmes résultats. En revanche, l'irradiation de la lignée U87MG n'induisait pas d'augmentation de l'expression du récepteur, quelle que soit la condition d'oxygénation.

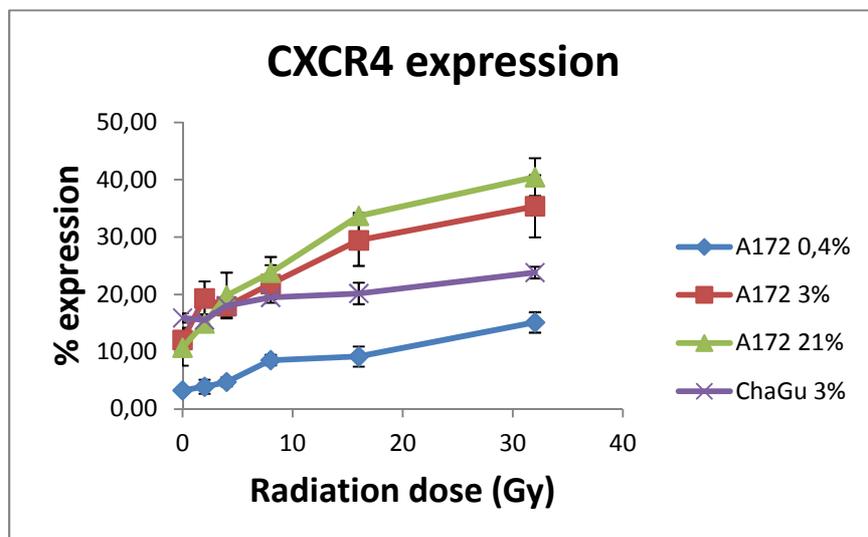


Figure 1 : Expression de CXCR4 en fonction de la dose d'irradiation.

Nous avons ensuite souhaité savoir si l'irradiation entraînait une augmentation de l'expression de CXCR4 par les cellules ou un enrichissement de la population CXCR4-positives. Nous avons alors trié les cellules A172 pour ne sélectionner que les cellules CXCR4-négatives. Ces cellules ont été irradiées à 16Gy et analysées par cytométrie en flux (Figure 2).

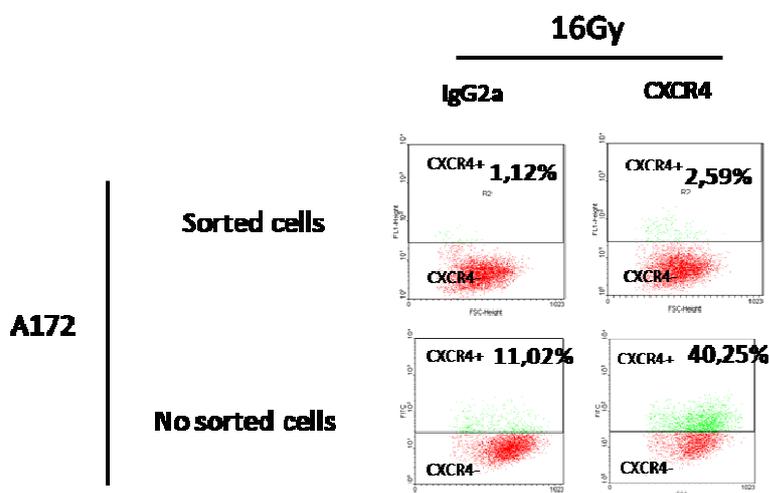


Figure 2 : Expression de CXCR4 sur les A172 après un tri cellulaire et une irradiation à 16Gy.

Après analyse, on constate que le contingent de cellules CXCR4-négatives reste négatif après irradiation. On peut donc affirmer que celle-ci entraîne un enrichissement de la population CXCR4+ plutôt que l'induction de l'expression de ce récepteur.

Cependant, le récepteur CXCR4 peut être internalisé et son niveau d'expression à la surface des cellules peut varier [33]. Afin de nous affranchir des problèmes de variabilité dans l'expression de ce récepteur et du risque que les 12G5-LNC ne reconnaissent pas leur cible, nous avons transfecté la lignée U87MG, dont nous avons montré qu'elle n'exprimait pas le CXCR4, par un lentivirus codant pour ce récepteur. Nous avons ainsi obtenu une lignée de GBM humain exprimant le CXCR4 de manière constitutive.

Ces cellules ont été implantées dans le striatum droit de souris femelles CB17/Scid immunodéficientes. Ces souris ont la particularité de ne pas posséder de lymphocytes B ni de lymphocytes T.

L'efficacité des 12G5-LNC188Re a été recherchée ainsi que les réponses cellulaires de la tumeur à cette irradiation.

---

## Publication n°1

**Intracerebral active CXCR4-immunotargeting through <sup>188</sup>Re-loaded lipid nanocarriers leads to a major clinical benefit in a murine model of human glioblastoma.**

---

## **Intracerebral active CXCR4-immunotargeting through <sup>188</sup>Re-loaded lipid nanocarriers leads to a major clinical benefit in a murine model of human glioblastoma.**

Delphine Séhédic<sup>ac</sup>, Igor Chourpa<sup>e</sup>, Ellyn Renou<sup>a</sup>, Audrey Griveau<sup>ac</sup>, Laurent Lemaire<sup>ac</sup>, Didier Wion<sup>f</sup>, Jean-Pierre Benoît<sup>ab</sup>, François Hindré<sup>ac</sup>, François Davodeau<sup>d</sup>, Emmanuel Garcion<sup>ac</sup>

<sup>a</sup> PRES LUNAM Université, Université d'Angers, INSERM U1066 MINT, Angers, France

<sup>b</sup> Pharmacy Department, Angers University Hospital, Angers, France.

<sup>c</sup> PRIMEX, Plateforme de Radiobiologie et d'Imagerie EXperimentale, Angers, France.

<sup>d</sup> PRES LUNAM Université, Université de Nantes, INSERM U892 CRCNA, Nantes, France.

<sup>e</sup> Université de Tours, EA6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Tours, France.

<sup>f</sup> Université Joseph Fourier, INSERM U1167, CLINATEC, Centre de recherche Edmond J Safra, MINATEC Campus CEA, Grenoble, France.

### **Abstract**

Radiation therapy is the gold standard for glioblastoma treatment but its efficacy remains limited due to the radioresistance of some target cells among which cancer stem like cells (CSLC). In parallel, although data from the literature suggest that crossing of the blood-brain barrier is possible, many difficulties remain among which systemic toxicity and genuine parenchyma accumulation. We here present an original system of internal radiation therapy combining a radiopharmaceutical to an immunonanoparticule for a locoregional targeting. The nanocarrier combined rhenium-188 loaded in lipid nanocapsules (LNC<sup>188</sup>Re) that were further functionalized with a blocking 12G5 antibody, directed to the chemokine receptor CXCR4, an epitope associated with CSLC phenotype. We demonstrated the clinical benefit of this strategy. This effect was notably accompanied by modification of the tumor microenvironment phenotype and by the local containment of the radiopharmaceutical in the close vicinity of the targeted tumor cells here established by the use of an innovative technique of tissue spectral imaging.

**Key words:** CXCR4, glioblastoma, <sup>188</sup>Re-loaded lipid nanocarriers, 12G5

## 1 Introduction

Glioblastoma is the most common and deadly primarily brain tumor in adult [1]. Conventional therapies consist on surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy that lead to an improvement of patient survival but are rarely curative [2]. These treatments effectiveness is limited by the blood-brain barrier (BBB) and the high sensitivity of brain tissue that limits high dose administration [3].

Ionizing radiation is the gold-standard adjuvant treatment for malignant gliomas. In order to limited toxicity on surrounding healthy tissue and enhance radiation damages on the tumor, locoregional drug delivery modalities, such as stereotactic radiosurgery, which allow for BBB bypass and reduced systemic toxicity. Many clinical trials on GBM have demonstrated the interest intern radioimmunotherapy using alpha radio-emitter ( $^{211}\text{At}$ -tenascin [4]) or beta-emitter ( $^{131}\text{I}$ -tenascin [5-6],  $^{90}\text{Y}$ -Abegrin [7],  $^{188}\text{Re}$ -nimotuzumab [8]). Other studies have developed nanotechnologies to vectorized radioemitter in locoregional strategies ( $^{225}\text{Ac}$ -liposome [9],  $^{186}\text{Re}$ -liposome [10],  $^{188}\text{Re}$ -nanoliposome [11]). Our group has developed lipid nanocapsules (LNC) designed to incorporate radionuclide. These LNCs are synthesized through a phase inversion process without any organic solvent and consist of a lipid core surrounded by a tensioactive shell [12]. LNCs are implanted in brain tumors using stereotactic injections for locoregional therapy. 50 nm-LNCs are able to load a lipophilic complex of rhenium-188 (LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS; half-life: 16.9 h;  $\beta^-$  emitter: 2.12 MeV;  $\gamma$  emitter: 155 keV) for internal radiation therapy in malignant glioma, demonstrating a median survival of up to 45 days after a single injection of LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS in an orthotopic 9L-glioma model [13]. More recently, Vanpouille-Box and coworkers demonstrated the interest of fractionated radiotherapy and the importance of injection modalities of LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS. They notably showed that single injection followed by convection enhancement delivery (CED) is the most effectiveness protocol with 80% long survival animals [14].

Radiotherapy efficiency depends on an efficient targeting of tumor cells, minimum damages on healthy tissue but also on capacity to bypass intrinsic radioresistant properties of glioblastoma. Indeed, last decade, a specific cell contingent, called glioma initiating cells (GSCs) have been identified [15-19]. These cells express neural stem cell markers, have the capacity for self-renewal and long term proliferation and the formation of neurospheres, like normal neural progenitors, but resist to radiation through activation of the DNA damage checkpoint [20-21]. Many GSCs markers have been identified, especially CD-133 (prominin-1) [17], Nestin, Musashi, Oct4, Sox2 [22] or CD171 (L1CAM) [23]. Recently, another receptor has been defined as an interesting target for the development of GSCs targeting therapy: the chemokine receptor CXCR4. It is the receptor of the chemokine CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) and CXCL12/CXCR4 binding activates different signaling pathways including phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt and MAP-kinases signaling pathways. In adult, CXCL12/CXCR4 axis plays a role in GBM development, tumor cell proliferation [24] and invasiveness *via* activation of matrix metalloproteinases (MMPs) [25]. CXCL12 is secreted by the GSCs themselves but also by endothelial cells that generates an autocrine and paracrine effect in the perivascular niche. The CXCL12/CXCR4 axis was reported as a main regulator of GSCs biological features: self-renewal, proliferation, migration, angiogenesis and chemo- and radio-resistance. Overexpression of CXCR4 was observed in GSCs which increase proliferation in response of exogenous CXCL12 [26]. Furthermore, the CXCL12/CXCR4 axis plays a crucial role in vasculogenesis. In a recent review, Brown

presented the importance of this mechanism in tumor development [27]. He explained that the primary pathway to supply the tumor is angiogenesis, but when this pathway is blocked, especially after radiation, vasculogenesis may become of prime importance [28]. CXCL12/CXCR4 axis induced CD11b+ myeloid cells, the precursors of tumors-associated macrophages (TAMs), migration to the tumor site. These cells expressed MMP and recruited endothelial cells to form new vessels [29]. These monocytes expressed also CXCR4 on their surface. It was demonstrated that inhibition of the interaction of CXCL12 and CXCR4 using CXCR4 inhibitor, AMD3100 or antibody against CXCR4 prevented the radiation-induced increase of CD11b+ monocytes/macrophages and inhibited revascularization in intracranial human GBM xenograft. Moreover, these inhibitors abrogated or delayed the recurrence of the tumors following irradiation [30]. Thus, CXCL12/CXCR4 axis inhibition could have an impact on tumor cell development either by inhibition of cell signaling implicated in survival and proliferation either acting on micro environment.

In this study, we investigated the impact of internal vectorized radiotherapy using 12G5-LNC<sup>188</sup>Re on U87MG CXCR4+ Scid mouse glioma model. 12G5 is a blocking antibody directed to CXCR4. Barbero and coworkers demonstrated that this mAb inhibits the CXCL12-induced proliferation [31]. Special attention was given to therapeutic efficiency and nanocarriers' behavior.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Ethics Statement

This study was carried out in strict accordance with the French Minister of Agriculture and the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the "Pays de la Loire" (permit number: CEEA.2012.60). All surgery was performed under ketamine/xylazine anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

### 2.2 Materials

Lipoïd® S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) and Solutol® HS15 (a mixture of polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) were provided by Lipoïd GmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASH (Ludwigshafen, Germany), respectively. NaCl was provided by Sigma (St-Quentin, Fallavier, France). Deionized water was obtained from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France). Lipophilic Labrafac® CC (caprylic-capric acid triglycerides) was provided by Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France).

### 2.3 Preparation of the $^{188}\text{Re}$ -SSS complex

$^{188}\text{Re}$  as carrier-free  $\text{Na} [^{188}\text{ReO}_4^-]$  in physiological solution was obtained by saline elution and concentration of  $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$  generator (*Institut des Radioéléments*, Fleurus, Belgium). The  $^{188}\text{Re}$ -SSS complex was prepared according to the method developed by Lepareur *et al.* [32]. In brief, the  $^{188}\text{Re}$ -SSS was obtained by the reaction of the ligand sodium dithiobenzoate (Plateform of organic synthesis, Rennes, France) with a freeze-dried formulation containing 30 mg sodium gluconate, 30 mg ascorbic acid, 40 mg potassium oxalate, and 4 mg  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  reconstituted in 0.5 mL of physiological serum. Approximately 2 GBq of  $^{188}\text{Re}$ -perrhenate ( $^{188}\text{ReO}_4^-$ ; in 0.5 mL) was added, and the solution was mixed for 15 min at room temperature. Next, 20 mg of sodium dithiobenzoate (in 0.5 mL; pH = 7) was added before being heated at 100°C for 30 min, which allowed for the formulation of the  $^{188}\text{Re}$ -SSS complex. Due to its preparation in aqueous media, the  $^{188}\text{Re}$ -SSS complex was extracted with dichloromethane (1 mL) and washed three times with 1 mL of deionized water.

## 2.4 Nanocapsule formulation and characterization

Studies were performed on 50 nm diameter LNCs, which were prepared according to a phase-inversion process described by Heurtault *et al.* [12] that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily/fatty phase (triglycerides: Labrafac® WL 1349), a non ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate: Solutol®HS15), and a lipophilic surfactant (lecithins: Lipoïd® S75-3). Briefly, 18.75 mg Lipoïd® S75-3, 211.5 mg Solutol® HS15, 257 mg Labrafac®, 22.25 mg NaCl and 740.5 mg deionized water were mixed by magnetic stirring. The  $^{188}\text{Re}$ -SSS complex extracted with dichloromethane (1 mL) was then added to the other components of the emulsion. The organic solvent was removed by being heating at 60°C for 15 min. Three cycles of progressive heating and cooling between 60°C and 90°C were then carried out and followed by an irreversible shock, induced by addition of 3.125 mL of 0°C deionized water. Afterwards, slow magnetic stirring was applied to the suspension for 5 min. LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS were filtered on a 0.22 µm filter. The mean diameter, polydispersity index and zeta-potential were then determined using Malvern Zetasizer® Nano Serie DTS 1060 (Malvern instruments S.A., Worcestershire, UK).

## 2.5 Coupling mAbs to LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS

Monoclonal antibodies (mAb) were coupled to LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS according to the method 2 described by Bourseau-Guilmain *et al.* [33]. Briefly, DSPE-PEG<sub>2000</sub>-maleimide (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) solubilized in DPBS, was added to a solution of DPBS containing 8 mg of thiolated mAbs (12G5 and IgG2a) to obtain an equimolar concentration of 0.05mM for the two reactive species (DSPE-PEG<sub>2000</sub>-maleimide and thiolated mAbs) within a final volume of 2 mL. Overnight incubation was then performed at room temperature under low agitation. 170 mg of LNCs corresponding to 1.3 mL of LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS were added to the formed "lipo-immunoglobulins" for 1h incubation at 45°C. To separate the functionalized LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS from free micelles composed of free lipo-immunoglobulins, a 1.5 cm x 40 cm sepharose CL4-B column (Sigma-Aldrich) equilibrated with sterile water, was used. Fractions containing Ig-LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS were pooled and concentrated on Amicon®Ultra (100 000 MWCO, Millipore, Billerica, USA) by centrifugation at 4000 rpm, 30 min. After concentration, Ig-LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS were diluted at a final concentration of 2.7MBq/10L. The mean diameter, polydispersity index and zeta-potential were then determined using Malvern Zetasizer® Nano Serie DTS 1060.

Turbidimetric measurements were performed to evaluate LNC concentrations within the collected fractions. MicroBCA protein assay (Pierce) was used according to the manufacturer's instructions with DO analysis at 580 nm to determine corresponding mAbs concentrations. The number of mAbs per LNC was determined by the following equation:

$$mAbs \text{ per LNC} = \frac{mAbs \text{ number}}{LNCs \text{ number}} = \frac{[mAbs] \times v \times N_a}{(([LNCs] \times v) \div d) \div v_{LNC}}$$

[mAbs] = mAbs concentration (mol/L)

[LNCs] = LNCs concentration (g/L)

$v$  = fraction volume ( $10^{-3}$  L)

$v_{LNC}$  = 50 nm LNC volume

$N_a$  = Avogadro number ( $6.022 \times 10^{23}$ )

$d$  = Labrafac® density

The content activity of each fraction was determined using a gamma counter (Packard Auto-Gamma 5000 series).

## 2.6 Tumor cells, lentiviral transfection and immunoglobulins purification

Human malignant glioma cell lines U87MG were purchased from American Tissue Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Tumor cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium 4,5g/L glucose and L-glutamine (DMEM, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Lonza) and 1% antibiotics suspension (10 units/mL of penicillin, 10mg/mL streptomycin and 25µg/mL amphotericin B, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Tumor cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 21% oxygenation.

In order to get rude with variation of CXCR4 expression, the U87MG, known in our laboratory to not express this receptor, was transfected with two lentivirus, one encoding CXCR4 (# LVP103, GenTarget Inc, San Diego, Ca) and give rise to a stable expression of this receptor or a second, the control lentivirus (CMV-Null-RB, GenTarget). The U87MG cells ( $10^4$  cells/mL) harvested in the exponential growth phase were seeded on 6-well plate in Eagle's minimal essential medium (EMEM, Lonza) with 10% FBS, in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Lentiviral particles were harvested 24h after seeding. Medium and lentivirus were removed 24h after infection. The infected tumor cells were kept in culture and selected 72h after infection by addition of blasticidin (10µg/mL) (Fisher Scientific, Illkirch, France).

C1.18.4 (IgG2a producing cells) (TIB-11™) was obtained from ATCC and was cultivated in DMEM (Lonza) with 1% antibiotics and 10% horse serum. 12G5 was kindly given by Dr. James Hoxie (University of Pennsylvania) and was cultivated in DMEM (Lonza) supplemented with 1% antibiotics, 8% NCTC (Lonza) and 20% FBS. Cells were plated in uncoated flask at  $2 \times 10^4$  cell/mL and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> until they reach  $10^6$  cell/mL, before replating and purification of immunoglobulins from supernactants.

Supernactant harvested from cultures of the 12G5 and TIB-11 hybridoma cell lines containing 12G5 and IgG2a isotype control mAbs, respectively, was concentrated using Amicon®Ultra (100 000 MWCO) according to manufacturer's instruction (Millipore, Billerica, USA). Immunoglobulins were then purified by passage over a high performance HiTrap Protein G HP column (GE Healthcare, Orsay, France) followed by elution in acid conditions and immediate neutralization according to the manufacturer's direction. mAbs buffer was changed by dialysis in PBS using overnight membrane dialysis (15 000 MWCO, SpectrumLabs, Rancho Domingez, CA, USA) and then concentrated with Amicon®Ultra centrifugal filter units (30 000 MWCO, Millipore). The antibody concentration was determined by Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). For thiolation, mAbs in PBS

was incubated with 1 mg/mL of 2-iminothiolane (Traut's reagent, Fisher, Illkirch, France) for 1h in darkness under agitation. Traut's reagent was eliminated by purification of relational medium on PD10 column (Sephadex™ G-25M, GE Healthcare, Burckinghamshire, UK).

## 2.7 U87MG CXCR4-positive immunolabeling

U87MG were collected and dissociated using trypsin (Sigma-Aldrich). They were incubated with 5µg/mL 12G5 (CD184, #555971, BD Pharmingen) or IgG2a (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) or immune-LNC (1/200) for 1h at 4°C in PBS containing 5% FBS and 0.02% sodium azide. After three washes in PBS/FCS/Azide, cells were incubated for 30 min at 4°C with 20 µg/mL FITC-conjugated goat anti-mouse IgG F(ab')<sub>2</sub> fragment (Dako, Trappes, France) in PBS/FCS/Azide. Following three more washes, cells were re-suspended in PBS added with 2% formaldehyde and 0.02% sodium azide before flow cytometry.

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

## 2.8 Animals

Female CB17-SCID immune-deprived (CB-17/lcr-Prkdc<sup>scid</sup>/Rj) mice aged 6-7 weeks were obtained from Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France). The animals were kept in polycarbonate cages in a room with controlled temperature (20-22°C), humidity (50-70%), and light (12 h light/dark cycles). Room air was renewed at the rate of 10 vol/hour. Tap water and diet were provided *ad libitum*.

## 2.9 Intracerebral tumor implantation

Tumor cells for intracerebral implantation were trypsinized, counted, and checked for viability by trypan blue exclusion. Cells were washed twice with Phosphate-Buffered Saline (PBS, Lonza) and suspended in EMEM (Lonza) without FBS or antibiotics at the final concentration of 1x10<sup>7</sup> cells/1mL. Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 100µL/10mg of a solution containing 500µL ketamine (Clorkétam 1000, Vétoquinol, Lure, France), 325µL xylazine (Rompun 2%, Bayer, Puteaux, France) diluted in sterile water at the final volume of 5 mL. Using stereotactic head frame (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) and a 10 µL Hamilton syringe (Hamilton® glass syringe 700 series RN) with a 32-G needle (Hamilton®), 5µL of 5x10<sup>4</sup> U87MG CXCR4 positive cells were injected into the mouse's right striatum. The coordinates used for the intracerebral injection were 0.5 mm anterior to the bregma, 2 mm lateral to the saggital suture (right hemisphere), and 3 mm below the dura.

For spectral imaging experiment, a cell suspension containing 7/10 of U87MG and 3/10 of U87MG CXCR4 positive cells was injected in a similar manner at the concentration of 5x10<sup>4</sup>/5µL.

## 2.10 Protocol and groups

Tumors were implanted in 8 weeks female mice SCID. The efficacy of 12G5-LNC<sup>188</sup>Re-SSS was assessed at a late stage of tumor progression, and the animals therefore received internal radiotherapy on D12. The administration type of treatments is CED with a final volume of 10  $\mu$ L and a flow of 0.5  $\mu$ L/min. Experiment was composed of seven groups: a 12G5-LNC<sup>188</sup>Re-SSS group (n = 6), IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re-SSS group (n = 7), LNC<sup>188</sup>Re-SSS group (n = 7), 12G5-LNC group (n = 6), IgG2a-LNC group (n = 6), LNC group (n = 9), and a saline solution group (n = 6).

We chose to set the injected activity at 2.7 MBq of LNC<sup>188</sup>Re-SSS because it proved to be effective after a single injection in previous animal model [13].

## 2.11 Convection enhancement delivery procedures

Animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 100 $\mu$ L/10mg of a solution containing 500 $\mu$ L ketamine, 325 $\mu$ L xylazine diluted in sterile water at the final volume of 5 mL.

10  $\mu$ L were injected into the mouse striatum at the flow of 0.5  $\mu$ L/min using a 10  $\mu$ L syringe (Hamilton® glass syringe 700 series RN) with a 32-G needle (Hamilton®) connected to a pump (Harvard apparatus pump II Elite, Les Ulis, France). For this purpose, mice were immobilized in a stereotactic head frame. Coordinates were 0.5 mm anterior to the bregma, 2 mm lateral to the saggital suture (right hemisphere), and 3 mm below the dura. Following the injection, the needle was left in place for an additional 5 min to avoid expulsion of the suspension from the brain during the removal of the syringe.

## 2.12 MRI

Mice under isoflurane anesthesia (1.5-0.5%, O<sub>2</sub> 0.5 L/min) were scanned using a Burker Biospec 70/20 device, operating at a magnetic field of 7T (Bruker, Wissembourg, France), equipped with a 1H cryoprobe to assess tumor development. Mouse body temperature was maintained at 36.5-37.5°C by a feedback-regulated heating pad throughout the imaging protocol. Rapid anatomical proton images were obtained using a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) sequence [TR = 3200 ms; mean echo time (TE) = 21.3 ms; RARE factor = 4; FOV = 2 x 2 cm; matrix 256 x 256; 11 contiguous slices of 0.5 mm, Nex = 1].

## 2.13 Immunohistochemistry

Animals were sacrificed at three different points in the protocol: D12, corresponding on tumor characteristics before treatment; D19 and at the end point. Brains from tumor-bearing animals were frozen at  $-30^{\circ}\text{C}$  in isopentane cooled by liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Fourteen-micron cryosections were fixed with methanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  during 10 min. In order to block nonspecific sites, sections were incubated 45 min in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA) and 10% normal goat serum, and wash three times with PBS. All incubation with primary antibodies diluted in PBS/BSA 4%: CD31 (1/200, #550274, BD Pharmingen), CD11b (1/200, #MCA74G, AbD Serotec), CXCR4 (1/200, #PA3-305, Thermo Scientific), IgG2a (1/320, #559073, BD Pharmingen), IgG2b (1/100, # 559478, BD Pharmingen) were performed overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . After three washes with PBS, primary antibodies were detected using a biotinylated anti-rat, anti-rabbit or anti-mouse IgG secondary antibody (1/100, Vector Laboratories). After 1h at room temperature (RT), the sections were washed three times with PBS containing. Sections were developed with FITC-conjugated secondary antibody (1/500, Streptavidine-FITC conjugate, Dako) after an incubation of 45 min at RT and mounted using the Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako).

Each cryosections were observed using cryostat Leica CM3050S.

## 3 Spectral imaging

50 nm LNC were prepared by the inversion phase process described by Hirsjärvi et al. [34]. Briefly, Solutol<sup>®</sup>, Lipoïd<sup>®</sup>, Labrafac<sup>®</sup>, NaCl<sup>®</sup> and water were mixed and DiD in acetone (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was added to this mixture. Final concentration of DiD was 3 mmol/L/total Labrafac<sup>®</sup> amount. Acetone was evaporated by heating at  $60^{\circ}\text{C}$  for 15 min under stirring. As previously described, a micro-emulsion o/w was performed after three cycles of heating/cooling between  $60^{\circ}\text{C}$  and  $90^{\circ}\text{C}$  and fixed by addition of water at  $0^{\circ}\text{C}$ .

DiD-LNCs were coupled with 12G5 and IgG2a mAbs in a similar manner than LNC<sup>188</sup>Re-SSS and were injected in the right striatum of chimeric tumor (U87MG/U87MG CXCR4+, (70:30)) bearing mice by CED. Four groups of 4 animals were treated with the following treatment: DiD-LNC, 12G5-DiD-LNC, IgG2a-DiD-LNC, saline solution. 24h after injection, animals were sacrificed and brains from tumor bearing mice were removed and fourteen nm cryosections were performed.

An algorithm has been used to define three spectrum models corresponding to RFP/DiD co-localization with a dominance of RFP, co-localization with a dominance DiD and a "high" co-localization represented by the addition of RFP and DiD at the same intensity. Then, these three models allowed estimating co-localization percentage for each map.

Statistical analysis

GraphPad Prism 5 Version 5.03 was used for data analysis. Statistical significance for survival experiment was determined by Log Rank test. The tests were considered as significant with  $p$ -values of less than 0.05 and very significant with  $p$ -values of less than 0,001.

## 4 Results

### 4.1 Nanoparticles synthesis and characteristics

#### 4.1.1 Nanoparticles formulation and characteristics

Physico-chemical proprieties of LNC are given in Figure 1A. In proportions described, blank LNC were obtained with a mean size of  $55.41 \pm 3.6$  nm with a good polydispersity index ( $PDI < 0.1$ ).  $LNC^{188}Re$  were measured at  $58.12 \pm 2.5$  nm, with a good polydispersity index too. Immunoglobulins post-insertion enhanced LNC size of 10 nm, whatever the vector: blank LNC (12G5-LNC =  $60.44 \pm 2.8$  nm and IgG2a-LNC =  $63.48 \pm 3.8$ ) or  $LNC^{188}Re$  (12G5- $LNC^{188}Re$  =  $77.25 \pm 6.8$  nm and IgG2a- $LNC^{188}Re$  =  $74.81 \pm 6.5$  nm). The polydispersity index was worst than those of non-functionalized LNC ( $PDI = 0.2$ ) which represented a higher degree of heterogeneity but remained still inferior to 0.3. Zeta-potentials were negative for all nanocarriers but were reduced by immunoglobulin post-insertion and with a greater extent for immuno- $LNC^{188}Re$ .

These nanocarriers have optimal physic-chemical proprieties for CED injection. As described by Allard *et al.*, the ideal nanoparticles for CED would be less than 100 nm in diameter, have a neutral or negative surface charge and would need a targeting ligand to adhere to a target cell [13]. Thus, our LNC and immuno-LNC are conforms for CED injection.

#### 4.1.2 Immuno-LNC and immuno- $LNC^{188}Re$ synthesis

Immuno- $LNC^{188}Re$  manufacturing process could be divided in two phases: on the one hand,  $^{188}Re$ -SSS complex formation and on the other hand, LNCs formulation and post-insertion (Figure 1 B).

$^{188}Re$ -SSS complex formation follows the reaction described by Lepareur *et al.* [32]. Perrhenate ( $^{188}ReO_4$ ) was reduced to form an intermediate compound which reacts with the sodium salt of a dithiobenzoate ligand to give the neutral complex [ $^{188}Re(PhCS_3)_2(PhCS_2)$ ]. This  $^{188}Re$ -SSS was added to other LNC excipients to form  $LNC^{188}Re$ . After formulation, thiolated antibodies (12G5 or IgG2a) were incubated with blank LNCs or  $LNC^{188}Re$  for 1h at 45°C. Post-insertion time was reduced compared to process described by Bourseau *et al.* [33] because of  $^{188}Re$  half-life. Antibody stability was evaluated to control if heating at 45°C did not destroy antibody and its recognition of its receptor CXCR4. Flow cytometry analysis showed that heating did not affect 12G5 recognition capacity (Figure 1 C). After incubation, immuno- $LNC^{188}Re$  were purified on sepharose column. 1 mL fractions were harvested and antibody and LNC concentrations and activity were measured for each fraction (Figure 1 B). There are approximately ten antibodies on each LNCs (Figure 1 A). Maximal measured activity correlated with fractions containing immuno-LNC. Then, positives fractions were concentrated to obtain a final concentration of 2.7MBq/10 $\mu$ L.

Immunospecificity assay was performed on 12G5-LNC to determine if post-inserted antibody could efficiently recognize its receptor. Flow cytometry analysis presented in Figure 1 D show that 12G5-LNCs efficiently recognize CXCR4 but in a lesser extent than free 12G5. This difference is due to steric hindrance around the LNC.

## 4.2 Human GBM mice model characteristics

In order to obtain a CXCR4-positive glioblastoma cell line, U87MG cells were transfected with a lentivirus encoding for this receptor and the fluorophore RFP (Red Fluorescent Protein) (Figure 2 A). U87MG are known in our laboratory to be CXCR4-negative (data not shown). After transfection, CXCR4 expression was controlled by flow cytometry analysis. Figure 2 B shows that, in cell population transfected by the CXCR4 encoding lentivirus, 90% of cells are CXCR4-positives. Conversely, cells transfected by the control lentivirus remain CXCR4-negatives.

These cells are implanted in the right striatum of SCID female mice. Tumor growths were monitored by MRI 9 days and 17 days after implantation (Figure 2 C). Images and calculated tumoral volume showed that CXCR4-positives tumors were more invasive and grew faster than CXCR4-negatives tumors. At D9, CXCR4- tumors measured 0.9 $\mu$ L and did not grow in 8 days (0.6 $\mu$ L at D17). Conversely, CXCR4+ tumors measured 4 $\mu$ L at D9 and grew more than twice in 8 days (10.2 $\mu$ L at D17).

Given these results on tumors growth, it was decided to treat mice with CXCR4+ tumor at D12. Tumor tissue characteristics were determined at this stage of development by immunohistochemistry on cryosections from brains tumor-bearing mice (Figure 2 D). CXCR4 labeling showed that the targeted receptor was efficiently expressed by tumor cells at the day of treatment (left picture). Blood vessels density was evaluated by CD31 labeling and showed a homogenous vasculature of the tumor at D12 (middle picture). Then, as SDF-1 is known to induce CD11b+ macrophages migration, CD11b+ density was evaluated. Immuno-labeling showed that these cells are initially presents in the tumor site before treatment, especially at the edge of the tumor (right picture).

## 4.3 Treatment efficacy of internal radiotherapy at day 12 following tumor implantation

The efficacy of internal radiotherapy with the functionalized 12G5-LNC<sup>188</sup>Re was studied. Mice were treated with stereotactic injections of 2.7MBq of LNC<sup>188</sup>Re, 12G5-LNC<sup>188</sup>Re or IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re or equivalent LNC concentration of non-radioactive nanocarriers, 12 days after U87MG CXCR4 positive cell implantation (Figure 3 A). These different treatments were administrated by CED at the flow of 0.5 $\mu$ L/min, 20 min. In control group animals, the median survival time was close to 35 days for both blank LNC and saline solution, close to 40 days for IgG2a-LNC and 12G5-LNC and close to 50 days for both LNC<sup>188</sup>Re and IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re (Figure 3 B). There were no significant differences between the control groups ( $p > 0.05$ ). Treatment with 12G5-LNC<sup>188</sup>Re was associated with an increased median survival time (IMST) of 50% related to non-radioactive treatments with two animals survivors after 100 days. Magnetic resonance imaging corroborated this observation. Tumors are presents for each group at the beginning of the experiment. Tumors regressed to totally disappeared when animals were treated with 12G5-LNC<sup>188</sup>Re, IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re and LNC<sup>188</sup>Re with various time to progression. Mice treated with LNC<sup>188</sup>Re presented a new visible tumor mass as soon as 65 days, animals treated

with IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re relapse from 85 days and those treated with 12G5-LNC<sup>188</sup>Re from 100 days. Thus, 12G5-LNC<sup>188</sup>Re seemed to be the most effectiveness treatment with the longest measured time to progression. Nevertheless, there are no significant differences between 12G5-LNC<sup>188</sup>Re treated group and other rhenium treated groups (IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re and LNC<sup>188</sup>Re) but only 12G5-LNC<sup>188</sup>Re treated mice had a significant survival benefit compared to non-radiated animals (significant difference compared to 12G5-LNC and IgG2a-LNC and very significant difference compared to saline solution and blank LNC) (Figure 3 C).

#### 4.4 Effect of 12G5 post-insertion on immuno-LNC diffusion in the brain

In order to define preferential retention zone of LNCs in the cerebral tissue of tumor bearing mice, intrinsic fluorescence of healthy and tumor parenchymas containing CXCR4+(RFP+) cells and CXCR4-(RFP-) cells (chimeric tumor) have been characterized. Spectral analysis allowed defining three spectrums for three distinct zones: red spectrum corresponding to RFP+ cells, green spectrum for healthy cerebral tissue and blue spectrum for tumor tissue without RFP (Figure 4 C). Images corresponding to the topographic distribution of these spectrums have been defined (Figure 4 A and B). Then, co-localization with fluorescent LNCs has been calculated in these specific zones. Spectrum corresponding of fluorescent LNC (DiD +) was introduced in Figure 5 A (magenta spectrum).

When the tissue was treated with immuno-LNC-DiD, none scanning zones with tumor and RFP signal (CXCR4 positive cells) presented RFP signal alone (Figure 5 B and C). That means that whatever the treatment (IgG2a-LNC-DiD or 12G5-LNC-DiD), there are nanocarriers in RFP positive zones. Nevertheless, calculated co-localization percentage of DiD and RFP 24h after treatment showed that DiD accumulation in RFP+ zones was more important with 12G5-LNC-DiD than with the control IgG2a-LNC-DiD (Figure 5 C). Thus, 12G5-LNC-DiD seemed to be more efficiently retained in the tissue that expressed its receptor CXCR4 than IgG2a-LNC-DiD.

#### 4.5 Effect of 12G5-LNC<sup>188</sup>Re on tumor outcome

Animals were sacrificed when they lost 10% of their initial weight. Then, tumor bearing-brains were extracted and analyzed by immunohistochemistry (Figure 6). As for the treatment day, tumor vasculature and CD11b+ macrophages infiltration were evaluated and tumor cells were red (RFP+, CXCR4+).

There were no significant differences between tumor vasculature whatever the treatment, only brains of 12G5-LNC<sup>188</sup>Re and IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re treated mice presented fewer CD31 labeling and 12G5-LNC<sup>188</sup>Re treated mice seemed to have hypovascularized tumor compared to other tumors. Interestingly, CD11b+ labeling was inversely proportional to tumor vasculature. Indeed, there was a high CD11b+ infiltrate in brains of 12G5-LNC<sup>188</sup>Re treated mice, very more important than for other treatments. Nevertheless, tumor bearing-brains from LNC<sup>188</sup>Re and IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re treated mice presented a CD11b+ infiltrate too.

## 5 Discussion - Conclusion

In this study, we evaluated internal vectorized radiotherapy using 12G5-LNC<sup>188</sup>Re in an orthotopic U87MG CXCR4+ Scid mouse glioma model. Tumor characteristics, survival and nanocarrier behavior were investigated.

In the first part of this work, we demonstrated that 12G5-LNC<sup>188</sup>Re enhanced mice survival compared to saline solution and non-radiated LNC (blank LNC, IgG2a-LNC and 12G5-LNC). More generally, we can note that each rhenium-188 treatments improved mice survival but only 12G5-LNC<sup>188</sup>Re treated-mice presented a median survival significantly different related to control group. In order to understand why 12G5-LNC<sup>188</sup>Re gave this survival advantage, we characterize nanocarriers' diffusion in tumor parenchyma by spectral imaging. We showed that 12G5-LNC-DiD co-localized with RFP+ zones (CXCR4+) more efficiently than IgG2a-LNC-DiD. Thus, 12G5-LNC seemed to be retained at CXCR4+ zone in the tumor. This effect did not depend on the presence of immunoglobulin on the surface of the LNC because IgG2a-LNC-DiD had a weak co-localization with RFP+ (CXCR4+) zones, but depend on the presence of 12G5.

