



HAL
open science

Développement de stratégies de vectorisation pour réduire les effets de l'hypoxie dans les glioblastomes

Clement Anfray

► **To cite this version:**

Clement Anfray. Développement de stratégies de vectorisation pour réduire les effets de l'hypoxie dans les glioblastomes. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC409 . tel-01948497

HAL Id: tel-01948497

<https://theses.hal.science/tel-01948497>

Submitted on 7 Dec 2018

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

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



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Développement de stratégies de vectorisation pour réduire les effets de l'hypoxie dans les glioblastomes.

**Présentée et soutenue par
Clément Anfray**

**Thèse soutenue publiquement le 6 octobre 2017
devant le jury composé de**

Dr. Delphine Felder-Flesch	DR, CNRS, Université de Strasbourg	Rapporteur
Pr. Jean-Marc Constans	PU-PH, CHU d'Amiens	Rapporteur
Dr. Sophie Pinel	MC, Université de Lorraine, Nancy	Examineur
Dr. Svetlana Mintova	DR, CNRS, Université de Caen Normandie	Examineur
Dr. Samuel Valable	CR, CNRS, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
Dr. Karim Bordji	IR, CNRS, Université de Caen Normandie	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par le Dr. Samuel Valable et le Dr. Karim Bordji, ISTCT - FRE2001, équipe CERVOxy



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



EdNBISE

Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



IMAGERIE & STRATÉGIES
THÉRAPEUTIQUES DES PATHOLOGIES
CÉRÉBRALES & TUMORALES

TABLE DES MATIERES

Table des matières	1
Liste des figures	5
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	11
Avant-propos	13
Introduction	15
I. Les Glioblastomes	15
A. Du diagnostic au pronostic : les données cliniques	15
B. Classification des gliomes par l'Organisation Mondiale de la Santé	16
C. La prise en charge thérapeutique des patients	18
1. L'exérèse tumorale	18
2. La radiothérapie	18
3. La chimiothérapie	20
4. Les nouvelles approches thérapeutiques	20
D. Physiopathologie des glioblastomes	21
1. La cellule tumorale	21
2. La vascularisation : un point faible des glioblastomes ?	26
3. Le microenvironnement tumoral	31
II. L'hypoxie	33
A. Généralités sur l'hypoxie dans les glioblastomes	33
1. Définition des niveaux d'oxygène	33
2. Ses causes au niveau tumoral	34
3. La mesure de l'hypoxie intra-tissulaire	35
4. L'hypoxie est un facteur de mauvais pronostic pour les patients	38
B. Le facteur de transcription HIF	38
1. Effets moléculaires d'une diminution de l'oxygène	39
2. Les gènes cibles de HIF	40
C. Les conséquences de l'hypoxie : physiopathologie	41
1. A l'échelle cellulaire	41
2. A l'échelle tissulaire	44
D. La résistance à la radiothérapie	45
1. Généralités	45
2. Les effets physico-chimiques et l'effet oxygène	46
3. La résistance tumorale à la radiothérapie	47
4. Les approches de radio-sensibilisation	48

III. Stratégies de vectorisation passive	53
A. Les nanoparticules pour le traitement des cancers	53
1. Définitions des nanoparticules	53
2. Les propriétés des nanoparticules	54
3. Les différents types de nanoparticules	58
4. Les nanoparticules d'argent	60
5. Nanoparticules et cancer	61
6. Les stratégies de réoxygénation par les nanoparticules	62
7. La nanoparticule idéale pour le traitement des cancers	63
B. Les zéolithes	64
1. Introduction aux Zéolithes	64
2. Structure	65
3. Synthèse et modification post-synthèse	67
4. Les propriétés et les applications des zéolithes	68
IV. Stratégies de vectorisation active : utilisation d'un « cheval de troie »	73
A. Stratégie de vectorisation active : la thérapie cellulaire	74
B. L'érythropoïétine	75
1. Généralités	75
2. Le récepteur de l'EPO	76
3. Implication de l'érythropoïétine dans les tumeurs	77
V. Conclusions de l'introduction	80
Objectifs	83
Matériels & Méthodes	85
I. Constructions moléculaires	85
II. Synthèse des zéolithes	86
III. Méthodologie in vitro	86
A. Culture cellulaire	86
1. Lignées cellulaires	86
2. Cultures primaires d'astrocytes	87
3. Cultures primaires de neurones/astrocytes corticaux	88
4. Culture de bactéries	88
5. Transfections cellulaires	88
6. Exposition aux nanozéolithes	88
B. Tests de toxicité	89
1. Évaluation de la viabilité cellulaire	89
2. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	89
3. Test de formation des micronoyaux	90

4. Détermination des cassures double-brin de l'ADN : immunocytochimie γ H2AX	90
C. PCR en temps réel	91
IV. Expérimentation animale	91
A. Etude des paramètres physiologiques après injection de zéolithes chez des animaux sains	92
B. Modèles orthotopiques de glioblastome	93
V. Imagerie par résonance magnétique	94
A. Mesures de relaxivité	94
B. Imagerie du volume tumoral	95
C. Détection des Fe-X et des Gd-X par IRM	95
D. Cartes de volume sanguin cérébral et de saturation en oxygène	95
VI. Analyses Statistiques	96
Résultats	97
I. Développement de constructions inductibles par l'hypoxie pour l'inhibition de l'érythropoïétine dans les glioblastomes	97
A. Objectifs	97
B. Expression de l'EPORT inductible par l'hypoxie	99
C. Vectorisation de l'EPORT par les macrophages	102
D. Conclusions & discussion	104
II. Utilisation de nanovecteurs de thérapies gazeuses pour réoxygéner les glioblastomes	106
A. Etude de la toxicité des nanozéolithes	108
1. Les particules d'argent libres ou encapsulées dans des nanozéolithes présentent une toxicité aigüe pour les cellules eucaryotes (article 1)	108
2. Etude de la toxicité des zéolithes de type FAU	117
3. Conclusions et discussion	121
B. Etude de l'affinité des nanozéolithes vis-à-vis des gaz	122
1. Synthèse de zéolithes de type EMT avec une grande affinité pour le CO ₂ et le NO (Article 2)	123
2. Etude de l'affinité des zéolithes de type FAU vis-à-vis de l'oxygène et du CO ₂	133
3. Conclusions et discussion	139
C. Utilisation de nanozéolithes X contenant des atomes métalliques pour diminuer l'hypoxie dans des tumeurs cérébrales agressives (Article 3)	139
1. Avant-propos de l'article 3	139
2. Article 3	141
3. Informations supplémentaires de l'article 3	162
4. Vectorisation de carbogène et Radiothérapie	168

Discussion Générale & Perspectives	171
I. Inhibition des effets de l'hypoxie par ciblage actif de l'EPO par les macrophages	172
II. Réoxygénation tumorale par vectorisation passive de gaz hyperoxiques	174
III. Conclusion générale	179
Bibliographie	181
Annexe 1	197
Annexe 2	205

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Les tumeurs primaires malignes du système nerveux central aux États-Unis entre 2008 et 2012.	15
Figure 2 Classification des sous-types de glioblastomes.	17
Figure 3 Le diagnostic du glioblastome.	18
Figure 4 L'irradiation conformationnelle permet d'obtenir un compromis entre l'efficacité et la toxicité.	19
Figure 5 La prise en charge thérapeutique des patients.	20
Figure 6 Les facteurs d'hétérogénéité de la tumeur.	23
Figure 7 Origine cellulaire du glioblastome.	23
Figure 8 Le métabolisme des cellules tumorales.	24
Figure 9 Les différentes voies d'invasion.	26
Figure 10 La vascularisation tumorale.	28
Figure 11 La barrière hémato-encéphalique.	28
Figure 12 Les différents médiateurs vasculaires fréquemment exprimés dans les cancers et participant à l'effet EPR.	29
Figure 13 Ciblage passif par le biais de l'effet EPR.	30
Figure 14 La perméabilité vasculaire augmente avec le grade du gliome.	30
Figure 15 Dialogue entre les macrophages et le gliome.	32
Figure 16 L'hypoxie aiguë et chronique.	34
Figure 17 La mise en place du gradient d'oxygène durant le développement tumoral.	35
Figure 18 Quantification de la saturation en oxygène à partir du signal BOLD.	37
Figure 19 Corrélation entre la captation de [¹⁸ F]-FMISO, le grade des gliomes et la survie des patients.	37
Figure 20 Structure des sous-unités HIF.	38
Figure 21 Détection de l'oxygène par la cellule.	39
Figure 22 L'expression de HIF-1α dans le glioblastome est associée à un faible pronostic pour le patient.	41
Figure 23 Hypoxie et adaptation métabolique.	42
Figure 24 Les niches pour cellules souches cancéreuses.	43
Figure 25 Les foyers nécrotiques dans les glioblastomes.	44
Figure 26 Relation entre la distance aux vaisseaux, le pH et la pression en oxygène.	45
Figure 27 La réponse biologique de la cellule aux rayonnements ionisants.	46

Figure 28 L'effet des rayonnements ionisants est dépendant de l'oxygène.....	48
Figure 29 L'effet Auger.	49
Figure 30 Un outil théranostique pour les tumeurs cérébrales : l'exemple des AgulX®.	50
Figure 31 Courbe de survie des patients atteints de glioblastome dans l'étude ARCON.	52
Figure 32 L'inhalation de carbogène a une efficacité limitée pour réoxygéner le glioblastome.....	52
Figure 33 Exemples de nanoparticules à base de carbone.....	53
Figure 34 Les principales propriétés des nanoparticules influençant leur biodistribution, leur élimination et leur ciblage.	54
Figure 35 Endocytose de nanoparticules.	54
Figure 36 Potentiel ζ des nanoparticules.	56
Figure 37 Les propriétés des nanoparticules influencent leurs effets biologiques. ...	58
Figure 38 Exemples de nanoparticules.....	59
Figure 39 Conceptualisation d'une nanoparticule idéale.	63
Figure 40 Différents types de zéolithes naturelles et synthétiques.	64
Figure 41 Les zéolithes, véritables tamis moléculaires.	65
Figure 42 Structure des zéolithes.	66
Figure 43 Schéma général de la synthèse des zéolithes.	67
Figure 44 Les applications des zéolithes.	68
Figure 45 Mécanisme de porte dépendant des cations pour la sélectivité des zéolithes vis-à-vis du CO ₂	69
Figure 46 Cristallisation de zéolithes de type EMT.	71
Figure 47 Les avantages des monocytes/macrophages pour la vectorisation cellulaire.	75
Figure 48 Les différentes formes du récepteur à l'érythropoïétine.....	76
Figure 49 L'érythropoïétine et son récepteur sont exprimés dans les régions hypoxiques des glioblastomes.	78
Figure 50 Les effets et les mécanismes de la signalisation EPO/EPOR dans les tumeurs.....	78
Figure 51 La surexpression de l'EPOR permet un contrôle de la tumeur.....	79
Figure 52 Le cycle cellulaire en cytométrie en flux.	89
Figure 53 Saturation des zéolithes en gaz et suivi physiologique des animaux.	93
Figure 54 Protocole expérimental pour l'acquisition des cartes de volume sanguin cérébral et de saturation en oxygène.	96

Figure 55 Représentation schématique du lien entre l'hypoxie et la synthèse d'EPO, la prolifération cellulaire, la résistance aux traitements et le tropisme pour les macrophages.	97
Figure 56 Schéma représentatif du principe de fonctionnement des constructions inductibles par l'hypoxie.	98
Figure 57 Schéma représentatif de la stratégie de mise au point de constructions inductibles par l'hypoxie pour l'inhibition de l'érythropoïétine dans les glioblastomes. ...	99
Figure 58 Expression de l'érythropoïétine dans les cellules de gliomes U87-MG et U251-MG.	100
Figure 59 Expression inductible par l'hypoxie du gène de l'EPOR.	101
Figure 60 Vectorisation de l'EPOR par des macrophages.	102
Figure 61 Effet de la vectorisation de l'EPOR par des macrophages (THP1) sur la prolifération de cellules de gliome (U251-MG) <i>in vitro</i>	103
Figure 62 Relation entre hypoxie et présence de macrophages dans les modèles de glioblastome U87 et U251.	105
Figure 63 Structure des zéolithes FAU et EMT.	107
Figure 64 Effet des nanozéolithes de type FAU contenant différents cations sur la croissance de bactéries (Gram négatif) <i>Escherichia Coli</i>	118
Figure 65 Viabilité cellulaire après exposition aux nanozéolithes.	120
Figure 66 Capacité de sorption des zéolithes Na-X, Gd-X et Fe-X vis-à-vis du CO ₂	135
Figure 67 Capacité de sorption des zéolithes Na-X et Gd-X vis-à-vis de l'oxygène.	136
Figure 68 Libération de l'oxygène par les nanocristaux de zéolithes.	138
Figure 69 La vectorisation de carbogène par les zéolithes influence-t-elle l'efficacité de la radiothérapie ?.....	169
Figure 70 Proposition de mécanisme pour la libération de l'oxygène.	176
Figure 71 La vectorisation ciblée de CO ₂ permet d'augmenter le volume sanguin dans la tumeur de manière plus importante par rapport à l'inhalation de carbogène.	179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Les critères anatomopathologiques qui gouvernent l'attribution du grade des gliomes.....	16
Tableau 2 Pressions normales en oxygène dans quelques organes humains.....	33
Tableau 3 Définitions des niveaux d'oxygène.....	33
Tableau 4 Exemples de gènes cibles de HIF-1 α et HIF-2 α	40
Tableau 5 Coordonnées stéréotaxiques pour l'implantation de tumeurs dans le striatum droit de rats et souris.	93
Tableau 6 Valeurs de concentration inhibitrice médiane (IC50, en $\mu\text{g/ml}$) des zéolithes Na-X, Gd-X et Fe-X sur différents types cellulaires après 96h d'exposition.	121