Thus, we can logically think that 12G5-LNC<sup>188</sup>Re have a higher retention in a CXCR4+ tumor tissue than other nanocarriers and can irradiate this tissue more efficiently. This hypothesis is corroborated by immuno-histochemistry analysis. Indeed, radiation induces hypoxia, resulting from loss of endothelial cells (EC). Irradiated tumor gradually loses vasculature after radiation, thereby becoming increasingly hypoxic and up-regulating hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). Then, CXCL12 functions as a hypoxia-inducible gene through the action of the transcription factor HIF-1 [30]. Elevated CXCL12 level leads to accumulation of CXCR4-expressing monocytes/macrophages CD11b+, the precursors of tumor-associated macrophages (TAMs) in the irradiated tissue [29-30]. Thus, increase in TAMs after irradiation was due to increased tumor HIF-1 levels. To reinforce this finding, Chau *et al.* showed that in HIF inhibitor NSC 134754 treated mice, the radiation-induced influx of macrophages was totally abolished [35]. Thus, it is possible that radiation induced by 12G5-LNC<sup>188</sup>Re was more important than for other rhenium treatments, due to its stronger persistence within the CXCR4+ tumor tissue, and induced a higher hypoxia than LNC<sup>188</sup>Re and IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re. After treatment, 12G5-LNC<sup>188</sup>Re-treated tumors became very hypoxic that induced their regression and made them undetectable by MRI follow-up. In the first time, tumor progression was contained but then, hypoxia induced CD11b+ monocytes/macrophages migration to the tumor site that stimulated tumor progression.

We have developed a tool for vectorized radiotherapy that increases survival of tumor-bearing mice but finally, fails to cure these animals. Another group has used AMD3100 (Plerixafor, Mozobil®), a specific inhibitor of the interaction of CXCL12 with its receptor CXCR4, in continuous application for 21 days following external beam radiation in an intracranial U251 glioblastoma model in mice [27]. They found an inhibition of the recurrence of the tumors following irradiation with no effect on the un-irradiated tumors. Furthermore, they showed a similar effect with both fractionated irradiation (5 x 2 Gy) as a single dose of 15 Gy. They performed similar experiment with a neutralizing antibody to CXCR4 and they found the same inhibition of recurrence of the tumors. They concluded that inhibition of the CXCL12/CXCR4 pathway can produce a substantial radiosensitization of tumors [27]. However, this study followed animal survivals until 100 days and we do not know if tumors regrowth after this date like in our study. Nevertheless, it is possible that a single dose 12G5-LNC<sup>188</sup>Re was inadequate to block CD11b+ dependent vasculogenesis and cannot lead to a curative therapy.

---

Another explanation could be given. With the 12G5 antibody, we just inhibit the interaction between CXCL12 and one of this receptor, CXCR4. However, CXCL12 has a second receptor, CXCR7, which is implicated in endothelial cell migration [36-37], is present on tumor vasculature [36] and is potentially also able to activate vasculogenesis. In a recent study, Walters and coworkers used a specific inhibitor of CXCR7, CCX771 in the intracranial U251 GBM mice model. As for CXCR4, they found that CXCR7 inhibitor did not affect the tumor growth or survival of the rodents that did not receive local brain irradiation but significantly enhanced tumor growth delay and survival of the animals that received local brain irradiation [38-39]. Thus, the involvement of both CXCR4 and CXCR7 suggests that CXCL12 could be the master regulator of vasculogenesis. Inhibition of CXCL12 interaction with both CXCR4 and CXCR7 with specific inhibitors or a CXCL12 inhibitor could enhance the impact on tumor vasculogenesis and radiosensitivity.

Finally, it is possible that 12G5-LNC<sup>188</sup>Re could be more efficient in a non-immunodeprived model. Indeed, in a previous study, Vanpouille *et al.* highlighted the importance of immune system to eradicate tumor mass [14]. They first showed that internal radiation by LNC<sup>188</sup>Re in a 9L rat glioma model induced activation of monocyte-macrophage-microglia and they observed an improved recruitment of natural killer and dendritic cells in the tumor site. Finally, they also showed that LNC<sup>188</sup>Re induced a memory anti-tumor response as long-term survivors were partially or totally immunized after re-injecting 9L cells in contrast to naïve animals. They linked this immune response to the <sup>188</sup>Re-activity gradient, demonstrating the importance of CED related to simple injection or external beam radiation to induce immune system. Thus, we can make the hypothesis that 12G5-LNC<sup>188</sup>Re, with its specific retention in the tumor tissue, could induce similar or higher immune response to enhance radiation therapy.

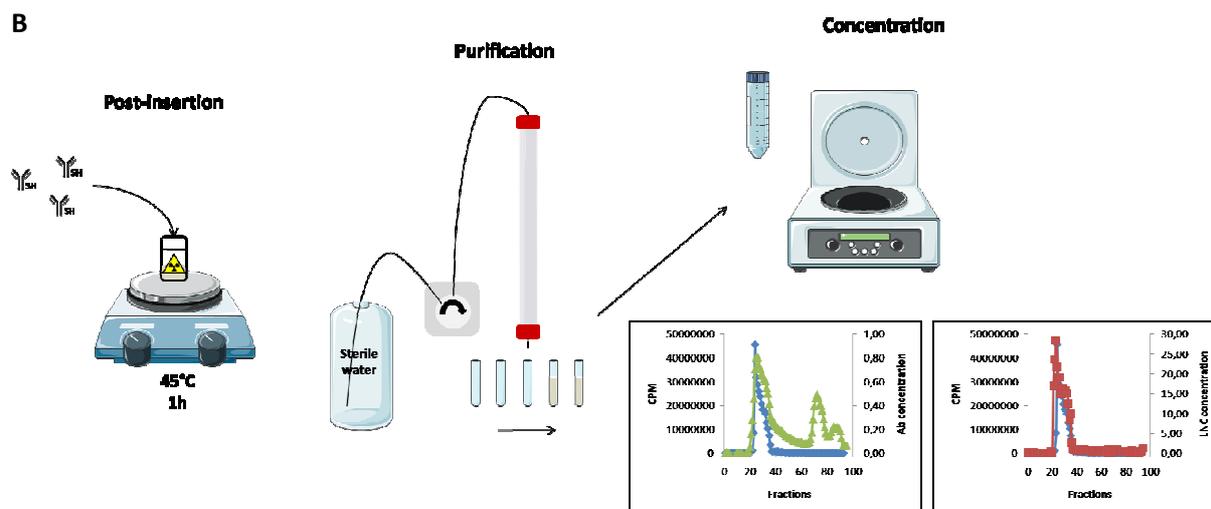
## Acknowledgement

We would like to thank Catherine Guillet from the “Service Commun de Cytométrie et d’Analyses Nucléotidiques” (SCCAN, Angers, France), Rodolphe Perrot from the “Service Commun d’Imageries et d’Analyses Microscopiques” (SCIAM, Angers, France), Pierre Legras et Jérôme Roux from the “Service Commun d’Animalerie hospital-universitaire” (SCCAN, Angers, France), Philippe Moullier and Véronique Blouin from INSERM U1089 (Nantes, France), Nicolas Lepareur and Nicolas Noirer from “Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes” (ENSCR, Rennes, France) and Magali Edouard from the “Institut de Cancérologie de l’Ouest” (ICO, Angers, France) for skiful technical support. This work was supported by “La Région Pays-de-la-Loire” throughout the *Nuclear Technology for Health project (NucSan)*, by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), by “La Ligue Nationale Contre le Cancer” throughout an “Equipe Labellisée 2012” grant and by the “Axe Vectorisation and Radiothérapies of the Cancéropôle Grand-Ouest”. Delphine Séhédic was a Ph.D. student from the *NucSan project* and received a fellowship from “La Région Pays-de-la-Loire”.

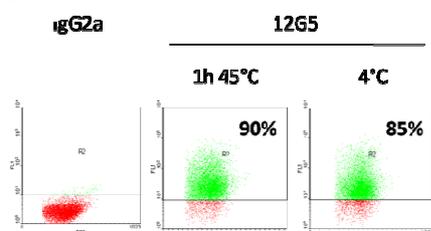
**A**

	Size (nm)	Pdl	Zeta-potential (mV)	Antibodies per LNC
LNC	55.41±3.6	0.03±0.01	-4.51±0.75	
12G5-LNC	60.44±2.8	0.24±0.15	-13.87±2.0	35±20
IgG2a-LNC	63.48±3.8	0.26±0.01	-14.95±2.2	15±2
LNC- <sup>188</sup> Re	58.12±2.5	0.05±0.03	-8.37±3.5	
12G5-LNC <sup>188</sup> Re	77.25±6.8	0.21±0.04	-24.77±4.9	13±3
IgG2a-LNC <sup>188</sup> Re	74.81±6.5	0.21±0.03	-26.23±8.3	10±5

**B**



**C**



**D**

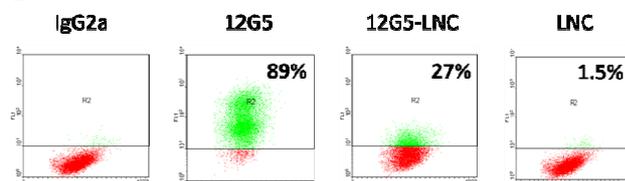


Figure 1 : Nanocarriers formulation. A: Physico-chemical proprieties (Size, polydispersity index (Pdl), zeta-potential) of different nanocarriers. B: Schematic representation of immune-LNCs synthesis. Thiolated antibodies (12G5 and IgG2a) were added to LNC<sup>188</sup>Re or blank LNC and incubated 1h at 45°C. Then, immuno-LNCs were purified on sepharose column and positive fractions were constreated. Micro BCA assay was performed on each collected fractions to determine Ab concentration. Activity was measured by gamma counter. C: Stability assay on heating antibody (12G5) at 45°C by flow cytometry analysis. D: Immunospecificity assay of free 12G5 antibody and 12G5-LNC by flow cytometry.

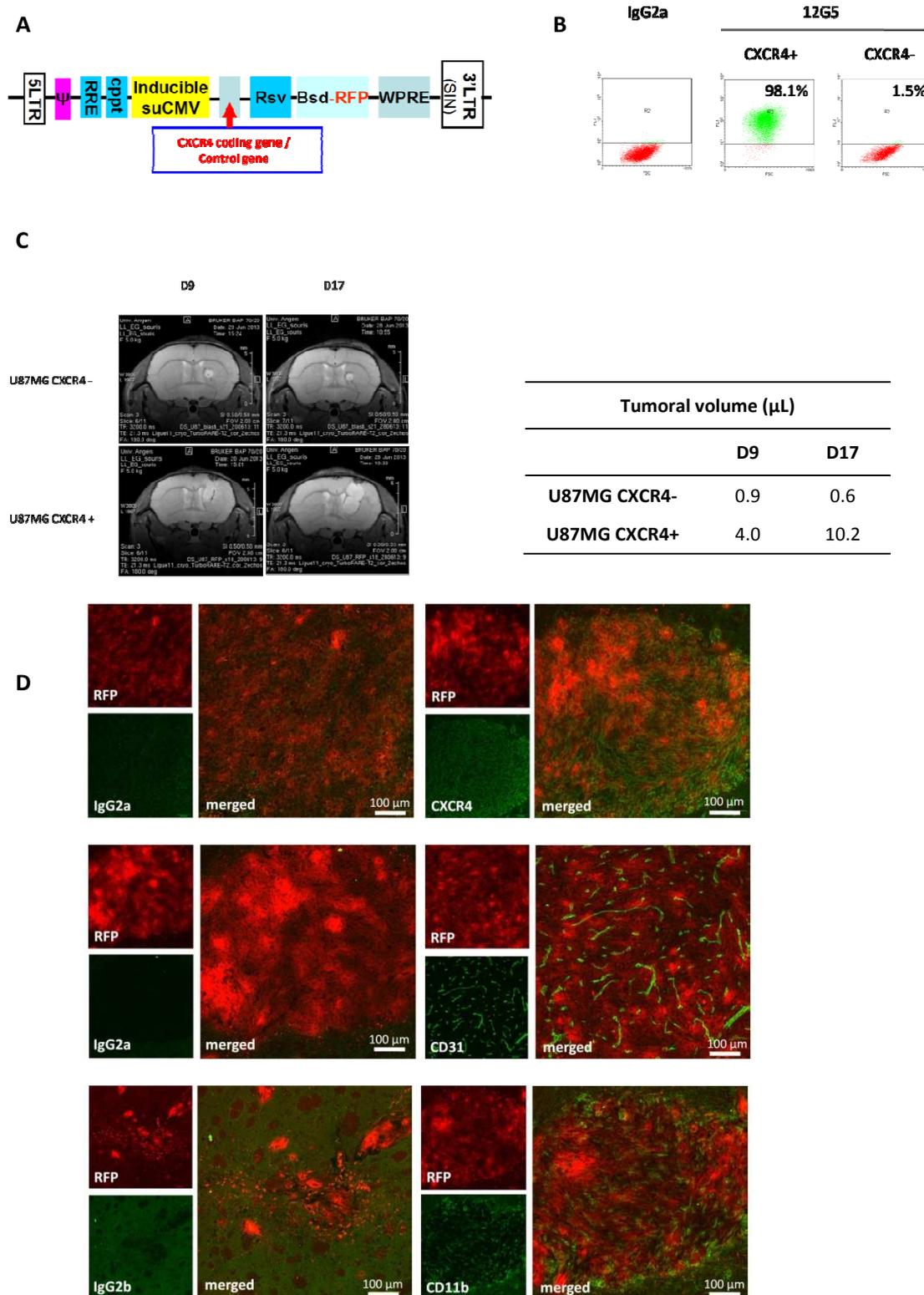
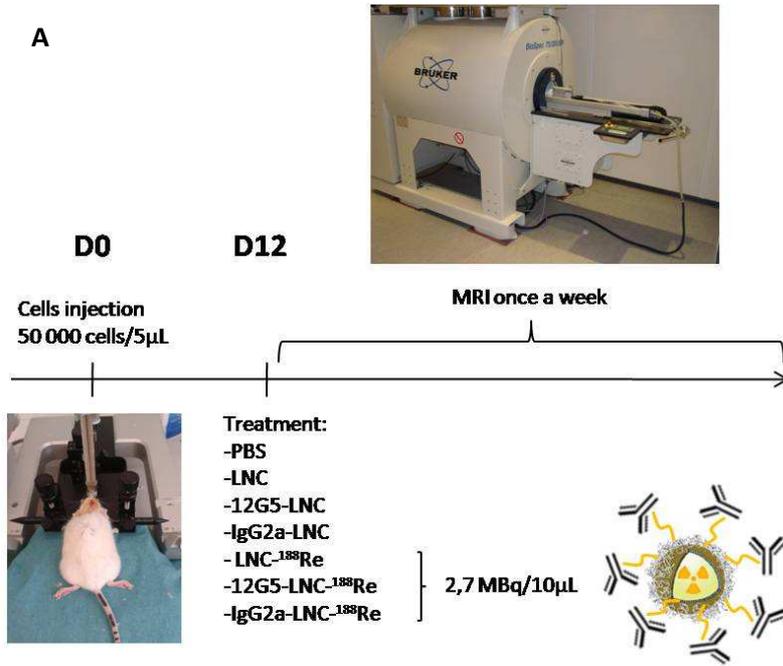
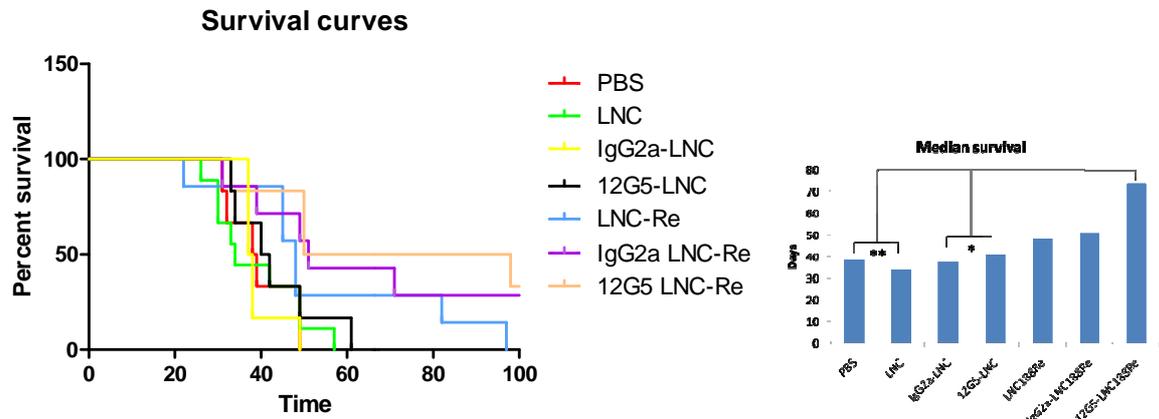


Figure 2 : Animal model establishment. A : Schematic representation of lentivirus encoding for CXCR4 or a control gene. B: Cytometry analysis performed on U87MG transfected cells. The 12G5 antibody efficiently labeled U87MG CXCR4+ cells but not U87MG negative cells, transfected with the control lentivirus. C: MRI performed at D9 and D17 after implantation of U87 CXCR4- cells and U87 CXCR4+ cells and corresponding tumoral volumes. D: Immunohistochemistry analysis on U87 CXCR4+ tumors 12 days after implantation with CXCR4, CD31 and CD11b labeling and corresponding controls.



**B**



	PBS	LNC	IgG2a-LNC	12G5-LNC	<sup>188</sup> ReLNC	IgG2a <sup>188</sup> ReLNC	12G5 <sup>188</sup> ReLNC
	N=6	N=9	N=6	N=6	N=7	N=6	N=7
Median survival (days)	38.5**	34**	41*	37.5*	48	51	74

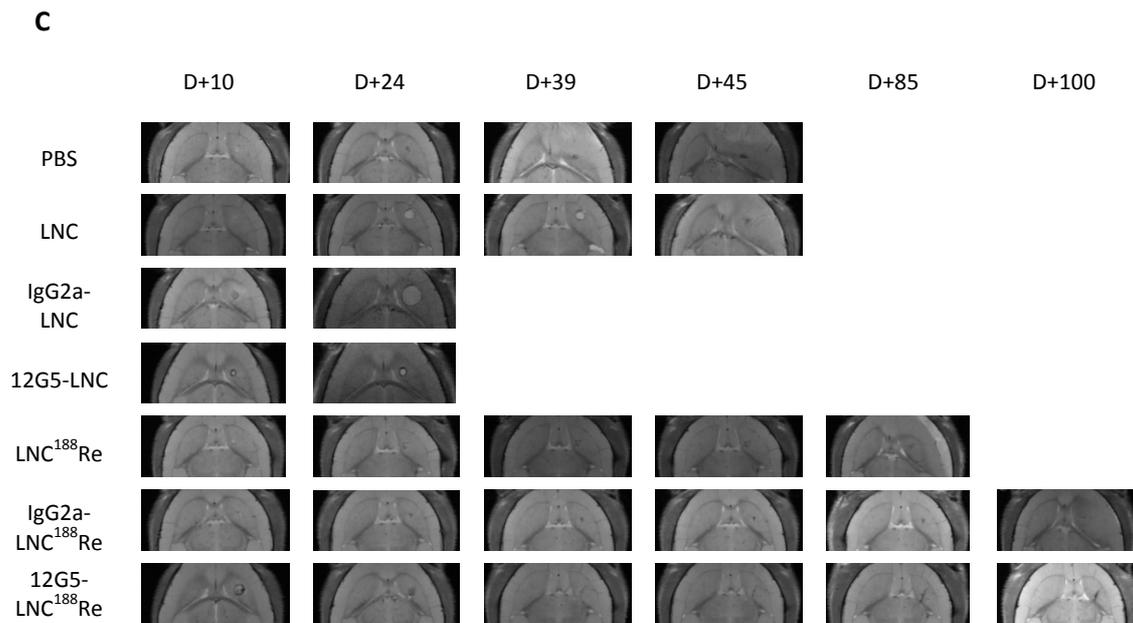


Figure 3 : *In vivo* study. A: Experimentation protocol. B: Survival analysis. Statistical analysis were performed with Log rank test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ ). Only 12G5-LNC<sup>188</sup>Re treated mice presented a median survival significantly different with those of 12G5-LNC and IgG2a-LNC treated mice ( $p < 0.05$ ) and very significantly different with those of PBS and LNC treated mice. C: MRI follow-up of mice treated with saline solution (PBS), blank LNC, immuno-LNC (12G5-LNC and IgG2a-LNC) and internal radiotherapies (LNC<sup>188</sup>Re, IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re and 12G5-LNC<sup>188</sup>Re).

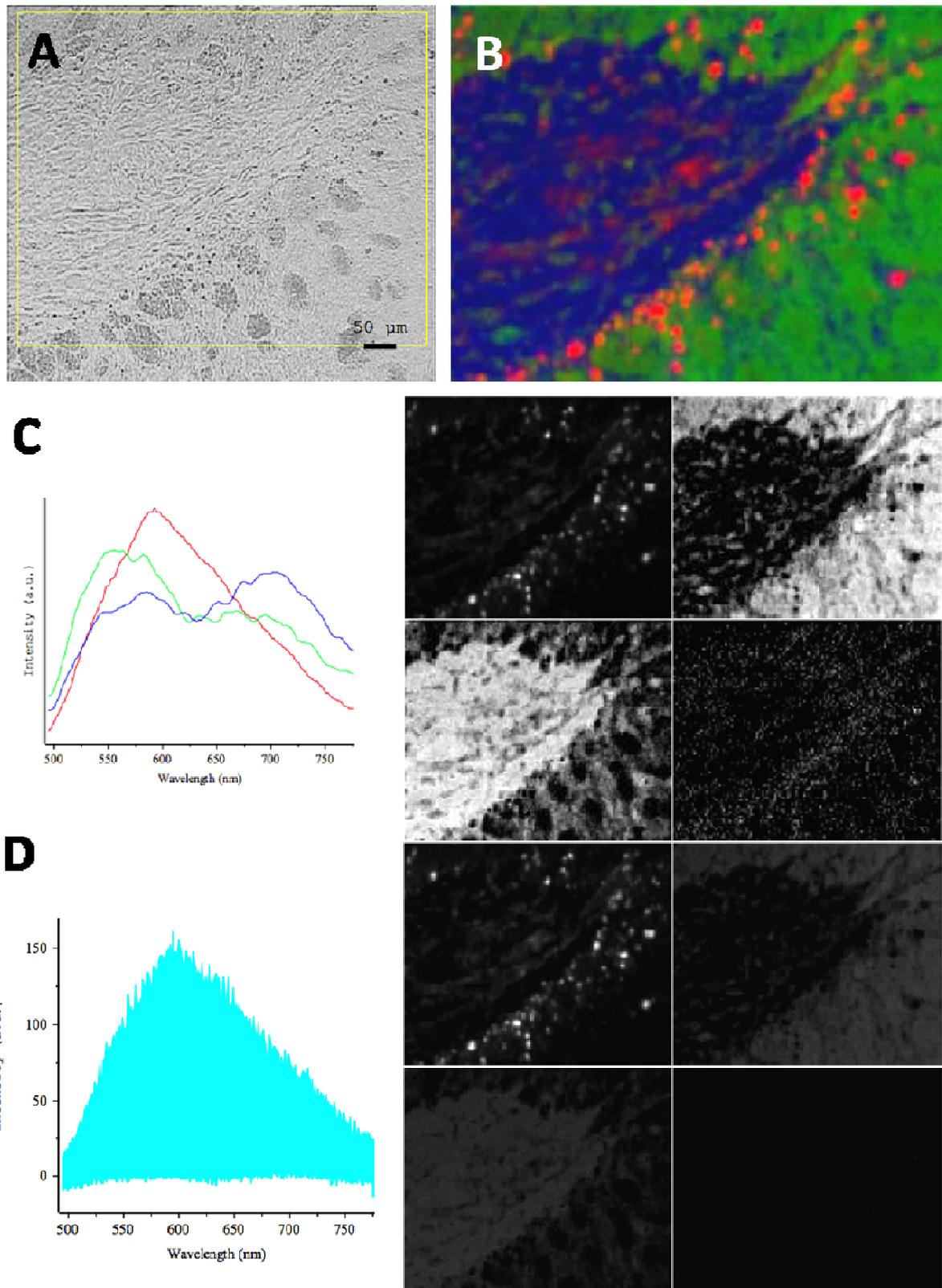


Figure 4 : Spectral imaging methodology. A : Microscopic image. B: Spectral image. C: Spectrums and images after normalized integration. Red spectrum for RFP spectrum, green spectrum for healthy parenchyma, blue spectrum for tumor tissue. D: Spectrum and images real integration.

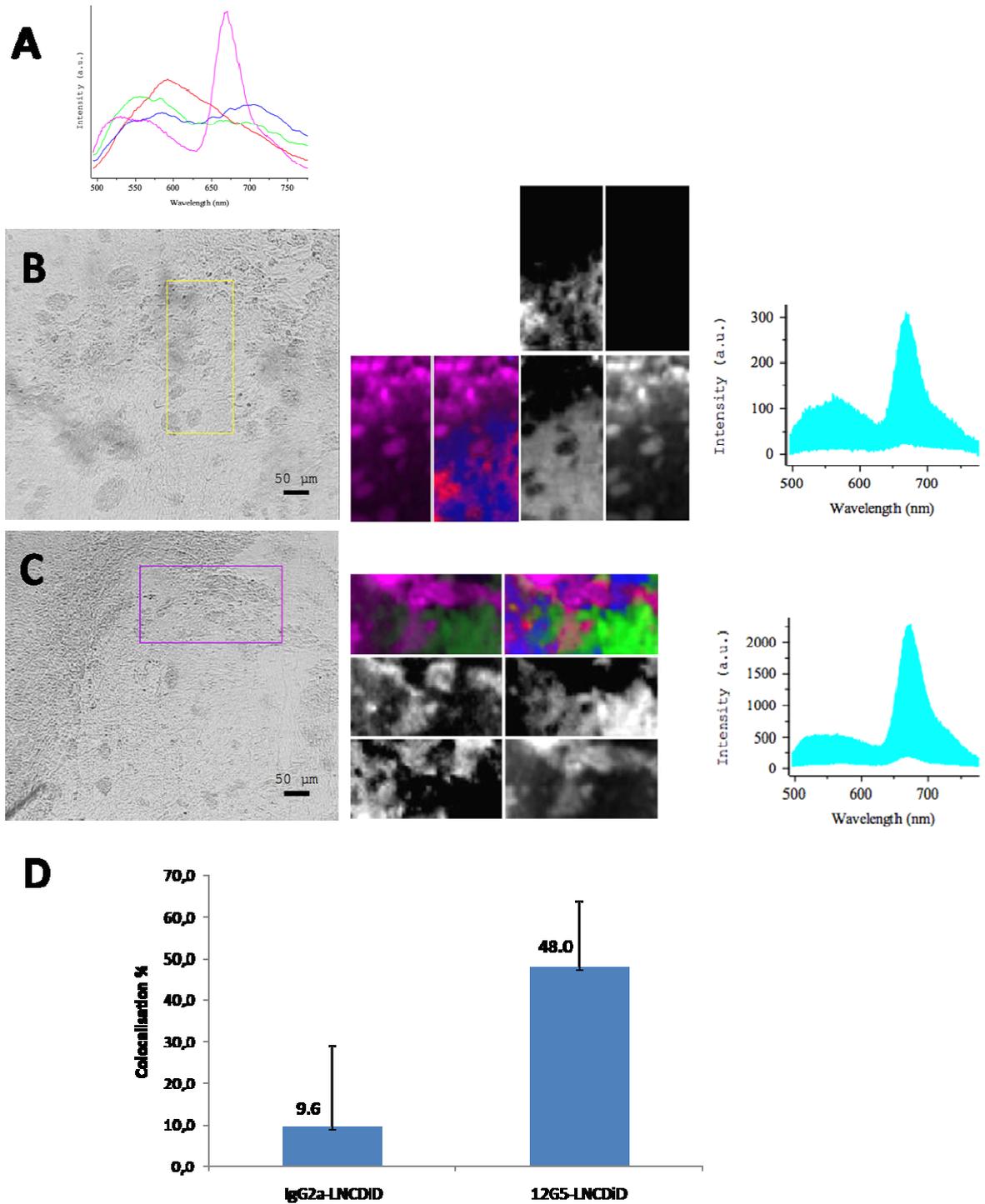


Figure 5 : Spectral characterization of immuno-LNCDiD distribution within the brain parenchyma of tumor bearing mice. A: All different spectrum presents in the parenchyma treated by immuno-LNCDiD: RFP (red), healthy parenchyma (green), tumor parenchyma (blue) and LNCDiD (magenta). B: Spectrums of parenchyma treated by IgG2a-LNCDiD. C: Spectrum of parenchyma treated by 12G5-LNCDiD. D: RFP/DiD co-localization rate.

End-point

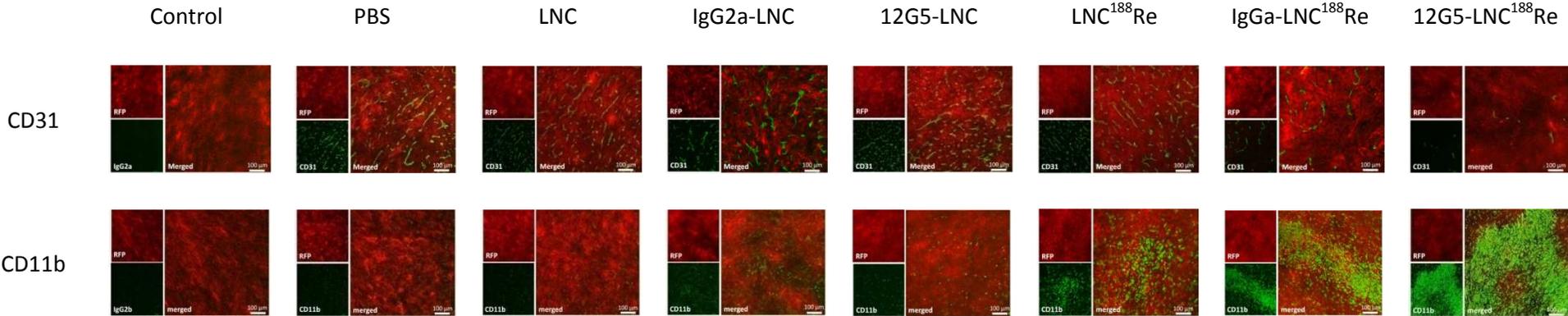


Figure 6 : Immunohistochemistry analysis of brain tumor when animals were sacrificed. Brains were extracted from tumor bearing mice treated with saline solution (PBS), blank LNC, IgG2a-LNC, 12G5-LNC, LNC<sup>188</sup>Re, IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re, 12G5-LNC<sup>188</sup>Re and CD31 and CD11b+ expression were evaluated.

## References

1. Bondy, M.L., et al., *Brain tumor epidemiology: Consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium*. *Cancer*, 2008. **113**(7): p. 1953-1968.
2. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(10): p. 987-996.
3. Muldoon, L.L., et al., *Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: A reality check*. *Journal of Clinical Oncology*, 2007. **25**(16): p. 2295-2305.
4. Zalutsky, M.R., et al., *Clinical experience with alpha-particle-emitting At-211: Treatment of recurrent brain tumor patients with At-211-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2008. **49**(1): p. 30-38.
5. Reardon, *Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: Phase II study results (vol 24, pg 115, 2006)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2006. **24**(9): p. 1484-1484.
6. Reardon, D.A., et al., *Phase II trial of murine I-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas*. *Journal of Clinical Oncology*, 2002. **20**(5): p. 1389-1397.
7. Veeravagu, A., et al., *Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Radioimmunotherapy of Glioblastoma Multiforme*. *Clinical Cancer Research*, 2008. **14**(22): p. 7330-7339.
8. Casaco, A., et al., *Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with (188)Re in adult recurrent high-grade glioma*. *Cancer Biology & Therapy*, 2008. **7**(3): p. 333-339.
9. Sofou, S., et al., *Engineered Liposomes for potential alpha-particle therapy of metastatic cancer*. *Journal of Nuclear Medicine*, 2004. **45**(2): p. 253-260.
10. Phillips, W.T., et al., *Rhenium-186 liposomes as convection-enhanced nanoparticle brachytherapy for treatment of glioblastoma*. *Neuro-Oncology*, 2012. **14**(4): p. 416-425.
11. Huang, F.Y.J., et al., *Imaging, Autoradiography, and Biodistribution of Re-188-Labeled PEGylated Nanoliposome in Orthotopic Glioma Bearing Rat Model*. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2011. **26**(6): p. 717-725.
12. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. *Pharmaceutical Research*, 2002. **19**(6): p. 875-880.
13. Allard, E., et al., *Re-188-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas*. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2008. **35**(10): p. 1838-1846.
14. Vanpouille-Box, C., et al., *Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with Re-188-lipid nanocapsules*. *Biomaterials*, 2011. **32**(28): p. 6781-6790.

15. Vescovi, A.L., R. Galli, and B.A. Reynolds, *Brain tumour stem cells*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(6): p. 425-436.
16. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Research, 2003. **63**(18): p. 5821-5828.
17. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
18. Galli, R., et al., *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. Cancer Research, 2004. **64**(19): p. 7011-7021.
19. Sanai, N., A. Alvarez-Buylla, and M.S. Berger, *Mechanisms of disease: Neural stem cells and the origin of gliomas*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(8): p. 811-822.
20. Bao, S.D., et al., *Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor*. Cancer Research, 2006. **66**(16): p. 7843-7848.
21. Cheng, L., et al., *L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1*. Embo Journal, 2011. **30**(5): p. 800-813.
22. Schonberg, D.L., et al., *Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy*. Molecular aspects of medicine, 2013.
23. Bao, S., et al., *Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth*. Cancer Research, 2008. **68**(15): p. 6043-6048.
24. Singh, A.K., et al., *Chemokine receptor trio: CXCR3, CXCR4 and CXCR7 crosstalk via CXCL11 and CXCL12*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2013. **24**(1): p. 41-49.
25. Zhang, J., S. Sarkar, and V.W. Yong, *The chemokine stromal cell derived factor-1 (CXCL12) promotes glioma invasiveness through MT2-matrix metalloproteinase*. Carcinogenesis, 2005. **26**(12): p. 2069-2077.
26. Ehtesham, M., et al., *CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells*. Cancer Letters, 2009. **274**(2): p. 305-312.
27. Brown, J.M., *Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy*. British Journal of Radiology, 2014. **87**(1035).
28. Ahn, G.O. and J.M. Brown, *Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: Role of bone marrow-derived myelomonocytic cells*. Cancer Cell, 2008. **13**(3): p. 193-205.
29. Tseng, D., D.A. Vasquez-Medrano, and J.M. Brown, *Targeting SDF-1/CXCR4 to inhibit tumour vasculature for treatment of glioblastomas*. British Journal of Cancer, 2011. **104**(12): p. 1805-1809.
30. Kioi, M., et al., *Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice*. Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(3): p. 694-705.
31. Barbero, S., et al., *Stromal cell-derived factor 1 alpha stimulates human glioblastoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinases 1/2 and Akt*. Cancer Research, 2003. **63**(8): p. 1969-1974.

32. Lepareur, N., et al., *A kit formulation for the labelling of lipiodol with generator-produced Re-188*. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals*, 2004. **47**(12): p. 857-867.
33. Bourseau-Guilmain, E., et al., *Development and characterization of immuno-nanocarriers targeting the cancer stem cell marker AC133*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012. **423**(1): p. 93-101.
34. Hirsjarvi, S., et al., *Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: Comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **453**(2): p. 594-600.
35. Chau, N.M., et al., *Identification of novel small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 that differentially block hypoxia-inducible factor-1 activity and hypoxia-inducible factor-1 alpha induction in response to hypoxic stress and growth factors*. *Cancer Research*, 2005. **65**(11): p. 4918-4928.
36. Miao, Z., et al., *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(40): p. 15735-15740.
37. Wuerth, R., et al., *CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014. **8**.
38. Walters, M.J., et al., *Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats*. *British Journal of Cancer*, 2014. **110**(5): p. 1179-1188.
39. Brown, J.M., *Inhibiting Vasculogenesis After Radiation: A New Paradigm to Improve Local Control by Radiotherapy*. *Seminars in Radiation Oncology*, 2013. **23**(4): p. 281-287.

## CHAPITRE II

# Chapitre II

---

## Développement d'un nouveau vecteur pour une chimio-radiosensibilisation des GBMs

---

Dans la première partie de cette thèse, nous avons potentialisé l'effet de la radiothérapie en concentrant les rayonnements au niveau des cellules CXCR4-positives.

Dans cette deuxième partie, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux voies de signalisation impliquées dans la radiorésistance. En effet, il a été démontré que les cellules souches de gliome activaient certaines voies et mécanismes de réparation de l'ADN qui leur permettent de survivre. Les nanotechnologies sont intéressantes dans la mise en place de stratégies de radiosensibilisation dans la mesure où leur grande diversité en terme de structure permet à la fois de synthétiser des nano-objets métalliques qui vont augmenter le gradient de dose au niveau du tissu cible et d'autre part, elles permettent d'encapsuler des agents pharmacologiques qui vont potentialiser l'effet de l'irradiation. Les avancées dans le domaine des nano-médecines radiosensibilisantes sont présentées dans la revue ci-après.

Nous nous sommes ensuite intéressés à un moyen de radio-sensibiliser les cellules de GBM par un agent pharmacologique. Nous avons alors choisi d'encapsuler la rapamycine qui est un inhibiteur de la voie PI3K/Akt/mTOR, largement impliquée dans la radiorésistance, et qui n'est pas soluble dans les solvants aqueux. Ainsi, son encapsulation dans le cœur lipidique des LNCs permet sa distribution dans les milieux biologiques.