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FU: 5-Fluorouracil	EMT: <i>Elf Mulhouse Two</i>
ADN: Acide désoxyribonucléique	EPI: <i>Echo Planar Imaging</i>
Ag-NP: Nanoparticule d'argent	EPO: Erythropoïétine
ARCON: <i>Accelerated Radiotherapy with Carbogen and Nicotinamide</i>	EPOR: Récepteur à l'érythropoïétine
ARNm: Acide ribonucléique messenger	EPORF: Récepteur à l'érythropoïétine entier
ARNT: <i>Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>	EPORF: Récepteur à l'érythropoïétine tronqué
ATCC: <i>American Type Culture Collection</i>	EPR: <i>Enhanced Permeability and Retention</i>
ATP: Adénosine triphosphate	FAIR-RARE: <i>Flow Sensitive Alternating Inversion Recovery and Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement</i>
BHE: Barrière Hémato-Encéphalique	FAU: Faujasite
BOLD: <i>Blood Oxygen Level-Dependent</i>	FLASH: <i>Fast Low Angle Shot</i>
BSA: Albumine de sérum bovin	FMISO: Fluoromisonidazole
CAF: <i>Cancer Associated Fibroblasts</i>	FTIR: <i>Fourier Transform InfraRed spectroscopy</i>
CAIX: Anhydrase carbonique 9	GB: Glioblastome
CBV: Volume sanguin cérébral	GFAP: <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
CSC: Cellules souche cancéreuse	γH2AX: Phospho-Histone H2A.X
CSG: Cellules souche de gliome	GLUT: Transporteur du glucose 1
CSM: Cellule souche mésenchymateuse	Hb: Hémoglobine
CSN: Cellule souche neurale	HIF: <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	HRE: <i>Hypoxia Response Element</i>
dSVF: Sérum de Veau foetal décomplémenté	HSV-tk: <i>Herpes Simplex Virus thymidine kinase</i>
E.Coli: Escherichia Coli	IDH1: Isocitrate déshydrogénase-1
EGFR: Récepteur de l' <i>Epidermal Growth Factor</i>	

LISTE DES ABREVIATIONS

IGF: Facteur dérivé de l'insuline	pO₂: Pression en oxygène
IP: Iodure de propidium	ptO₂: Pression tissulaire en oxygène
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique	pVHL: protéine de von Hippel-Lindau
JAK/STAT: <i>Janus kinase/ Signal Transducer and Activator of Transcription</i>	qBOLD: BOLD quantitatif
LB: <i>Lysogeny broth</i>	qPCR: Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel
LTA: <i>Linde Type A</i>	RES: Système réticulo-endothélial
MAPK: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>	RPMI: <i>Roswell Park Memorial Institute's medium</i>
MCT: <i>MonoCarboxylate Transporter</i>	RT: Radiothérapie
MEC: Matrice Extra-Cellulaire	SatO₂: Saturation en oxygène
MGMT: <i>O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase</i>	sEPOR: Récepteur à l'érythropoïétine soluble
MMP2: <i>Matrix Metalloproteases 2</i>	SNC: Système Nerveux Central
MSME: <i>Multi-Slice Multi-Echo</i>	SPION: <i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
NEX: Nombre d'expériences	S-TRAIL: <i>Soluble-Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand</i>
NF-κB: <i>Nuclear Factor κB</i>	TAA⁺: Cation tetraalkylammonium
NP: Nanoparticule	TAM: <i>Tumor Associated Macrophage</i>
OER: <i>Oxygen Enhancement Ratio</i>	TE: Temps d'écho
OMS: Organisation Mondiale de la Santé	TEP: Tomographie par Emission de Positons
PBS: Tampon Phosphate	TI: Temps d'Inversion
pCO₂: Pression en CO ₂	TMZ: Témazolomide
PDGF: Facteur de croissance dérivé des plaquettes	TR: Temps de répétition
PFA: Paraformaldéhyde	VEGF: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
PHD: <i>Prolyl Hydroxylases Domain</i>	
PI3K/Akt: <i>Phosphatidylinositol-3-kinases/ Protein kinase B</i>	

AVANT-PROPOS

Les glioblastomes (GB) sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes et les plus agressives chez l'adulte. A l'heure actuelle, malgré l'arsenal thérapeutique déployé pour traiter les patients, le pronostic reste très sombre puisque la médiane de survie ne dépasse pas 15 mois (Chinot *et al.* 2014). Améliorer la prise en charge thérapeutique reste donc actuellement un enjeu de santé publique majeur.

L'hypoxie, définie comme une inadéquation entre l'apport en oxygène et sa consommation, est une des caractéristiques majeures des GB (Spence *et al.* 2008). Elle favorise la croissance de la tumeur et participe à la résistance aux traitements, notamment à la radiothérapie (RT).

Ainsi, plusieurs stratégies ont été mises au point pour tenter de réoxygéner ces tumeurs, telles que l'utilisation de carbogène, un gaz composé d'oxygène (95%) et de CO₂ (5%). Bien que cette stratégie se soit révélée efficace dans des essais cliniques pour certains types de tumeurs, les résultats se sont avérés décevants dans le cadre des GB (Kaanders *et al.* 2002). Il est apparu que le carbogène ne parvient pas à réoxygéner le tissu tumoral et, au contraire, augmente l'oxygénation du tissu sain.

L'hypoxie induit également l'expression de facteurs conduisant à des adaptations de la part des cellules tumorales favorisant la croissance et la résistance aux traitements de la tumeur (Aguilera & Giaccia 2015). Parmi ces facteurs, l'érythropoïétine (EPO) est synthétisée et il a été montré que l'activation des voies de signalisation induite par la fixation de l'EPO sur son récepteur (EPOR) favorise la croissance de la tumeur ainsi que sa résistance aux traitements conventionnels (Pérès *et al.* 2011, 2014). Cibler la signalisation EPO/EPOR pourrait donc représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour les GB. Cependant, bien que plusieurs inhibiteurs de l'EPO aient été développés, une inhibition non spécifique et systémique de l'EPO serait problématique en raison du rôle hématopoïétique de cette cytokine.

L'objectif de ces travaux de thèse est de mettre au point des stratégies thérapeutiques innovantes de vectorisation ciblée dans le cadre des GB, dirigées contre l'hypoxie directement ou contre les effets de l'hypoxie en inhibant l'EPO. Nous proposons donc i) d'utiliser des nanovecteurs de thérapies gazeuses pour réoxygéner les GB et augmenter l'efficacité de la RT et ii) mettre au point des constructions inductibles par l'hypoxie véhiculées par des macrophages pour inhiber, l'EPO spécifiquement dans les GB.

La première partie de l'introduction s'intéresse à la description des GB, depuis les données cliniques jusqu'à leur physiopathologie. L'enjeu est de comprendre les

caractéristiques et les ressorts de ce type de cancer, qui en font une tumeur hautement agressive et résistante aux traitements.

La deuxième partie de cette introduction se focalise sur cette caractéristique majeure des GB expliquant leur agressivité : l'hypoxie. La mise en place des mécanismes de l'hypoxie, son influence sur la croissance tumorale, et sur l'efficacité de la RT, sont détaillées.

Enfin les troisième et quatrième parties sont consacrées à deux types de vectorisation de thérapies : la vectorisation passive et la vectorisation active. La troisième partie est ainsi consacrée aux nanoparticules et plus particulièrement aux zéolithes. L'objectif ici est de décrire les principales propriétés de ce type de matériau et de montrer en quoi ces nanoparticules semblent extrêmement prometteuses pour un ciblage thérapeutique spécifique dirigé contre l'hypoxie dans les GB. La quatrième partie s'intéresse aux stratégies de vectorisation active, basées sur l'utilisation de cellules vectrices de thérapies. Elle permettra de voir en quoi ce type de stratégie permettrait de cibler et d'inhiber spécifiquement au sein d'une tumeur les facteurs induits par l'hypoxie, comme l'EPO.

INTRODUCTION

I. LES GLIOBLASTOMES

A. DU DIAGNOSTIC AU PRONOSTIC : LES DONNEES CLINIQUES

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes chez l'adulte. Ils représentent 27% des tumeurs primaires du système nerveux central (SNC) et 80% des tumeurs malignes du SNC (Ostrom *et al.* 2015; Schwartzbaum *et al.* 2006). Les gliomes comprennent toutes les tumeurs ayant pour origine une cellule gliale. Cela comprend les astrocytomes, les oligodendrogliomes, les épendymomes et les gliomes mixtes.

Parmi les gliomes, le GB, qui est un sous-type d'astrocytome, en est la forme la plus fréquente. Il compte en effet pour plus de 46% des tumeurs cérébrales primaires malignes (**Figure 1**). Son incidence aux Etats-Unis est de 4 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants avec une prédominance masculine, le ratio homme/femme étant de 1,6 (Ostrom *et al.* 2015). L'âge médian de diagnostic de la tumeur est d'environ 62 ans (Louis *et al.* 2016).

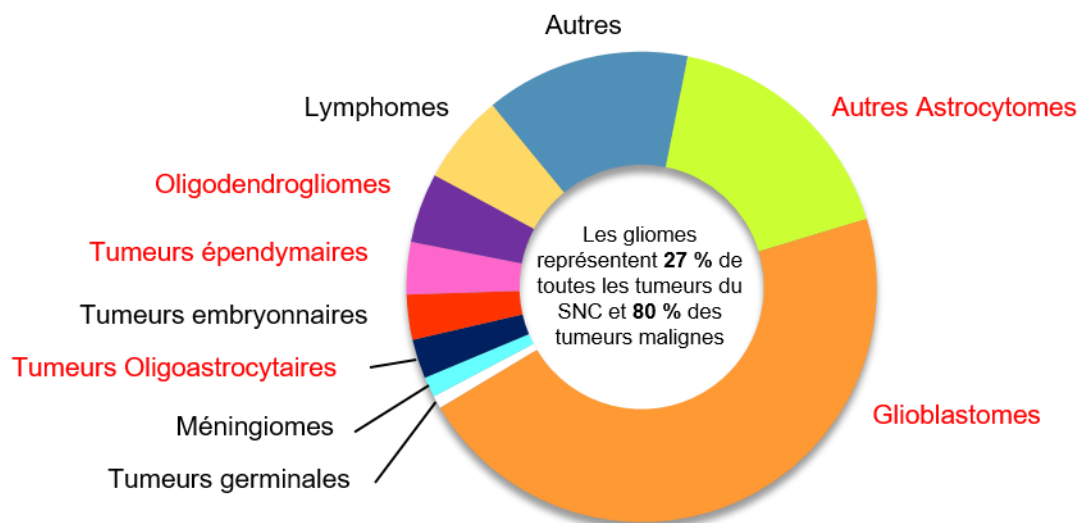


Figure 1 | Les tumeurs primaires malignes du système nerveux central aux États-Unis entre 2008 et 2012. La distribution est basée sur des critères histologiques. En rouge, les gliomes. Adapté de Ostrom *et al.* 2015.

Les GB comptent également parmi les tumeurs les plus agressives. La médiane de survie après le diagnostic ne dépasse pas 15 mois, malgré l'arsenal thérapeutique employé pour traiter les patients (Chinot *et al.* 2014). Enfin, le coût moyen de prise en charge thérapeutique était de 78 355 € par patient en 2011 en France (Henaine *et al.* 2016) pour un gain d'espérance de vie faible par rapport à des patients non traités.

B. CLASSIFICATION DES GLIOMES PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

Les gliomes étant un groupe de tumeurs hétérogène, des classifications ont été établies afin d'harmoniser le diagnostic à travers le monde, d'améliorer la prise en charge des patients et de permettre une détermination plus fiable du pronostic et de la réponse au traitement. La classification la plus répandue est celle établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Celle-ci est basée à la fois sur des critères anatomo-pathologiques et des critères moléculaires (Louis *et al.* 2016).

En ce qui concerne les gliomes, ils sont dans un premier temps différenciés en astrocytome, en oligodendrogliome et en gliome mixte en fonction de critères histologiques. Un grade leur est ensuite attribué en fonction de leur degré de malignité, allant du grade I pour les moins agressifs au grade IV. Les grades I et II sont dits de bas grade tandis que les grades III et IV sont de haut grade. Ces grades, résumés dans le **Tableau 1**, sont attribués en fonction de critères anatomopathologiques et concernent l'activité mitotique, l'angiogenèse ou la présence de nécrose.

Tableau 1 | Les critères anatomopathologiques qui gouvernent l'attribution du grade des gliomes. - - - absente, +/- occasionnelle, + modérée, ++ augmentée, +++ élevée. D'après Louis *et al.* 2016.

Tumeur	Grade	Densité cellulaire	Activité mitotique	Angiogenèse	Nécrose
Astrocytome diffus	II	- - -	- - -	- - -	- - -
Oligodendrogliome	II	- - -	+/-	+/-	- - -
Oligoastrocytome	II	- - -	+	- - -	- - -
Astrocytome anaplasique	III	++	+	- - -	- - -
Oligodendrogliome anaplasique	III	++	++	++	+/-
Oligoastrocytome anaplasique	III	++	++	+/-	- - -
Glioblastome IDHmut	IV	+++	+++	++	+
Glioblastome IDHwt	IV	+++	+++	+++	+++

De plus, des sous-types de gliomes ont pu être établis en fonction de critères se basant sur les altérations génétiques et moléculaires non discernables sur le plan histologique. Ces avancées ont ainsi permis de différencier des sous-types de GB : les GB *de novo* ou primaires et les GB secondaires qui évoluent à partir d'un gliome de grade inférieur. Ces deux sous-types de GB se différencient principalement par la présence de mutations sur le gène de l'isocitrate déshydrogénase-1 (IDH1). Les GB primaires possèdent un gène *IDH1* non muté et représentent environ 90% des cas tandis que les GB secondaires présentent un gène *IDH1* muté et représentent environ 10% des cas (Louis *et al.* 2016).

Des mutations sur d'autres gènes sont également trouvées préférentiellement sur l'un des deux sous-types et permettent d'affiner la classification (**Figure 2**).

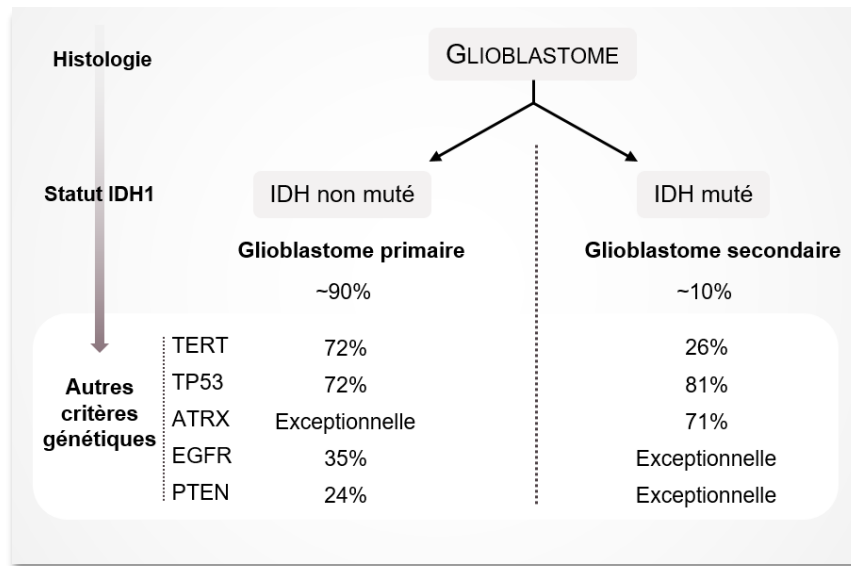


Figure 2 | Classification des sous-types de glioblastomes. D'après Louis *et al.* 2016.