---

## Publication n°2

**Nanomedicine to overcome radio-resistance in glioblastoma stem-like cells.**

---

# **Nanomedicine to overcome radio-resistance in glioblastoma stem-like cells.**

Delphine Séhédic<sup>1</sup>, Annabelle Cinkankowitz<sup>1</sup>, François Hindré<sup>1</sup>, François Davodeau<sup>2</sup>, Emmanuel Garcion<sup>1</sup>

<sup>1</sup> LUNAM Université, Université d'Angers, INSERM U1066 MINT, Angers, France

<sup>2</sup> LUNAM Université, Université de Nantes, INSERM U892 CRCNA, Nantes, France

## **Abstract**

Radiotherapy is one of the standard treatments in glioblastoma, but its effectiveness often encounters phenomena of radioresistance. This resistance to radiotherapy was recently attributed to a distinct cell population known as cancer stem-like cells (CSCs), and is characterized in particular by the activation of signalling pathways and DNA repair mechanisms. Recent advances in the field of nanomedicine offer new possibilities for the radiosensitizing of GSCs. Several strategies have been developed in this direction, the first consisting of encapsulating a contrast agent or synthesizing metal-based nanocarriers to concentrate the dose gradient at the level of the target tissue. In the second strategy, the physicochemical properties of the vectors are used to encapsulate a wide range of pharmacological agents, which act in synergy with the ionizing radiation to destroy the cancerous cells. This review reports the various molecular anomalies present in GSCs and the predominant role of nanomedicines in the development of radiosensitization strategies.

**Key words:** glioblastoma, radioresistance, radiosensitization, nanomedicine, targeted therapies

# 1 Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and deadly primary brain cancer in adult. The World Health Organization (WHO) classifies central nervous system tumors into four grades: I, II, III and IV. Grade IV glioblastoma multiforme is the most frequent, devastating and malignant astrocytic glioma [1]. The current treatment of GBM consists of surgical resection of the tumor followed by chemotherapy with temozolomide (TMZ), and/or radiotherapy with X-rays. Despite these very aggressive strategies, the median survival is less than 15 months and 5-year survival remains below 2% because of inevitable tumor reappearance [2].

While surgery is the most effective treatment against cancer, surgical resection in the case of glioblastoma is limited by the localization of the tumor in the brain, the seat of our consciousness. Depending on the tumor site, not all tumors are resectable and, whenever possible, the surgical resection margin is limited. Thus, poor survival is due to a high rate of tumor recurrence, mainly within 2-3 cm of the original resection cavity suggesting insufficient killing of tumorigenic cells even in case of macroscopically complete resection of *de novo* tumors. The second therapeutic arsenal relies on chemotherapy with the alkylating agent TMZ conferring a clinical advantage [3]. However, and although debatable [4-6], damage caused to DNA by TMZ and its effectiveness seem inversely correlated to the expression of an enzyme called "*O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase" (MGMT), due to promoter hypermethylation [7]. Like other chemotherapeutic agents, TMZ must reach the tumor and more particularly the nucleus of GBM cells, to be effective, but in the case of brain tumors, access is limited by the blood-brain barrier (BBB). Oral route administration of TMZ requires the use of an increased dose that is not specific and can give rise to side effects. Finally, radiation therapy appears to be an unavoidable therapeutic strategy in GBM. Indeed, radiation causes DNA damage and thus will preferentially target cells with high division rates such as tumor cells. Furthermore, with new radiation technologies, it is possible to specifically target the tumor site and limit the irradiation of healthy surrounding tissue.

Nevertheless, current radiation-combined therapies proved to be inefficient for the total eradication of GBM tumor cells. This therapeutic failure raise the question of the identification of relevant GBM targets affected by the treatment and the by the tumor resistance to radiochemotherapy that can itself result from the infiltrating nature of GBM cells, from the high expression of intrinsic and extrinsic survival factors and from a sub-optimum administration and/or delivery of drugs. As such, and although controversial, the GBM initiating or GBM stem-like cells (GSC) hypothesis suggest that, while focusing on the tumor

cell mass, conventional radiochemotherapeutic protocols may neglect some rare GBM cell populations. Those cells, with self-renewal capacities, are well prepared to resist to or to repair damages caused by the treatment and thus capable to recapitulate later a hierarchically derived tumor mass, similar or distinct from the initial tumor, as a result of abnormal and multi-lineage differentiation [8-9]. Alternatively, as one of the characteristics of the GBM cell populations is their genetic instability, intraclonal genetic and epigenetic evolution may represent GBM subclones at different stages of neoplastic transformation, each having a growth and survival advantage when exposed to radiochemotherapeutic treatments [10]. Hence, tumor heterogeneity may not only result from differentiation but also from clonal evolution. It is therefore important to find common denominators of resistance to all these cell subpopulations. As such, a relationship has been established between GBM radio-resistance and CD133+ GSC capable to activate signaling pathways that confer a survival benefit and DNA damage repair mechanisms more efficiently than non-GBM stem cells [11-13]. As such, Cancer stem-like cells markers among which AC133 [14-15], alpha-6 integrin [16], JAM-1 [17], CXCR4 [18], are not only decorative but also involved in specific processes that can be modulated in order to reinforce the beneficial impact of radiation therapy. Thus, a clear understanding of signaling pathways implicated in radio-resistance has led to the development of targeted therapies directed to well-defined mechanisms. This strategy offers the advantage of a selective inhibition of a signaling pathway in the cancer stem-like cell or dominant clones [19], while also, in some cases, inhibiting other signaling pathways due to relationships between pathways [20], or being pleiotropic on distinct cell contingents such as radioresistant GBM cells and stromal cells involved in GBM progression including bone marrow derived cells [21] or endothelial cells [22]. As such hypofractionated radiation therapy may reinforce synergistic impact of radiations on the tumor vasculature and tumor cell themselves [23].

Nevertheless, the brain localization of GBM raises the question of administration route. Indeed, treatments usually involve systemic administration (intravenous or oral route), and the therapeutic agents must cross the blood brain barrier (BBB) to be effective. In this context, development of the loco-regional administration route using convection-enhanced delivery (CED), osmotic minipumps or wafers, allows direct transport of the drug to the tumor site. The second problem associated with conventional therapies is their rapid metabolism and elimination.

In this context, nanocarriers may be of particular interest because, owing to their very small size (nanometer scale), they can cross the BBB and reach the tumor site. It is also possible to vectorize drugs and metals as well as radionuclides. Thus, nanocarriers can actively

participate in radiosensitizing therapy either by enhanced dose deposition or by a synergistic effect vectorizing a radiosensitizer drug.

In this review, we present the biological effects of radiation and how the GSCs activate repair mechanisms and signaling pathways to resist radiation damage. We also discuss how the knowledge of radio-resistance is used to develop targeting therapies. In this context, we point out the important role of nanocarriers in the development of radiosensitizer therapies.

## 2 Biological and cellular effects of radiation

Radiation therapy in glioblastoma consists of using X-rays (i.e. photons) to kill the cancer cells. The radiation process can be divided into three phases (physical, chemical and cellular). During the physical phase, photons interact with biological matter. This is followed by the chemical phase, which is a direct consequence of the physical phase [24-25]. The main reaction involved is cell water radiolysis, which gives rise to different reactive oxygen species (ROS) [24]: hydroxyl radical  $\text{HO}^\bullet$ , hydrogen radical  $\text{H}^\bullet$ , superoxide  $\text{O}_2^-$ , hydroperoxyl radical  $\text{HO}_2^\bullet$ , oxonium ion  $\text{H}_3\text{O}^+$ , hydroxyl ion  $\text{OH}^-$ , hydrogen peroxide  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dihydrogen  $\text{H}_2$ .

Water radiolysis and ROS appear to be responsible for two-thirds of ionization radiation effects. While radiation acts on cell membrane permeability by causing the degradation of phospholipids, as well as on ribosomes and mitochondria in the cytoplasm, biological effects are mainly due to lesions on the DNA. These lesions can be direct, resulting from interactions between photons and DNA molecules, or indirect following interactions with ROS leading to the activation of DNA checkpoint signaling and DNA repair, which occur during the cellular phase of the radiation process [25-26].

DNA double-strand breaks (DSBs) are the most toxic DNA lesions, and the biological efficacy of radiotherapy depends on the ability to produce these DSBs. Activation of checkpoint pathways initiates cell-cycle arrest with attempted DNA repair or induces apoptosis when the extent of DNA damage exceeds the cellular capacity for repair [27]. Bao *et al* showed that GSCs display a high activation of cell cycle checkpoints implicated in DNA damage repair after radiation, and this activation represents a radioresistance factor [11]. DSBs are recognized primarily by the MRN complex, consisting of Mre11, Rad50 and Nsb1 proteins, which rapidly relocate to the site of damage, recruiting ATM (ataxia-telangiectasia mutated kinase), which then initiates cell cycle arrest and DNA repair. The MRN complex plays a critical role in initiating DNA repair and G2 checkpoint activation by governing ATM

kinase activity after radiation. Radiation-induced DSBs trigger the activation of an ATM-dependent Rad17-Chk2-CDC25A signaling cascade to induce cell-cycle arrest.

Two major DSB pathways are involved during DNA repair [28]: non-homologous end joining (NHEJ) is initiated predominantly during the G1 phase of the cell cycle. The second repair mechanism occurs during the S- and G2-phases. Homologous recombination is an error-free method of repair using sister chromatids as templates to replace damaged DNA [29]. In contrast, NHEJ relies on ligases and excision repair enzymes to adhere broken DNA ends that can introduce spontaneous mutations [30]. Depending on the severity of the mistake, cells with high mutational burden may initiate apoptosis to minimize damage to the genome and prevent mutations from being maintained through subsequent cell divisions. In 2012, Lim *et al.*, showed that GSCs exhibit a reduced level of NHEJ and homologous recombination is important for the survival of GSCs. Due to an attenuated S-phase checkpoint activity, most cells are accumulated in this state resulting in preferential use of the homologous recombination pathway [31].

Thus, both DNA damage checkpoint activation and DNA repair capacity primarily protect cell survival. In response to DSBs, the activation of ATM, Chk2 and Rad17 are higher in GSCs than the matched non-stem tumor cells [11]. Consistent with this observation, Bao *et al.* showed that the L1 cell adhesion molecule (L1CAM) supported GSC survival and tumor growth [32]. Its protein level in GSCs is enhanced by radiation. Inhibition of L1CAM attenuates the activating phosphorylation of ATM and Chk2 and moderately attenuates the phosphorylation of Rad17 and Chk1 in response to radiation. The study of Bao *et al.* demonstrates that L1CAM promotes checkpoint activation in response to DNA damage. This promotion is due to L1CAM being up-regulated by NBS1, a protein of the MRN complex, which is required for ATM activation and the subsequent activation of its downstream checkpoint proteins such as Chk2 [33]. Other strategies may consist of inhibiting checkpoint kinase signaling. Thus, DNA damage by ionizing radiation activates G2 checkpoint signaling initiated by the ATM kinase. The signaling pathway communicates through several downstream mediator proteins, including the tumor suppressor proteins p53 and BRCA1 as well as the checkpoint kinase CHK1 and CHK2 [34]. In the orderly division of a cell, the transition from G2 phase to mitosis is inhibited through phosphorylations of the Cdc2 kinase belonging to the Cdc2/cyclin B complex. At the onset of mitosis, these inhibitory phosphorylations are removed by Cdc25C phosphatase. The activation of Cdc25C also requires phosphorylation, which is carried out by polo-like kinase 1 (Plk1)[35]. In breast carcinoma, Ree *et al.* have shown that UCN-01, a specific inhibitor of CHK1, seems to amplify the cytotoxic effect of ionizing radiation on clonogenic regrowth [36].

In addition to the impact on DNA, damages caused by radiation therapy to the cellular plasma membrane and organelles may have additional consequences on cell behaviour and survival that have to be considered [37]. The main radio-induced alteration to the plasma membrane is the change in the organization and or the composition of the glycocalyx, which is related to the change in the quantity and the distribution of the membrane negatively charged compounds (e.g. sialic acid) and binding sites for calcium and lectins. It was also reported that application of ionizing radiations lead to a reversible decrease in the negative surface charge in several cell types [38-39]. Radiation therapy can also induce conformational and structural changes that can modify the activity of membrane receptors and enzymes including the adenylate cyclase and calcium ATPases [40]. Morphologically, irradiation can lead to rapid withdrawal of cell protrusions and cause the appearance of "giant" cells. The irradiated cells also exhibit impaired intercellular communication functions with a modification of GAP junctions, which can lead to cell death by also to malignant transformation [41]. At the level of the cytoskeleton, a disruption of the actin network and a destruction of intermediate filaments were also observed in various cell types after irradiation [42]. Additionally, mitochondria, which continuously produced reactive oxygen species in relatively high under physiological conditions, represent direct targets of ionizing radiation. It was indeed established that after exposition to radiations the cellular level of reactive oxygen species was significantly increase and was combined with an accumulation of products of lipid peroxidation, thus resulting in the alteration of the structure and function of mitochondria [43-44].

### **3 Signaling pathways implicated in radioresistance in GSCs**

Radiation therapy may involve different kind of ionizing radiations through the use of different methods of irradiation, among which brachytherapy and alpha or beta vectorized radiation therapy, we focus primarily in this review on extrinsic and intrinsic cellular resistances to external X-ray beam radiation therapy that are essentially ubiquitous. Although most of the cancer cells are destroyed during the treatment, but some GSCs survive. This phenomenon is notably due to activation of specific signaling pathways implicated in resistance to apoptosis, invasion, migration and maintenance of stem cell properties. In GSCs, there are three main signaling pathways implicated in radioresistance: Notch, Sonic Hedgehog and Wnt (Figure 1) and they are highly connected to other signaling pathways.

### 3.1 Wnt signaling pathway

The Wnt glycoproteins are produced by the neighboring cells. The secreted Wnt ligands bind to the receptors of the seven-membrane-spanning Frizzled (FZD) family and single-spanning LRP family. Three main branches are activated downstream from the Wnt signals: (i) canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, (ii) the noncanonical Jun kinase and (iii) Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathways. The central component of the canonical Wnt signaling is  $\beta$ -catenin. In the absence of Wnt signals,  $\beta$ -catenin forms a stable complex with E-cadherin and participates in adherens junction formation (Figure 1). Excess  $\beta$ -catenin is captured by a destruction complex containing GSK3 $\beta$ , Axin1, Axin2/Conductin and APC, where it becomes N-terminally phosphorylated and, following ubiquitination by  $\beta$ -Trcp, is then targeted to proteasome-mediated degradation. By contrast, in the presence of Wnt ligands, disassembly of the destruction complex occurs through phosphorylation of LRP5/6 by GSK3 $\beta$  and CK1 $\alpha$ , along with binding of Axin to LRP, thereby preventing  $\beta$ -catenin degradation. Free cytoplasmic  $\beta$ -catenin can then enter the nucleus, where it forms a transcriptionally active complex with the Tcf/Lef family of transcription factors, by replacing Grouchos from chromatin, and interacting with other coactivators such as CBP, BCL9, and Pygopus. The three pathways branch at the level of Dishevelled (Dsh) protein. In the noncanonical Jun kinase pathway, Dsh is connected via Daam1 to downstream effectors, such as Rho, and regulates cytoskeletal organization and cell polarity. The Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway leads to the release of intracellular calcium, and involves activation of Phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC).  $\text{Ca}^{2+}$  can activate Calmodulin-dependent protein kinase C (CaMKII) and Nemo-like kinase (NLK), while also suppressing canonical Wnt signaling [45].

During carcinogenesis, activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is often involved through up-regulation of Wnt ligands or FZD receptors. In parallel,  $\beta$ -catenin degradation is stopped due to failure of some upstream members of the signaling pathway, and/or the  $\beta$ -catenin is mutated [46-47]. Intracellular accumulation of  $\beta$ -catenin and its translocation into the nucleus regulates the expression of target genes.

In 2012, Kim et al. showed that established-GBM cell lines and patient-derived freshly dissociated GBM specimens are more clonogenic and enriched in CSC after radiation compared with non IR cells [48]. Transcriptomic analyses and RT-PCR reveal that the Wnt pathway is preferentially activated in post-irradiated GBM cells. Irradiated cells are enriched with positive active  $\beta$ -catenin (ABC) and Sox2 cell population, and these subpopulations are further increased after additional *in vitro* radiation treatment, suggesting that the radioresistance of GBM is due, in part, to the activation of stem-cell- associated pathways

including Wnt. Finally, these authors (*op. cit.*) showed that pharmacological and siRNA inhibition of the Wnt pathway significantly decreases survival and clonogenicity of GBM cells and reduces the ABC+/Sox2+ subpopulation [48].

Many inhibitors have been developed or could be used to inhibit the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (Figure 1). Some inhibitors directly target effectors of this pathway. For example, phosphorylation of GSK3 by p38 MAPK at Thr390 reduces the activity of the GSK3 kinase. Accordingly, small molecular inhibitors of p38 MAPK (SB203580 or SB239063) can lead to increased GSK3 activity and, as a result, reduced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [49-50]. Axin can be dephosphorylated by the serine/threonine phosphatases PP1 (Protein Phosphatase 1) [51-52]. Hence, inhibition of PP1 can lead to an increased phosphorylation of Axin followed by an enhancement of  $\beta$ -catenin degradation [52]. In this context, PP1 inhibitor tautomycin has been shown to reduce Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [52]. Additionally, there are two poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) that are implicated in this signaling: Tankyrase 1 (PARP5a) and Tankyrase 2 (PARP5b) [53-54]. Tankyrases have been identified as a promising target for inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Several research groups have identified small molecules that inhibit Tankyrases, and, correspondingly, the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, by stabilizing the destruction complex [55-60]. Two PARP inhibitors are currently being evaluated in a clinical trial in association with TMZ and RT (Table 1).

Others inhibitors act on Wnt receptor. A small molecule has been identified which triggers the internalization of Wnt receptors: the FDA-approved antihelminthic drug Niclosamide. Among other functions, Niclosamide was found to inhibit Wnt/Frizzled signaling [61-63]. It also downregulates Dishevelled-2 (Dvl-2) [64] and induces LRP6 degradation in prostate and breast cancer cells [62]. Interestingly, Niclosamide has no reported toxicity against non-cancer cells [64]. Other inhibitors such as filipin can inhibit LRP6/Frizzled endocytosis [65]. Finally, inhibition of other transmembrane receptors influences Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. Thus is the case with Imatinib, a tyrosine kinase inhibitor, which reduces Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [66].

### **3.2 PI3K/Akt signaling pathway**

Wnt is not a single unit but collaborates with other pathways, and mainly with PI3K/Akt/mTOR.

GBM commonly display hyperactivation of the PI3K/Akt pathway. The activation of this pathway results in activation of a receptor tyrosin kinase (RTK) by a cytokine or growth factor

which drives a sequential activation of PI3K, Akt and mTOR (Figure 1). PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) is a heterodimer with a regulator subunit p85 and a catalytic subunit p110. After activation of the RTK, PI3K migrates to the cell membrane, p110 is activated and phosphorylates PIP2 (phosphatidylinositol diphosphate). PIP3 (phosphatidylinositol triphosphate) recruits the serin/threonin kinase Akt to the membrane, which is then phosphorylated and activated by PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1). Akt has many downstream targets, mainly represented by mTOR (mammalian target of rapamycin) which regulates translation and protein synthesis, cell cycle and apoptosis. The mTORC1 complex (composed of mTOR, RAPTOR and PRAS40) activates eIF4E-binding protein, releasing the transcription factor eIF4 and the kinase S6K1 (or p70S6K) implicated in translation. Thus, mTOR regulates translation of cyclin D1, HIF1/2 and GLUT-1 [67].

This pathway can be activated in tumors through a number of mechanisms, including activation of up-stream growth factors, mutations of the PI3K catalytic subunit, overexpression or amplification of Akt family members, inactivation of the inhibitory effects of PTEN (phosphatase and tensin homolog) tumor suppressor or by a non-canonical Wnt pathway. Hyperactive Akt signaling promotes tumorigenic cell behaviors by increasing cell survival, proliferation, invasion and angiogenesis, and has been directly associated with *in vitro* conversion of grade III anaplastic astrocytoma to grade IV GBM [68-71]. Furthermore, it was reported that Akt is implicated in tumorigenesis and aggressiveness [72].

Rapamycin is a macrolide antibiotic which binds to FK506 binding protein 12 (FKBP12) (Figure 1). The rapamycin-FKBP12 complex inhibits mTOR and prevents further phosphorylation of protein involved in the control of transcription, translation and the cell cycle. Furthermore, prolonged rapamycin treatment reduces the levels of cAMP responsive element binding (CREB)-regulated transcription coactivator 2 (mTORC2), which is essential to maintain Akt/PKB signaling in many cell types [73]. Rapamycin has been reported to induce apoptosis in cancer cell lines and also been proved as a potential antiangiogenic agent [74]. Irradiation activates mTOR signaling in vascular endothelium and in glioblastoma cell lines U87MG, T98 and A172, but not in GL261 [75-77]. In 2011, Anandharaj *et al.* worked on three PTEN-null GBM cell lines, showing that, combined with radiotherapy, rapamycin inhibits the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family protein surviving through repression of phospho-Akt. Thus, targeting Akt through mTOR using treatment with rapamycin increases the radiation sensitivity [75]. In 2002, Eshleman *et al.* found that rapamycin has no effect on the intrinsic radiation sensitivity of cells grown in monolayer culture, whereas this molecule profoundly enhances the efficacy of fractionated radiotherapy in xenografts [77]. These authors (*op. cit.*) showed that although rapamycin inhibits cell

proliferation *in vitro* and *in vivo*, the *in vivo* effects only seem to be due to the direct effect of rapamycin on the cell. Indeed, the *in vivo* effects of this molecule on tumor proliferation are relatively modest compared with the sensitizing effect of the drug in the xenograft regrowth delay assay [77]. This suggests that other factors may also be important for the sensitizing effects of rapamycin. For example, rapamycin induces changes in glucose and nitrogen metabolism that can decrease oxygen consumption in solid tumors and improve overall tumor oxygenation [78]. Any decrease in the proportion of radioresistant hypoxic cells should significantly increase the efficacy of radiation. Rapamycin is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation *in vitro* and systemic administration of rapamycin can inhibit angiogenesis [79]. This finding is supported by the study of Shinohara *et al.*, which shows that mTOR inhibition induces apoptosis in endothelial cells HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) and sensitizes vascular endothelium to radiation injury both *in vitro* and *in vivo* [76]. Eshleman proposed that these effects are mediated primarily through modulation of VEGF-dependent signaling, with rapamycin inhibiting both hypoxia-inducible VEGF expression and downstream signaling from the VEGF receptor. It has been demonstrated that inhibition of VEGF signaling pathways can sensitize tumors to radiation. So, taken together, these observations suggest that the antiangiogenic effect of rapamycin might enhance the efficacy of radiation [77].

Finally, these different studies show that inhibition of the PI3K/Akt pathway through mTOR inhibitor sensitizes tumors to radiation. This effect is not only due to a direct inhibition of mTOR and an inhibition of translation and cell cycle progression, but also to the effects of rapamycin on the microenvironment, and mainly concerning the oxygenation of the tumor.

Other “first-generation” mTOR-targeted agents or Rapalogs have been developed, in particular Temsirolimus (CCI-779) and Everolimus (RAD-001) (Figure 1). Nevertheless, it is known that mTOR inhibition by the rapamycin-FKBP12 complex indirectly induces Akt activation by a negative feedback. Indeed, rapamycin effectively blocks S6 kinase (mTORC1 target) phosphorylation and also induces Akt phosphorylation and activity in an mTORC2-dependent manner [80-81]. Furthermore, p70S6K causes feedback inhibition of insulin-like growth factor 1 (IGF-1)/insulin signaling by phosphorylating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and causing its degradation [82]. In this way, rapamycin relieves this feedback and causes up-regulation of IRS-protein levels that increase IGF-IR/IRS-1/PI3K signaling to Akt [80]. Furthermore, signaling by type-I receptor (IGF1R) is activated by chemotherapy, radiotherapy or stress stimulation in several types of cancer. Up-regulation of IGF1R signaling has also been found to promote radioresistance in several types of solid tumor. In the bulk of tumor cells, IGF1R-induced activation of PI3K-Akt signaling gives rise to

radioresistance by preventing apoptosis and promoting cell survival. Recently, Osuka *et al.*, found that radiation increases the secretion of IGF1 and results in a gradual upregulation of IGF1R in GSCs. Moreover, they showed that inhibition of IGF1R is an effective way to reverse radioresistance *in vitro* and *in vivo* [83]. Rapalogs have been usually evaluated in combination with other targeted and chemotherapeutic agents. Recent studies have highlighted the potential synergism between EGFR and mTOR inhibition, and various clinical trials have investigated combinations such as gefitinib and everolimus [84-85] (Figure 1). An ongoing clinical trial is evaluating the therapeutic potential of temsirolimus associated with TMZ and radiotherapy (Table 1). In parallel, more specific inhibitors as well as dual inhibitors have been developed and evaluated. The dual mTOR/PI3K inhibitor PI103 is the first mTOR inhibitor that possesses simultaneous target inhibition while also inhibiting mTOR in an ATP-competitive manner [86]. Unfortunately, its poor pharmacokinetic properties have compromised its clinical application. Others mTOR and PI3K inhibitors have been developed, especially NVP-BEZ235 and XL-765 (Figure 1). NVP-BEZ235 is an mTOR and PI3K inhibitor which has shown efficacy in GBM and is currently in phase-I trials for a variety of solid tumors(#NCT01508104) [87]. Combination therapies with NVP-BEZ235 have also been explored. One strategy consists of associating NVP-BEZ235 with the autophagy inhibitor chloroquine to obtain a synergistic increase in *in vivo* tumor apoptosis [88]. In another study, NVP-BEZ235 was shown to inhibit the DNA repair protein DNA-PKC and ATM in GBM, which are thought to mediate resistance to ionization radiation [89], and this treatment may have a synergistic effect with radiotherapy in humans. NVP-BEZ235 has also been shown to sensitize xenograft GBM tumor models to radiation, which depends on its ability to induce autophagy [90]. XL-765 is another PI3K/mTOR inhibitor, currently undergoing trials in combination with radiotherapy and TMZ for GBM as well as in subjects with recurrent GBM (Table 1). Finally, studies of perifosine, an Akt inhibitor, in combination with adjuvant radiotherapy have also been evaluated to assess synergistic combinations. Unfortunately, in xenograft models, perifosin failed to synergize with radiation [91]. Nevertheless, another study showed that, in contrast to perifosin and nelfinavir, Akt inhibitor IV efficiently radiosensitizes wild-type PTEN glioma cells with a high level of radioresistance [92].

### **3.3 Notch signaling pathway**

Notch family proteins (Notch 1, 2, 3, 4) are transmembrane receptors proteins mediating cell-cell interactions and which function in proliferation, differentiation and apoptosis [93]. Notch receptors interact with five ligands (Delta-like 1, 3, 4 and Jagged-1, 2) [94]. Activation of

Notch-1 occurs after binding to Delta-like or Jagged ligands at the epidermal growth factor region of the Notch-1 extracellular domain [93] (Figure 1). Two sequential enzymatic cleavages by the  $\gamma$ -secretase complex release the Notch intracellular domain (NICD) from the membrane to the nucleus. The NICD translocates into the nucleus, where it binds the CFB1/RBP-Jk/Su(H)/Lag1 (CSL) transcription factor family. The CSL family can either activate or repress transcription via histone acetylases and desacetylases, respectively [94].

In brain tumors, Notch signaling regulates brain tumor progression and cancer stem cells. Inhibition of Notch-1 signaling via a  $\gamma$ -secretase inhibitor induces medulloblastoma stem cell apoptosis and differentiation, and thus reduces tumor progression [95]. Notch pathway is also important in GSCs and plays an important role in radioresistance [96-97]. Indeed, Wang *et al.* showed that expression of Notch target gene, including Hes2 and, to a lesser degree, Hes4 and Hes5, is increased after radiation exposure. Using CD133+ cells, these authors (*op. cit.*) showed that  $\gamma$ -secretase inhibitors (GSIs) moderately reduced growth of these cells in the absence of radiation, but severely impaired growth of cells exposed to radiation at either 1, 2 and 3 Gy (Figure 1). They also showed that GSIs significantly increase caspase activity and annexin V positive cells after radiation, suggesting that GSIs sensitize GSCs to radiation-induced cell death [96]. Similar results were obtained by Lin and coworkers, who showed that GSI at low concentration sensitizes U87MG and U251MG cells to radiation by depletion of radioresistant CD133-positive cells [98].

Notch can promote cellular survival through different mechanisms such as activation of the PI3K/Akt pathway and up-regulation of the pro-survival proteins Bcl-2 and Mcl-1. The PI3K/Akt pathway plays a central role in the radioprotective functions of Notch as indicated by the results of Wang *et al.* showing that inhibitors of PI3K or Akt abolish the radioprotective activities of NICD2 [96]. Another study reports a non-canonical transcription-independent function of Notch that suggests membrane-anchored Notch1 is sufficient to activate Akt [99]. Wang *et al.* also showed that, surprisingly, NICD2 upregulates two tumor suppressors PTEN and p53 (Figure 1). It is documented that PTEN and p53 can mediate cell cycle arrest and then promote survival after radiation in medulloblastoma stem cells [100]. Thus, in glioma stem cells, Notch-induced PTEN and p53 can indirectly contribute to reducing cell death after radiation by promoting cell cycle arrest.

In addition to  $\gamma$ -secretase inhibitors, arsenic trioxide (ATO) has demonstrated an inhibitory effect on GSCs (Figure 1). ATO inhibits the phosphorylation and activation of Akt and STAT3 through blockade of Notch signaling. *In vivo*, this drives to depletion of CSLCs in GBM and inhibits neurosphere recovery and secondary neurosphere formation [101].

### 3.4 Hedgehog signaling pathway

In mammals, there are three types of secreted glycoprotein ligands: Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) and Desert Hedgehog (DHH) (Figure 1). They bind to the receptor Patched (PTCH) associated with a second transmembrane receptor Smoothed (SMO), and activate the signaling pathway. Target genes (*GLI*, *PTCH1*, *Cyclin D*, *Cyclin E*, *MYC*, *VEGF*, *PDGF* etc.) are able to control tissue patterning, differentiation, proliferation and migration. Transcription factors GLI1 and GLI2 serve as positive regulators of Hedgehog signaling pathways, but GLI3 is a negative regulator [102]. In gliomas, Hedgehog/Gli signaling regulates the stemness signature and self-renewal of CD133+ cells, as well as the growth and survival of GSCs [103]. In 2011, Takezaki *et al.* showed the importance of this pathway for GSC proliferation and malignancy, whereas inhibiting the Notch or Wnt signaling pathway has little effect (Figure 1). Inhibition of the Hedgehog signaling pathway with cyclopamine strongly prevents cell proliferation in both cell lines tested compared with the inhibition of Wnt or Notch. These authors (*op. cit.*) also showed that, among the potential Gli target factors (Bmi, N-myc, Sox2 and Cdc2), Cdc2 is found to be indispensable for GSC proliferation [104]. Bar *et al.* studied the consequences of Hedgehog signaling pathway inhibition on GSC. They treated glioblastoma neurospheres with cyclopamine alone and also in combination with 10Gy of radiation. These authors observed a significantly lower growth rate when 10 $\mu$ M cyclopamine was given in addition to 10 Gy of radiation, as compared with radiotherapy alone. Their study suggests that the Hedgehog signaling blockade may target GBM cells not affected by radiation [105].

Other small molecules have been developed that bind Hedgehog and block its signaling. Other than cyclopamine, SANTI and Cur-61415 are among the SHH antagonists that bind SMO [106-107]. Small molecules have been reported that inhibit SHH signaling downstream of SMO, GANT61 and GANT58 [108]. A phase-I trial is currently underway in basal cell carcinoma and pancreatic cancer involving the SMO antagonists GDC-0449 and IPI-926 (#NTC00607724 and #NTC00761696) [109].

### 3.5 TGF $\beta$

The microenvironment can contribute to radiation responses. A critical component of the GBM microenvironment is the pleiotropic cytokine transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Figure 1). TGF- $\beta$  has a range of effects on the glioma microenvironment, including

extracellular matrix deposition, angiogenesis and invasion [110]. TGF- $\beta$ 2 is overexpressed in gliomas [111]. Ionizing radiation induces TGF- $\beta$  expression *in vitro* and *in vivo* in both normal and cancer cells [112-113]. Reactive oxygen species are possibly involved in the radiation-induced activation of TGF- $\beta$ , and the process is mediated by a conformational change in the latency associated peptide (LAP)-TGF $\beta$  complex, allowing the release of active TGF- $\beta$ 1 [114]. Furthermore, Shao and coworkers have demonstrated that radiation, and especially helium ions, can induce nitric oxide (NO) and TGF- $\beta$  secretion, playing a key role as a signaling factor in radiation-induced bystander effects by further inducing free radicals and DNA damage in the non-targeted bystander cells [115].

Inhibiting TGF- $\beta$  decreases radiation-induced phosphorylation of p53, chk2, H2AX and rad17, all of which are substrates of ATM. In 2011, Zhang and coworkers conducted a preclinical study of the antitumor effects of the TGF- $\beta$  receptor (TGF $\beta$ R) I kinase inhibitor LY2109761 in combination with radiotherapy. *In vivo* studies on an orthotopic intracranial model have shown that LY2109761 significantly reduces tumor growth, prolongs survival, and extends the prolongation of survival induced by radiation treatment [116]. These authors also evaluated the combination of LY2109761 with RT and TMZ. They demonstrated that the addition of a TGF- $\beta$ RI kinase inhibitor to the clinical standard (radiation plus TMZ) has the potential to improve the clinical outcome in human glioblastoma, especially in patients with unmethylated MGMT promoter status [117]. In 2012, Hardee *et al.* showed that GSCs are protected from radiation-induced killing by increased TGF- $\beta$  production under neurosphere culture conditions, which promotes effective DNA damage response and self-renewal via CXCR4 and Notch1. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling by LY364947 compromises both mechanisms [118]. Phase-I/II and phase-IIb studies performed with the antisense oligonucleotide AP-12009 have yielded encouraging results [119-120].

### 3.6 STAT-3

Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) is a transcription factor for cytokine signaling which is constitutively activated in numerous cancer types including brain tumors. In turn, STAT3 can be activated by the ciliary neurotrophic factor (CNTF) family of cytokine receptors in neural cells to activate tyrosine kinases associated with JAK cytokine receptors. STAT3 is then recruited to the cytokine receptor and activated when the tyrosine residue Tyr705 is phosphorylated (Figure 1). STAT3 can also be directly activated by the tyrosine

kinase activity of growth factor receptors such as EGFR [121]. The role of STAT3 in tumorigenesis is to mediate the expression of downstream genes that suppress apoptosis, regulate cell cycle progression, mediate cellular invasion and modulate angiogenesis. Chang *et al.* have shown that cucurbitacin I, a STAT3 inhibitor, suppresses the stem cell phenotype in CD133+ cells in medulloblastoma. Furthermore, this treatment increases the sensibility to radiation and inhibits the tumorigenicity of CD133+ cells when associated with radiation [122]. Yang *et al.* showed that STAT3 inhibition with shRNA-STAT3 or resveratrol inhibits stem cell properties and radioresistance of CD133+ glioblastoma cells [123]. In the same way, it has been demonstrated that the STAT3 inhibitor STX-0119 inhibits proliferation of cancer stem-like cells derived from glioblastoma and could be of interest in combination with TMZ plus radiation therapy [49].

### 3.7 FGF and Integrin $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$

FGF is a powerful angiogenic factor expressed by endothelial cells in tumor vessels. Cohen-Jonathan *et al.* showed that nuclear FGF-2 isoforms display some radioprotective properties [124], increasing the enzymatic activity of DNA-PKcs implicated in radio-induced non-homologous repair of DSBs and activated by radiation [125-128]. This radioresistance is controlled by GTPase RhoB, known to be activated under different stress conditions including ultraviolet and ionizing radiation, hypoxia [129] and certain growth factors such as the epidermal growth factor (EGF) or FGF-2 (Figure 1). These authors also showed that farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome over-duplication [130]. Inhibition of this farnesylated RhoB with the farnesyltransferase inhibitor R115777 significantly enhances radiosensitization in glioblastoma cell lines. *In vivo*, R115777 facilitates oxygenation of the tumor, normalizes tumor vessels and inhibits matrix metalloproteinase-2 (MMP2) [131-133]. Furthermore, tumor radiosensitivity is controlled by endothelial cells, being dependent on FGF-2 which is a radioprotector [134]. Thus, inhibition of FGF-2 and its cell signaling pathway leads to the radiosensitization of glioblastoma, acting directly on tumor cells and indirectly through modulation of endothelial cell sensitization.

Integrins are heterodimeric receptors, and their ligands are components of the extracellular matrix which transmit cell-cell or cell-matrix signals (Figure 1). They can not only control angiogenesis but also cell survival. In glioblastoma, radiation induces tumor cell migration associated with an increase of  $\alpha\beta 3$  expression [135]. Activation of this signaling pathway is controlled by the integrin link kinase (ILK) and passes through RhoB-GTP activation [136].

When carried out prior to radiation, the pharmacological inhibition of integrins with cilengitide, a cyclicized arginine-glycine-aspartic acid-containing pentapeptide (RGD pentapeptide), causes a significant radiosensitization of glioblastoma cell lines. These results demonstrate a cross-talk via RhoB between FGF-2,  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$ , leading to a decrease of tumor radiosensitivity [124].

Thus, several groups have proposed the hypothesis of increased glioma radiosensitization due to inhibition of FGF-2,  $\alpha\beta3$  and  $\alpha\beta5$ . Notably, Cohen-Jonathan's group has designed a phase-I trial in which thirteen patients were enrolled. After resection or biopsy, tipifarnib, the farnesyltransferase inhibitor, was administered one week before and then continuously during radiotherapy (60 Gy), followed by adjuvant administration until progression (Table 1). The tipifarnib dose during radiotherapy was escalated in cohorts of 3 doses starting at 200 mg/day. They concluded that tipifarnib (200 mg/day) concurrent with standard radiotherapy is well tolerated in patients with glioblastoma [137]. Subsequently, Ducassou and coworkers found that the farnesylated form of RhoB in glioblastoma is implicated in radioresistance (Table 1). These authors (*op. cit.*) designed a phase II trial associating tipifarnib with radiotherapy in patients with glioblastoma. The patients were treated with 200mg tipifarnib given continuously during radiotherapy. Twenty-seven patients were included in phase II and analysis of the results show promising overall survival (OS), but no increase in time to progression (TTP) compared to historical data [138]. Stupp and coworkers evaluated the therapeutic benefit of cilengitide in a phase-I/IIa trial, in association with TMZ and radiotherapy (Table 1). Fifty-two patients were treated with cilengitide (500 mg) administered twice weekly intravenously in addition to standard radiotherapy with concomitant and adjuvant TMZ. Treatment was continued until disease progression or for up to 35 weeks. Results show that the combination of cilengitide with TMZ and radiotherapy was well tolerated, with no additional toxicity. No pharmacokinetic interactions were identified between TMZ and cilengitide. Conclusion: compared with historical controls, the addition of concomitant and adjuvant cilengitide to standard chemoradiotherapy demonstrates promising activity in patients with glioblastoma with MGMT promoter methylation [139]. More recently, Ader and coworkers have evaluated SSR128129E, a small-molecule multi-fibroblast growth factor receptor blocker, as a radiosensitizer in glioblastoma cell lines [140]. They demonstrated that treating U87MG xenograft mice orthotopically with SSR128129E before two subsequent local irradiations of 2.5 Gy significantly increases the animals' neurological sign-free survival compared to the control groups.