Enfin, d'autres différences génétiques sont observées, ne permettant pas de dégager des sous-types de GB, mais permettant de prédire la réponse aux traitements. Ces marqueurs génétiques sont donc importants dans le cadre de la médecine personnalisée. Deux marqueurs principaux peuvent être cités : la méthylation du promoteur du gène de la *O⁶-alkylguanine DNA alkyltransferase* (MGMT) et la co-délétion 1p/19q. La MGMT est une enzyme impliquée dans la réparation des lésions de l'ADN à la suite d'alkylations. La méthylation du promoteur de son gène, retrouvée dans beaucoup de GB, entraîne son inactivation et sensibilise donc les cellules cancéreuses aux chimiothérapies par agent alkylant. La méthylation du promoteur de la MGMT est donc un facteur de bon pronostic (Hegi *et al.* 2005). Il en va de même pour la co-délétion 1p/19q retrouvée à la fois dans les GB primaires et les GB secondaires et dont il a été montré que la présence améliore la réponse à la chimiothérapie (van den Bent *et al.* 2003).

C. LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES PATIENTS

Les symptômes permettant le diagnostic d'un GB peuvent être variés. Le plus souvent, les premiers signes impliquent des maux de tête intenses causés par une pression intracrânienne élevée et la survenue de crises d'épilepsie ou de déficits neurologiques. Le diagnostic est ensuite posé par imagerie, notamment par imagerie par résonance magnétique (IRM) (**Figure 3**). Le grade du gliome est quant à lui définitivement établi par un anatomopathologiste suivant les critères exposés dans la partie précédente, ce qui nécessite un prélèvement chirurgical du tissu tumoral.

1. L'EXERESE TUMORALE

La première étape de la prise en charge thérapeutique est la chirurgie. Selon la localisation de la tumeur et son accessibilité, la chirurgie peut aller de la biopsie, dans le but d'établir le grade de la tumeur, à la résection totale. Ce dernier cas de figure permet d'augmenter significativement la survie des patients par rapport à ceux pour qui la seule option est la biopsie (McGirt *et al.* 2008). Cependant, le caractère invasif et diffus des GB fait qu'il est impossible de retirer l'ensemble des cellules tumorales après une résection tumorale, même complète, et de ce fait, la récurrence est inévitable. La chirurgie est incontournable pour le traitement de première ligne des GB, ne serait-ce que pour établir précisément le diagnostic. Elle permet également de réduire la pression intracrânienne en réduisant le volume tumoral et ainsi d'atténuer les déficits neurologiques.

2. LA RADIOTHERAPIE

Après la chirurgie, les patients sont traités par RT. La RT est basée sur l'utilisation de rayonnements ionisants focalisés sur les cellules tumorales dans le but d'entraîner des lésions sur leur ADN puis la mort des cellules. Les mécanismes impliqués lors de la RT feront l'objet d'une présentation plus détaillée dans le chapitre II.D.

Cependant, le traitement par RT a des conséquences sur le tissu sain par lequel passe inévitablement le faisceau pour atteindre la tumeur et entraîne des effets secondaires parfois importants pour le patient. On distingue les effets aigus, qui se manifestent par la survenue d'œdèmes et de fatigue chez le patient, des effets tardifs responsables de

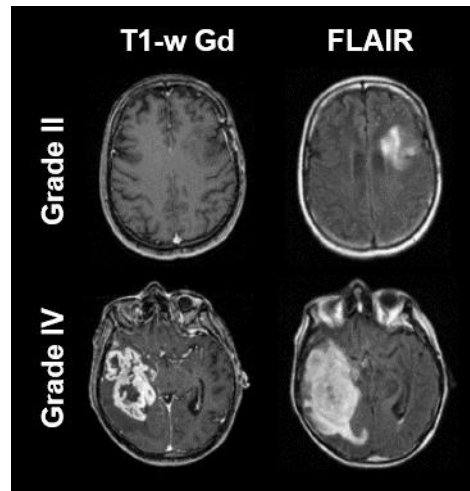


Figure 3 | Le diagnostic du glioblastome. Aspect en IRM de deux gliomes de bas et de haut grade avec ou sans injection d'un agent de contraste. Adapté de Collet *et al.* 2015.

séquelles parfois graves. Ces dernières se manifestent par l'apparition de zones de nécroses radio-induites et de déficits cognitifs qui diminuent la qualité de vie et la survie des patients (Siu *et al.* 2012; Greene-Schloesser *et al.* 2012). L'enjeu majeur de cette technique consiste donc à déposer suffisamment d'énergie sur les cellules tumorales pour entraîner leur mort tout en lésant au minimum le tissu sain.

La première méthode utilisée pour réduire les effets secondaires sur le tissu sain consiste à fractionner les doses. Ainsi, dans le cadre clinique, les patients reçoivent une dose journalière de 2 Gy, 5 jours par semaine pendant 6 semaines soit 60 Gy au total.

Des avancées ont également été faites en ce qui concerne le mode d'administration de la RT, comme l'irradiation conformationnelle. Cette technique permet d'utiliser simultanément plusieurs faisceaux braqués sur la tumeur selon des angles d'entrée différents. Ceci permet de déposer plus d'énergie dans le tissu tumoral que dans le tissu sain. Elle permet donc d'augmenter la précision avec laquelle la dose est distribuée selon la conformation de la tumeur tout en préservant au mieux les tissus sains. Elle est déclinée en plusieurs modalités comme la RT conformationnelle tridimensionnelle, la RT conformationnelle avec modulation d'intensité, la RT stéréotaxique robotisée (CyberKnife®) ou la RT conformationnelle en conditions stéréotaxiques (**Figure 4**).

Cependant, malgré ces avancées, certains types de tumeurs, comme les GB présentent une radiorésistance élevée. D'autres stratégies ont été mises au point pour optimiser la RT tout en épargnant au maximum le tissu sain. Elles seront détaillées dans le chapitre **II.D.4**.

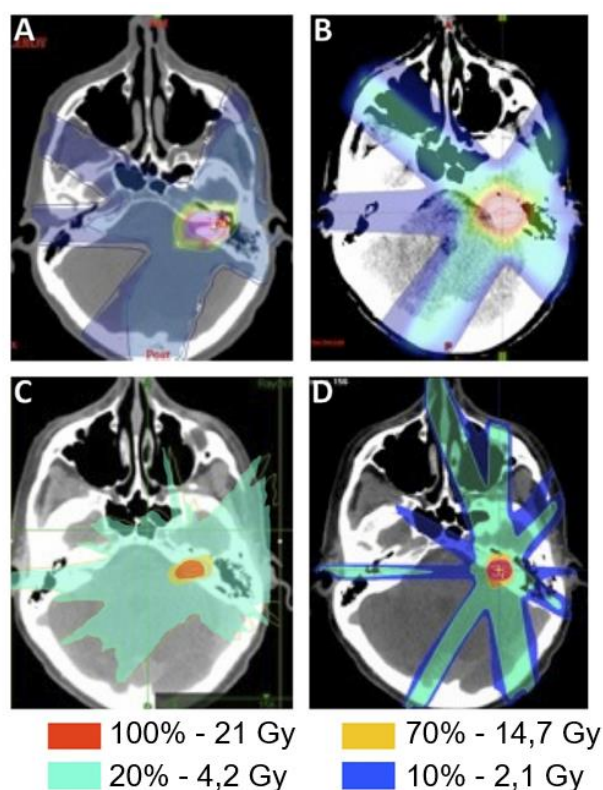


Figure 4 | L'irradiation conformationnelle permet d'obtenir un compromis entre l'efficacité et la toxicité. Distribution de dose pour les quatre modalités de traitement. **A.** Radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle. **B.** Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité. **C.** Radiothérapie stéréotaxique robotisée (CyberKnife®). **D.** Radiothérapie conformationnelle en conditions stéréotaxiques. Adapté de Spasic *et al.* 2011.

3. LA CHIMIOThERAPIE

Depuis 2005, la prise en charge des patients passe par une administration de témozolomide (TMZ), un agent alkylant de l'ADN. Il est administré par voie orale et présente certains avantages comme une disponibilité proche de 100%, une affinité pour les tissus tumoraux et sa capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Alifieris & Trafalis 2015).

Les patients nouvellement diagnostiqués reçoivent une administration de TMZ concomitante à la RT (dose journalière de 75 mg/m² de surface corporelle, 7 jours par semaine) suivie d'une administration en adjuvant débutant quatre semaines après la fin de la RT à une dose de 150 à 200 mg/m², 5 jours par semaine pendant 6 cycles espacés de 4 semaines (**Figure 5A**).

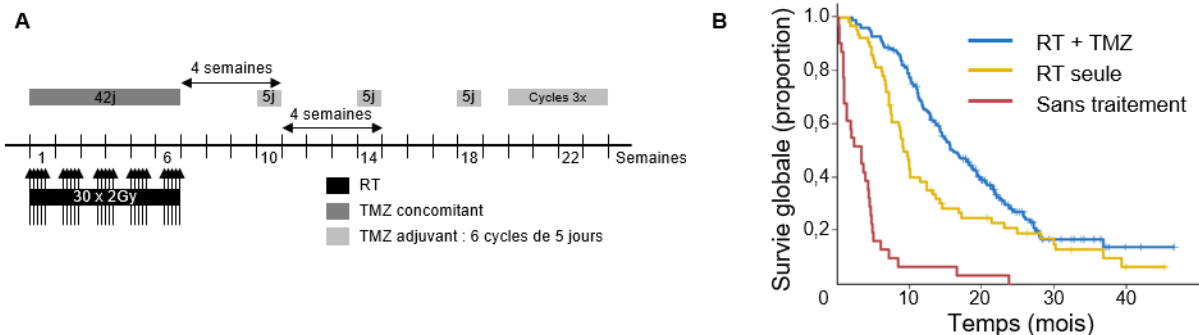


Figure 5 | La prise en charge thérapeutique des patients. A. Schéma représentant le protocole de prise en charge thérapeutique des patients atteints de glioblastomes. Adapté de Stupp *et al.* 2009. **B.** Courbe de survie des patients atteints de glioblastome après avoir été traités suivant différents protocoles. RT = radiothérapie, TMZ = témozolomide. Adapté de Weller *et al.* 2009.

Ce protocole associant la RT au TMZ après la chirurgie est appelé « protocole Stupp » et correspond au protocole standard de prise en charge des patients (Stupp *et al.* 2009). Malgré les bénéfices sur la médiane de survie des patients obtenus grâce à la mise en pratique de ce protocole, celle-ci reste extrêmement faible, aux alentours de 15 mois (**Figure 5B**) et une récurrence est inévitablement observée au terme du traitement initial.

4. LES NOUVELLES APPROCHES THERAPEUTIQUES

Afin d'améliorer le pronostic des patients, notamment en situation de récurrence tumorale, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées. Cependant, aucune n'est pour le moment appliquée de manière standard.

La stratégie la plus étudiée concerne le traitement à base de molécules anti-angiogéniques. L'importance de la vascularisation pour le développement et le maintien de la tumeur sera exposée en détail dans le chapitre **I.D.2** mais l'objectif est de priver la

tumeur de sa source d'oxygène et de nutriment en inhibant l'angiogenèse tumorale. Deux études multicentriques de phase III ont évalué l'effet d'un traitement à base de Bevacizumab, un anticorps humanisé ciblant le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), l'une des principales cytokines pro-angiogéniques, en combinaison avec le TMZ et la RT. Cependant, les résultats de ces études ont été extrêmement décevants puisqu'aucune amélioration de la survie globale des patients n'a été constatée (Chinot *et al.* 2014) et plusieurs effets secondaires indésirables ont été observés.

Une autre piste, plus récente et prometteuse, concerne l'immunothérapie. Le principe est d'exploiter le système immunitaire du patient en induisant ou en augmentant la réponse immunitaire et en levant les blocages du microenvironnement tumoral, lui-même immunosuppresseur. Cette approche est de plus en plus utilisée en oncologie et montre de bons résultats dans un certain nombre de cancers. Des essais cliniques ont été menés dans le cadre des GB, notamment en utilisant des anticorps ciblant les points de contrôle immunosuppresseurs de la tumeur. Des résultats encourageants ont été observés sur l'activité immunitaire des patients et sur la réponse clinique. Cependant, des réponses durables et soutenues restent rares (Huang *et al.* 2017). Les obstacles à la réussite de ce type de traitement dans les GB étant la BHE, l'identification d'antigènes tumoraux spécifiques, appropriés et immunogènes et enfin l'identification de biomarqueurs permettant d'anticiper et de mesurer la réponse thérapeutique. De plus, certaines caractéristiques des GB comme leur composante hypoxique pourraient expliquer leur résistance vis-à-vis de l'inflammation (Leblond *et al.* 2016).

Du fait de l'échec des traitements actuellement utilisés à lutter efficacement contre les GB, il est nécessaire de mettre au point de nouvelles stratégies permettant d'améliorer la prise en charge des patients. Pour cela, une connaissance fine de la physiopathologie des GB est indispensable.

D. PHYSIOPATHOLOGIE DES GLIOBLASTOMES

Le GB est une tumeur hétérogène où les cellules cancéreuses cohabitent et interagissent avec les cellules saines et leur microenvironnement. Ce système évolue au cours du temps et selon les stades de développement de la tumeur.