### 3.8 Hypoxia and HIF-1 $\alpha$ and HIF-2 $\alpha$

Although tumor-mediated cell recruitment attracts vessels, the vessels are often highly disorganized. Solid tumors, including gliomas, contain regions of irregular blood flow that experience fluctuating abnormal hypoxic oxygen tension levels, ranging from less than 1-5%. Hypoxia-mediated responses are carried out predominantly by hypoxia-inducible factors (HIFs) belonging to the family of transcription factors. Under normoxic conditions, HIFs are hydroxylated by HIF-prolyl-hydroxylases, allowing ubiquitination by the von Hippel-Lindau (vHL) tumor suppressor gene followed by proteasomal degradation. Under hypoxia, HIF prolyl-hydroxylase, which requires oxygen, is inhibited. HIF proteins become stabilized, leading to dimerization and subsequent binding to hypoxia-responsive elements (HREs) on the promoters of target genes that are often involved in modulating cell survival, motility, metabolism and angiogenesis [141-142].

HIF1 $\alpha$  is widely expressed in various tissues, while HIF2 $\alpha$  expression appears to be more restricted. In parallel, HIF1 $\alpha$  promotes proliferation and survival of all cancer cells and HIF2 $\alpha$  is specifically regulated with enhanced transcription in GSCs even under modest hypoxic conditions. On the other hand, non-glioma stem cells express essentially no HIF2 $\alpha$ , making HIF2 $\alpha$  an attractive GSC target [143]. In 2005, Williams *et al* showed that there are no differences in the radiation response of wild type or HIF-1 deficient mouse hepatoma cells *in vitro*, but HIF-1 deficiency promotes radio-responsiveness *in vivo*. These authors also showed that, under hypoxic conditions, the presence of HIF-1 $\beta$ , and thereby intact HIF-1 function, provides a survival signal for cells maintained in hypoxia and may enhance the ability of cells to adapt to a reoxygenation event following hypoxic exposure. Such reoxygenation events would occur following tumor irradiation [144]. In 2006, Bernardi *et al.* proposed a correlation between the PI3K/Akt/mTOR pathway and hypoxia. These authors mainly showed that the promyelocytic leukaemia tumor suppressor gene inhibits HIF-1 $\alpha$  translation and neoangiogenesis through repression of mTOR [145].

Target	Drug(s)	Trial design	Study population	Outcome	Ref
EGFR	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase I/II #N0177	97 newly diagnosed GBM	Median survival 15.3 months, no benefit at OS	[146]
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II	65 newly diagnosed GBM / gliosarcoma	Median survival 19.3 months vs 14.1 controls, positive correlation MGMT methylation with survival and MGMT methylation + PTEN positivity with improved survival	[147]
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II	27 newly diagnosed GBM	OS 8.6 months median PFS 2.8 months	[148]
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II #NCT00187486	newly diagnosed GBM / gliosarcoma	Ongoing	
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II #NCT00274833	newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Cetuximab (+TMZ+RT)	Phase I/II	39 newly diagnosed GBM	12-months OS, 89% 24-months OS, 42% 6 month PFS, 76% 12-month PFS, 45%	[149]
	BIBW2992 (Afatinib) (+RT+TMZ)	Phase I #NCT00977431	38 newly diagnosed GBM	Ongoing	
VEGF	Bevacizumab (+RT+TMZ)	Phase III #NCT00884741	942 newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Bevacizumab (+RT+TMZ)	Phase III #NCT00943826	920 newly diagnosed GBM	Bevacizumab + RT +TMZ did not improve survival in patients with GBM	[150]
VEGFR	Cediranib (TMZ+RT)	Phase II	283 newly	Ongoing	

		#NCT01062425	diagnosed GBM		
	Sorafenib (+RT+TMZ)	Phase I/II #NCT00734526	51 newly diagnosed GBM / gliosarcoma	Ongoing	
	Sorafenib (+TMZ+RT)	Phase II #NCT00544817	46 newly diagnosed GBM	Ongoing	
	XL184 (Cabozantinib) (+RT+TMZ)	Phase I #NCT00960492	85 newly diagnosed GBM	Ongoing	
Akt	Nelfinavir (+TMZ+RT)	Phase I/II #NCT00694837	newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Nelfinavir (+TMZ+RT)	Phase I #NCT01020292		Ongoing	
mTOR	Temsirolimus (+RT+TMZ)	Phase I #NCT00316849	newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Everolimus (+TMZ+RT)	Phase I/II #NCT00553150	108 newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Everolimus (+RT+TMZ+bevacizumab)	Phase II #NCT00805961	68 newly diagnosed GBM	PFS=11.3 months and OS= 13.9 months	[151]
mTOR/PI3K	XL765 (+TMZ + RT)	Phase I #NCT00704080	Malignant gliomas	Ongoing	
TGF- $\beta$	Antisense oligonucleotide AP-12009	Phase I/II	recurrent or refractory malignant (high-grade) glioma WHO grade III or IV	Prolonged survival compared with historical control	[119]
	Antisense oligonucleotide AP-12009	Phase IIb	Recurrent or refractory GBM or anaplastic astrocytoma	Tumor control rate superiority of lower dose AP-12009 over standard chemotherapy and	[120]

				comparable survival in GBM, with lower rate of toxicity	
Notch	gamma-secretase/Notch signaling pathway inhibitor RO4929097	Phase I #NCT01119599	Newly diagnosed malignant glioma	Ongoing	
FGF-2	Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib	Phase I			[137]
	Tipifarnib + RT	Phase I/II	27 newly diagnosed GBM	Phase II: TTP=23.1 weeks OS=80.3 weeks Phase I/II: TTP=18.1 weeks OS=60.4 weeks	[138]
Integrin $\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$	Cilengitide (+TMZ+RT)	Phase I/IIa	52 newly diagnosed GBM	Median survival 16.1 months 6-month PFS,69%	[139]
	Cilengitide (+TMZ+RT)	Phase III #NCT00689221	Newly Diagnosed Glioblastoma and Methylated Gene Promoter Status	Ongoing	
	Cilengitide (+TMZ+RT)	Phase II #NCT00813943	Newly Diagnosed Glioblastoma and Methylated Gene Promoter Status	Ongoing	
PARP	ABT-888 (+TMZ+RT)	Phase I #NCT00770471	newly diagnosed GBM	Ongoing	
	BSI-201 (+TMZ+RT)	Phase II #NCT00687765	100 newly diagnosed	Ongoing	

			GBM		
HDAC	Vorinostat (+RT+TMZ)	Phase I/II #NCT00731731	132 newly diagnosed GBM	Ongoing	

**Table 1: Clinical trial using targeting therapies directed to elements implicated in radioresistance associated with radiotherapy. TMZ = temozolomide, RT = radiotherapy, GBM = glioblastoma multiforme, PFS = Progression free survival, OS = Overall survival, TTP = Time to progression.**

### **Box1: coordination of signaling pathways**

Although many clinical trials are developed in order to block specific effectors of well defined signaling pathways such as the tyrosine receptor kinases or their ligands (Table 1), those new strategies do not much consider combinatorial and side effect of regulation as for instance blocking of mTORC1 that can be independent from the one of mTORC2 that can itself activate Akt [81]. As a consequence, inhibitions are mainly focused on a single pathway. Moreover, by consideration of intratumor and interpatient diversity, as for instance of MGMT hypermethylation (or not) that can affect responsiveness to TMZ, to define the finest link between prognosis, diagnosis and therapeutic relevance of treatments, access to biobank, epigenetic and “omic” characterizations and integration of new technologies will allow defining more efficient and more personalized medicines. So far, despite the promising preliminary clinical trial results, no treatment has demonstrated more efficacy than the conventional treatment: TMZ plus radiotherapy.

To improve these treatments, it is important to have a good knowledge of the relationship between signaling pathways in terms of negative and positive feedback. Thus, Vitucci and coworkers showed the importance of PI3K and MAPK cooperation in glioblastoma pathogenesis. Indeed, they showed that Kras activation is insufficient for invasion in the absence of *Pten* deletion, suggesting that Ras-mediated invasion requires concurrent activation of PI3K signaling. In contrast, monoallelic *Pten* deletion is sufficient to induce maximal invasion only in the presence of activated Kras. Biallelic *Pten* deletion has been found to cause maximal invasion in both the presence and the absence of activated Kras [152]. Thus, it appears possible to inhibit Kras-mediated invasion by PI3K inhibition. Nevertheless, Carracedo *et al.* showed that inhibition of mTORC1 by RAD001, a rapamycin analogue, leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in some cancers, including breast, colon and melanoma [153].

Otherwise, Santoni and coworkers pointed out the importance of the Gli proteins. Gli proteins regulate Insulin receptor substrate 1 (IRS1) protein expression, and insulin-like growth factor (IGF) induces MAPK activation and consequent RAF1, MEK and ERK phosphorylation. Gli1 inhibition reduces IGF-1 induced GSCs self-renewal, proliferation and VEGF expression. Gli proteins may not directly transactivate the VEGF gene, but may regulate its expression through the MAPK pathway via activation of the specific protein-1 (SP-1) transcription factor [20].

Finally, Paul *et al.* have shown that few interactions exist between EGFR-inducible signaling pathways and Wnt/ $\beta$ -catenin. Intratumoral administration of  $\beta$ -catenin siRNA into

subcutaneous gliomas in nude mice transcriptionally downregulates EGFR, STAT3, Akt1, Cyclin D1, MMP2 and MMP9. Reciprocally, transcriptional activity of  $\beta$ -catenin has been found to be significantly correlated to Akt1 expression in glioma cells [154].

Thus, a precise knowledge of signaling pathways and their regulation should first enable a judicious association of inhibitors to obtain a synergistic effect. Roy *et al.* showed that co-inhibition of PI3K/Akt and Erk induces the transcription factor FOXO, leading to cell cycle arrest and apoptosis. Secondly, inhibitors should be used with prudence because some inhibitors can activate another pathway (PI3K and Akt) or inhibit another signaling pathway (Gli).

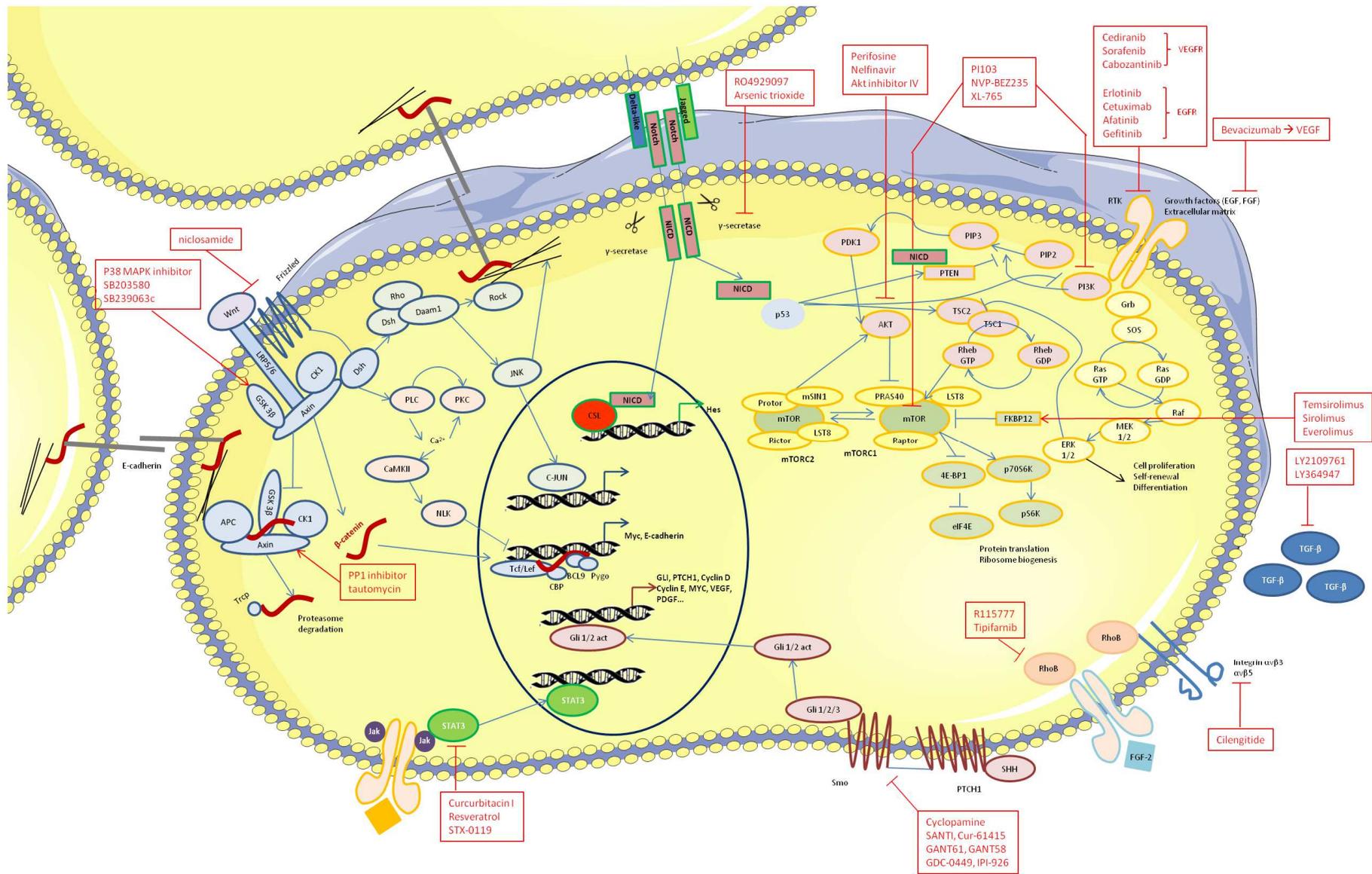


Figure 1: Signaling pathways implicated in radioresistance and corresponding inhibitors tested in association with radiotherapy. Wnt/β-catenin (Blue circle); Notch (green circle); PI3K/Akt and MAPK (Yellow circle) and SHH (red circle) are the main pathways implicated in radioresistance and are associated with STAT3, TGFβ, integrins αvβ3 and αvβ5.

## **4 The emerging role of nanomedicines in therapeutic strategies using radiosensitization**

Radiation sensitization is a process of enhancing the susceptibility of tumor tissues to injury by radiation exposure. Hence, radio-sensitizers are therapeutic or otherwise inert agents that enhance the effects of radiation therapy (Table 1 and Table 2).

GBM stem cells receive extrinsic signals from hypoxia zones, extra-cellular matrix and neighboring cells such as VEGF, TGF- $\beta$ , growth factor and cell-cell signal [124, 155-156]. These signals activate signaling pathways and radio-resistance mechanisms and give rise to GSCs selection. The targeting therapies presented in Table 1 focus on inhibition of signaling pathways implicated in radio-resistance. With nanocarriers, it is possible to explore new radiosensitizing strategies because of the possibility of loading radionuclides or radio-chemosensitizers. There are three generations of nanocarriers: (i) the first generation contains non-functionalized nanocarriers which are rapidly trapped in the reticuloendothelial system (RES) organs, (ii) the second generation are sterically stabilized PEGylated nanocarriers, which can evade the RES. The first and the second generation make passive targeting, mainly through enhanced permeability and retention (EPR) effect (Figure 2) [157-160]. However, in the case of brain tumors, the EPR effect is very unlikely to occur due to the dense matrix network impeding the diffusion, while the elevated interstitial fluid pressure reduces the convective transport [161-162]. As such, brain loco-regional delivery of drug may be of interest, thus reducing systemic toxicity while avoiding the problem of BBB crossing [163]. Finally, the third generation contains nanocarriers functionalized with specific antibodies or peptides to actively target specific tumor or tissues through molecular interaction or affinity. These nanocarriers reach their targets by active targeting (Figure 2).

With their diversity in term of structures, nanocarriers allow vectorization of beta- or alpha-emitter for vectorized radiotherapies. This results in an intense destruction of tumor cells and limited damage of the surrounding tissues [164-165]. Other radiosensitization strategies consist of using vectorized metals that enhance dose deposition, or radio-chemosensitizers that enhance DNA damage (Figure 2). These non-mutually exclusive strategies, as having been or may be combined with each other, are presented below.

## 4.1 Nanomedicines and factors influencing dose deposition

### 4.1.1 Iodine

The historical approach to improve dose in the tumor involved the use of a contrast agent, as first demonstrated by Santos Mello *et al.* [166]. These authors showed the potential of contrast agent enhanced radiotherapy, using a conventional scanner modified for this purpose. They performed preclinical studies on tumor-bearing rabbits and observed complete regression of the tumors after direct injection of contrast agent into the tumors followed by irradiation. The efficacy and safety of this approach was then demonstrated in the treatment of spontaneous brain tumors in dogs and later in a clinical trial [167-168]. Recently, Rousseau and coworkers used 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) as a radiosensitizer in a F98 glioma-bearing rat model and in association with synchrotron X-rays. Nevertheless, each treatment alone significantly increased the rat's survival in comparison with the untreated group, but the combination of treatments did not significantly improve survival compared with X-irradiation alone or chemotherapy alone [169].

Contrast agents can effectively cross the BBB and reach the tumor site, but concentrations are limited due to the side effects. Thus, other agents have been developed that improve the radiation dose.

### 4.1.2 Gold nanoparticles

Since gold has a high atomic number ( $Z=79$ ) and is very inert to tissue interactions, it is ideal for photosensitization reactions [170]. Indeed, X-ray radiations have a high probability to interact with an electron within a high-Z atom, giving several types of emission. First, the incoming radiation imparts its energy to an electron, ejecting it from its orbital and then generating a photoelectric effect. The ejected electrons are replaced by electrons from higher-energy orbits that release energy as Auger electrons or fluorescent photons (Figure 2).

Zheng and colleagues carried out a major study to test the enhanced radiosensitization effects of gold nanoparticles on DNA damage induced by high-energy electrons. The results of their study suggest that the enhanced effects are due to the production of low-energy electrons from gold particles and that these effects are directly proportional to the number of

particles in proximity of the DNA [171]. Joh et al. studied the effects of gold nanoparticles in combination with radiotherapy in glioblastoma. Their study shows that GNPs (Gold NanoParticles) can effectively radiosensitize the GBM cell line U251MG when radiated at 4Gy, leading to enhanced DNA damage and delayed tumor growth and improved mice survival in an orthotopic model. These authors also demonstrated that GNPs could be used to enhance radiation damage to tumor-associated vasculature [172] (Table 2). Separate studies by Bobyk *et al.* on rat glioma models showed a similar increase in efficacy and improved survival rate with 15-nm gold nanoparticles in combination with low-energy radiation therapy at 15Gy delivered in a single dose by synchrotron [173] (Table 2).

#### 4.1.3 Gadolinium nanoparticles

**Gadolinium** represents another new class of radiation sensitizers that are also very practical because they can also be easily viewed *in vivo* through the use of magnetic resonance imaging. Mowat *et al.* showed 5-nm gadolinium-based nanoparticles could efficiently enter the glioblastoma cell line U87MG. These particles consisted of a core of gadolinium oxide with a shell of polysiloxane, and were functionalized by diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). These formulations were found to possess efficient *in vitro* radiosensitizing properties at an energy of 660keV [174] (Table 2).

#### 4.1.4 Titanium nanotubes

**Titanium dioxide** has also been shown to be useful for killing cancer cells using photocatalytic chemistry. Since elongated organic nanoparticles internalize into cells more effectively than their spherical counterparts of similar volume, titanium dioxide nanotubes were formulated and tested for their radiosensitization [175]. It should be noted that titanate nanotubes (TiONts) contain high amounts of water, oxygen and hydroxides in their structure. Subjecting this composition to radiation may increase the production of free radicals, such as  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}^\cdot$  and  $\text{HO}_2^\cdot$ , which are well known sensitizers [176]. Mirjolet *et al.* showed that 1 $\mu\text{g/mL}$  titanium dioxide nanotubes induce radiosensitization on U87MG when irradiated with X-rays [177]. They also demonstrated that, at this concentration, ROS production is not significantly different immediately following irradiation, whether or not the cells are pre-treated with TiONts for 24h. Some studies previously highlighted that exposure to  $\text{TiO}_2$  nanoparticles

induced ROS [178-179]. However, in most of these studies, a significant induction is only observed for TiO<sub>2</sub> concentrations higher than 10µg/mL. TiONts also induce an increase in the proportion of cells in the G2/M cell cycle phase after 24h of exposure and at low concentrations and it was demonstrated that cells in the G2 phase are more sensitive to radiation [180-181]. Furthermore, TiONts combined with irradiation (at 2Gy) induce more double-strand DNA damage than irradiation alone for one hour [177] (Table 2).

#### 4.1.5 Silver nanoparticles

**Silver** nanoparticles (AgNPs) also have radiosensitizing properties, similar to those seen with gold nanoparticles. Silver nanoparticles utilize similar mechanisms of action for radiosensitization effects, in common with other high Z-number atoms. Xu and colleagues showed that both 20 and 50nm AgNPs significantly enhanced radiation sensitivity of glioblastoma cell line U251MG, with 20 nm particles performing better than 50 nm ones while the effect of 100 nm AgNPs was much weaker [182]. They hypothesized that the mechanism of radio-sensitization by AgNPs might be related to the release of Ag<sup>+</sup> cation from the silver nanostructures inside cells. The Ag<sup>+</sup> cation has the ability to capture electrons and thus functions as an oxidative agent, which could further reduce ATP content of the cell and increase production of reactive oxygen species. Indeed, treating cells of an established colony with Ag<sup>+</sup> cation led to rapid cytotoxicity and further irradiation completely killed the cells within the colony. The radiosensitization effect of AgNPs suggest that intracellular nanostructures may interact with DNA repair system, and has important implications in the design of nanotechnology-based radiosensitizers for improving the outcomes of cancer radiotherapy [182] (Table 2).

#### 4.1.6 Hafnium oxide nanocrystals

Nanoparticles have been made using rare earth metals and other high-Z elements, as in the case of hafnium oxide (HfO<sub>2</sub>).Marill *et al.* tested the effect of hafnium oxide nanocrystals on different cancer cell lines and particularly on glioblastoma cell line 42-MG-BA. They showed that using 100µM to 400µM of nanoparticles before X-ray irradiation at 2Gy enhances radiosensitivity *in vitro* [183] (Table 2).

## **4.2 Nanomedicines and synergistic effect**

The properties of nanocarriers allow the encapsulation of drugs. A nanocapsule can release its endocytosed contents into the cell [184]. Encapsulation provides physical protection from drug metabolism as well as from pharmacokinetic and pharmacodynamic modifications and changes in biodistribution of the drug. Radiation sensitizers are drugs that can enhance the effects of both single and fractionated radiation therapies. The ideal drug would have potent independent cytotoxicity, as well as the ability to sensitize radioresistant tumor cells to the lethal effects of ionizing radiation.

### **4.2.1 Delivery of alkylating agents: Platinum liposomes**

Radiosensitization studies have been performed with platinum compounds. The heavy metal compounds exert their anti-neoplastic effect by binding to DNA. Cisplatin combined with external beam radiotherapy results in only marginal benefits in the survival of GBM patients [185]. Adverse effects like renal toxicity, gastrointestinal toxicity, peripheral neuropathy, asthenia and ototoxicity hinder the use of higher doses to maximize the antineoplastic effects of cisplatin. To prevent the side effects caused by platinum compounds, a potential approach consists of incorporating the platinum agent in liposomes and combining this with radiation to obtain a synergistic effect. In Charest *et al.*'s study, an important increase in cell uptake is measured when drugs are loaded in liposomes [186]. It has been proposed that the ability of liposomes to bypass the P-glycoprotein pumps responsible for multidrug resistance can promote a higher uptake of chemotherapeutic agents in resistant cancer cells. Furthermore, among platinum compounds and their liposomal form tested in this study, carboplatin and carboplatin-loaded liposome yield the best radiosensitizing effect even at low concentrations, showing the best cellular incorporation, and has already been reported to be less neurotoxic than other platinum compounds [186].

### **4.2.2 Delivery of intercalating agent: doxorubicin liposome**

In the same way, encapsulation of doxorubicin in liposomal carriers has been shown to reduce toxicities and improve brain tumor exposure to this drug. Using a xenograft model, Chastagner and coworkers showed that non-pegylated liposomal doxorubicin is markedly

less toxic than doxorubicin and appears to act as a radiosensitizer [187]. A clinical trial performed by Beier and coworkers using pegylated liposomal doxorubicine (PEG-Dox) and prolonged TMZ in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma showed that the combination is tolerated and feasible; however, neither the addition of PEG-Dox nor the prolonged administration of TMZ leads to a meaningful improvement of the patient's outcome as compared to the previous results [188].

#### **4.2.3 Delivery of spindle poison: paclitaxel nanoparticles**

Paclitaxel (Px) is a potent chemotherapeutic agent that is also known to be a cell-cycle-specific radiosensitizer. This is because it arrests cell cycle progression at G2/M, a stage in which the cells are most susceptible to radiation induced damage. It is a poorly soluble in aqueous solution and only weakly crosses the BBB. The action of this agent is concentration and time-dependent, forming the substrate of the MDR-1 efflux pump which prevents the cytotoxicity. Thus, Vinchon-Petit and coworkers have developed lipidic nanocapsules which encapsulate paclitaxel in the lipophilic core of the LNC. They first demonstrated that LNC increases Px efficacy through improvement of its cellular bioavailability, notably ascribed to the inhibition of the multidrug resistance phenomena. They also show that Px-loaded LNC could be safely and effectively used at initial presentation in combination with external beam radiation. In their study, these authors treated animals with 0.375mg/kg of bodyweight, with animals receiving 18Gy of X-ray irradiation (XRT) in three fractions of 6Gy. Unfortunately, with this schedule, no benefit from using "radio-chemotherapy" on "radiotherapy" alone is observed in this study [189]. In another study performed on hypoxic human tumor cells, Jin *et al.* showed that encapsulation of paclitaxel and etanidazole from a degradable PLGA nanoparticles delivery system enhances radiosensitivity when cells are irradiated with gamma rays [190]. More recently, Gabikian and colleagues demonstrated the safety and efficacy of biodegradable paclitaxel microspheres. These authors showed a significant benefit from the use of combined paclitaxel and X-ray radiotherapy. Moreover, they observed a clinically and statistically significant synergistic survival benefit due to paclitaxel pretreatment before XRT in relation to the additive effect observed with the use of XRT prior to paclitaxel [191].

#### **4.2.4 Delivery of anti-metabolic agent: 5-Fluorouracil (5-FU) microspheres**

Other chemotherapeutic agents such as 5-fluorouracil have also been used as radiosensitizers. Its efficiency as a radiosensitizer has been evaluated in a clinical trial. Eight patients with newly diagnostic glioblastoma were included in the study and two increasing doses of 5-FU were investigated (70mg and 132mg). After surgical resection of the tumor, poly(D,L-lactide-co-glycolide) 5-FU-loaded microspheres with an mean diameter of 45µm were implanted in the wall of the surgical cavity. External beam radiation (59.4Gy) was initiated before the seventh postsurgical day. Menei and colleagues have shown that biodegradable microspheres are efficient systems for drug delivery into the brain; their preliminary results are encouraging because, at the time of last follow-up, the overall median survival time was 98 weeks from the time of implantation and 2 patients had achieved disease remission at 139 and 153 weeks, respectively. Nevertheless, further studies are needed to confirm the potential of 5-FU-loaded microspheres for the radiosensitization of glioblastoma [192].

#### **4.2.5 Delivery of siRNA/miRNA**

As described in the second part of this review, there are multiple biological pathways that become activated in cancer, which makes the cancer cells either inherently resistant to radiation therapy or able to acquire resistance upon exposure to radiation.

Various drugs and treatment strategies are being designed to target these specific pathways and render the cancer cells more susceptible to radiation therapy. The cancer target survivin counteracts apoptosis but also promotes cell proliferation, regulates cell division and promotes tumor cell survival following cytotoxic treatment [193]. Survivin is associated with radioresistance and has been implicated in the repair of DNA double-strand breaks. Through novel small-molecule therapies are being developed, most of the therapies currently designed for attacking survivin involve macromolecular approaches, such as the use of siRNA, which suffer from multiple drug delivery issues. To overcome these delivery issues, a human serum albumin-based nanoparticulate carrier system for plasmid-mediated miRNA has been designed and tested for their efficacy in reversing survivin-mediated radioresistance. Gaca and colleagues tested 220-nm sized nanoformulations for their effects

on inhibition of survivin expression and its overall effects on radiosensitization. The results are promising with a significant increase in radiation sensitivity on the U87MG cell line [193].

In parallel to this study, inhibition of the EGFR with nanoparticles encapsulating antisense oligonucleotides of the EGFR were shown to enhance radiosensitivity in squamous carcinoma cells [194] while the silencing of miR-21 by locked nucleic acid complexed to lipid nanocapsule were capable to sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death [195].

### **4.3 Nanomedicines combined with targeting moiety and active recognition**

The possibility to modify the surface of nanocarriers permits the improvement of pharmacokinetic parameters and bioavailability while also capable to reduce their toxicity. In addition It offers the opportunity of developing several strategies of active recognition by combining them to targeting moieties such as peptides, antibodies, affitins or well defined biological ligands. In antineoplastic strategies two main kind of target can be considered: the stromal environment among which the tumor vasculature and the cancer cell themselves that can be very heterogen. In antivascular strategies, targeting of integrins, among which  $\alpha\beta3$  expressed on endothelial cells of newly formed vessels, is of particular interest [196]. As integrins are an heterodimeric receptors with an  $\alpha$ - and a  $\beta$ -subunit notably activated by the tripeptide sequence Arg-Gly-Asp (RGD), biomimetic nanocarriers combined to such RGD sequence can be useful [197]. As such, polyethylene glycol-coated (PEGylated) RGD peptide-modified carbon nanotubes demonstrated efficient targeting of integrin positive tumor in mice and a high tumor accumulation was achieved with these nanocarriers [198]. In the same way, it was demonstrated that RGD-targeted nanoparticles can act on endothelial cells and produce anti-angiogenesis effect [199]. Alternatively, other study demonstrated the feasibility of gold nanoparticles functionalization and resulting biological impact in terms of selective recognition [200-201]. Given the possibility of doping the gold nanoparticles with radionuclides [202] or to use gold as a factors influencing dose deposition [203-204], gold nanoparticle functionalization may represent an opportune tool for GBM targeting and therapy that remains to be evaluated.

Mechanism	Molecule/Tool	Encapsulation strategies	Consequences	Association RT
Enhances dose gradient	Iodine	Iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) and 125IUdR-loaded biodegradable microspheres		Not yet studied [205]
	Gold	Gold nanoparticles	Enhanced DNA damage, delayed tumor growth and improved mice survival	[172]
	Gold	Gold nanoparticles	Improved survival rate	[173]
	Gadolinium	Gadolinium nanoparticles	Improved radiosensitization	[174]
	Titanium	Titanium dioxide nanotubes	Improved radiosensitization	[177]
	Silver	Silver nanoparticles	Improved radiosensitization	[182]
	Hafnium	Hafnium oxide nanocrystals	Improved radiosensitization	[183]
Pharmacologic synergism	Anti-EGFR	Cell encapsulation: cells transfected with viral vector coding for Lrig (pan-negative regulator of the EGFR receptor family) and encapsulated in alginate polymers to generate bioreactors.	Reduction of tumor size (40%) in orthotopic GBM xenografts	Not yet studied [206]
	Curcumin	Nanoemulsion of curcumin	Improvement of bioavailability and cytotoxicity against malignant glioma cells	Not yet studied [207]
		Dendrosomal curcumin nanoformulation	Suppression of U87MG proliferation and down-regulation of pluripotency genes via miR-145 activation	Not yet studied [208]

		Dual drug loaded magnetic nanoparticles combining TMZ and curcumin	High cytotoxic effect on T-98G	Not yet studied [209]
		Polymeric nanoparticle formulation of curcumin	Decreased growth of multiple brain tumor cell cultures through modulation of cell proliferation, survival and stem cell phenotype.	Not yet studied [210]
Pharmacologic synergism	Doxorubicin	Doxorubicin-loaded nanospheres formulated with PLGA	Increased cellular up-take of doxorubicin in A172	Not yet studied [211]
		Doxorubicin encapsulation in nanospheres	Contact between doxorubicin-bearing nanospheres and cells is required for circumvention of MDR	Not yet studied [212]
	Daunorubicin	Daunorubicin-loaded liposome	Low-level systemic exposure	Not yet studied [213]
	Endostatin	Endostatin transfected cells encapsulated in alginate	Rats receiving glioma cells and endostatin-producing capsules survive 84% longer than the controls.	Not yet studied [214]
	NFκB	PLGA microparticle delivery system for NFκB decoy oligonucleotide inhibiting NFκB translocation	Significant reduction of cell number <i>in vitro</i> (U87, A172, D37)	Not yet studied [215]
	TMZ	Binding of TMZ inside the cavity of cucurbit[7]uril nano-container	Improvement in drug activity as against primary GBM cell lines.	Not yet studied [216]
	Cisplatin	Cisplatin-loaded PBCA nanoparticles	Enhancement in mean survival time and reduced side effects.	Not yet studied [217]

		Paclitaxel-loaded PEG-PLA nanoparticles decorated with MT1-AF7p peptide	Enhancement of median survival of nude mice with intracranial C6 glioma	Not yet studied [218]
	Paclitaxel	Paclitaxel-loaded MPEG-PTMC nanoparticles	<i>In vivo</i> anti-tumor effect, with median survival time of NP/PTX-treated mice (27 days) significantly longer than for mice treated with controls	Not yet studied [219]

**Table 2 : Encapsulated drugs with radiosensitizing proprieties.**

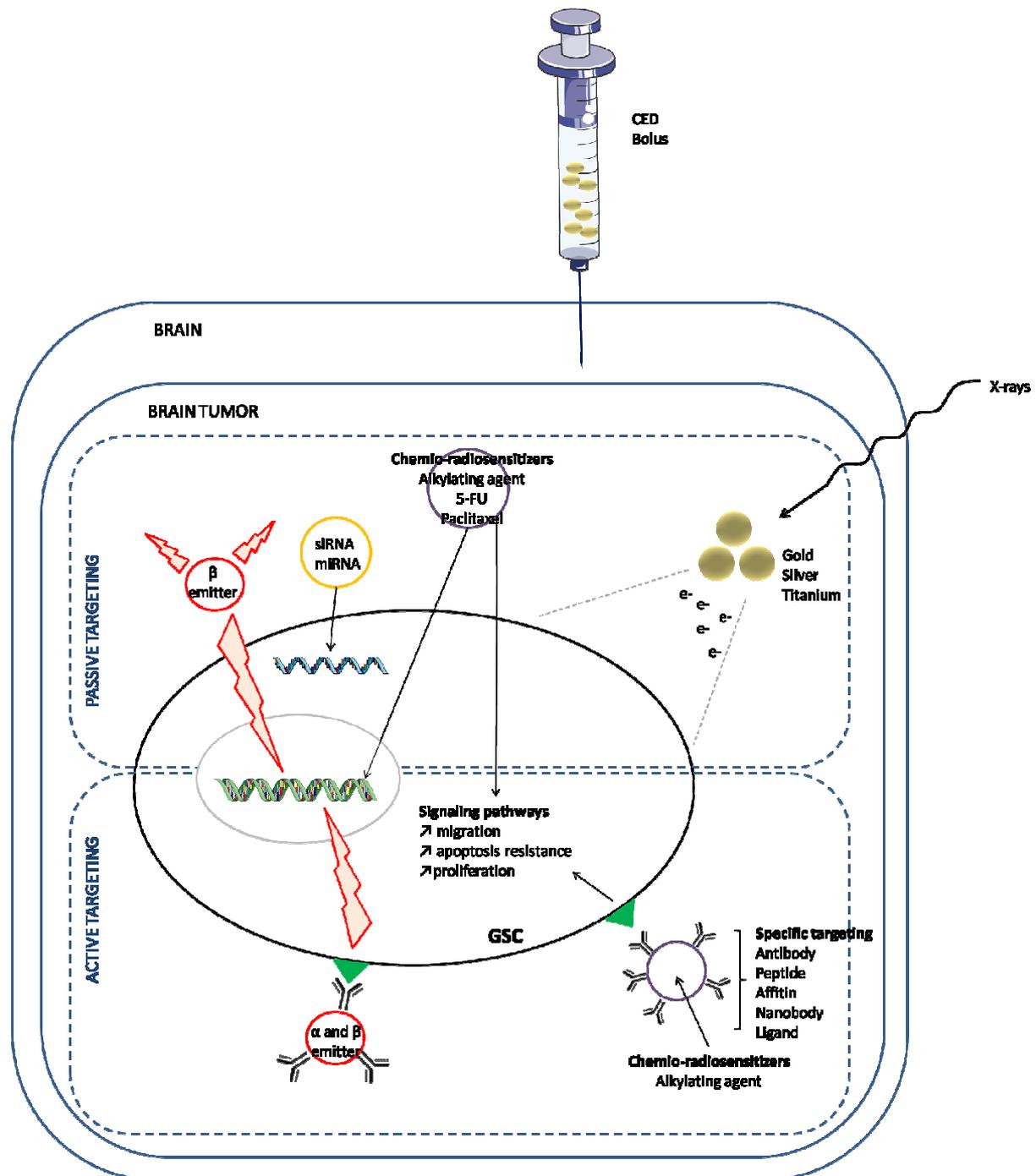


Figure 2 : Nanomedicine applications for radiosensitization. Targeting strategies could be divided in two categories: passive targeting and active targeting. Passive strategies contain non functionalized nanocarriers loaded with chemio-radiosensitizers drugs which target DNA or signaling pathways implicated in migration, apoptosis resistance and proliferation (Table 2). These strategies also include metal nanoparticles which enhance dose deposition and nanovector loaded with a beta-emitter [220-221] or siRNA/miRNA [193]. Active strategies contain nanocarriers functionalized with antibodies, peptides, affitins, nanobodies or other ligand directed to specifics markers like CXCR4 chemiokine receptor, CD133, RGD, integrin  $\alpha\beta3$ , allowing an efficient targeting. These nanocarriers can also contain chemio-radiosensitizers or  $\alpha$ - or  $\beta$ -emitters. These nano-objects are directly injected into the brain by convection-enhanced delivery (CED) in pre-clinical trials.