1. LA CELLULE TUMORALE

L'hétérogénéité des GB s'observe d'un patient à un autre (hétérogénéité inter-tumorale) mais également au sein d'une même tumeur (hétérogénéité intra-tumorale) et provient à la fois de la cellule tumorale elle-même et de son origine, mais aussi des interactions avec le microenvironnement tumoral.

a) **Des cellules tumorales : origine et hétérogénéité**

Une tumeur correspond à une population cellulaire hétérogène, contenant des cellules tumorales différenciées, des cellules de soutien et des cellules tumorales infiltrantes. Cette hétérogénéité intra-tumorale est renforcée par l'existence d'une variabilité clonale au sein de cet ensemble de cellules et par l'influence qu'exerce le microenvironnement sur celui-ci. Il a ainsi été montré que de multiples clones présentant des mutations distinctes ou des différences de méthylation de leurs promoteurs peuvent être trouvés au sein d'une même tumeur (Gerlinger *et al.* 2012).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer cette hétérogénéité. Le premier est le modèle d'évolution clonale. Il propose la sélection naturelle comme moteur de l'hétérogénéité intra-tumorale. Ainsi, les mutations stochastiques qui apparaissent dans les cellules individuelles induisent la sélection des clones les plus adaptés à la tumeur et son microenvironnement. Les clones qui acquièrent des avantages pour leur croissance vont proliférer tandis que les clones moins adaptés vont être moins compétitifs et vont disparaître.

Le second modèle, le plus récent, est celui des cellules souches cancéreuses (CSC). Ce modèle suggère que seule une partie des cellules cancéreuses possède la capacité d'initier et de maintenir la croissance tumorale en se répliquant à l'infini. De ce fait, les tumeurs sont organisées de manière hiérarchique comme les tissus normaux le sont avec les cellules souches saines. En conséquence, les CSC génèrent une hétérogénéité cellulaire en installant une hiérarchie établie selon les stades de différenciation des cellules (Prasetyanti & Medema 2017) (**Figure 6**).

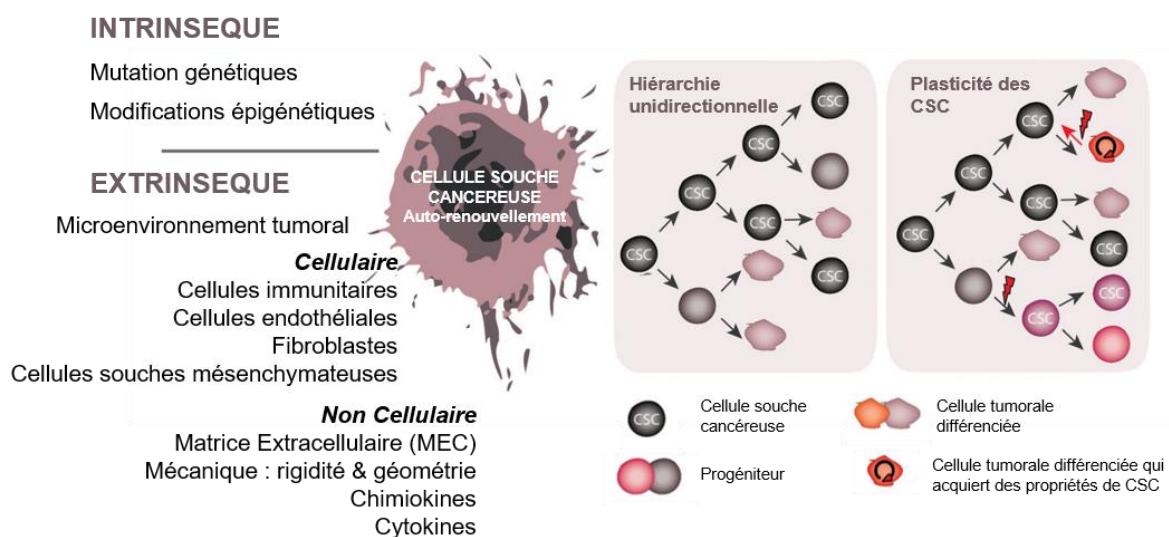


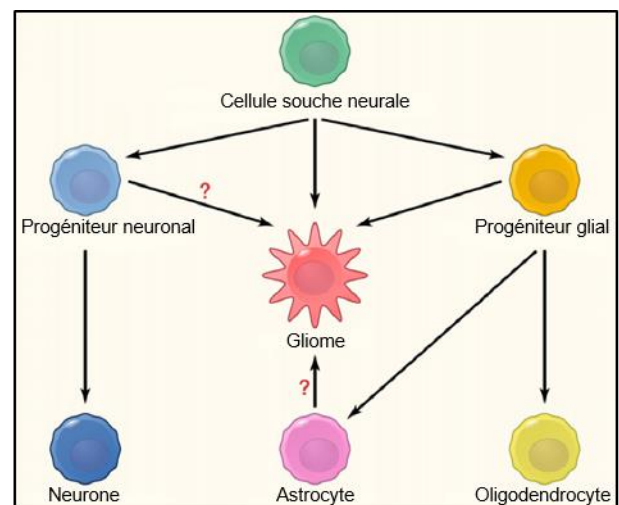
Figure 6 | Les facteurs d'hétérogénéité de la tumeur. Le modèle originel (la hiérarchie unidirectionnelle) suppose que seules les cellules souches cancéreuses (CSC) sont capables de générer la masse tumorale via une division symétrique (l'auto-renouvellement) ou une division asymétrique (génération de cellules différenciées). Dans ce cas, la hiérarchie est strictement unidirectionnelle et exclut le concept de la réversibilité du devenir cellulaire à partir des cellules progénitrices. Au contraire, de plus en plus de preuves démontrent que la hiérarchie est plus fluide que ce qui était admis jusqu'à présent. Dans le modèle de plasticité des CSC, la cellule possède une capacité de dédifférenciation depuis un état non-CSC à un état CSC et vice-versa. Dans ce modèle, la caractéristique de cellule souche et la plasticité sont déterminées par divers signaux intrinsèques et extrinsèques qui agissent simultanément ou indépendamment dans le temps. De ce fait, les cellules non-CSC peuvent servir de réservoir pour créer une population de CSC pendant l'oncogenèse. Ceci est indiqué par un éclair sur la figure et peut être le fait de signaux du microenvironnement ou de changements génétiques ou épigénétiques. Adapté de Prasetyanti & Medema 2017.

Parmi ce nouveau type de cellule, les cellules souches de gliomes (CSG) ont été parmi les premières à être isolées à partir d'une tumeur solide (Yuan *et al.* 2004; Singh *et al.* 2003). Dans ces travaux, il a été montré que seulement 100 GSC étaient suffisantes pour donner naissance à une nouvelle tumeur chez des souris immunodéficientes, alors que plus de 10^6 cellules tumorales classiques n'en étaient pas capables (Singh *et al.* 2004).

Les CSC sont les cellules qui permettent à la tumeur de se propager et qui maintiennent une tumeur déjà formée et ne doivent pas être confondues avec la cellule d'origine. Cette dernière est la cellule dans laquelle les mutations oncogéniques interviennent et s'accumulent en premier pour initier ensuite la formation d'une masse tumorale maligne (**Figure 7**). Avant la découverte des cellules souches neurales, il était considéré que les astrocytes étaient à l'origine des GB puisqu'ils représentaient la seule population connue de cellules capable se répliquer. Cependant la preuve d'une origine astrocytaire des gliomes n'est pas encore établie à l'heure actuelle (Chen *et al.* 2012).

Figure 7 | Origine cellulaire du glioblastome.