## 5 Concluding remarks

It is likely that a single drug will not solve the GBM by itself, in consequence of which it appears that a combinatorial, even restricted, will be a more significant solution. With the failures of molecules with high affinity and high specificity such as kinase inhibitors or antibodies, the development of innovant multi-target therapies or polytherapies, allowing to damage on several fronts radioresistant cancer cells, in parallel to the emergence of new nanomedicines is an opportunity not to be missed. The idea is that greater specificity can be achieved not by the interaction between two partners, but through a more subtle combinatorial between factors, multiple but limited in number, for which methodologies and tools can in parallel be beneficial. To counteract the development of resistant populations, it may be desirable not only to target well-defined subpopulations and pathways but also to keep a certain reduction in the specificity in order to favor a certain versatility of therapeutic products and methods applied notably in case of GBM for which the margins are very large.

The development of nanocarriers opens up many perspectives in radiosensitizing therapy. Since the vectors display a wide diversity in terms of structure, it appears possible to encapsulate all types of radio-sensitizers, whatever their physico-chemical proprieties. Thus, nanocarriers useful for imaging (diagnosis) and therapy have been developed with gadolinium nanoparticles. Radiation effects can be enhanced with chemo-radiosensitizer vectorization using a loco-regional route that prevents side effects and delays metabolism and elimination. However, the radio-sensitizing effect of an encapsulating drug must be demonstrated clinically and cannot be based on *in vitro* studies. For example, paclitaxel-loaded lipid nanocapsules (LNC) show a remarkable radiosensitizing effect *in vitro*, but which is less marked *in vivo* and totally absent in clinical trials. This is due to the LNC loading capacity, which too limited to ensure that the drug has a clinical effect. Thus, the choice of vector is important to transpose the *in vitro* effect to clinical level.

The use of radiosensitizers raises the question of the optimal protocol to be applied: should it be a single step or multistep, and how many times before radiotherapy? In lung cancer, Chen *et al.* showed that low-dose paclitaxel was sufficient for radiosensitization, and delayed radiation is better than immediate radiation after drug treatment [222]. In colon cancer cell lines, Ojima and coworkers showed that the cytotoxicity of radiation followed by 5-FU was significantly greater than for 5-FU followed by radiation [223]. Thus, the optimal clinical schedule should be defined for all radiosensitizers based on preclinical and phase-I clinical trials.

Keeping in mind that a radiosensitizer or a factor that may influence the dose deposit is no longer dependent on the intrinsic properties but those of his carrier, on the way of the

development of personalized medicine, nanomedicine appear as a considerable asset. Indeed, so far, personalized medicine mainly rely on drug targeted to overexpressed cell surface receptors. In contrast, with nanomedicines, the drug itself does not need to recognize a receptor present on the cell surface since it is the particle that will do this job until the drug does its own.

## **6 Acknowledgement**

This work was supported by “La Région Pays-de-la-Loire” throughout the *Nuclear Technology for Health project (NucSan)*, by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), by “La Ligue Nationale Contre le Cancer” throughout an “Equipe Labellisée 2012” grant and by the “Axe Vectorisation and Radiothérapies of the Cancéropôle Grand-Ouest”. Delphine Séhédic was a Ph.D. student from the *NucSan project* and received a fellowship from “La Région Pays-de-la-Loire”.

## References

1. Kleihues, P., P.C. Burger, and B.W. Scheithauer, *THE NEW WHO CLASSIFICATION OF BRAIN-TUMORS*. Brain Pathology, 1993. **3**(3): p. 255-268.
2. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(10): p. 987-996.
3. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
4. Etcheverry, A., et al., *DGKI Methylation Status Modulates the Prognostic Value of MGMT in Glioblastoma Patients Treated with Combined Radio-Chemotherapy with Temozolomide*. PLoS One, 2014. **9**(9).
5. Karayan-Tapon, L., et al., *Predictive value of MGMT in glioblastoma: A multicenter study*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(15).
6. Eoli, M., et al., *Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival*. Clinical Cancer Research, 2007. **13**(9): p. 2606-2613.
7. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
8. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
9. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
10. Adams, J.M. and A. Strasser, *Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones?* Cancer Res, 2008. **68**(11): p. 4018-21.
11. Bao, S.D., et al., *Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response*. Nature, 2006. **444**(7120): p. 756-760.
12. Wang, J., et al., *Notch promotes radioresistance of glioma stem cells*. Stem Cells, 2009. **28**(1): p. 17-28.
13. Walters, M.J., et al., *Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats*. Br J Cancer, 2014. **110**(5): p. 1179-88.
14. Wei, Y., et al., *Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. 6829-34.
15. Bourseau-Guilmain, E., et al., *The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25515.
16. Lathia, J.D., et al., *Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(5): p. 421-32.
17. Lathia, J.D., et al., *High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule a as a cancer stem cell maintenance factor*. Cell Rep, 2014. **6**(1): p. 117-29.

18. Schulte, A., et al., *A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target*. *Glia*, 2011. **59**(4): p. 590-602.
19. Morrison, R., et al., *Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis*. *J Oncol*, 2011. **2011**: p. 941876.
20. Santoni, M., et al., *Essential Role of Gli Proteins in Glioblastoma Multiforme*. *Current Protein & Peptide Science*, 2013. **14**(2): p. 133-140.
21. Duda, D.G., et al., *CXCL12 (SDF1 alpha)-CXCR4/CXCR7 Pathway Inhibition: An Emerging Sensitizer for Anticancer Therapies?* *Clinical Cancer Research*, 2011. **17**(8): p. 2074-2080.
22. Reardon, D.A., et al., *Randomized Phase II Study of Cilengitide, an Integrin-Targeting Arginine-Glycine-Aspartic Acid Peptide, in Recurrent Glioblastoma Multiforme*. *Journal of Clinical Oncology*, 2008. **26**(34): p. 5610-5617.
23. Gutin, P.H., et al., *SAFETY AND EFFICACY OF BEVACIZUMAB WITH HYPOFRACTIONATED STEREOTACTIC IRRADIATION FOR RECURRENT MALIGNANT GLIOMAS*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2009. **75**(1): p. 156-163.
24. Le Caer, S., *Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H-2 Production under Ionizing Radiation*. *Water*, 2011. **3**(1): p. 235-253.
25. Azria, D., J.-B. Dubois, and F.d.M. Montpellier-Nîmes, *Notions radiobiologiques; Principaux effets secondaires*. 2006.
26. Goodhead, D.T., *INITIAL EVENTS IN THE CELLULAR EFFECTS OF IONIZING-RADIATIONS - CLUSTERED DAMAGE IN DNA*. *International Journal of Radiation Biology*, 1994. **65**(1): p. 7-17.
27. Abraham, R.T., *Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases*. *Genes & Development*, 2001. **15**(17): p. 2177-2196.
28. Dupre, A., L. Boyer-Chatenet, and J. Gautier, *Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006. **13**(5): p. 451-457.
29. Dronkert, M.L.G., et al., *Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **20**(9): p. 3147-3156.
30. Wilson, T.E., U. Grawunder, and M.R. Lieber, *Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining*. *Nature*, 1997. **388**(6641): p. 495-498.
31. Lim, Y.C., et al., *A Role for Homologous Recombination and Abnormal Cell-Cycle Progression in Radioresistance of Glioma-Initiating Cells*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012. **11**(9): p. 1863-1872.
32. Bao, S.D., et al., *Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth*. *Cancer Research*, 2008. **68**(15): p. 6043-6048.
33. Cheng, L., et al., *L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1*. *Embo Journal*, 2011. **30**(5): p. 800-813.
34. Iliakis, G., et al., *DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(37): p. 5834-5847.
35. Roshak, A.K., et al., *The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase*. *Cellular Signalling*, 2000. **12**(6): p. 405-411.

36. Ree, A.H., et al., *Inhibitory targeting of checkpoint kinase signaling overrides radiation-induced cell cycle gene regulation: a therapeutic strategy in tumor cell radio sensitization?* Radiotherapy and Oncology, 2004. **72**(3): p. 305-310.
37. Somosy, Z., *Radiation response of cell organelles.* Micron, 2000. **31**(2): p. 165-181.
38. Somosy, Z., T. Kubasova, and G.J. Koteles, *MORPHOLOGICAL DETECTION OF SURFACE-CHARGES OF X-IRRADIATED FIBROBLASTS.* International Journal of Radiation Biology, 1986. **49**(4): p. 718-718.
39. Koteles, G.J., Z. Somosy, and T. Kubasova, *RADIATION-INDUCED CHANGES ON CELL-SURFACE CHARGES.* Radiation Physics and Chemistry, 1987. **30**(5-6): p. 389-399.
40. Somosy, Z., et al., *EFFECTS OF MODULATED MICROWAVE AND X-RAY-IRRADIATION ON THE ACTIVITY AND DISTRIBUTION OF CA2+-ATPASE IN SMALL-INTESTINE EPITHELIAL-CELLS.* Scanning Microscopy, 1994. **8**(3): p. 613-620.
41. Trosko, J.E., *Role of low-level ionizing radiation in multi-step carcinogenic process.* Health Physics, 1996. **70**(6): p. 812-822.
42. Somosy, Z., et al., *X-IRRADIATION-INDUCED DISORGANIZATION OF CYTOSKELETAL FILAMENTS AND CELL CONTACTS IN HT29 CELLS.* Scanning Microscopy, 1995. **9**(3): p. 763-772.
43. Kergonou, J.F., M. Braquet, and G. Rocquet, *INFLUENCE OF WHOLE-BODY GAMMA-IRRADIATION UPON RAT-LIVER MITOCHONDRIAL FRACTIONS.* Radiation Research, 1981. **88**(2): p. 377-384.
44. Erickson, G.A. and W.H. Koppenol, *EFFECTS OF GAMMA-IRRADIATION ON ISOLATED RAT-LIVER MITOCHONDRIA.* International Journal of Radiation Biology, 1987. **51**(1): p. 147-155.
45. Grigoryan, T., et al., *Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of alpha-catenin in mice.* Genes & Development, 2008. **22**(17): p. 2308-2341.
46. Thompson, M.C., et al., *Genornics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations.* Journal of Clinical Oncology, 2006. **24**(12): p. 1924-1931.
47. Chiba, T., et al., *Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation.* Gastroenterology, 2007. **133**(3): p. 937-950.
48. Kim, Y., et al., *Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance.* Laboratory Investigation, 2012. **92**(3): p. 466-473.
49. Ashizawa, T., et al., *Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma.* International Journal of Oncology, 2013. **43**(1): p. 219-227.
50. Thornton, T.M., et al., *Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 beta inactivation.* Science, 2008. **320**(5876): p. 667-670.
51. Strovel, E.T., D.Q. Wu, and D.J. Sussman, *Protein phosphatase 2C alpha dephosphorylates axin and activates LEF-1-dependent transcription.* Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(4): p. 2399-2403.
52. Luo, W., et al., *Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex.* Embo Journal, 2007. **26**(6): p. 1511-1521.
53. Smith, S., et al., *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres.* Science, 1998. **282**(5393): p. 1484-1487.

54. Hsiao, S.J. and S. Smith, *Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond*. *Biochimie*, 2008. **90**(1): p. 83-92.
55. Chen, B.Z., et al., *Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer*. *Nature Chemical Biology*, 2009. **5**(2): p. 100-107.
56. Waaler, J., et al., *Novel Synthetic Antagonists of Canonical Wnt Signaling Inhibit Colorectal Cancer Cell Growth*. *Cancer Research*, 2011. **71**(1): p. 197-205.
57. Waaler, J., et al., *A Novel Tankyrase Inhibitor Decreases Canonical Wnt Signaling in Colon Carcinoma Cells and Reduces Tumor Growth in Conditional APC Mutant Mice*. *Cancer Research*, 2012. **72**(11): p. 2822-2832.
58. Huang, S.M.A., et al., *Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling*. *Nature*, 2009. **461**(7264): p. 614-620.
59. Karlberg, T., et al., *Structural Basis for the Interaction between Tankyrase-2 and a Potent Wnt-Signaling Inhibitor*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010. **53**(14): p. 5352-5355.
60. Wahlberg, E., et al., *Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors*. *Nature Biotechnology*, 2012. **30**(3): p. 283-+.
61. Chen, M.Y., et al., *The Anti-Helminthic Niclosamide Inhibits Wnt/Frizzled1 Signaling*. *Biochemistry*, 2009. **48**(43): p. 10267-10274.
62. Lu, W.Y., et al., *Niclosamide Suppresses Cancer Cell Growth By Inducing Wnt Co-Receptor LRP6 Degradation and Inhibiting the Wnt/beta-Catenin Pathway*. *Plos One*, 2011. **6**(12).
63. Pan, J.X., K. Ding, and C.Y. Wang, *Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells*. *Chinese Journal of Cancer*, 2012. **31**(4): p. 178-184.
64. Osada, T., et al., *Antihelminth Compound Niclosamide Downregulates Wnt Signaling and Elicits Antitumor Responses in Tumors with Activating APC Mutations*. *Cancer Research*, 2011. **71**(12): p. 4172-4182.
65. Li, Y.H., et al., *Dkk1 Stabilizes Wnt Co-Receptor LRP6: Implication for Wnt Ligand-Induced LRP6 Down-Regulation*. *Plos One*, 2010. **5**(6).
66. Zhou, L., et al., *Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity*. *Cancer Letters*, 2003. **193**(2): p. 161-170.
67. Heimberger, A.B., et al., *Mechanisms of action of rapamycin in gliomas*. *Neuro-Oncology*, 2005. **7**(1): p. 1-11.
68. Castellino, R.C. and D.L. Durden, *Mechanisms of Disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node - an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors*. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2007. **3**(12): p. 682-693.
69. Jiang, B.H. and L.Z. Liu, *PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis*, in *Advances in Cancer Research, Vol 102*, G.F.V. Woude and G. Klein, Editors. 2009. p. 19-65.
70. Knobbe, C.B., A. Trampe-Kieslich, and G. Reifenberger, *Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas*. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2005. **31**(5): p. 486-490.
71. Sonoda, Y., et al., *Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma*. *Cancer Research*, 2001. **61**(18): p. 6674-6678.

72. Chautard, E., et al., *Role of Akt in human malignant glioma: from oncogenesis to tumor aggressiveness*. Journal of Neuro-Oncology, 2014. **117**(2): p. 205-215.
73. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. Molecular Cell, 2006. **22**(2): p. 159-168.
74. Nguyen, M., et al., *Rapamycin-regulated control of antiangiogenic tumor therapy following rAAV-mediated gene transfer*. Molecular Therapy, 2007. **15**(5): p. 912-920.
75. Anandharaj, A., S. Cinghu, and W.Y. Park, *Rapamycin-mediated mTOR inhibition attenuates survivin and sensitizes glioblastoma cells to radiation therapy*. Acta Biochimica Et Biophysica Sinica, 2011. **43**(4): p. 292-300.
76. Shinohara, E.T., et al., *Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors*. Oncogene, 2005. **24**(35): p. 5414-5422.
77. Eshleman, J.S., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 Xenografts to fractionated radiation therapy*. Cancer Research, 2002. **62**(24): p. 7291-7297.
78. Hardwick, J.S., et al., *Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(26): p. 14866-14870.
79. Guba, M., et al., *Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor*. Nature Medicine, 2002. **8**(2): p. 128-135.
80. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. Cancer Research, 2006. **66**(3): p. 1500-1508.
81. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
82. Tremblay, F., et al., *Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(35): p. 14056-14061.
83. Osuka, S., et al., *IGF1 Receptor Signaling Regulates Adaptive Radioprotection in Glioma Stem Cells*. Stem Cells, 2013. **31**(4): p. 627-640.
84. Reardon, D.A., et al., *Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma*. Journal of Neuro-Oncology, 2010. **96**(2): p. 219-230.
85. Kreisl, T.N., et al., *A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM)*. Journal of Neuro-Oncology, 2009. **92**(1): p. 99-105.
86. Hayakawa, M., et al., *Synthesis and biological evaluation of pyrido 3',2': 4,5 furo 3,2-d pyrimidine derivatives as novel PI3 kinase p110 alpha inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(9): p. 2438-2442.
87. Maira, S.-M., et al., *Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity*. Molecular Cancer Therapeutics, 2008. **7**(7): p. 1851-1863.
88. Fan, Q.W., et al., *Akt and Autophagy Cooperate to Promote Survival of Drug-Resistant Glioma*. Science Signaling, 2010. **3**(147).
89. Mukherjee, B., et al., *The Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Is a Potent Inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-Mediated DNA Damage Responses*. Neoplasia, 2012. **14**(1): p. 34-U53.

90. Cerniglia, G.J., et al., *Inhibition of Autophagy as a Strategy to Augment Radiosensitization by the Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BEZ235*. *Molecular Pharmacology*, 2012. **82**(6): p. 1230-1240.
91. Becher, O.J., et al., *Preclinical Evaluation of Radiation and Perifosine in a Genetically and Histologically Accurate Model of Brainstem Glioma*. *Cancer Research*, 2010. **70**(6): p. 2548-2557.
92. Chautard, E., et al., *Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma*. *Neuro-Oncology*, 2010. **12**(5): p. 434-443.
93. Purow, B.W., et al., *Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation*. *Cancer Research*, 2005. **65**(6): p. 2353-2363.
94. Lathia, J.D., M.P. Mattson, and A. Cheng, *Notch: from neural development to neurological disorders*. *Journal of Neurochemistry*, 2008. **107**(6): p. 1471-1481.
95. Fan, X., et al., *Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors*. *Cancer Research*, 2006. **66**(15): p. 7445-7452.
96. Wang, J.L., et al., *Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells*. *Stem Cells*, 2010. **28**(1): p. 17-28.
97. Wang, R., et al., *Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium*. *Nature*, 2010. **468**(7325): p. 829-U128.
98. Lin, J., et al., *gamma-Secretase Inhibitor-I Enhances Radiosensitivity of Glioblastoma Cell Lines by Depleting CD133(+) Tumor Cells*. *Archives of Medical Research*, 2010. **41**(7): p. 519-529.
99. Perumalsamy, L.R., et al., *A hierarchical cascade activated by non-canonical Notch signaling and the mTOR-Rictor complex regulates neglect-induced death in mammalian cells*. *Cell Death and Differentiation*, 2009. **16**(6): p. 879-889.
100. Hambardzumyan, D., et al., *PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo*. *Genes & Development*, 2008. **22**(4): p. 436-448.
101. Wu, J., et al., *Arsenic trioxide depletes cancer stem-like cells and inhibits repopulation of neurosphere derived from glioblastoma by downregulation of Notch pathway*. *Toxicology Letters*, 2013. **220**(1): p. 61-69.
102. Janikova, M. and J. Skarda, *Differentiation pathways in carcinogenesis and in chemo- and radioresistance*. *Neoplasma*, 2012. **59**(1): p. 6-17.
103. Clement, V., et al., *HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity*. *Current Biology*, 2007. **17**(2): p. 165-172.
104. Takezaki, T., et al., *Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells*. *Cancer Science*, 2011. **102**(7): p. 1306-1312.
105. Bar, E.E., et al., *Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma*. *Stem Cells*, 2007. **25**(10): p. 2524-2533.
106. Chen, J.K., et al., *Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed*. *Genes & Development*, 2002. **16**(21): p. 2743-2748.
107. Williams, J.A., et al., *Identification of a small molecule inhibitor of the hedgehog signaling pathway: Effects on basal cell carcinoma-like lesions*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003. **100**(8): p. 4616-4621.

108. Wang, B.L., J.F. Fallon, and P.A. Beachy, *Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb*. Cell, 2000. **100**(4): p. 423-434.
109. Epstein, E.H., *Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog*. Nature Reviews Cancer, 2008. **8**(10): p. 743-754.
110. Barcellos-Hoff, M.H., et al., *Therapeutic Targets in Malignant Glioblastoma Microenvironment*. Seminars in Radiation Oncology, 2009. **19**(3): p. 163-170.
111. Hau, P., et al., *TGF-beta 2 Signaling in High-Grade Gliomas*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2011. **12**(12): p. 2150-2157.
112. Satoh, E., et al., *Effect of irradiation on transforming growth factor-beta secretion by malignant glioma cells*. Journal of Neuro-Oncology, 1997. **33**(3): p. 195-200.
113. Wang, J.R., et al., *Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy*. American Journal of Pathology, 1998. **153**(5): p. 1531-1540.
114. Jobling, M.E., et al., *Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species*. Radiation Research, 2006. **166**(6): p. 839-848.
115. Shao, C., M. Folkard, and K.M. Prise, *Role of TGF-beta 1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells*. Oncogene, 2008. **27**(4): p. 434-440.
116. Zhang, M., et al., *Blockade of TGF-beta Signaling by the TGF beta R-I Kinase Inhibitor LY2109761 Enhances Radiation Response and Prolongs Survival in Glioblastoma*. Cancer Research, 2011. **71**(23): p. 7155-7167.
117. Zhang, M.X., et al., *Trimodal Glioblastoma Treatment Consisting of Concurrent Radiotherapy, Temozolomide, and the Novel TGF-beta Receptor I Kinase Inhibitor LY2109761*. Neoplasia, 2011. **13**(6): p. 537-U61.
118. Hardee, M.E., et al., *Resistance of Glioblastoma-Initiating Cells to Radiation Mediated by the Tumor Microenvironment Can Be Abolished by Inhibiting Transforming Growth Factor-beta*. Cancer Research, 2012. **72**(16): p. 4119-4129.
119. Hau, P., et al., *Inhibition of TGF-beta 2 with AP 12009 in recurrent malignant gliomas: From preclinical to phase I/II studies*. Oligonucleotides, 2007. **17**(2): p. 201-212.
120. Bogdahn, U., et al., *Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study*. Neuro-Oncology, 2011. **13**(1): p. 132-142.
121. de la Iglesia, N., S.V. Puram, and A. Bonni, *STAT3 Regulation of Glioblastoma Pathogenesis*. Current Molecular Medicine, 2009. **9**(5): p. 580-590.
122. Chang, C.J., et al., *Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells*. Childs Nervous System, 2012. **28**(3): p. 363-373.
123. Yang, Y.P., et al., *Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis*. Journal of Cellular Physiology, 2012. **227**(3): p. 976-993.
124. Moyal, E.C.J., *From bench to bedside: Experience of the glioblastoma model for the optimization of radiosensitization*. Cancer Radiotherapie, 2012. **16**(1): p. 25-28.
125. Cohen-Jonathan, E., et al., *Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and a hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa cells*. Cancer Research, 1997. **57**(7): p. 1364-70.

126. Ader, I., et al., *The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit.* *Oncogene*, 2002. **21**(42): p. 6471-6479.
127. Ader, I., et al., *RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death.* *Oncogene*, 2002. **21**(39): p. 5998-6006.
128. Dittmann, K., et al., *Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase.* *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(35): p. 31182-31189.
129. Skuli, N., et al., *Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1 alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells.* *Cancer Research*, 2006. **66**(1): p. 482-489.
130. Milia, J., et al., *Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication.* *Cell Death and Differentiation*, 2005. **12**(5): p. 492-501.
131. Delmas, C., et al., *Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation.* *International Journal of Cancer*, 2002. **100**(1): p. 43-48.
132. Delmas, C., et al., *The farnesyltransferase inhibitor R115777 reduces hypoxia and matrix metalloproteinase 2 expression in human glioma xenograft.* *Clinical Cancer Research*, 2003. **9**(16): p. 6062-6068.
133. Ader, I., et al., *Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts.* *Oncogene*, 2003. **22**(55): p. 8861-8869.
134. Haimovitzfriedman, A., et al., *PROTEIN-KINASE-C MEDIATES BASIC FIBROBLAST GROWTH-FACTOR PROTECTION OF ENDOTHELIAL-CELLS AGAINST RADIATION-INDUCED APOPTOSIS.* *Cancer Research*, 1994. **54**(10): p. 2591-2597.
135. Wild-Bode, C., et al., *Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: Implications for radiotherapy of human glioblastoma.* *Cancer Research*, 2001. **61**(6): p. 2744-2750.
136. Monferran, S., et al., *alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB.* *International Journal of Cancer*, 2008. **123**(2): p. 357-364.
137. Moyal, E.C.J., et al., *Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme.* *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2007. **68**(5): p. 1396-1401.
138. Ducassou, A., et al., *alpha v beta 3 Integrin and Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): Prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of Tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma.* *European Journal of Cancer*, 2013. **49**(9): p. 2161-2169.
139. Stupp, R., et al., *Phase I/IIa Study of Cilengitide and Temozolomide With Concomitant Radiotherapy Followed by Cilengitide and Temozolomide Maintenance Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma.* *Journal of Clinical Oncology*, 2010. **28**(16): p. 2712-2718.
140. Ader, I., et al., *Preclinical evidence that SSR128129E-A novel small-molecule multi-fibroblast growth factor receptor blocker - Radiosensitises human glioblastoma.* *European Journal of Cancer*, 2014. **50**(13): p. 2351-2359.

141. Harris, A.L., *Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(1): p. 38-47.
142. Keith, B. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer*. Cell, 2007. **129**(3): p. 465-472.
143. Li, Z., et al., *Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells*. Cancer Cell, 2009. **15**(6): p. 501-13.
144. Williams, K.J., et al., *Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1*. Radiotherapy and Oncology, 2005. **75**(1): p. 89-98.
145. Bernardi, R., et al., *PML inhibits HIF-1 alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 779-785.
146. Brown, P.D., et al., *Phase I/II Trial of Erlotinib and Temozolomide With Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177*. Journal of Clinical Oncology, 2008. **26**(34): p. 5603-5609.
147. Prados, M.D., et al., *Phase II Study of Erlotinib Plus Temozolomide During and After Radiation Therapy in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme or Gliosarcoma*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(4): p. 579-584.
148. Peereboom, D.M., et al., *Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme*. Journal of Neuro-Oncology, 2010. **98**(1): p. 93-99.
149. Combs, S.E., et al., *Influence of expression of EGFR and PTEN on outcome in patients with primary glioblastoma treated with standard radiochemotherapy and cetuximab: Interim analysis from the GERT-Protocol*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(15).
150. Chinot, O.L., et al., *Bevacizumab plus Radiotherapy-Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2014. **370**(8): p. 709-722.
151. Hainsworth, J., et al., *Phase II study of concurrent radiation therapy, temozolomide, and bevacizumab followed by bevacizumab/everolimus as first-line treatment for patients with glioblastoma*. Clin Adv Hematol Oncol., 2012 Apr. **10**(4): p. 240-6.
152. Vitucci, M., et al., *Cooperativity between MAPK and PI3K signaling activation is required for glioblastoma pathogenesis*. Neuro-Oncology, 2013. **15**(10): p. 1317-1329.
153. Carracedo, A., et al., *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer*. Journal of Clinical Investigation, 2008. **118**(9): p. 3065-3074.
154. Paul, I., et al., *Current Understanding on EGFR and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk*. Genes Cancer, 2013. **4**(11-12): p. 427-46.
155. Cheng, L., S.D. Bao, and J.N. Rich, *Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma*. Biochemical Pharmacology, 2010. **80**(5): p. 654-665.
156. Lee, J., et al., *Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines*. Cancer Cell, 2006. **9**(5): p. 391-403.
157. Papahadjopoulos, D., et al., *STERICALLY STABILIZED LIPOSOMES - IMPROVEMENTS IN PHARMACOKINETICS AND ANTITUMOR THERAPEUTIC EFFICACY*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(24): p. 11460-11464.
158. Lasic, D.D., *Doxorubicin in sterically stabilized liposomes (vol 380, pg 562, 1996)*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 630-630.

159. Peer, D., et al., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. Nature Nanotechnology, 2007. **2**(12): p. 751-760.
160. Bertrand, N., et al., *Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology*. Adv Drug Deliv Rev, 2014. **66**: p. 2-25.
161. Jain, R.K. and T. Stylianopoulos, *Delivering nanomedicine to solid tumors*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(11): p. 653-64.
162. Chang, J., et al., *Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells*. Pharm Res, 2011. **29**(6): p. 1495-505.
163. Vanpouille-Box, C., et al., *Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules*. Biomaterials, 2011. **32**(28): p. 6781-90.
164. Vanpouille-Box, C., et al., *Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with Re-188-lipid nanocapsules*. Biomaterials, 2011. **32**(28): p. 6781-6790.
165. Zalutsky, M.R., et al., *Clinical experience with alpha-particle-emitting At-211: Treatment of recurrent brain tumor patients with At-211-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6*. Journal of Nuclear Medicine, 2008. **49**(1): p. 30-38.
166. Mello, R.S., et al., *RADIATION-DOSE ENHANCEMENT IN TUMORS WITH IODINE*. Medical Physics, 1983. **10**(1): p. 75-78.
167. Norman, A., et al., *X-ray phototherapy for canine brain masses*. Radiat Oncol Investig, 1997. **5**(1): p. 8-14.
168. Rose, J.H., et al., *First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx)*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 1999. **45**(5): p. 1127-1132.
169. Rousseau, J., et al., *Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma*. Journal of Synchrotron Radiation, 2009. **16**: p. 573-581.
170. Kwatra, *Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer*. Translational Cancer Research, 2013. **2**(4): p. 330-342.
171. Zheng, Y., et al., *Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons*. Radiation Research, 2008. **169**(1): p. 19-27.
172. Joh, D.Y., et al., *Selective Targeting of Brain Tumors with Gold Nanoparticle-Induced Radiosensitization*. Plos One, 2013. **8**(4).
173. Bobyk, L., et al., *Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment*. Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine, 2013. **9**(7): p. 1089-1097.
174. Mowat, P., et al., *In Vitro Radiosensitizing Effects of Ultrasmall Gadolinium Based Particles on Tumour Cells*. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2011. **11**(9): p. 7833-7839.
175. Gratton, S.E.A., et al., *The effect of particle design on cellular internalization pathways*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(33): p. 11613-11618.
176. Papa, A.L., et al., *Effect of Reaction Parameters on Composition and Morphology of Titanate Nanomaterials*. Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(29): p. 12682-12689.

177. Mirjolet, C., et al., *The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept*. *Radiotherapy and Oncology*, 2013. **108**(1): p. 136-142.
178. Park, E.J., et al., *Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells*. *Toxicology Letters*, 2008. **180**(3): p. 222-229.
179. Saquib, Q., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells*. *Toxicology in Vitro*, 2012. **26**(2): p. 351-361.
180. Ramkumar, K.M., et al., *Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO<sub>2</sub> nanofibers in HeLa cells*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012. **81**(2): p. 324-333.
181. Krueger, S.A., et al., *THE EFFECTS OF G2-PHASE ENRICHMENT AND CHECKPOINT ABROGATION ON LOW-DOSE HYPER-RADIOSENSITIVITY*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2010. **77**(5): p. 1509-1517.
182. Xu, R., et al., *Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells*. *Cell Research*, 2009. **19**(8): p. 1031-1034.
183. Marill, J., et al., *Hafnium oxide nanoparticles: toward an in vitro predictive biological effect?* *Radiat Oncol Investig*, 2014. **9**(1): p. 150.
184. Paillard, A., et al., *The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability*. *Biomaterials*, 2010. **31**(29): p. 7542-54.
185. Glass, J., et al., *Fractionated stereotactic radiotherapy with cis-platinum radiosensitization in the treatment of recurrent, progressive, or persistent malignant astrocytoma*. *American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials*, 1997. **20**(3): p. 226-229.
186. Charest, G., et al., *Concomitant treatment of F98 glioma cells with new liposomal platinum compounds and ionizing radiation*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2010. **97**(2): p. 187-193.
187. Chastagner, P.B., et al., *Comparison of doxorubicin and its non-pegylated liposomal form as radiosensitizer in high grade glioma xenografts*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(16): p. 124S-124S.
188. Beier, C.P., et al., *RNOP-09: Pegylated liposomal doxorubicine and prolonged temozolomide in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma - a phase II study*. *Bmc Cancer*, 2009. **9**.
189. Vinchon-Petit, S., et al., *In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy*. *Journal of Neuro-Oncology*, 2010. **97**(2): p. 195-205.
190. Jin, C., et al., *Radiosensitization of paclitaxel, etanidazole and paclitaxel plus etanidazole nanoparticles on hypoxic human tumor cells in vitro*. *Biomaterials*, 2007. **28**(25): p. 3724-3730.
191. Gabikian, P., et al., *Radiosensitization of malignant gliomas following intracranial delivery of paclitaxel biodegradable polymer microspheres Laboratory investigation*. *Journal of Neurosurgery*, 2014. **120**(5): p. 1078-1085.
192. Menei, P., et al., *Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma - A pilot study*. *Cancer*, 1999. **86**(2): p. 325-330.

193. Gaca, S., et al., *Targeting by cmHsp70.1-antibody coated and survivin miRNA plasmid loaded nanoparticles to radiosensitize glioblastoma cells*. Journal of Controlled Release, 2013. **172**(1): p. 201-206.
194. Ping, Y., et al., *Inhibition of the EGFR with nanoparticles encapsulating antisense oligonucleotides of the EGFR enhances radiosensitivity in SCCVII cells*. Medical Oncology, 2010. **27**(3): p. 715-721.
195. Griveau, A., et al., *Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death*. Int J Pharm, 2013. **454**(2): p. 765-74.
196. Ruoslahti, E., *Specialization of tumour vasculature*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(2): p. 83-90.
197. Ruoslahti, E. and M.D. Pierschbacher, *ARG-GLY-ASP - A VERSATILE CELL RECOGNITION SIGNAL*. Cell, 1986. **44**(4): p. 517-518.
198. Liu, Z., et al., *In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice*. Nature Nanotechnology, 2007. **2**(1): p. 47-52.
199. Zhang, C.F., et al., *Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner*. Cancer Research, 2007. **67**(4): p. 1555-1562.
200. Qian, X.M., et al., *In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags*. Nature Biotechnology, 2008. **26**(1): p. 83-90.
201. Yang, S., et al., *Biomimetic, synthetic HDL nanostructures for lymphoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(7): p. 2511-6.
202. Marega, R., et al., *Antibody-functionalized polymer-coated gold nanoparticles targeting cancer cells: an in vitro and in vivo study*. Journal of Materials Chemistry, 2012. **22**(39): p. 21305-21312.
203. Karmani, L., et al., *Zr-89-labeled anti-endoglin antibody-targeted gold nanoparticles for imaging cancer: implications for future cancer therapy*. Nanomedicine, 2014. **9**(13): p. 1923-1937.
204. Karmani, L., et al., *Antibody-functionalized nanoparticles for imaging cancer: influence of conjugation to gold nanoparticles on the biodistribution of 89Zr-labeled cetuximab in mice*. Contrast Media & Molecular Imaging, 2013. **8**(5): p. 402-408.
205. Reza, M.S. and T.L. Whateley, *Iodo-2 '-deoxyuridine (IUdR) and (125)IUdR loaded biodegradable microspheres for controlled delivery to the brain*. Journal of Microencapsulation, 1998. **15**(6): p. 789-801.
206. Johansson, M., et al., *The soluble form of the tumor suppressor Lrig1 potently inhibits in vivo glioma growth irrespective of EGF receptor status*. Neuro-Oncology, 2013. **15**(9): p. 1200-1211.
207. Kumar, A., et al., *Curcumin-loaded lipid nanocarrier for improving bioavailability, stability and cytotoxicity against malignant glioma cells*. Drug Delivery, 2014: p. 1-16.
208. Mirgani, M.T., et al., *Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells*. International Journal of Nanomedicine, 2014. **9**: p. 403-417.

209. Dilnawaz, F. and S.K. Sahoo, *Enhanced accumulation of curcumin and temozolomide loaded magnetic nanoparticles executes profound cytotoxic effect in glioblastoma spheroid model*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2013. **85**(3): p. 452-462.
210. Lim, K.J., et al., *A polymeric nanoparticle formulation of curcumin inhibits growth, clonogenicity and stem-like fraction in malignant brain tumors*. Cancer Biology & Therapy, 2011. **11**(5): p. 464-473.
211. Tahara, K., et al., *Intracellular drug delivery using polysorbate 80-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres to glioblastoma cells*. Journal of Microencapsulation, 2011. **28**(1): p. 29-36.
212. Hu, Y.P., et al., *On the mechanism of action of doxorubicin encapsulation in nanospheres for the reversal of multidrug resistance*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1996. **37**(6): p. 556-560.
213. Zucchetti, M., et al., *Distribution of daunorubicin and daunorubicinol in human glioma tumors after administration of liposomal daunorubicin*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1999. **44**(2): p. 173-176.
214. Read, T.A., et al., *Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells*. Nature Biotechnology, 2001. **19**(1): p. 29-34.
215. Gill, J.S., et al., *Effects of NF kappa B decoy oligonucleotides released from biodegradable polymer microparticles on a glioblastoma cell line*. Biomaterials, 2002. **23**(13): p. 2773-2781.
216. Appel, E.A., et al., *Enhanced stability and activity of temozolomide in primary glioblastoma multiforme cells with cucurbit n uril*. Chemical Communications, 2012. **48**(79): p. 9843-9845.
217. Shahmabadi, H.E., et al., *Efficacy of Cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma*. Tumor Biology, 2014. **35**(5): p. 4799-4806.
218. Gu, G.Z., et al., *The influence of the penetrating peptide iRGD on the effect of paclitaxel-loaded MT1-AF7p-conjugated nanoparticles on glioma cells*. Biomaterials, 2013. **34**(21): p. 5138-5148.
219. Jiang, X.Y., et al., *PEGylated poly(trimethylene carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel for the treatment of advanced glioma: In vitro and in vivo evaluation*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. **420**(2): p. 385-394.
220. Sofou, S., *Radionuclide carriers for targeting of cancer*. International Journal of Nanomedicine, 2008. **3**(2): p. 181-199.
221. Vanpouille-Box, C., et al., *Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with 188Re-lipid nanocapsules*. Biomaterials, 2011. **32**(28): p. 6781-6790.
222. Chen, Y., et al., *Schedule-dependent pulsed paclitaxel radiosensitization for thoracic malignancy*. American Journal of Clinical Oncology-Cancer Clinical Trials, 2001. **24**(5): p. 432-437.
223. Ojima, E., et al., *The optimal schedule for 5-fluorouracil radiosensitization in colon cancer cell lines*. Oncology Reports, 2006. **16**(5): p. 1085-1091.

---

## Publication n°3

**Safe delivery of rapamycin to glioblastoma cells through lipid nanocapsules resulted in selective inhibition of the mTORC1 signaling pathway.**

---

## **Safe delivery of rapamycin to glioblastoma cells through lipid nanocapsules resulted in selective inhibition of the mTORC1 signaling pathway.**

Delphine Séhédic<sup>1</sup>, Nada Matougui<sup>1</sup>, Sylvie Avril<sup>1</sup>, Jean-Pierre Benoît<sup>1,2</sup>, François Davodeau<sup>3</sup>, Emmanuel Garcion<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PRES LUNAM Université, Université d'Angers, INSERM U1066 MINT, Angers, France

<sup>2</sup> Pharmacy Department, Angers University Hospital, Angers, France.

<sup>3</sup> PRES LUNAM Université, Université de Nantes, INSERM U892 CRCNA, Nantes, France

### **Abstract**

Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway represented a potential issue for treating cancer among which glioblastoma. As such, rapamycin that inhibits mTOR the downstream effector of this signaling pathway is of great interest. However, clinical development of rapamycin floundered due to the lack of a suitable formulation. The present study investigated the opportunity of developing a safe rapamycin delivery system that preclude the use of organic solvent necessary to solubilize this lipophilic molecule. Hence, a phase inversion process to formulate lipid nanocapsules (LNC) was here adapted to load them with the lipophilic and temperature sensitive rapamycin. Rapamycin-loaded LNCs (LNC-rapa) have a size of about 110 nm, a zeta-potential of about -5 mV and a low polydispersity index (< 0,05). Encapsulation efficiency determined by spectrophotometry conjugated with filtration/exclusion was found to be about 69 % thus represent a loading capacity of LNC of about 54 % in w/w. Although the present work emphasized that LNC-rapa do not act synergistically with X-ray beam radiation in U87MG glioblastoma model *in vitro*, based on western blot analysis, it demonstrated the selective inhibition of the phosphorylation of mTOR at Ser2448 by LNC-rapa at the concentration of 1 $\mu$ M rapamycin in serum deprived medium. Interestingly, cells cultivated in normoxia seem to be more sensitive to mTOR inhibition by rapamycin than those cultivated in hypoxia in view of MTS assay (IC<sub>50</sub> 0,93  $\mu$ M at 21% pO<sub>2</sub> versus 7,97 $\mu$ M at 0,4% pO<sub>2</sub>). Finally, we also established that mTOR phosphorylation inhibition by LNC-rapa, while distinguishing the mTORC1 from the mTORC2 signal, also resulted in a negative feedback through the activation Akt phosphorylation. This phenomenon was more noticeable after stabilization of HIF-1 $\alpha$  in hypoxia. In conclusion, a safe nanocarrier of rapamycin, which acts selectively on the mTORC1-signaling pathway, was here developed. Therapeutic potentialities must continue to be investigated notably by considering parallel inhibition of the mTORC2 pathway and *in vivo* evaluation in well-defined pathological contexts.

**Key words:** Rapamycin, lipid nanoparticles, radiosensitization, glioblastoma, mTORC1, mTORC2, Akt

## 1 Introduction

Glioblastoma multiform is the most common and deadly primary brain tumor in adult. Despite remarkable advances in surgical techniques and treatment options including chemotherapy and radiotherapy, the prognosis of this disease remains very poor with a median survival under 15 months [1]. To ultimately allow the emergence of more effective therapeutic strategies for patients, it is, therefore, essential to readdress the question of the choice of the biological targets communally with the tools designed to reach them.

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) intracellular signaling pathway plays a central role in the regulation of cell proliferation, growth, differentiation and survival [2-6]. Stimulation of this pathway results in the activation of a receptor tyrosin kinase (RTK) by a cytokine or a growth factor, which drive a sequential phosphorylation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K), Akt and mammalian target of rapamycin (mTOR). The complex mTORC1 (composed with mTOR, RAPTOR and PRAS40) activates eIF4E-binding protein, releasing the transcription factor eIF4 and the kinase S6K1 (or p70S6K) implicated in translation [7]. This pathway can be activated through a numbers of mechanisms, including growth factors, overexpression or amplification of Akt family members, inactivation of the inhibitory effects of PTEN (phosphatase and tensin homolog) tumor suppressor or by non-canonical Wnt pathway. Furthermore, radiation activates mTOR signaling in vascular endothelium and in glioblastoma cell lines [8-10]. As a results, mutations in the PI3K or AKT genes, loss of phosphatase and tensin homolog (PTEN), epigenetic modifications or constitutive activation of upstream tyrosine kinase receptors, will lead to dysregulation of this pathway in a variety of tumors, including malignant glioma [11-14]. As such, there are marked association between alterations in the PI3K/AKT/mTOR pathway and a poor clinical survival [14]. Therefore, inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway has been widely investigated as a potential therapy for cancer. Interestingly, tumor cells in which the PI3K/Akt/mTOR pathway is dysregulated are more susceptible than normal cells to the inhibition of mTOR, the downstream effector of this signaling pathway [15]. Hence, from translational research to clinical applications, mTOR inhibitors among which rapamycin and its derivatives were and still are a matter of concern.

Rapamycin is a macrolide antibiotic, which binds to FK506 binding protein 12 (FKBP12). The rapamycin-FKBP12 complex inhibits mTOR and prevents further phosphorylation of protein involved in the transcription, translation and cell cycle control [7]. Anandharaj *et al.* have developed studies on three PTEN-null GBM cell lines and showed that, combined with radiotherapy, rapamycin inhibited the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family protein surviving through repression of phospho-Akt. Thus, targeting Akt through mTOR with rapamycin increased the radiation sensitivity [8]. Preclinical trials found that PTEN deficient tumors and those dependent on PI3K overexpression were most sensitive to rapamycin [6]. These finding provide a strong basis for investigating mTOR inhibitors as potential tumor-selective therapeutic agents. Rapamycin and its derivatives, CCI-779 and RAD001, specifically inhibit the function of mTOR by blocking the phosphorylation of downstream molecules, such as p70S6 kinase (p70S6K) and eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1), leading to G1-phase cell cycle arrest. Accumulating evidence from preclinical and early clinical studies suggests that these mTOR inhibitors would be effective as growth inhibitors against a broad range of tumors.

Despite the potency of rapamycin in preclinical studies, clinical development of rapamycin floundered due to the lack of a suitable formulation. The low oral bioavailability (<15%) [16] precluded tablet formulation except for low dosage treatments such as immunosuppression. Rapamycin's poor solubility in water, ca. 2.6 µg/mL, and common excipients made intravenous (i.v.) formulation difficult [17]. In addition, pharmacokinetic studies found that rapamycin strongly partitions into the erythrocytes ( $K_d$  ca. 20) where it may not readily access solid tumors [16]. This led to the development of ester derivatives, e.g. CCI-779, which were more easily formulated. Despite the promise of CCI-779 as a clinically feasible mTOR inhibitor, intravenous formulations required ethanol [18] due to the limited solubility of CCI-779, ca. 120 µg/mL, which may cause hemolysis. Furthermore, phase I trials found that the CCI-779 prodrug was rapidly hydrolyzed in the plasma back into rapamycin. Once CCI-779 hydrolyzed into rapamycin, the potential exists for it to partition into erythrocytes [16, 18], which is unlikely to favor tumor accumulation.

In order to improve rapamycin biodistribution, nanovectorization strategies were developed. They provide a physical protection and allow freedom from solubility problems. In this work, a new system of rapamycin loaded in lipid nanoparticles (LNC-rapa) was developed. We demonstrated that encapsulated rapamycin keeps its biological effect and efficiently inhibits mTOR phosphorylation. LNC-rapa were more cytotoxic than rapamycin alone but, in association with 8Gy radiation, no synergistic effect was observed. This result could be explained by the complexity of the PI3k/Akt/mTOR in GBM as demonstrated by activation of phosphorylated Akt with mTOR inhibition.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Materials

Lipoid® S75-3 (soybean lecithin at 69% of phosphatidylcholine) and Solutol® HS15 (a mixture of polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate) were kindly provided by LipoidGmbH (Ludwigshafen, Germany) and BASH (Ludwigshafen, Germany), respectively. NaCl was provided by Sigma (St-Quentin, Fallavier, France). Deionized water was obtained from a Milli-Q plus system (Millipore, Paris, France). Lipophilic Labrafac® CC (caprylic-capric acid triglycerides) was provided by Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France). Rapamycin was purchased from Interchim (Montluçon, France).

For solubility assays, we use different oils: Captex® 8000 (Triglyceride of caprylic acid), Transcutol® HP (Diethylene glycol monoethyl ether) and Miglyol® 812 (caprylic/capric triglyceride) were purchased from Abitec (Janesville, WI, USA), Gattefosse S.A. (Saint-Priest, France) and Sasol Germany GmbH (Marl, Germany) respectively.

### 2.2 Reagents and antibodies

Rapamycin was purchased from Interchim (Montluçon, France) and dissolved in DMSO. The final concentrations of DMSO in the culture medium did not exceed 0.2%. Anti-phospho-mTOR (ab109268, diluted 1:2000) and anti-HIF-1 $\alpha$  (ab5160, diluted 1:2000) were from Abcam (Cambridge, UK). Anti-phospho-Akt (#4058, diluted 1:1000) was from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) and anti-HSC70 (sc7298, diluted 1:10000) was from Santa Cruz biotechnology (Dallas, TX, USA). Peroxidase-conjugated anti-mouse (#32430, diluted 1:2000) and anti-rabbit (#32460, diluted 1:2000) secondary antibodies were from ThermoScientific, (Waltham, MA, USA).

### 2.3 Cell culture

Human malignant glioma cell lines U87MG were purchased from American Tissue Culture Collection (Rockville, MD). Tumor cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium 4.5 g/L glucose and L-glutamine (DMEM, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Lonza) and 1% antibiotics suspension (10 units/mL of penicillin, 10 mg/mL streptomycin and 25  $\mu$ g/mL amphotericin B, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Tumor cells were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and 21% or 0.4% oxygenation. Hypoxia conditions (0.4% oxygenation) were obtained in an InVivoO<sub>2</sub> 400 hypoxia workstation (Ruskin Technology, Ltd., Leeds, UK).

## 2.4 Solubility assays

Rapamycin solubility assays were performed in different oils: Captex® 8000, Labrafac® CC and Miglyol® 812. 5mg rapamycine were dissolved in 250 mg oil and kept in magnetic stirring during 3 hours at room temperature (RT) or at 90°C. Rapamycin concentration was determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) after 24 hours settling at +4°C, using  $\mu$ Bondapak C18 column (Waters corporation, Milford, MA) with an ultraviolet detector at 278 nm. The mixture of 90% acetonitrile and 10% water (v/v) was used as a mobile phase, and delivered at a flow rate of 2.0mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 10 $\mu$ L and the retention time was about 2.3 min.

## 2.5 Preparation of empty and rapamycin-loaded lipid nanocapsules (rapa-LNC) and their characterization

Studies were performed on 100 nm diameter LNCs, which were prepared according to a phase-inversion process described by Heurtault *et al.* [19] that follows the formation of an oil/water microemulsion containing an oily/fatty phase (triglycerides: Labrafac® WL 1349), a non ionic hydrophilic surfactant (polyethylene glycol hydroxystearate: Solutol®HS15), and a lipophilic surfactant (lecithins: Lipoïd® S75-3). Briefly, 21 mg Lipoïd® S75-3, 138 mg Solutol® HS15, 345 mg Labrafac®, 104 mg NaCl and 898 mg deionized water were mixed by magnetic stirring. 5 mg Rapamycin was added to other reagents for a final concentration of 1 mg/mL. Three cycles of progressive heating and cooling between 30°C and 70°C were then carried out and followed by an irreversible shock, induced by addition of 3.6 mL of 0°C deionized water. Afterwards, slow magnetic stirring was applied to the suspension for 5 min. LNCs were filtered on a 0.22  $\mu$ m filter and keep at 4°C. The mean diameter and polydispersity index were then determined using Malvern Zetasizer® Nano Serie DTS 1060 (Malvern instruments S.A., Worcestershire, UK).

Free rapamycin was removed by 0.22  $\mu$ m filtration and concentration was measured by spectrophotometry at 289 nm. The loading capacity (LC) was calculated using the following formula:

$$\text{Drug content } \left( \% \frac{w}{w} \right) = \frac{\text{mass of encapsulated drug}}{\text{mass of encapsulated drug} + \text{mass of LNC excipients}} \times 100\%$$

The encapsulation efficiency (EE) of rapa-LNC was calculated using the following formula:

$$\text{Encapsulation efficiency } \left( \% \frac{w}{w} \right) = \frac{\text{mass of encapsulated drug}}{\text{mass of initial drug}} \times 100\%$$

## 2.6 Electrical conductivity measurements

A conductimeter (Cond 330i/SET, WTW, Germany) was used in nonlinear temperature compensation mode, according to EN 27888. It allowed determining the location of the emulsion inversion zone following the conductivity variations according to the temperature. In fact, a conductivity value lower than  $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  and essentially zero on the illustrated scales, means that the continuous phase is oil, whereas high steady state reached reflects that a water continuous phase is established.

## 2.7 Cytotoxicity evaluation

Two assays were performed to determine the cytotoxicity effect of LNC-rapa on the glioblastoma cell line U87MG: the MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Promega, Charbonnières, France) cell survival assay and clonogenic assay by cristal violet coloration (Sigma-Aldrich).

For MTS assay, the U87MG cells ( $5 \times 10^4$  cells/mL) harvested in the exponential growth phase were seeded on 24-well plate in DMEM medium with 10% FBS, in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After the cells had been incubated in the exponential growth phase, serum-contained medium was removed and replaced by serum-deprived DMEM supplemented with 1% N1 supplement (Sigma-Aldrich). Different treatments at different concentrations (0.04; 0.2; 1; 5; 10; 20; 100; 200  $\mu\text{M}$ ) were added, rapamycin alone dissolved in DMSO, LNC-rapa and empty LNC, for 4h. 8Gy radiation was performed 6h after treatment by Faxitron CP-160 (Faxitron X-rays, Lincolnshire, UK). Medium was changed every day. 48h after treatment, MTS reagent was diluted (1:5) in U87MG cell medium and incubated for 2h at 37°C. The absorbance was measured at 492 nm using Multiskan® microplate spectrophotometer (Thermo Scientific).

For clonogenic assay, the U87MG cells ( $10^3$  cells/mL) harvested in the exponential growth phase were seeded on 6-well plate in DMEM medium with 10% FBS, in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After the cells had been incubated in the exponential growth phase, serum-contained medium was removed and replaced by serum-deprived DMEM supplemented with 1% N1 supplement. Cells were treated with rapamycin, LNC-rapa at 1  $\mu\text{M}$  and with LNC at the same dilution than LNC-rapa. 8 Gy radiation was performed 6h after treatment by Faxitron CP-160. 10 days after treatment, colonies were colored by cristal violet and number was evaluated with ImageJ Software version 1.43.

## 2.8 Western blotting

The U87MG cells ( $2.4 \times 10^5$  cells/mL) harvested in the exponential growth phase were seeded on dishes in DMEM medium with 10% FBS, in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and 21% or 0.4% oxygenation. After the cells had been incubated in the exponential growth phase, serum-contained medium was removed and replaced by serum-deprived DMEM supplemented with 1% N1

supplement. Cells were treated with rapamycin, LNC-rapa at 1 $\mu$ M and with LNC at the same dilution than LNC-rapa. 8Gy radiation was performed 6h after treatment by Faxitron CP-160.

Soluble proteins for immunoblotting was harvested from tumor cells lysed in 300 $\mu$ L lysis buffer [50 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA (pH8), 2.5 mM EGTA (pH 7.4), 0.1% Tween 20, 10% glycerol, 0.1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride and 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate] plus Protease inhibitor cocktail (# 539134 Calbiochem, Darmstadt, Germany), PMSF and Phosphatase inhibitor Cocktail Set II (#524636 Calbiochem) on ice. Cells were scrapped and lysed by sonication 10 seconds.

Equal amounts of protein from each sample estimated by the Bio-Rad (Richmond, CA) Protein Assay were separated by electrophoresis through a 4-20% SDS-polyacrylamide gel (Mini-protean<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Ge, BioRad), transferred to polyvinylidene Fluoride (PVDF) membranes (AmershamHybond, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and blocked with 4% nonfat dry milk in 1X TBS plus 0.1% Tween 20 at room temperature for one hour. The membranes were washed and incubated with a primary antibody diluted in 2% BSA in 1X TBS plus 0.1% Tween 20 overnight at 4°C. The membranes were washed and incubated again for one hour at room temperature with peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibody. The bound antibody was detected using the enhanced chemiluminescence reagent kit SuperSignal West Femto (ThermoScientific, Waltham, MA, USA) and read with a bioluminescence detector Image Quant Las 4000 (GE Healthcare, USA).

### 3 Results

#### 3.1 Rapamycin encapsulation in LNC, manufacturing process and characteristics

Rapamycin is a lipophilic molecule ( $\log P = 4,3$ ) and is preferentially encapsulated in the lipophilic core of the LNC. To determine the best encapsulation conditions, solubility assay was performed in different oil: 5mg rapamycin was mixed in 250mg of different oil: Captex<sup>®</sup> 8000, Miglyol<sup>®</sup> 812 and Labrafac<sup>®</sup> at room temperature (RT) or at 90°C. 24h after settling, rapamycin concentration in supernatant was determined by HPLC (Table 1).

At 90°C, rapamycin is completely degraded whatever the oil used and at room temperature, rapamycin has comparable solubility in Captex<sup>®</sup>, Miglyol<sup>®</sup> 812 and Labrafac<sup>®</sup>. Labrafac<sup>®</sup> was selected for rapamycin encapsulation.

The LNC manufacturing process as described by Heurtault *et al.* recommend three cycles of heating/cooling between 60°C and 90°C [19]. As presented in solubility assays, rapamycin is degraded at 90°C and underwent autoxidation when is kept in amorphous form at 30°C during 46h [20]. So, a fast encapsulation process at soft temperature must be developed. As described previously [19], LNCs were synthesized by using an inversion phase process. The drug was mixed with LNC excipients: NaCl, the oil phase Labrafac<sup>®</sup>, the non-ionic surfactant Solutol<sup>®</sup> and a lipophilic surfactant Lipoid<sup>®</sup> and heated between 60°C and 90°C. Then, the micro-emulsion oil/water was fixed by addition of water at 0°C at the beginning of the inversion phase.

To decrease the inversion phase temperature occurrence, a concentration of 2M of NaCl was used. Conductivity was measured for the "classical formulation" (0.5M) and for the formulation with 2M NaCl. A steady state at a high conductivity value indicates that the water is the continuous phase, whereas conductivity close to zero value means that the continuous phase is oil. Through the phase inversion region, the conductivity gradually changes, linking the two macro-emulsion phase. Figure 1 shows that inversion phase occur at smaller temperature when LNC were formulated with 2M NaCl than with 0.5M NaCl. Thus, this NaCl concentration is appropriate to perform rapamycin encapsulation in non degrading temperature between 30°C and 70°C.

Rapamycin-loaded LNCs (LNC-rapa) characteristics was measured and summarized in (Table 2). They have a size of  $112.6 \pm 8.4$  nm, a polydispersity index (PDI) of  $0.044 \pm 0.011$  and a zeta-potential of  $-5.47 \pm 0.44$  mV. Rapamycin is a lipophilic molecule that allow separation of free rapamycin and LNC-rapa on 0.22 $\mu$ m filtration. This drug is loaded in lipid nanocapsule with an encapsulation efficiency of  $68.85 \pm 7.1\%$  and a loading capacity of  $53.51 \pm 3.6\%$ . This encapsulation efficiency rate was considered in the calculation of rapamycin concentration in biological assays.

### 3.2 Rapamycin is efficiently encapsulated in LNC and keeps its biological effect on mTOR phosphorylation

Rapamycin binds FKBP12 and the complex FKBP12/rapamycin inhibits mTOR phosphorylation that leads to 4EBP1 dephosphorylation and inhibition of translation. To control if rapamycin-loaded LNC keeps this biological properties, U87MG cell line was treated with LNC-rapa, rapamycin alone dissolved in DMSO and LNC alone at the concentration of 1 $\mu$ M in serum deprived medium. Results presented on Figure 2 show that LNC encapsulated-rapamycin efficiently inhibits mTOR phosphorylation (Ser2448) but this inhibition is not improved by 8Gy radiation. Nevertheless, this inhibition is higher in hypoxia than in normoxia. This result is consistent with literature data. Brugarolas and coworkers have notably showed that hypoxia induced mTOR inhibition through TSC1/TSC2 tumor suppressor complex and the hypoxia-inducible gene REDD1/RTP801. Indeed, they showed that, in contrast to energy depletion, mTOR inhibition by hypoxia does not require AMPK or LKB1 but depend on increased expression of the hypoxia inducible *REDD1* gene. They also showed that down-regulation of S6K, an mTOR target, phosphorylation by Redd1 requires Tsc2 and Redd1 probably acts up-stream of the Tsc1/Tsc2 complex to down-regulate mTOR function in response to hypoxia [21]. Thus, at 0.4% oxygenation, mTOR is inhibited by rapamycin and hypoxia.

### 3.3 LNC-rapa do not act synergistically with X-ray radiation in U87MG model.

Cytotoxicity assay by MTS was performed to assess the early impact of rapamycin-loaded LNC on cell survival. Cells were treated with LNC, rapamycin alone and LNC-rapa at different concentrations: 0,04  $\mu$ M to 200  $\mu$ M. Survival curves presented in Figure 3A and 3B and the corresponding half inhibitory concentrations reported in Figure 3C showed that at 21% and 0.4% oxygenation, rapamycin is less toxic than LNC-rapa and LNC alone (IC50 of 20.54  $\mu$ M at 21% pO<sub>2</sub> and 34.65  $\mu$ M at 0.4% pO<sub>2</sub> for rapamycin versus 0.618  $\mu$ M and 0.93  $\mu$ M at 21% pO<sub>2</sub> and 7.053  $\mu$ M and 7.972  $\mu$ M at 0.4% pO<sub>2</sub> for LNC and LNC-rapa respectively). Furthermore, IC50 obtained for all treatments are inferior at 21% than at 0.4% that means that cells are more sensitive to treatments in normoxia than in hypoxia.

Nevertheless, LNC have a high cytotoxicity effect in this *in vitro* assay, similar to the one of LNC-rapa that does not allow demonstrating rapa-LNC superiority related to LNC with MTS assay.

To determine if rapamycin and especially rapamycin-loaded LNC can influence cell proliferation following irradiation, a clonogenic assay was performed. Pre-treatment with LNC, rapamycin or LNC-rapa at 1  $\mu$ M was realized 6 hours before 8 Gy radiation in two oxygenation conditions. Cells were maintained in culture during 10 days and colored by crystal violet. At 0.4% pO<sub>2</sub> the effect of LNC-rapa is weak but real. Without radiation, the highest effect was obtained with this treatment and proliferation inhibition increase between LNC, rapamycin and LNC-rapa. At 21% pO<sub>2</sub>, without radiation, relative cell proliferation is relatively the same for all treatments. Unfortunately, with 8 Gy,

the effect on cell proliferation is the same whatever the treatment. Thus, LNC-rapa seem to have an effect on cell proliferation at 0.4% pO<sub>2</sub> but no synergistic effect could be highlight when following with radiation.

### 3.4 Cytotoxic effect of LNC-rapa and activation of negative feedback

In order to investigate why only a moderated cytotoxic effect was obtained with LNC-rapa, protein expression of HIF-1 $\alpha$  and phosphorylated-Akt (Ser473) (Akt-p) were evaluated. Western Blot presented in Figure 5A and 5C show that HIF-1 $\alpha$  protein expression is reduced when cells were treated with rapamycin and LNC-rapa at 21% and 0.4% pO<sub>2</sub>. Inversely, these treatments enhance Akt-p protein level whatever the oxygen condition and in a higher extend at 0.4%. At 8Gy, similar results were obtained concerning HIF but, unlike without radiation, Akt-p protein expression is reduced related to HSC70 but it is increased by rapamycin and LNC-rapa (Figure 5B et 5D).

To explain this result, Hudson *et al.* reported that rapamycin inhibits both stabilization of HIF-1 $\alpha$  and the transcriptional activity of HIF-1 in hypoxic cancer cells and mTOR dependent signals stimulate HIF-1 $\alpha$  accumulation and HIF-1 mediated transcription in cells exposed to hypoxia or hypoxia-mimetic agent [22]. Rapamycin-sensitive functions of mTOR are not essential for the accumulation of HIF-1 $\alpha$  but are needed for maximal expression of this protein, as well as for optimal HIF-1-dependent gene expression under hypoxic conditions. The notion that mTOR is a nutrient sensor may be particularly relevant to HIF-1 function, since decrease oxygen tensions are almost inevitable accompanied by limited supplies of glucose and amino-acids in mammalian tissues [23]. *In vivo*, rapamycin enhance thrombosis and also an increase in the hypoxic zone [24]. Hypoxia causes activation of the TSC1/2 complex, which functions to inhibit mTOR. This can occur both via induction of the HIF-dependent gene REDD1, and/or through activation of AMPK [21, 25]. Rapamycin may be less effective in hypoxic regions of tumors since mTOR may already be at least partially inactivated by TSC. Thus the amount of hypoxia present at the start of treatment may play a part in determining sensitivity to rapamycin *in vivo* [24].

The higher Akt phosphorylation at 0.4% could also explain that cells are less sensitive to rapamycin than at 21%. Indeed, U87MG cell line is PTEN *null* that drives to a constitutive activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway and could explains its radioresistance. Thus, mTOR inhibition could restore radiosensitivity but our results show that maximal cytotoxic effect was observed with 8 Gy radiation and rapamycin or LNC-rapa were not sufficient to improve the cytotoxicity at the concentration of 1  $\mu$ M. To well understand this phenomenon, it is important to remind that mTOR exist in two complexes: mTORC1 and mTORC2. mTORC1 contains the mTOR, Raptor, mLST8/G $\beta$ L, and PRAS40 proteins and controls cell size and protein translation via two major substrates, p70S6K and 4E-BP1. Activated S6 kinase causes feedback inhibition of insulin-like growth factor 1 (IGF-1)/insulin signaling by phosphorylating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and causing its degradation [26]. mTORC2 has been shown to phosphorylate Akt. Phosphorylation of Akt at the serine 473 site by mTORC2 enhances the catalytic activity of Akt already phosphorylated on threonine 308 [27]. Rapamycin binds to FKBP-12 and this complex then binds to and causes the allosteric inhibition of mTORC1. Rapamycin effectively blocks S6K phosphorylation and also induces Akt S473 phosphorylation and Akt activity [28]. Physiologic activation of PI3k/Akt signaling is regulated by mTOR-dependent feed-

back inhibition of IRS expression and, consequently, IGF-1 receptor (IGF-1R)/insulin receptor signaling [26]. Rapamycin relieves this feedback and induces Akt S473 phosphorylation in an mTORC2-dependent manner, leading to Akt activation, which may attenuate its therapeutic effects [28]. Furthermore, mTOR inhibitory drug rapamycin up-regulates IRS-1 protein levels and induces Akt phosphorylation that increase IGF—IR/IRS-1/PI3K signaling to Akt [28]

## 4 Discussion - Conclusion

This work shows that rapamycin encapsulated in lipid nanocapsules allows keeping its activity while efficiently keeping its capability to specifically inhibit mTOR phosphorylation (Figure 2). These observations also established that the mechanism of action of rapamycin is different at 0.4% and 21% oxygenation (Figure 3 and Figure 4). Hence, cells cultivated in normoxia seem to be more sensitive to mTOR inhibition by rapamycin than those cultivated in hypoxia in view of MTS assay: IC<sub>50</sub> is 0.93  $\mu$ M at 21% pO<sub>2</sub> versus 7.97  $\mu$ M at 0.4% pO<sub>2</sub> when treated with LNC-rapa (Figure 3C). Indeed, protein expression analysis show that, if mTOR phosphorylation inhibition is higher at 0.4 % pO<sub>2</sub>, the up-stream effector of PI3k/Akt/mTOR pathway, Akt phosphorylation is higher too (Figure 5). Furthermore, rapamycin and LNC-rapa inhibited HIF-1 $\alpha$  expression at 21% pO<sub>2</sub> and in a lesser extent at 0.4 % pO<sub>2</sub>. This difference is due to HIF-1 $\alpha$  stabilization under hypoxia.

In response of this problem, Rodrik-Outmezguine *et al.* have used a selective ATP-competitive mTOR kinase inhibitor AZD8055. This drug inhibits 4E-BP1 phosphorylation more effectively than does rapamycin. It also inhibits mTORC2 and Akt S473 phosphorylation, which leads to Akt T308 dephosphorylation and suppression of Akt activity and downstream signaling. Unfortunately, even though mTORC2 inhibition is potent and persistent, inhibition of Akt T308 and of Akt substrate phosphorylation is only transient. Authors demonstrated that this reinduction results from hyperactivation of PI3K. In cell in which mTOR kinase inhibitors relieve feedback inhibition of receptor tyrosine kinase, leading to activation of PI3K, the result is a new steady state in which mTORC1 is potently inhibited and Akt is phosphorylated on T308 but not on the S473. This Akt species is activated and able to phosphorylate key substrates in the cell. This induction of PI3K activation is likely to depend on which receptor tyrosine kinases are activated and whether their ligands are present [29]. Another tested mTORC1/mTORC2 inhibitor is AZD2014. Kahn and coworkers showed, in *in vitro* assays, that addition of this drug to culture media 1h before irradiation enhanced the radiosensitivity of CD133+ and CD15+ glioblastoma stem-like cells [30]. The combination of AZD2014 and radiation delivered to mice bearing GSC-initiated orthotopic xenografts significantly prolonged survival of these animals as compared with individual treatments [30].

In parallel, dual PI3K/mTOR inhibitors were developed, notably, the NVP-BEZ235. It demonstrated suppression of mTORC1 (S6K1, S6K and 4EBP1) and mTORC2 (AKT) downstream components resulting in cell cycle arrest and induced autophagy [31]. NVP-BEZ235 showed inhibited *in vivo* glioma proliferation and improved anti-tumor effects compared to rapamycin analogs. Mukherjee *et al.* showed that NVP-BEZ235 can inhibit DNA repair proteins ATM and DNA-PKC in GBM that lead to a radiosensitizing effect. Nevertheless, because of the induction of autophagy that seems to be cytoprotective [31], combination therapies with NVP-BEZ235 have been explored. One strategy utilized NVP-BEZ235 with autophagy inhibitor chloroquine to show a synergistic effect in *in vivo* tumor apoptosis [32].

Nevertheless, those results were obtained *in vitro* and could be different *in vivo*. Indeed, some groups report that rapamycin sensitizes U87MG xenografts to fractionated radiation therapy. Eshleman and coworkers showed that there are no radiosensitizing effects of rapamycin on U87MG

in the radiation clonogenic survival assays too but a great effect in the U87 xenograft and spheroids models [10]. They proposed that other factors could also be important for the sensitizing effect of rapamycin. For example, rapamycin induces significant changes in glucose and nitrogen metabolism, and the starvation-like metabolic state induced by rapamycin potentially could decrease oxygen consumption in solid tumors and improve overall tumor oxygenation [33]. Any decrease in the proportion of radioresistant hypoxic cells should significantly increase the efficacy of radiation. The authors also suggest that rapamycin can inhibit host-dependent processes that contribute to the profound sensitizing effect of rapamycin in xenograft model. Furthermore, this drug is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation *in vitro*, and systemic administration of rapamycin can inhibit angiogenesis. It reduces VEGF production by tumor cells and the inhibition of VEGF-induced proliferation in endothelial cells [34].

In the same way, Wepler *et al.* investigated the combination of rapamycin with short course of fractionated radiotherapy so as to minimize the anti-proliferative effect of rapamycin and thus evaluate its potential to contribute to the direct cytotoxic effect of radiation. They find that rapamycin does not significantly improve radiation response but increase variability in tumor response to radiotherapy, with several individual tumors showing large increases in growth delay. Thus, they underlined the importance to determine the biological factors that mediate this differential response in order to potentially identify patients that may benefit from combination treatment [24].

In the present study, we develop a lipid nanocapsule (LNC) capable to efficiently loading rapamycin with encapsulation efficiency next to 70%. The manufacturing process was made between 30°C and 70°C that protect rapamycin from thermal degradation. Rapamycin-loaded LNCs keep its biological proprieties with an effective inhibition of mTOR phosphorylation. Nevertheless, as presenting by the MTS assay, rapa-LNCs cytotoxicity is similar to LNC cytotoxicity. This problem could be due to the limiting loading capacity of 100nm LNC. Other assay has been drive by our group with 100 nm and 50 nm diameter LNC to have a finale concentration of 2  $\mu$ M of rapa-LNC. Unfortunately, encapsulation efficiently (EE) was only 50% in 100 nm LNC. Thus, enhance initial rapamycin concentration does not allow enhance drug loading. In 50 nm, EE was better and next to 80% but this LNC are more cytotoxic *in vitro* (data not shown). Rapamycin cytotoxicity effect could be highlight using another vector, less cytotoxic. Forrest and coworkers have developed poly(ethylene glycol)-b-poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PEG-PCL) micelles loading with rapamycin and showed that this drug was efficiently loaded in PEG-PCL at 7% to 10% weight and superior to 1mg/mL [35]. Other group demonstrated that rapamycin encapsulation in poly(ethylene glycol)-Block-poly(2-methyl-2-benzoxycarbonyl-propylene carbonate) (PEG-b-PBC) micelles reduced its toxicity [36]. Shi *et al.* have developed elastin-based protein polymer nanoparticles loaded with rapamycin and decorated with its ligand FKBP. They demonstrated that this object slowed drug release compared to non-decorated nanoparticles, decrease gross toxicity and enhance the anti-cancer activity on human breast cancer mice model [37]. Finally, Tyler and coworkers incorporated rapamycin into biodegradable caprolactone-glycolide (35:65) polymer beads. *In vitro*, rapamycin was cytotoxic to 9L cells (rat glioma cells), causing growth inhibition at a concentration of 0.01  $\mu$ g/mL. No *in vivo* toxicity was observed at 0.3%, 3% and 30% loading doses and implanted intracranially. Animals treated with the highest dose of rapamycin beads (30%) consistently demonstrated significantly longer survival duration than the control and

placebo groups. They also showed that radiation therapy in addition to the simultaneous treatment with 30% rapamycin beads led to significantly longer survival duration than either therapy alone [38].

To conclude, we showed that activating negative feedback following mTOR phosphorylation inhibition is a serious brake on rapamycin cytotoxicity. The first solution could be consist on changing rapamycin for dual PI3K/mTOR inhibitors like the NVP-BE235 which has demonstrated effectiveness *in vivo* [31] or mTORC1/mTORC2 inhibitor is AZD2014 which radiosensitize glioma [30]. Nevertheless, rapamycin radiosensitizer effect have been proved *in vivo* or using fractionated radiation protocol [10] that let thinking that LNC-rapa could be effectiveness in an animal model with an adapted radiation protocol. Finally, Wepler *et al.* underline the importance of a biological screening of patient to select the most responsive.

## 5 Acknowledgement

This work was supported by “La Région Pays-de-la-Loire” throughout the *Nuclear Technology for Health project (NucSan)*, by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), by “La Ligue Nationale Contre le Cancer” throughout an “Equipe Labellisée 2012” grant and by the “Axe Vectorisation and Radiothérapies of the Cancéropôle Grand-Ouest”. Delphine Séhédic was a Ph.D. student from the *NucSan project* and received a fellowship from “La Région Pays-de-la-Loire”.

Oil	Solubility condition	Initial rapamycin, mg/mL	Rapamycin solubilized, mg/mL	Percentage solubilization
Captex® 8000	RT	19	1,83	9,6
	90°C	16,83	none	-
Miglyol® 812	RT	19,2	1,37	7,3
	90°C	17,12	none	-
Labrafac®	RT	24	1,45	6,04
	90°C	21,07	none	-

Table 1 :Rapamycin solubility in different oil at RT and 90°C. 5mg of rapamycin was dissolved in 250mg of each oil. Dissolved rapamycin concentration was measured by HPLC.

	Size (nm)	Pdl	Zeta-potential (mV)	Encapsulation efficiency (% w/w)	Loading capacity (% w/w)
LNC	112,6 ± 8,4	0,044 ± 0,011	-5,47 ± 0,44	68,85 ± 7,1	53,51 ± 3,6

Table 2 : Rapa-LNC size, Pdl, zeta-potential, encapsulation efficiency (EE) and loading capacity (LC).

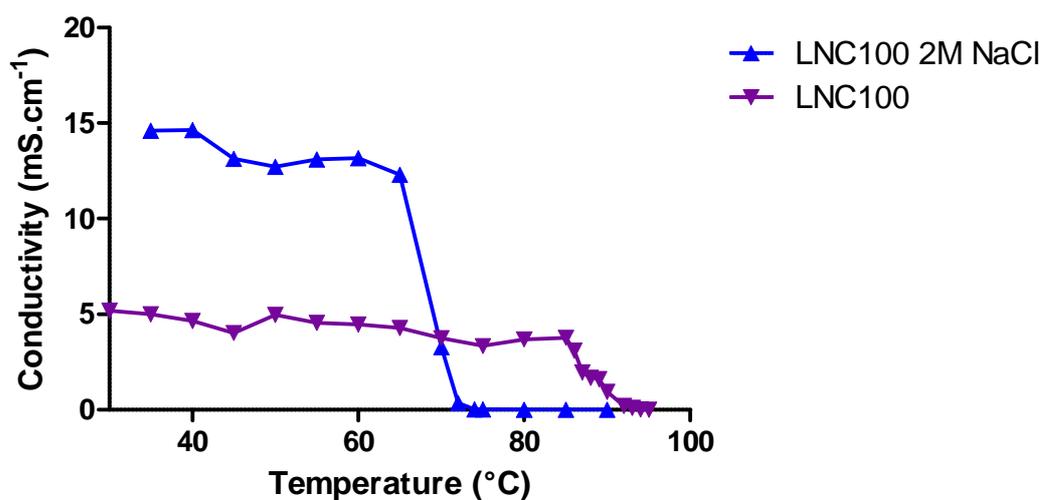


Figure 1 :Microemulsion conductivity during cycles of heating/cooling for LNC formulations with 2M NaCl and 0,5M NaCl.

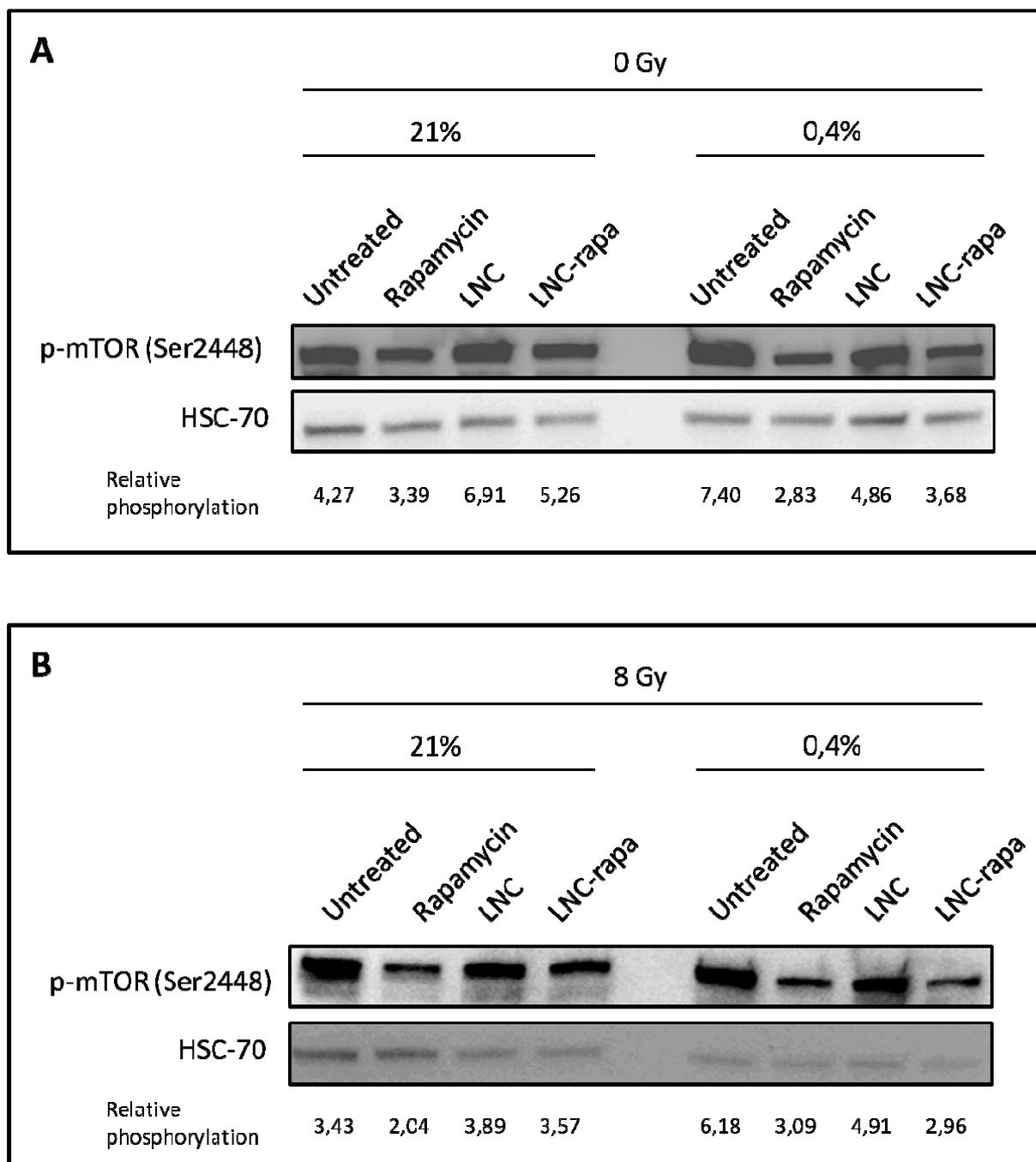


Figure 2 : Western Blot analysis. A, B: U87MG cells were treated with rapamycin alone, LNC alone or rapamycin-loaded LNC (LNC-rapa), radiated at 0Gy (A) or 8Gy (B) and maintained at two oxygenation conditions 21% and 0,4%. Rapamycin and LNC-rapa inhibit mTOR phosphorylation on serine 2448 residue. Relative phosphorylation was measured by volumetry ratio of p-mTOR/HSC70.

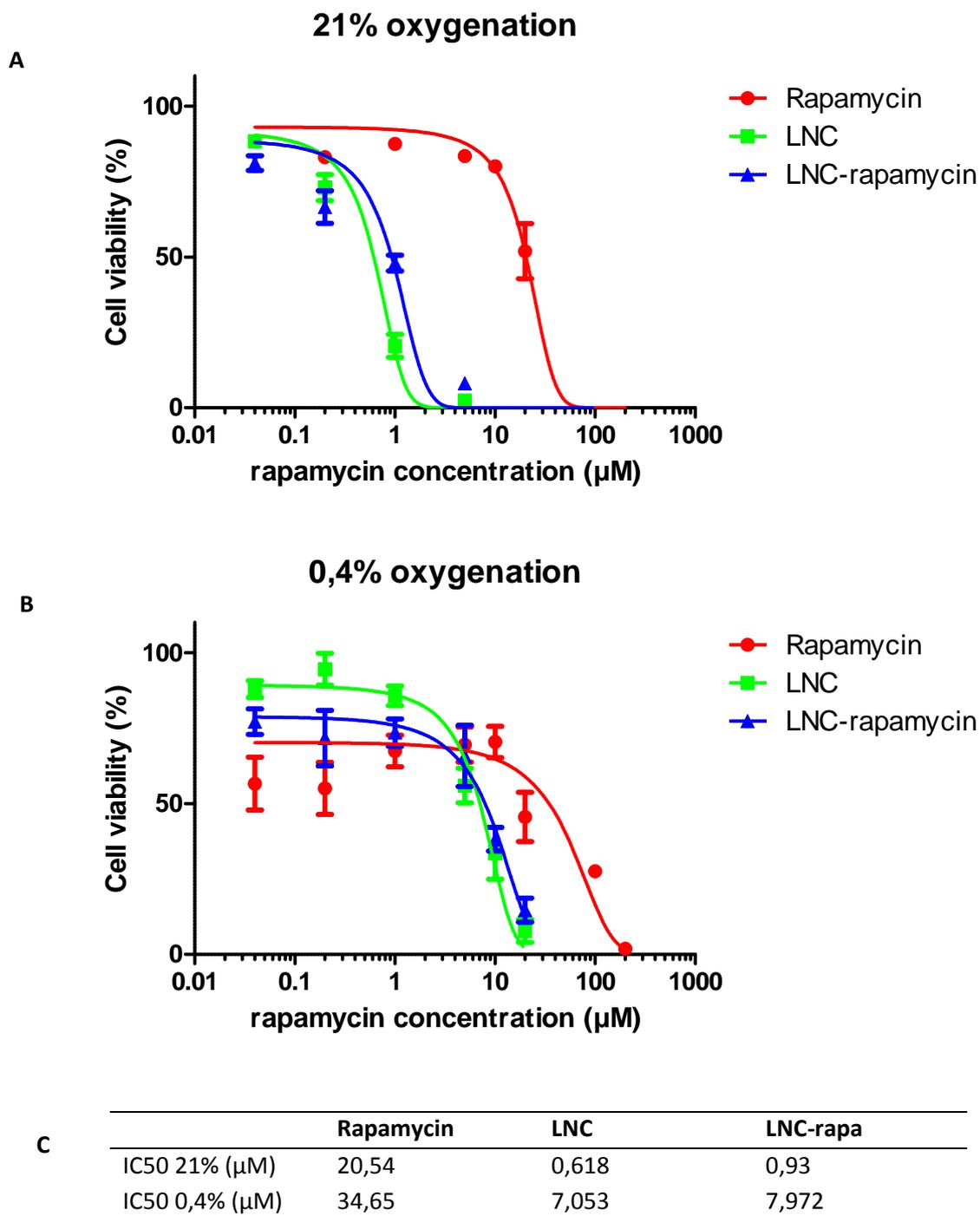
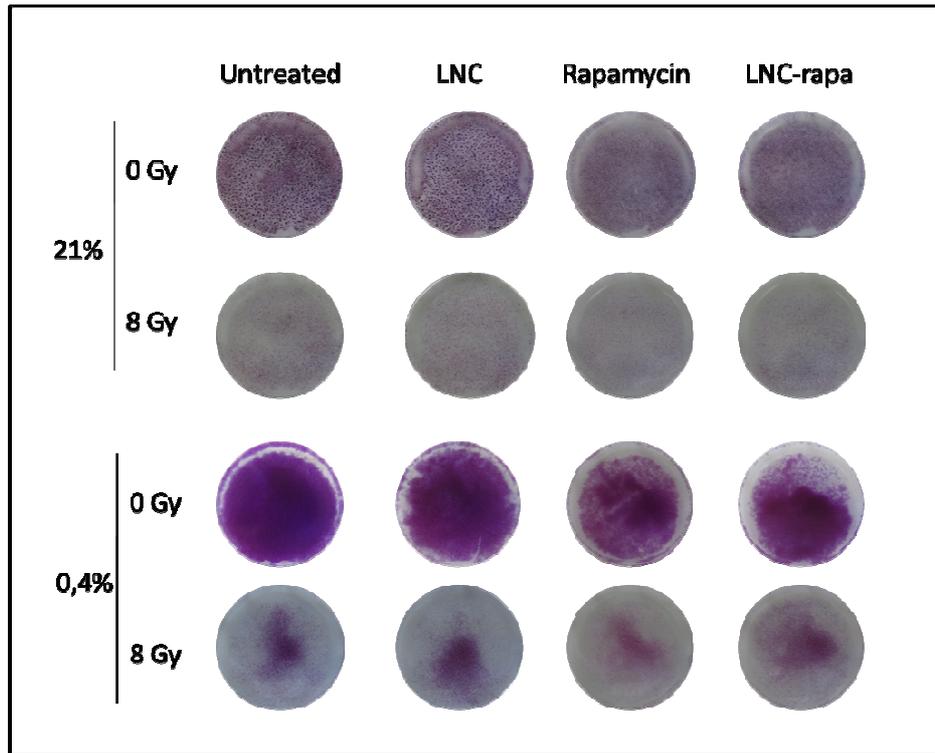
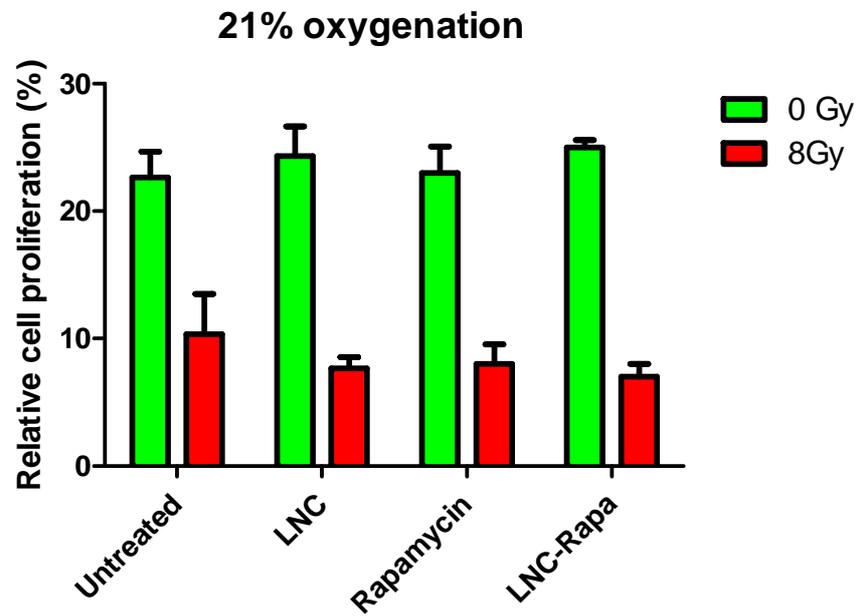


Figure 3 : MTS survival assay. A, B: U87MG cells were treated with rapamycin, LNC and rapamycin-loaded LNC (LNC-rapa) and maintained at 21% (A) or 0,4% (B) oxygenation. C: Calculated IC<sub>50</sub> at 21% and 0,4% oxygenation following three different treatments.

A



B



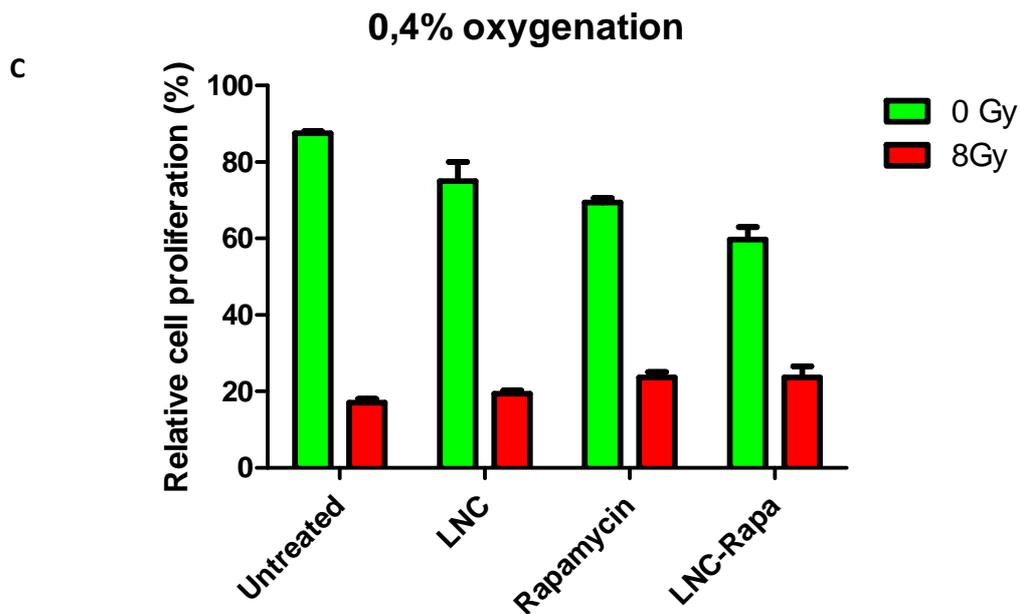


Figure 4 :Clonogenic assay. A: Photography of 6-wells plates containing U87MG cells treated with LNC, rapamycin or LNC-rapa and radiated at 0Gy or 8Gy. 10 days after treatments, cells were stained with crystal violet to visualize colonies counting with ImageJ software. B, C: Cell density is proportionate to the intensity of crystal violet stain. Cell survival was determined by measuring crystal violet stained from individual wells. Data show the mean from a combination of three independent experiments and error bars display the  $\pm$ SD.

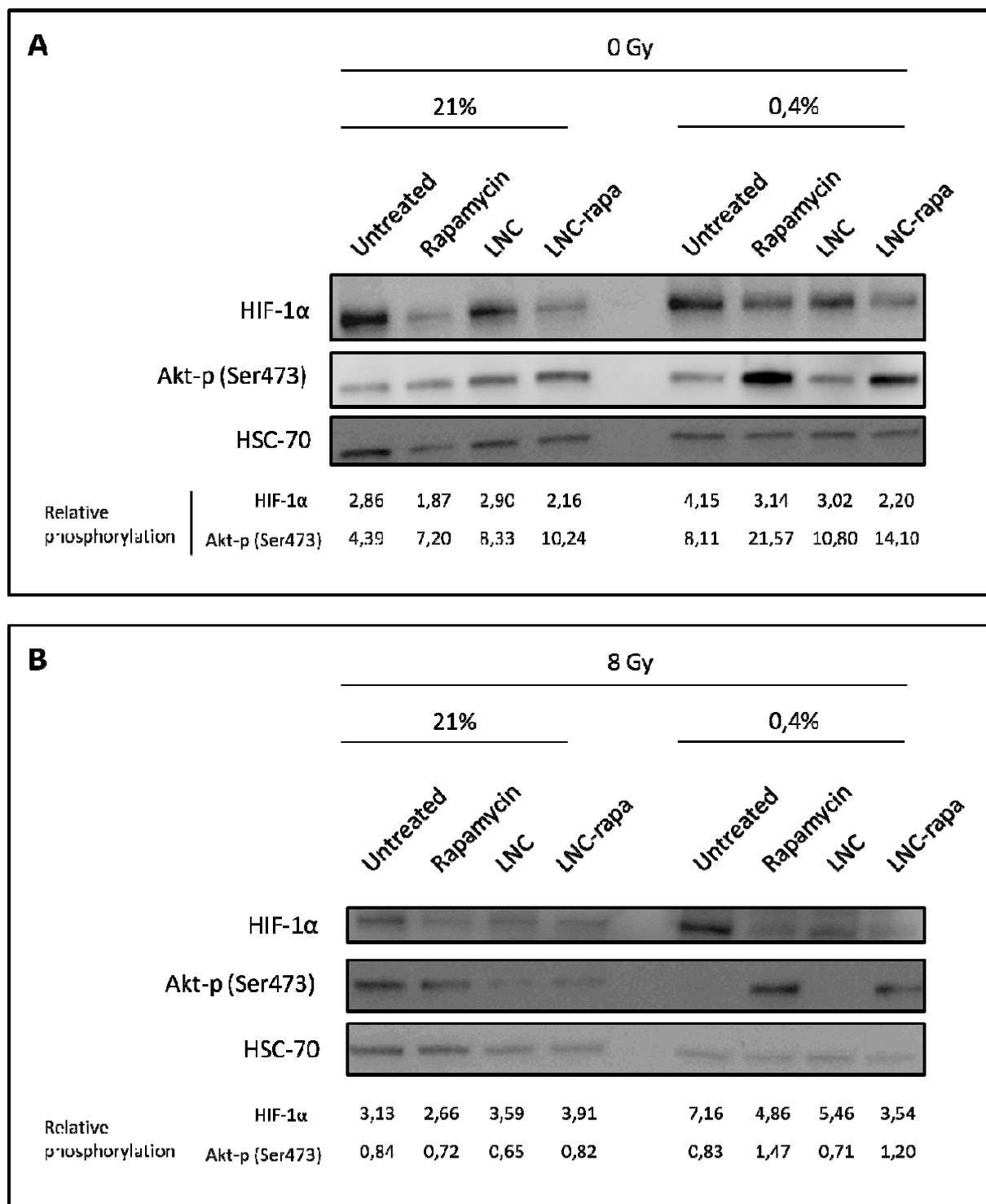


Figure 5 :Western Blot analysis. A, B: U87MG cells were treated with rapamycin alone, LNC alone or rapamycin-loaded LNC (LNC-rapa), radiated at 0Gy (A) or 8Gy (B) and maintained at two oxygenation conditions 21% and 0,4%. Rapamycin and LNC-rapa inhibit HIF-1 $\alpha$  and enhance Akt phosphorylation whatever oxygenation condition. Relative phosphorylation was measured by volumetry ratio of p-mTOR/HSC70.

## References

- [1] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987.
- [2] Castellino RC, Durden DL. Mechanisms of Disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node - an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nature Clinical Practice Neurology* 2007;3:682.
- [3] Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. In: Woude GFV, Klein G, editors. *Advances in Cancer Research*, Vol 102, vol. 102. 2009. p.19.
- [4] Knobbe CB, Trampe-Kieslich A, Reifenberger G. Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2005;31:486.
- [5] Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Research* 2001;61:6674.
- [6] Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: A target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2004;4:335.
- [7] Heimberger AB, Wang E, McGary EC, Hess KR, Henry VK, Shono T, Cohen Z, Gumin J, Sawaya R, Conrad CA, Lang FF. Mechanisms of action of rapamycin in gliomas. *Neuro-Oncology* 2005;7:1.
- [8] Anandharaj A, Cinghu S, Park WY. Rapamycin-mediated mTOR inhibition attenuates survivin and sensitizes glioblastoma cells to radiation therapy. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 2011;43:292.
- [9] Shinohara ET, Cao C, Niermann K, Mu Y, Zeng FH, Hallahan DE, Lu B. Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors. *Oncogene* 2005;24:5414.
- [10] Eshleman JS, Carlson BL, Mladek AC, Kastner BD, Shide KL, Sarkaria JN. Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 Xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer Research* 2002;62:7291.
- [11] Wick W, Weller M, Weiler M, Batchelor T, Yung AWK, Platten M. Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma. *Neuro-Oncology* 2011;13:566.
- [12] Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ. Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends in Molecular Medicine* 2011;17:301.
- [13] Mao H, LeBrun DG, Yang JX, Zhu VF, Li M. Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. *Cancer Investigation* 2012;30:48.
- [14] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550.
- [15] Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1075.
- [16] Yatscoff RW, Wang P, Chan K, Hicks D, Zimmerman J. RAPAMYCIN - DISTRIBUTION, PHARMACOKINETICS, AND THERAPEUTIC RANGE INVESTIGATIONS. *Ther. Drug Monit.* 1995;17:666.
- [17] Simamora P, Alvarez JM, Yalkowsky SH. Solubilization of rapamycin. *International Journal of Pharmaceutics* 2001;213:25.

- [18] Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Materman E, Boni J, Leister C, Korth-Bradley J, Hanauske A, Armand JP. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2004;22:2336.
- [19] Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm. Res.* 2002;19:875.
- [20] Oyler AR, Segmuller BE, Sun YQ, Polshyna A, Dunphy R, Armstrong BL, Achord P, Maryanoff CA, Alquier L, Il'ichev YV. Forced degradation studies of rapamycin: Identification of autoxidation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012;59:194.
- [21] Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witter LA, Ellisen LW, Kaelin WG. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 2004;18:2893.
- [22] Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. Modulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: Implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Research* 2000;60:1541.
- [23] Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Molecular and Cellular Biology* 2002;22:7004.
- [24] Wepler SA, Krause M, Zyromska A, Lambin P, Baumann M, Wouters BG. Response of U87 glioma xenografts treated with concurrent rapamycin and fractionated radiotherapy: Possible role for thrombosis. *Radiother. Oncol.* 2007;82:96.
- [25] Liu LP, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Molecular Cell* 2006;21:521.
- [26] Tremblay F, Brule S, Um SH, Li Y, Masuda K, Roden M, Sun XJ, Krebs M, Polakiewicz RD, Thomas G, Marette A. Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:14056.
- [27] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005;307:1098.
- [28] O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research* 2006;66:1500.
- [29] Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, Poulikakos PI, Scaltriti M, Moskatel E, Baselga J, Guichard S, Rosen N. mTOR Kinase Inhibition Causes Feedback-Dependent Biphasic Regulation of AKT Signaling. *Cancer Discov.* 2011;1:248.
- [30] Kahn J, Hayman TJ, Jamal M, Rath BH, Kramp T, Camphausen K, Tofilon PJ. The mTORC1/mTORC2 inhibitor AZD2014 enhances the radiosensitivity of glioblastoma stem-like cells. *Neuro-Oncology* 2014;16:29.
- [31] Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, Christofidou-Solomidou M, Rengan R, Koumenis C, Maity A. Inhibition of Autophagy as a Strategy to Augment Radiosensitization by the Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor NVP-BEZ235. *Molecular Pharmacology* 2012;82:1230.

- [32] Fan QW, Cheng C, Hackett C, Feldman M, Houseman BT, Nicolaides T, Haas-Kogan D, James CD, Oakes SA, Debnath J, Shokat KM, Weiss WA. Akt and Autophagy Cooperate to Promote Survival of Drug-Resistant Glioma. *Science Signaling* 2010;3.
- [33] Hardwick JS, Kuruvilla FG, Tong JK, Shamji AF, Schreiber SL. Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:14866.
- [34] Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nature Medicine* 2002;8:128.
- [35] Forrest ML, Won CY, Malick AW, Kwon GS. In vitro release of the mTOR inhibitor rapamycin from poly(ethylene glycol)-b-poly(epsilon-caprolactone) micelles. *J. Control. Release* 2006;110:370.
- [36] Lu WL, Li F, Mahato RI. Poly(ethylene glycol)-Block-Poly(2-methyl-2-benzoxycarbonyl-propylene Carbonate) Micelles for Rapamycin Delivery: In Vitro Characterization and Biodistribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011;100:2418.
- [37] Shi P, Aluri S, Lin YA, Shah M, Edman M, Dhandhukia J, Cui HG, MacKay JA. Elastin-based protein polymer nanoparticles carrying drug at both corona and core suppress tumor growth in vivo. *J. Control. Release* 2013;171:330.
- [38] Tyler B, Wadsworth S, Recinos V, Mehta V, Vellimana A, Li K, Rosenblatt J, Do H, Gallia GL, Siu IM, Wicks RT, Rudek MA, Zhao M, Brem H. Local delivery of rapamycin: a toxicity and efficacy study in an experimental malignant glioma model in rats. *Neuro-Oncology* 2011;13:700.

## DISCUSSION GENERALE

## 1 Génèse du travail

Le glioblastome est un cancer du cerveau qui touche près de 5 personnes sur 100 000 habitants chaque année. C'est la forme la plus sévère et la plus courante de gliome. En dépit d'une prise en charge thérapeutique agressive, les traitements actuels ne sont pas curatifs et ne permettent de prolonger la vie des patients que de quelques mois [1].

Les causes de cet échec sont variées, un diagnostic précoce de la tumeur n'est pas toujours possible, les tumeurs ne sont pas toutes opérables chirurgicalement et la localisation particulière de ce cancer empêche de faire une exérèse chirurgicale large qui permettrait de retirer tout le tissu cancéreux. De plus, il a récemment été démontré qu'il existait dans ces tumeurs des cellules appelées cellules cancéreuses de type souche ou cellules initiatrices de gliome (CSGs) qui présentent une résistance accrue aux radio- et chimiothérapie [2].

La radiothérapie externe fait partie de la prise en charge standard du glioblastome. Les techniques récentes sont de plus en plus performantes et permettent un contrôle local de la tumeur mais pas des localisations disséminées [3]. Or, le glioblastome est une tumeur diffuse qui nécessite l'association d'une chimiothérapie, avec les effets secondaires qui en découlent, pour atteindre les zones non ciblées par la radiothérapie externe.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au problème de la radiorésistance des glioblastomes. Nous avons développé notre étude sur deux stratégies principales :

- La première a consisté à concevoir un vecteur capable d'inhiber pharmacologiquement une voie de signalisation impliquée dans la résistance à l'irradiation.
- La seconde a consisté à développer un outil de radiothérapie interne vectorisée et à évaluer son efficacité *in vivo* dans un modèle de glioblastome humain chez la souris.

Nous avons utilisé comme vecteur les nanocapsules lipidiques (LNCs) de 50 nm et 100 nm. Ce sont des systèmes biocompatibles qui n'utilisent que des excipients validés par la FDA (*Food and Drug Administration*). Ils permettent notamment d'encapsuler des molécules lipidiques [4-6], et ont la propriété d'inhiber la P-glycoprotéine (P-gp) [7-9], d'échapper au compartiment endo-lysosomal [10] et de traverser certaines barrières biologiques [10].

## 2 Développement d'un nouveau vecteur pour la radiothérapie interne vectorisée (RIV) dans le glioblastome

Dans ce travail, nous avons développé un outil de radiothérapie interne vectorisée avec des nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 et fonctionnalisées avec un anticorps dirigé contre le récepteur à chimiokine CXCR4. Nous avons choisi de cibler ce récepteur car il intervient à la fois dans la signalisation intrinsèques de la cellule cancéreuse et au niveau de ses interactions avec le

microenvironnement qui peut être le tissu tumoral lui-même ou le parenchyme sain. Le récepteur CXCR4 est à cet égard surexprimé au niveau des cellules initiatrices de gliomes (GICs) et des cellules endothéliales vasculaires [11]. Il a aussi été rapporté que l'axe CXCL12/CXCR4 joue un rôle dans l'auto-renouvellement, la prolifération, la migration, l'angiogénèse et la radio- et chimiorésistance des GICs [12]. Au niveau du microenvironnement, le CXCR4 est exprimé au niveau de certaines sous-populations de monocytes macrophages CD11b+, précurseurs des macrophages infiltrant la tumeur [13-14]. Suite à une irradiation, la tumeur, rendue hypoxique par la destruction de cellules endothéliales, va sécréter le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  qui induit l'expression et la sécrétion de CXCL12. CXCL12 va agir au niveau des cellules CD11b+ et induire leur migration au niveau du site tumorale où elles vont favoriser la formation de nouveaux vaisseaux à partir des cellules endothéliales circulantes [13-14].

Ce travail s'appuie sur de précédents travaux qui avaient montré que l'injection stéréotaxique de LNC<sup>188</sup>Re dans un modèle orthotopique de rat 9L permettait de prolonger la durée de vie de ces animaux voire de les guérir lorsqu'ils étaient traités d'abord en injection directe puis par CED [15]. Dans cette thèse, nous avons fonctionnalisé les LNC<sup>188</sup>Re avec un anticorps bloquant, le 12G5 afin d'allier l'inhibition du CXCR4 à l'efficacité de la radiothérapie interne  $\beta^-$ .

## 2.1 Mise en évidence de l'efficacité du 12G5-LNC<sup>188</sup>Re dans un modèle de GBM humain chez la souris

Dans un premier temps, nous avons mis au point les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re selon la méthode décrite par Bourseau *et al.* [16]. La présence de <sup>188</sup>Re, avec une demi-vie de 16,9h, a toutefois nécessité de réduire le temps de post-insertion. Dans la méthode précédemment décrite, la post-insertion se faisait sur 4h à 37°C. Nous avons réduit ce temps à 1h à 45°C et nous avons vérifié que cette température n'altérait pas les capacités de reconnaissance de l'anticorps. Nous avons aussi montré que les 12G5-LNCs sont capables de reconnaître efficacement le récepteur CXCR4 mais dans une moindre mesure que l'anticorps libre, ce qui peut s'expliquer par l'encombrement stérique autour des LNCs.

Cet objet a ensuite été injecté par CED dans le striatum droit de souris Scid femelles porteuses d'une tumeur de type glioblastome humain avec des cellules U87MG CXCR4 positives. Ce modèle murin a été développé afin d'avoir une tumeur qui exprime le récepteur à chimiokine de manière constitutive. Nous avons donc transfecté la lignée U87MG, connue dans notre laboratoire pour ne pas exprimer le CXCR4, par un lentivirus codant pour ce récepteur et la RFP (*Red Fluorescent Protein*). L'étude de survie des animaux et le suivi IRM montre que les souris qui ont été traitées avec les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re ont une médiane de survie plus élevée, significativement différente par rapport à celles des souris traitées avec les 12G5-LNCs et les IgG2a-LNCs et très significativement différentes par rapport aux souris traitées avec la solution saline (PBS) et les LNCs. De manière générale, toutes les souris traitées avec du rhénium-188 ont une survie plus élevée, mais seules les animaux traités avec les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re ont une médiane de survie significativement différente de celles des animaux traités avec des LNCs non-radioactives. Pour comprendre comment les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re confèrent un avantage de survie, nous avons fait une analyse par imagerie spectrale qui permet d'apprécier, après infusion stéréotaxique, la biodistribution des nanoparticules dans le parenchyme atteint de tumeur.

Des LNCs contenant un fluorophore, le DiD, et étiquetées avec le 12G5 ou son immunoglobuline contrôle ont donc été injectées dans le striatum de souris porteuses d'une tumeur chimérique U87MG CXCR4- (RFP-)/U87MG CXCR4+ (RFP+). Ce modèle de tumeur chimérique présente l'avantage de coloniser un même environnement cérébral par deux sous-types cellulaires tumoraux qui se distinguent par leur répertoire de récepteurs membranaires et leur signalisation relatifs à la présence du CXCR4. Il est intéressant de constater que dans les zones tumorales identifiées par imagerie spectrales, seules les cellules CXCR4 positives se situent au niveau des marges et représentent des fronts de migration cellulaire ou d'expansion tumorale. Cette observation corrobore l'implication du CXCR4 dans l'agressivité et les capacités de colonisation de l'environnement sain par les cellules tumorales, même si les deux types cellulaires sont capables de proliférer et de former des tumeurs. L'objectif était de rechercher si les 12G5-LNC-DiD étaient capables de colocaliser au niveau des zones où le récepteur CXCR4 est exprimé, c'est-à-dire les zones RFP+. L'analyse spectrale a permis de montrer qu'il y avait effectivement une forte colocalisation du DiD avec la RFP sur les coupes de cerveaux correspondant aux souris traitées avec des 12G5-LNC-DiD. Cette colocalisation est beaucoup moins importante lorsque les souris ont été traitées avec des IgG2a-LNC-DiD. On peut donc affirmer que la présence du 12G5 à la surface des LNCs influence leur diffusion dans le tissu tumoral et facilite leur rétention dans les zones où le CXCR4 est exprimé.

Ce résultat laisse envisager que les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re sont elles aussi retenues au niveau des zones tumorales qui expriment le CXCR4. Il y aurait ainsi une plus importante irradiation de ces zones. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse histochimique réalisée au moment de la mort des animaux. On constate sur ces images que l'infiltrat de cellules CD11b+ est inversement proportionnel à la vascularisation de la tumeur. En effet, il est possible que l'irradiation générée par les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re ait été plus intense que pour les autres traitements rhénium, du fait de sa plus forte rétention au niveau des zones CXCR4+. Cette irradiation a généré une plus forte hypoxie ce qui a conduit d'abord à réduire la taille de la tumeur puis à la rendre indétectable à l'IRM. Mais l'hypoxie a aussi induit l'expression de HIF-1 au niveau de la tumeur, ce qui a induit l'expression de CXCL12 et a entraîné la migration des monocytes/macrophages CD11b+ [13-14]. Ce phénomène a pu favoriser la reprise de la croissance tumorale et explique la présence d'une quantité importante de ces cellules CD11b+ au niveau de la tumeur au moment de la mort de l'animal.

Ainsi, bien que les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re confèrent un avantage de survie pour les souris, elles ne permettent cependant pas de les guérir. Plusieurs explications peuvent être apportées pour expliquer l'absence de guérison. Dans ce travail, nous avons choisi de cibler le récepteur CXCR4 car il intervient à la fois sur des mécanismes intrinsèques de la cellule tumorale et participe ainsi à la radiorésistance des cellules et d'autre part, il est impliqué dans la vasculogénèse. Cependant, le CXCL12 a un autre récepteur, le CXCR7, lui aussi impliqué dans la migration des cellules endothéliales et la vasculogénèse [17]. Une étude récente a montré que l'inhibition de CXCR7 permettait aussi de retarder la croissance tumorale après une irradiation [18]. Ceci laisse supposer que l'utilisation concomitante d'inhibiteur de CXCR4 et CXCR7 ou un inhibiteur de CXCL12 pourrait renforcer la radiosensibilisation de la tumeur à une irradiation externe.

Enfin, il est possible que les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re soient plus efficaces dans un modèle murin immunocompétent. En effet, l'utilisation de souris Scid, nécessaire à l'implantation de cellules humaines, fait que nous observons l'effet direct du nanovecteur sur les cellules cancéreuses accompagné d'une partie réduite des effets indirects amputés de l'effet des lymphocytes T et B dont

il a été démontré, dans une étude précédente, qu'ils jouaient un rôle prépondérant dans l'éradication de la tumeur [15]. En effet, Vanpouille *et al.* démontraient que l'irradiation entraînait une activation des monocytes/macrophages/microglie et un afflux de cellules dendritiques, puis de lymphocytes T et B et de cellules *natural killer*. De plus, les LNC<sup>188</sup>Re étaient capables de générer une réponse mémoire anti-tumorale puisque la réimplantation de cellules 9L ne générerait pas de tumeur chez les rats irradiés à la différence des rats naïfs [15].

## 2.2 Le choix du rhénium-188 pour une RIV dans le glioblastome

La plupart des radiothérapies vectorisées utilisent des émetteurs  $\beta^-$  avec des transferts d'énergie linéique (TEL) généralement faibles c'est-à-dire que la densité des ionisations responsables de lésions cellulaires est faible le long du parcours des particules. Ce type d'émetteur va donc engendrer peu de lésions double-brin à l'ADN et avoir une efficacité limitée, dépendante de la distribution du vecteur dans la tumeur. C'est pourquoi le choix du radionucléide se porte de plus en plus vers des émetteurs  $\beta^-$  plus énergétiques comme l'yttrium-90 [19-20] ou le rhénium-188 [21] plutôt que l'iode-131, avec des TELs très élevés qui vont générer beaucoup d'ionisation et de dommages sur leur parcours. Les radioéléments à TEL élevés ont en plus l'avantage d'avoir une efficacité biologique pratiquement indépendante de l'oxygénation du tissu tumoral puisque les lésions à l'ADN sont directes et passent très peu par la formation de radicaux libres.

L'encapsulation du <sup>188</sup>Re dans des LNCs pour une RIV s'appuie sur les travaux précédents qui ont notamment permis de synthétiser le complexe de 188-rhénium, indispensable à son encapsulation. La synthèse suit la réaction décrite par Lepareur et al. : le rhénium au degré d'oxydation VII [<sup>188</sup>ReO<sub>4</sub><sup>-</sup>] va être réduit en composé intermédiaire de degré V Na[<sup>188</sup>ReO(gluc)<sub>2</sub>] qui réagit avec un ligand, le dithiobenzoate de sodium pour former un complexe neutre [<sup>188</sup>Re(PhCS<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(PhCS<sub>2</sub>)] [22]. Ce complexe est ensuite encapsulé dans le cœur lipophile des LNCs et peut être injecté de manière sécurisée *in situ*, dans le cerveau [4, 15].

Par ailleurs, au cours de cette thèse, nous nous sommes aussi intéressés au développement d'un autre type de RIV, avec cette fois un émetteur alpha. En effet, la proximité avec le cyclotron Arronax, à Nantes, qui produit de l'astate-211, a permis d'élaborer le projet de l'encapsulation de ce radio-émetteur dans des LNCs. Le développement de radiothérapies vectorisées avec des radio-émetteurs  $\alpha$  est intéressant dans la mesure où leur faible parcours dans la matière associé à un TEL très élevé permet d'envisager une destruction d'une cellule cible tout en limitant l'irradiation des cellules saines environnantes. Le développement de RIV alpha est toutefois limité par le fait que les émetteurs  $\alpha$  ont généralement un temps de demi-vie court voire extrêmement court pour certains (astate-211 7,2h ; bismuth-213 45 min), ce qui rend leur ingénierie et leur utilisation en clinique délicate. De plus, leur fort degré d'ionisation nécessite un ciblage efficace et exclusif des cellules cancéreuses.

Les premiers essais d'encapsulation ont été faits dans le cadre de cette thèse avec un autre halogène, l'iode-125, moins dangereux à manipuler et dont les propriétés physico-chimiques sont proches de celles de l'<sup>211</sup>At. Afin de pouvoir être encapsulé dans le cœur lipophile de la LNC, l'<sup>125</sup>I a été couplé à

une molécule de succinimidyl iodobenzoate (SIB) (Figure 1), analogue du succinimidyl astatobenzoate, et encapsulé selon le processus d'inversion de phase décrit précédemment [23]

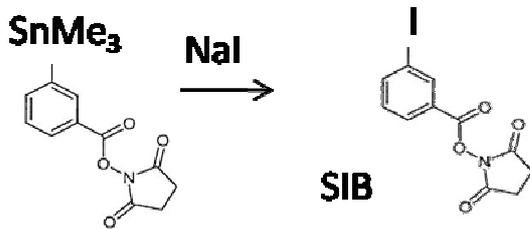


Figure 1 : Synthèse du succinimidyl iodobenzoate (SIB) à partir du précurseur stannique.

Les taux d'encapsulation ont été mesurés après purification de LNCs de 25 nm, 50 nm et 100 nm sur des colonnes PD10 (Séphadex G25) et mesure de l'activité de chaque fractions éluées au compteur gamma. Les résultats présentés en Figure 2 montrent qu'il est possible d'encapsuler près de 90% de 5 nmol de SIB quelque soit la taille de la nanoparticule, puis le taux de charge diminue en fonction de la quantité à encapsuler, ce qui témoigne de la saturation du vecteur.

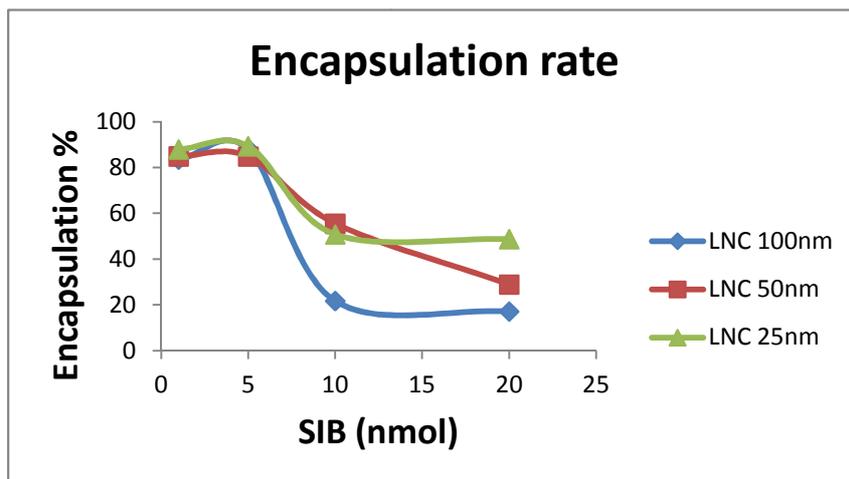


Figure 2 : Taux d'encapsulation du SIB dans les LNCs de différentes tailles.

Ces résultats encourageants ont été suivis d'essais de stabilité à 37°C dans du milieu de culture cellulaire. Malheureusement, nous avons constaté qu'après 1h d'incubation, le taux d'encapsulation chutait à 50%. Nous pensons que le SIB se met au niveau de la coque des LNCs ce qui contribue à les déstabiliser quand elles sont mises à incuber à 37°C. Il est en effet possible d'encapsuler plus de SIB dans les LNCs de 25 nm qui ont une coque plus large. Ces résultats nous ont poussés à arrêter l'encapsulation de  $^{125}\text{I}$  à partir de SIB. Des essais devront être faits avec d'autres molécules plus lipophiles et transposés ensuite avec de  $^{211}\text{At}$ .

## 2.3 Modalité d'administration

Comme il a été dit précédemment, le glioblastome est une tumeur très infiltrante et radio-résistante. La radiothérapie vectorisée est une alternative thérapeutique intéressante dans la mesure où elle peut permettre d'atteindre des lésions, soit qui n'auraient pas été décelées par l'imagerie soit qui seraient inopérables. En effet, l'un des problèmes majeurs dans l'éradication de cette maladie est la présence de lésions non décelables, au site initial et à distance, source de récurrences ultérieures.

Mais se pose alors la question de la meilleure modalité d'administration de ces vecteurs radio-marqués. Ce mode d'administration doit permettre d'apporter suffisamment de radioactivité au niveau de la tumeur, ce qui inclut de passer la BHE, tout en limitant les dommages faits aux tissus et organes sains. Afin de permettre aux agents de radiothérapie vectorisée d'agir au niveau du cerveau, de nombreuses techniques ont été développées et peuvent être classées en deux catégories : les méthodes non invasives et les méthodes invasives.

**Les techniques non invasives** mettent à profit des mécanismes physiologiques de passage de la BHE. Il s'agit des systèmes :

- *carrier-mediated transports* (CMT)
- *receptor-mediated endocytosis* (RME),
- *absorptive-mediated endocytosis* (AME) [24].
- La voie transnasale

La voie transnasale peut être une alternative intéressante. Les fosses nasales offrent une large surface d'échange avec une membrane endothéliale poreuse, un flux sanguin élevé, pas d'effet de premier passage hépatique et une utilisation facile [25]. Des molécules de faible poids moléculaire ou des peptides passent les cavités nasales et atteignent le SNC par transport le long des nerfs olfactifs et trijumeaux [26].

Le CMT qui utilise des transporteurs tels que GLUT1 (D-glucose), MCT1 (acide monocarboxylique), LAT1 (*large neutral amino-acids*), EAAT (excitatory amino-acids)...

Le RME est un système qui permet le passage de LDL (*Low density lipoproteins*). Des récepteurs spécifiques du LDL présents sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux ont été identifiés : celui de l'insuline, des *insuline-like growth factor* (IGF-1, IGF-2), de l'interleukine-1, de l'acide folique et de la transferrine.

Enfin, le système AME est basé sur les interactions électrostatiques entre un ligand chargé positivement et la BHE chargée négativement [24].

Ces systèmes ont été utilisés principalement pour permettre le passage de vecteurs contenant des agents de chimiothérapie. C'est le cas par exemple de la doxorubicine qui a été encapsulée dans des liposomes couplés à la transferrine pour permettre son passage par RME [27]. Cependant, bien qu'ils permettent dans certains cas d'atteindre une concentration efficace dans le cerveau, ils nécessitent une administration systémique qui, dans le cas d'une radiothérapie, peut entraîner de nombreux effets secondaires. En effet, dans une étude précédente, Béduneau *et al.* ont développé des LNCs

contenant du  $^{188}\text{Re}$  et fonctionnalisées avec un anticorps, l'OX26, qui a la capacité de se lier au récepteur à la transferrine, surexprimé au niveau des cellules endothéliales du cerveau et des cellules de gliome [28]. Ce vecteur a été administré par voie intraveineuse chez le rat et les auteurs ont constaté que, bien qu'une concentration efficace soit atteinte au niveau du cerveau, le vecteur était rapidement éliminé de la circulation sanguine avec une très forte concentration dans le foie (60% de la dose injectée) [28]. Une autre étude a, par la suite, démontré que des nanoparticules de PLGA (polymère) fonctionnalisées avec de la transferrine et administrées par voie veineuse, passaient très peu la BHE (moins de 1%). Lorsque la taille de la tumeur augmente, la concentration intracérébrale augmente grâce à l'effet EPR mais de manière indépendante de la transferrine [29]. Ainsi, une administration périphérique de nanoparticules pour une thérapie ciblant le SNC ne semble pas intéressante dans la mesure où elle induit beaucoup de toxicité systémique et où peu de médicament arrive au niveau du parenchyme cérébral.

Il apparaît donc que les **méthodes invasives**, malgré les risques qu'elles comportent, sont les plus appropriées pour des radiothérapies internes. En effet, elles vont permettre de concentrer un maximum d'irradiation au niveau du point d'injection et éviter ainsi une irradiation corps entier. Parmi ces techniques, on retrouve l'injection directe, la pose d'implant ou de pastille et la *convection enhanced delivery* (CED).

Nous avons choisi cette dernière méthode pour l'injection des LNC $^{188}\text{Re}$  étiquetées 12G5. Cette technique permet d'associer la diffusion de la molécule à la dynamique des fluides (convection) pour augmenter le volume de distribution par rapport à une injection simple [30]. Dans une première étude réalisée par Allard *et al.*, il a été montré que les LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS étaient longuement retenues au niveau du cerveau après une administration par CED dans un modèle de gliome de rat (9L), avec seulement 1% d'élimination 12h après l'injection. Les auteurs montraient ainsi que la nature lipophile des LNCs permet une rétention longue du radionucléide dans le cerveau ce qui améliore l'irradiation de la tumeur [4]. Dans une étude plus récente, Vanpouille *et al.* ont mesuré la cinétique d'élimination du perrhénate ( $\text{ReO}_4^-$ ) par rapport au LNC $^{188}\text{Re}$  après une simple injection ou une CED dans le cerveau de rat 9L. Ils ont montré que la modalité d'injection (SI ou CED) n'avait pas d'importance sur la cinétique d'élimination mais en revanche, le  $\text{ReO}_4^-$  était beaucoup plus rapidement éliminé du cerveau que les LNC $^{188}\text{Re}$ . En effet, 96h après injection, seulement 4% des LNC $^{188}\text{Re}$ -SSS sont éliminées contre 65% du  $\text{ReO}_4^-$  [15]. La CED semble donc être la meilleure méthode pour injecter une RIV car elle permet de concentrer le vecteur au niveau du cerveau et limite une distribution systémique.

L'utilisation de la CED au niveau clinique est encore au stade de développement mais une première étude de phase III a récemment été publiée. Elle a consisté à comparer l'injection par CED de IL13-PE38QQR par rapport à un implant de Gliadel® dans le glioblastome récurrent [31]. L'implant, comme le cathéter servant à la CED ont été placés dans la cavité post-chirurgicale directement après la résection de la tumeur. Les auteurs ont montré que plusieurs facteurs influençaient le volume de distribution en CED ; la configuration et la position du cathéter et le volume et le débit d'infusion [31-32]. Ils ont conclu qu'il n'y avait pas de différence entre la CED et le Gliadel® en termes de survie et de toxicité à l'exception de la survenue d'embolie pulmonaire plus fréquente avec la CED mais qui serait due à l'immobilisation prolongée pendant l'infusion. Les auteurs préconisent aussi de suivre l'injection en temps réel par un produit radiomarqué ou un agent de contraste afin de contrôler

précisément si le produit arrive en quantité suffisante au niveau de la zone cible [31, 33]. De plus, l'assistance par ordinateur permet d'optimiser la technique et notamment de contrôler le positionnement du cathéter, nécessaire à une bonne délivrance du produit [30].

### 3 Développement d'un nanovecteur, inhibiteur de mTORC1

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR est connue pour être largement impliquée dans les mécanismes de radiorésistance (Cf. revue, Chapitre II).

La rapamycine est un macrolide qui inhibe l'un des effecteurs de cette voie, la protéine mTOR. Plus exactement, elle se lie à FKBP12 et le complexe FKBP12/rapamycine empêche la phosphorylation de mTOR. La protéine ainsi inhibée ne peut plus activer p70S6K et lève l'inhibition de 4E-BP1 qui se lie à eIF4E, ce qui inhibe la traduction de certains gènes cibles.

Des essais cliniques ont été menés [34] ou sont en cours avec des rapalogues (everolimus et temsirolimus) (Phase I #NCT00316849, Phase I/II #NCT00553150, Phase II #NCT00805961) et les analogues de la rapamycine CCI-779 (temsirolimus), RAD001 (everolimus) et AP23573 sont les premiers inhibiteurs de mTOR à être validés comme anticancéreux chez l'homme [35]. La principale contrainte de l'utilisation de la rapamycine est sa très faible solubilité dans les milieux aqueux. Cette molécule doit donc être encapsulée pour pouvoir être utilisée. Nous avons réalisé des formulations de nanocapsules lipidiques de rapamycine dans des LNCs de 100 nm. Nous avons montré qu'elles permettent d'encapsuler près de 70% de la quantité initiale de rapamycine soit une concentration finale en rapamycine de 0,7 mg/mL. Nous avons ensuite montré que la rapamycine encapsulée garde ses effets biologiques en bloquant efficacement la phosphorylation de mTOR et que cet effet est plus marqué lorsque les cellules sont cultivées en conditions d'hypoxie. En effet, HIF-1 $\alpha$  active les complexes TSC1/TSC2 qui inhibent mTOR [36], il y a donc une double inhibition de mTOR en condition d'hypoxie, l'une avec la rapamycine et l'autre avec HIF-1 $\alpha$ .

Nous n'avons pas observé une radio-sensibilisation des cellules U87MG par la rapamycine lorsque celles-ci sont soumises à un rayonnement externe. Ce résultat n'est pas complètement surprenant car les modèles *in vitro* ne tiennent pas compte de l'ensemble des signaux permettant de mettre en évidence une radio-sensibilisation induite par la rapamycine. Ainsi Eshleman *et al.* ont montré une fonctionnalité très distincte de la rapamycine en conditions *vivo* et *in vitro* [37]. Ils ont notamment constaté qu'il n'y avait pas de radio-sensibilisation de la rapamycine sur des U87MG *in vitro*. En revanche, elle était capable de potentialiser une radiothérapie fractionnée dans un modèle de xénogreffe.

D'autres explications peuvent toutefois expliquer ce résultat. Nos analyses suivantes ont en effet montré que, bien que la rapamycine induise une inhibition de mTOR, elle induit aussi une inhibition de HIF-1 $\alpha$  et surtout une activation d'Akt, corroborant par ailleurs le fait rapporté que la rapamycine inhibe la stabilisation et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  [38]. Comme il existe deux complexes de mTOR, mTORC1 et mTORC2, la rapamycine inhibe la phosphorylation de mTORC1 mais pas celle de mTORC2 ce qui va avoir plusieurs conséquences (Figure 3) :

- D'une part, p70S6K exerce habituellement un rétrocontrôle négatif sur IRS-1 et entraîne sa dégradation [39]. La rapamycine lève l'inhibition sur IRS-1 ce qui entraîne une activation de la voie IGF-IR/IRS-1/PI3K et l'activation d'Akt [40],
- D'autre part, mTORC2 est capable de phosphoryler directement Akt ce qui augmente son activité catalytique [41].

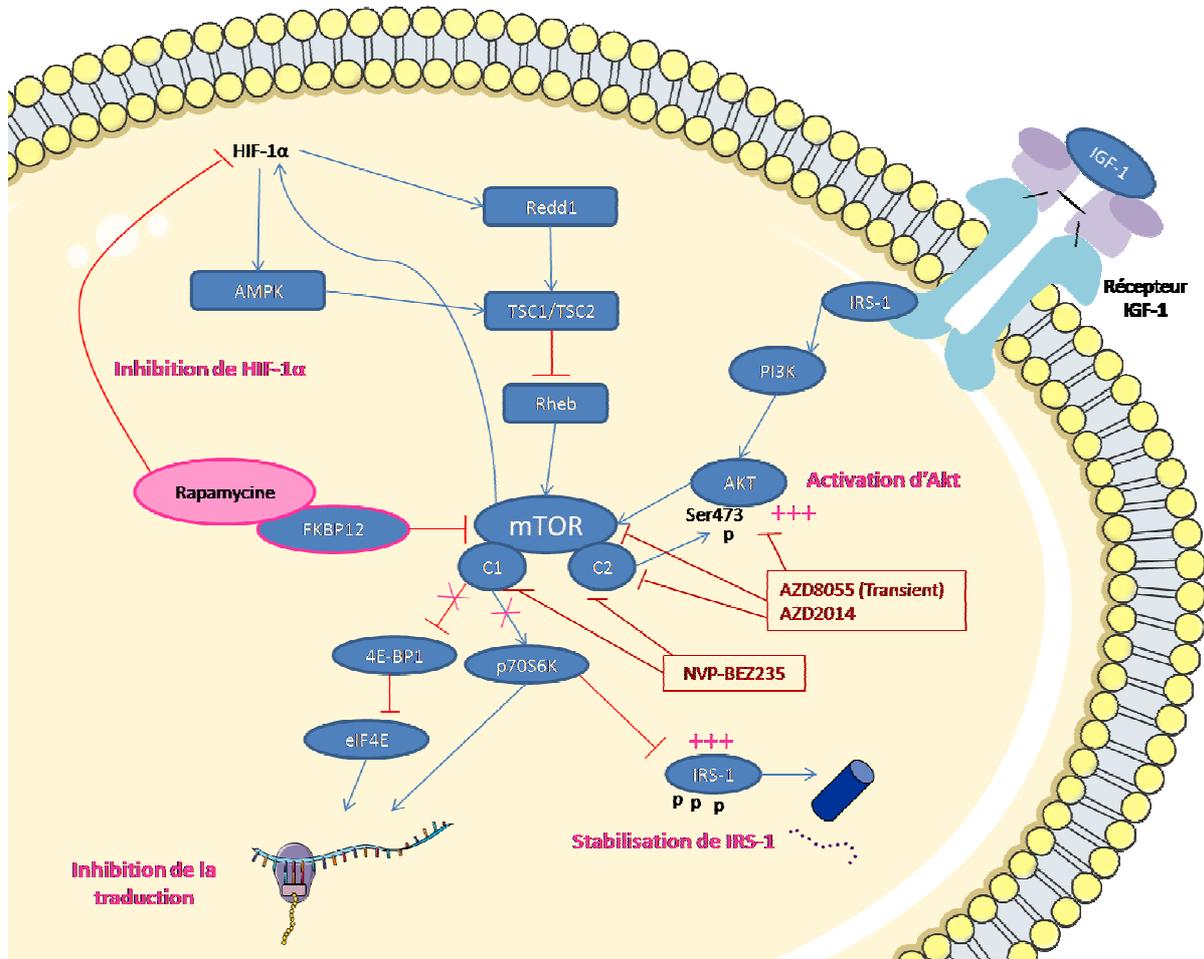


Figure 3 : Mécanisme d'action de la rapamycine dans une cellule. La rapamycine se lie à FKBP12 et le complexe ainsi formé inhibe la phosphorylation de mTORC1. Ceci a pour conséquence majeure d'inhiber eIF4E et p70S6K et la traduction. Mais la rapamycine va aussi inhiber la stabilisation et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  ce qui a pour conséquence de réduire l'efficacité du rétrocontrôle négatif qu'exerce mTOR sur HIF-1 $\alpha$ . D'autre part, la rapamycine va induire la phosphorylation d'Akt : via le complexe mTORC2 qui n'est pas inhibé et par l'activation de la voie IGF-1 récepteur/insuline récepteur. En effet, mTOR exerce normalement un rétrocontrôle négatif sur IRS-1 en induisant sa phosphorylation et sa dégradation par le protéasome. En présence de rapamycine, ce rétrocontrôle est supprimé ce qui permet une activation de Akt via la voie IGF-1/IGF-1R. Les doubles inhibiteurs tels que le NVP-BEZ235 ou les inhibiteurs mTOR/Akt permettent de contrecarrer l'activation d'Akt.

Ces résultats illustrent toute la complexité d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques pour inhiber une voie de signalisation. Nous avons montré qu'il existait au sein même de la voie PI3K/Akt des phénomènes de rétrocontrôle négatif qui permettent en temps normal de contrôler la voie. En présence, d'un inhibiteur, ces mécanismes sont levés ce qui conduit finalement à une activation de Akt, et de la voie, plutôt qu'à son inhibition. De plus, à l'échelle de la cellule, il a été rapporté que les voies de signalisation « communiquent » entre elles. Ainsi, Carracedo *et al.* montraient que

---

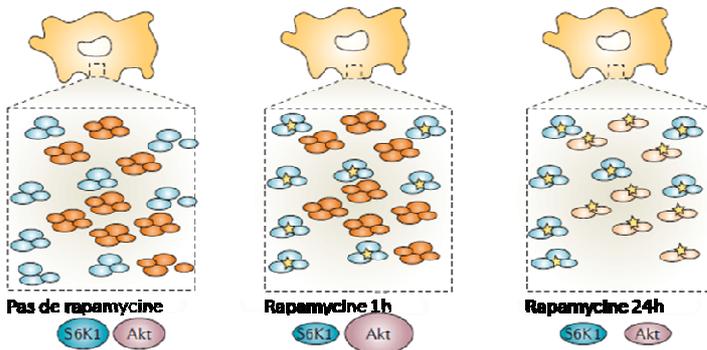
l'inhibition de mTORC1 par RAD001 entraîne une activation de la voie des MAPK par un mécanisme de rétrocontrôle dans les cancers du sein, du colon et dans le mélanome [42].

Cependant, la rapamycine et ses analogues n'ont pas la même activité anti-tumorale d'un cancer à un autre. Par exemple, le taux de réponse est de 10% dans le glioblastome [43-44] ou le cancer du rein [45] alors qu'il approche les 40% dans certaine forme de lymphome [46]. Sabatini avance des raisons qui peuvent expliquer ces variations. Par exemple, la rapamycine est inefficace dans les cellules qui n'ont pas de TSC2. De même, il note que la rapamycine est particulièrement efficace dans les tumeurs où la voie PI3K/Akt est activée mais sans pour autant être très efficace dans le glioblastome et le cancer du sein où l'activité d'Akt est très élevée. Il propose donc d'associer des inhibiteurs de mTOR avec un inhibiteur de l'IGF1R qui prévient de l'activation d'Akt [40, 47].

Il apparait cependant que l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR dans le glioblastome est une stratégie intéressante dans la mesure où elle est très fortement impliquée dans les mécanismes de résistance à l'apoptose, d'oncogénèse et de résistance aux irradiations. Dans le cas de ce cancer, il serait intéressant de travailler sur le potentiel de radio-sensibilisation d'une association inhibiteur de mTOR/inhibiteur d'Akt ou sur des doubles inhibiteurs mTORC1/mTORC2. Une étude de phase I avait déjà fait ce constat. Elle avait consisté à traiter des patients atteints d'un glioblastome récurrent PTEN négatif par un traitement continu de rapamycine. Les auteurs ont constaté que la rapamycine contribuait à réduire la prolifération cellulaire. Cependant, chez certains patients, elle contribuait aussi à activer Akt, ce qui était associé à une réduction du temps jusqu'à progression. Des études cliniques sont actuellement en cours et associent un inhibiteur d'Akt (pérfosine) au sirolimus (#NCT02238496, #NCT01051557) afin de renforcer l'effet anti-tumoral.

Notre nanovecteur peut par ailleurs être indiqué dans d'autres applications. Il a par exemple été montré que dans certains cancers, la rapamycine inhibe à la fois mTORC1 et mTORC2 [35], ce qui inhibe la phosphorylation d'Akt. Cette double inhibition par la rapamycine est aussi retrouvée au niveau des cellules endothéliales et contribue à un effet anti-angiogénique [35, 48].

**a Cellules avec mTORC2 sensible à la rapamycine**



**b Cellules avec mTORC2 partiellement sensible à la rapamycine**

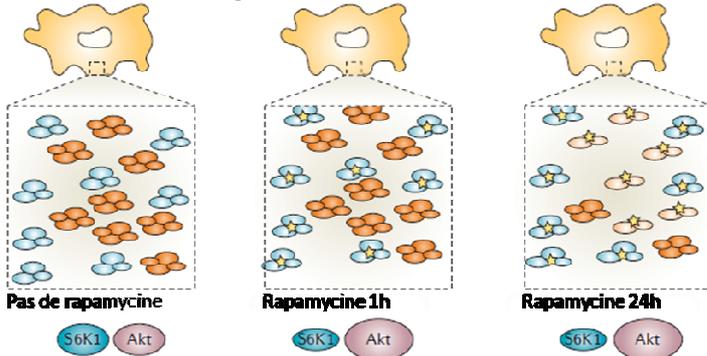


Figure 4 : Deux modèles pour expliquer les variations de l'expression d'Akt après un traitement à long par de la rapamycine.[47]

Pour expliquer ce phénomène, Sabatini propose les modèles suivants. Dans le premier modèle, mTORC2 est sensible à la rapamycine. 24 h après un traitement par rapamycine, il ne reste plus de mTORC2 intact dans la cellule. Ainsi il n'y a plus de phosphorylation d'Akt et son activité diminue. 1h après traitement, seul mTORC1 est inhibé ce qui conduit à lever l'inhibition sur IRS, ce qui active la voie PI3K/Akt. Ici, l'activité d'Akt est stimulée par un traitement court à la rapamycine mais inhibée par un traitement prolongé. Dans le second modèle, l'activité d'Akt est aussi augmentée au bout d'1h de traitement mais mTORC2 n'est pas complètement sensible au traitement et quelques complexes restent intacts dans la cellule, même avec un traitement prolongé. Seulement 20% des cancers seraient sur le premier modèle, il est donc important de bien caractériser une tumeur sur le plan moléculaire pour utiliser au mieux l'arsenal thérapeutique (Figure 4) [47].

## CONCLUSION et PERSPECTIVES

Au cours de ces travaux de thèse, deux nouveaux nano-vecteurs ont été synthétisés dans l'objectif d'augmenter la sensibilité des glioblastomes à l'irradiation. Deux stratégies ont été développées :

- Dans la première, nous avons développé un outil de radiothérapie interne vectorisé au moyen des 12G5-LNC<sup>188</sup>Re.

Nous avons montré que l'association d'un anticorps bloquant à une nanocapsule lipidique n'altérait pas les capacités de reconnaissance de son récepteur CXCR4. Une fois injecté par CED dans des cerveaux de souris porteuses de glioblastome CXCR4+, les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re sont plus fortement retenues dans les zones qui expriment le récepteur que les IgG2a-LNC<sup>188</sup>Re, étiquetées avec l'immunoglobuline contrôle. Nous en avons conclu que l'irradiation générée par les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re devait être plus importante au niveau de la zone ciblée, ce qui c'est effectivement traduit par une augmentation de la médiane de survie des animaux traités avec les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re.

Cependant, même si ces résultats sont encourageants, les 12G5-LNC<sup>188</sup>Re n'ont pas permis de guérir les animaux traités, tout du moins dans les conditions où nous les avons administrées. Il semble donc intéressant de tester l'efficacité de cet objet en association avec un inhibiteur de CXCR4 et de CXCR7. Le traitement par 12G5-LNC<sup>188</sup>Re serait donné à J12 et serait suivi d'une consolidation par les deux inhibiteurs de CXCR4 et CXCR7 de manière à inhiber l'influx de macrophage CD11b+ et empêcher la vasculogénèse au niveau de la tumeur. Le traitement de consolidation pourrait être donné pendant 21 jours post-irradiation, comme dans l'étude de Brown, qui a démontré l'efficacité de ce protocole [13, 18, 49]. Il serait possible aussi de tester l'efficacité des 12G5-LNC<sup>188</sup>Re dans un modèle immunocompétent, comme par exemple des tumeurs GL261 (gliome de souris) dans des souris C57/black 6.

Il serait aussi intéressant de comparer les profils d'élimination et la pharmacocinétique des 12G5-LNC<sup>188</sup>Re avec l'anticorps 12G5 directement couplé au rhénium.

- Dans la seconde stratégie, nous avons développé une nanoparticule contenant de la rapamycine, un inhibiteur de mTORC1.

Nous avons montré que même encapsulée, la rapamycine conservait ses propriétés d'inhibiteur de mTORC1. Cependant, elle induisait aussi une inhibition de HIF-1 $\alpha$  et aussi et surtout, une augmentation de l'activation d'Akt. Dans les conditions où nous avons utilisé ce vecteur, nous n'avons donc pas observé de radio-sensibilisation.

Cependant, dans une étude similaire, Eshleman *et al.* ne constatent pas non plus un effet radio-sensibilisant de la rapamycine sur les U87MG *in vitro*, cependant ils montrent qu'elle potentialise l'effet d'une irradiation fractionnée dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Notre objet pourrait donc avoir une efficacité *in vivo* [37].

Son utilisation dans le glioblastome pourrait être renforcée par des inhibiteurs d'Akt ou de PI3K. Enfin, son efficacité pourrait être recherchée dans d'autres applications comme le traitement du lymphome, l'immunosuppression ou l'inhibition de l'angiogénèse.

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis de développer des outils efficaces dans l'objectif d'améliorer la radio-sensibilisation des glioblastomes. Ce travail illustre aussi toute la difficulté de

---

développer de nouvelles thérapies contre le cancer. En effet, les traitements de thérapie ciblée doivent prendre en compte toute la complexité qui existe au niveau de la cellule cancéreuse elle-même, ses mécanismes de régulation, de survie et de résistance, et l'intégrer au sein de son microenvironnement.

---

## Références

1. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. New England Journal of Medicine, 2005. **352**(10): p. 987-996.
2. Schonberg, D.L., et al., *Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy*. Molecular aspects of medicine, 2013.
3. Vuillez, J.-P., *Radiothérapie métabolique: état et perspectives*. Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique, 2005. **29**(4): p. 247-256.
4. Allard, E., et al., *Re-188-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2008. **35**(10): p. 1838-1846.
5. Hureauux, J., et al., *Lipid nanocapsules: Ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. **73**(2): p. 239-246.
6. Vonarbourg, A., et al., *The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules*. Biomaterials, 2009. **30**(18): p. 3197-3204.
7. Garcion, E., et al., *A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats*. Molecular Cancer Therapeutics, 2006. **5**(7): p. 1710-1722.
8. Roger, E., et al., *Reciprocal competition between lipid nanocapsules and P-gp for paclitaxel transport across Caco-2 cells*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. **40**(5): p. 422-429.
9. Lamprecht, A. and J.P. Benoit, *Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition*. Journal of Controlled Release, 2006. **112**(2): p. 208-213.
10. Paillard, A., et al., *The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability*. Biomaterials, 2010. **31**(29): p. 7542-7554.
11. Ehtesham, M., et al., *CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells*. Cancer Letters, 2009. **274**(2): p. 305-312.
12. Wuerth, R., et al., *CXCL12 modulation of CXCR4 and CXCR7 activity in human glioblastoma stem-like cells and regulation of the tumor microenvironment*. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2014. **8**.
13. Tseng, D., D.A. Vasquez-Medrano, and J.M. Brown, *Targeting SDF-1/CXCR4 to inhibit tumour vasculature for treatment of glioblastomas*. British Journal of Cancer, 2011. **104**(12): p. 1805-1809.
14. Kioi, M., et al., *Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice*. Journal of Clinical Investigation, 2010. **120**(3): p. 694-705.
15. Vanpouille-Box, C., et al., *Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with Re-188-lipid nanocapsules*. Biomaterials, 2011. **32**(28): p. 6781-6790.
16. Bourseau-Guilmain, E., et al., *Development and characterization of immuno-nanocarriers targeting the cancer stem cell marker AC133*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. **423**(1): p. 93-101.

17. Miao, Z., et al., *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(40): p. 15735-15740.
18. Walters, M.J., et al., *Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats*. British Journal of Cancer, 2014. **110**(5): p. 1179-1188.
19. Foss, F.M., et al., *Phase I study of the pharmacokinetics of a radioimmunoconjugate, Y-90-T101, in patients with CD5-expressing leukemia and lymphoma*. Clinical Cancer Research, 1998. **4**(11): p. 2691-2700.
20. Witzig, T.E., et al., *Phase I/II trial of IDEC-Y2B8 radioimmunotherapy for treatment of relapsed or refractory CD20(+) B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. Journal of Clinical Oncology, 1999. **17**(12): p. 3793-3803.
21. Juweid, M., et al., *Pharmacokinetics, dosimetry and toxicity of rhenium-188-labeled anti-carcinoembryonic antigen monoclonal antibody, MN-14, in gastrointestinal cancer*. Journal of Nuclear Medicine, 1998. **39**(1): p. 34-42.
22. Lepareur, N., et al., *A kit formulation for the labelling of lipiodol with generator-produced Re-188*. Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals, 2004. **47**(12): p. 857-867.
23. Heurtault, B., et al., *A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers*. Pharmaceutical Research, 2002. **19**(6): p. 875-880.
24. Beduneau, A., P. Saulnier, and J.P. Benoit, *Active targeting of brain tumors using nanocarriers*. Biomaterials, 2007. **28**(33): p. 4947-4967.
25. Illum, L., *Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **11**(1): p. 1-18.
26. Thorne, R.G., et al., *Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration*. Neuroscience, 2004. **127**(2): p. 481-496.
27. Eavarone, D.A., X.J. Yu, and R.V. Bellamkonda, *Targeted drug delivery to C6 glioma by transferrin-coupled liposomes*. Journal of Biomedical Materials Research, 2000. **51**(1): p. 10-14.
28. Beduneau, A., et al., *Brain targeting using novel lipid nanovectors*. Journal of Controlled Release, 2008. **126**(1): p. 44-49.
29. Chang, J., et al., *Transferrin Adsorption onto PLGA Nanoparticles Governs Their Interaction with Biological Systems from Blood Circulation to Brain Cancer Cells*. Pharmaceutical Research, 2012. **29**(6): p. 1495-1505.
30. Laine, A.-L., et al., *Brain tumors: convection-enhanced delivery of drugs (Method)*. Tumors of the central nervous system, 2011. **3**: p. 207-216.
31. Kunwar, S., et al., *Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma*. Neuro Oncol, 2010. **12**(8): p. 871-881.
32. Linninger, A.A., et al., *Prediction of convection-enhanced drug delivery to the human brain*. Journal of Theoretical Biology, 2008. **250**(1): p. 125-138.
33. Sampson, J.H., et al., *Clinical utility of a patient-specific algorithm for simulating intracerebral drug infusions*. Neuro Oncol, 2007. **9**: p. 343-353.
34. Hainsworth, J., et al., *Phase II study of concurrent radiation therapy, temozolomide, and bevacizumab followed by bevacizumab/everolimus as first-line treatment for patients with glioblastoma*. Clin Adv Hematol Oncol., 2012 Apr. **10**(4): p. 240-6.

35. Sarbassov, D.D., et al., *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB*. *Molecular Cell*, 2006. **22**(2): p. 159-168.
36. Brugarolas, J., et al., *Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex*. *Genes & Development*, 2004. **18**(23): p. 2893-2904.
37. Eshleman, J.S., et al., *Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 Xenografts to fractionated radiation therapy*. *Cancer Research*, 2002. **62**(24): p. 7291-7297.
38. Hudson, C.C., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin*. *Molecular and Cellular Biology*, 2002. **22**(20): p. 7004-7014.
39. Tremblay, F., et al., *Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(35): p. 14056-14061.
40. O'Reilly, K.E., et al., *mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt*. *Cancer Research*, 2006. **66**(3): p. 1500-1508.
41. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. *Science*, 2005. **307**(5712): p. 1098-1101.
42. Carracedo, A., et al., *Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer*. *Journal of Clinical Investigation*, 2008. **118**(9): p. 3065-3074.
43. Galanis, E., et al., *Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: A north central cancer treatment group study*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(23): p. 5294-5304.
44. Chang, S.M., et al., *Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme*. *Investigational New Drugs*, 2005. **23**(4): p. 357-361.
45. Atkins, M.B., et al., *Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. **22**(5): p. 909-918.
46. Witzig, T.E., et al., *Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma*. *Journal of Clinical Oncology*, 2005. **23**(23): p. 5347-5356.
47. Sabatini, D.M., *mTOR and cancer: insights into a complex relationship*. *Nature Reviews Cancer*, 2006. **6**(9): p. 729-734.
48. Phung, T.L., et al., *Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin*. *Cancer Cell*, 2006. **10**(2): p. 159-170.
49. Brown, J.M., *Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy*. *British Journal of Radiology*, 2014. **87**(1035).



# Thèse de Doctorat

Delphine SEHEDIC

## Développement de nouvelles stratégies en nanomédecine pour le ciblage et la radiosensibilisation des cellules cancéreuses de type souche dans le glioblastome

### Résumé

Le glioblastome est la forme la plus commune et la plus mortelle de tumeur cérébrale chez l'adulte. La prise en charge thérapeutique conventionnelle de ce cancer consiste en une exérèse chirurgicale de la tumeur suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie par témozolomide (Temodal®). En dépit de ces traitements pourtant agressifs, la plupart des patients rechutent et leur survie n'excède généralement pas 15 mois.

Plusieurs études ont été menées afin de comprendre les mécanismes qui conduisent à une résistance de la tumeur vis-à-vis de ces traitements et récemment, un contingent cellulaire appelé cellule souche de gliome (CSG) a été mis en évidence.

L'objectif de cette thèse a été de développer un nanovecteur capable de cibler ces CSGs afin de concentrer l'efficacité de la radiothérapie au niveau des cellules radio-résistantes et notamment des cellules CXCR4-positives impliquées dans la prolifération, la migration cellulaire et la résistance à l'apoptose. Pour cela, nous avons développé des nanocapsules lipidiques (LNC) contenant du rhénium-188 (<sup>188</sup>Re), un émetteur bêta -, et fonctionnalisées au moyen d'un anticorps bloquant (12G5) dirigé contre le récepteur à chimiokine CXCR4. L'efficacité de cet objet a été testée dans un modèle orthotopique de glioblastome humain chez la souris et nous avons montré que les souris traitées avec ces LNC-<sup>188</sup>Re couplées au 12G5 présentent les meilleures médianes de survie.

En parallèle de ce travail, nous avons conçu un autre nanovecteur contenant de la rapamycine, un inhibiteur de la voie PI3K/Akt/mTOR impliquée dans la radio-résistance et seulement soluble dans des solvants organiques. L'efficacité de ce vecteur à rendre la rapamycine biodisponible au niveau cellulaire et à bloquer la voie mTOR a été validée *in vitro*. Son activité antitumorale propre et son rôle en tant que radiosensibilisant ont de plus été caractérisés en amont d'investigations précliniques.

En conclusion, cette thèse a permis de développer un outil de radiothérapie interne dans le cadre d'une thérapie ciblée dans le glioblastome. Nous avons pour la première fois montré que des LNC-<sup>188</sup>Re couplées à un anticorps présentent un intérêt dans le traitement du glioblastome.

**Mots clés :** Glioblastome, radiosensibilisation, rhénium, rapamycine, nanocapsules lipidiques

### Abstract

Glioblastoma is the most common and deadly primarily brain tumor in adult. Conventional therapy consists on a surgical resection of the tumor followed by radiotherapy and chemotherapy. Despite these treatments, most patients relapse.

These recurrences have recently been assigned to radio-chemotherapeutic resistant cell contingents called glioblastoma stem-cells (GSCs).

The aim of this thesis was to develop nanovector targeting these GSCs CXCR4 positive cells implicated in proliferation, cell migration and apoptosis resistance. Then, we have developed lipid nanocapsules (LNC) loaded with rhenium-188 (<sup>188</sup>Re), a beta-emitter, and functionalized with a blocking antibody (12G5) directed to CXCR4. Nanovector efficiency was evaluated in an orthotopic human glioblastoma mice model and we showed that 12G5-LNC<sup>188</sup>Re treated mice had the best median survival.

Concurrently of this study, we have developed another nanovector loaded with rapamycin, an inhibitor of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway implicated in radioresistance and only soluble in organic solvents. Efficiency of this new nanovector to improve rapamycin bioavailability and to block mTOR phosphorylation was assessed *in vitro*. Its own antitumor activity and its role as radiosensitizer have been evaluated in up-stream of preclinical studies.

To conclude, this thesis allowed the development of a new tool for vectorized internal radiotherapy in glioblastoma. We have shown for the first time that LNC-<sup>188</sup>Re functionalized with a blocking antibody present an interest in glioblastoma therapy.

**Key Words:** Glioblastoma, radiosensitization, rhenium, rapamycin, lipid nanocapsules.