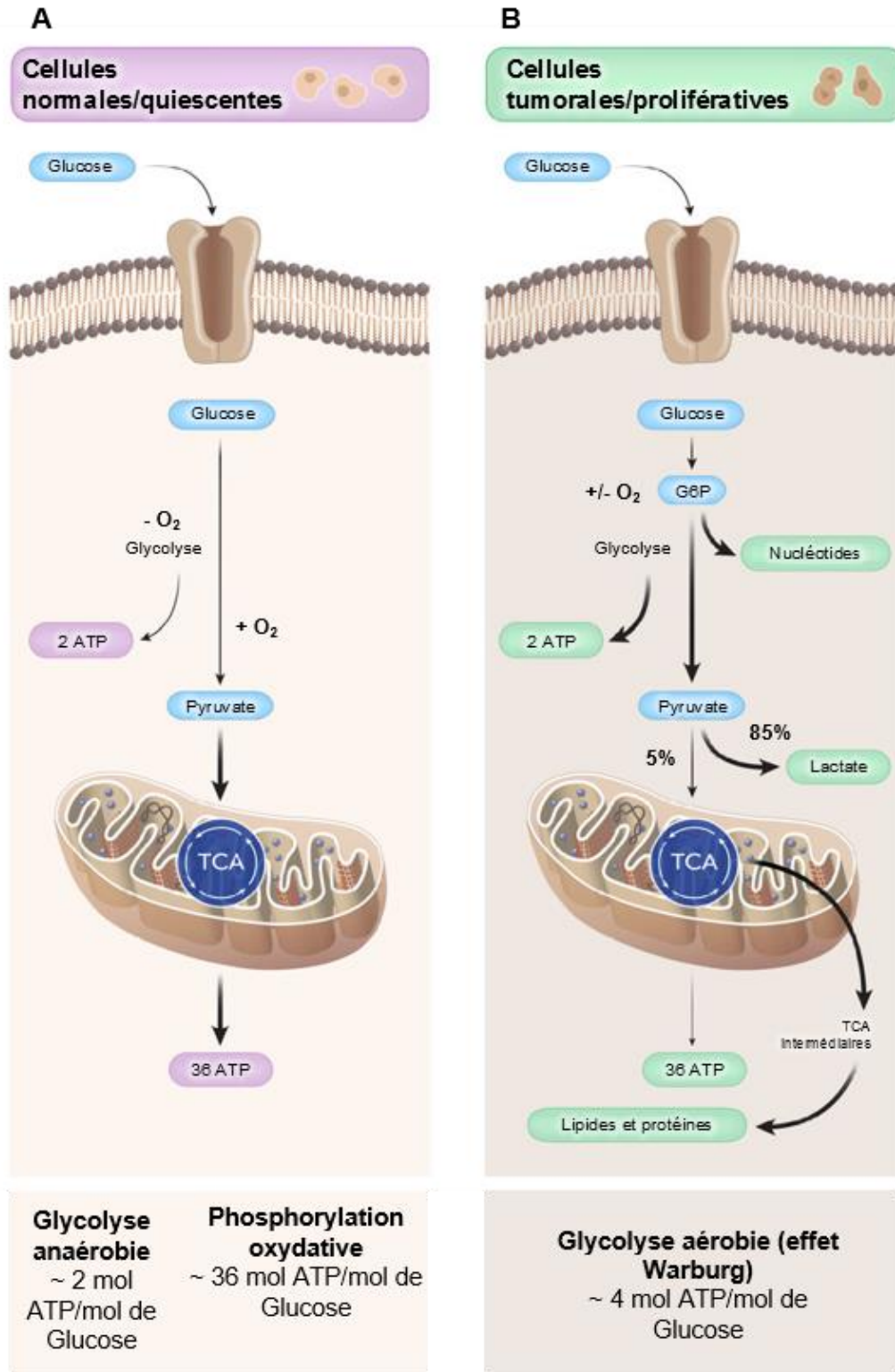
Des mutations chez les cellules souches neurales adultes sont suffisantes pour initier la formation d'un gliome malin *in vivo*. Certaines preuves en faveur d'une origine à partir d'un astrocyte mature ou d'un progéniteur ont également été obtenues *in vitro* et *in vivo*. Cependant l'origine des gliomes reste à ce jour non connue avec certitude. Adapté de Chen *et al.* 2012.



b) Le métabolisme et l'effet Warburg

Le métabolisme des cellules tumorales est différent de celui des cellules normales. Pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP), ces dernières utilisent principalement la phosphorylation oxydative, processus aérobie qui permet de métaboliser dans la mitochondrie le pyruvate issu de la glycolyse. En anaérobie, le pyruvate fermente en lactate (**Figure 8A**). Dans les GB, l'hétérogénéité de la disponibilité en O₂, qui sera détaillée dans le chapitre suivant (chapitre II), induit l'expression de facteurs régulant la glycolyse aérobie ou anaérobie et la production de lactate. Les cellules tumorales présentent ainsi de nombreuses anomalies métaboliques, parmi lesquelles la particularité de privilégier la fermentation lactique, peu importe la présence ou non d'oxygène. Cette particularité est sans doute la plus étudiée et l'une des plus importantes pour la prolifération et l'agressivité des cellules tumorales. Ce phénomène est couramment appelé glycolyse anaérobie ou effet Warburg, du nom de son découvreur Otto Warburg dans les années 1920. L'effet Warburg est souvent accompagné d'une augmentation de la captation de glucose, d'une glycolyse intense, d'une inhibition partielle de l'activité mitochondriale et d'une consommation en oxygène diminuée (Vartanian *et al.* 2014) (**Figure 8B**).

Figure 8 | Le métabolisme des cellules tumorales. **A.** Cellules normales : Le glucose entre dans la cellule via un transporteur du glucose et subit la glycolyse, ce qui génère du pyruvate. Le pyruvate pénètre ensuite dans la mitochondrie et entre dans le cycle de Krebs (TCA pour *TriCarboxylic Acid*) pour générer 36 ATP à travers le processus de phosphorylation oxydative. L'ATP est la source d'énergie des cellules normales : l'hydrolyse de la molécule d'ATP libère l'énergie nécessaire aux réactions essentielles à la cellule. **B.** Cellules tumorales : Les cellules tumorales métabolisent le glucose en lactate, même en présence d'oxygène. Ce processus est appelé glycolyse aérobie ou effet Warburg. Bien que la génération d'ATP soit moins efficace durant ce processus en comparaison du métabolisme oxydatif complet du glucose, les cellules tumorales l'utilisent pour générer les précurseurs indispensables à leur croissance et pour générer suffisamment d'ATP nécessaire au maintien de leurs fonctions. En modulant la glycolyse et grâce à l'altération de leur métabolisme mitochondrial, les cellules tumorales peuvent détourner les intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs pour générer des nucléotides, des lipides, des protéines et du NADPH qui leur permet de se défendre contre le stress oxydatif. Ces cellules génèrent également des quantités importantes de lactate qui participent à plusieurs fonctions pro-tumorales. Adapté de Agnihotri & Zadeh 2016 et de Vander Heiden *et al.* 2009.



c) **L'invasion**

Une autre particularité des GB est d'être une tumeur diffuse. Cela est dû à la capacité d'invasion des cellules de GB. Au contraire d'autres tumeurs solides de haut grade, les GB ne forment pas de métastases. A l'inverse, les cellules de gliome migrent activement

à travers les espaces extracellulaires tortueux du parenchyme cérébral, ce qui conduit à la formation de tumeurs satellites distantes (**Figure 9**). Cette capacité d'infiltration est la principale cause de récurrence après la résection chirurgicale, les cellules infiltrées dans le parenchyme cérébral sain ayant la capacité de reformer de nouvelles tumeurs (Cuddapah *et al.* 2014).

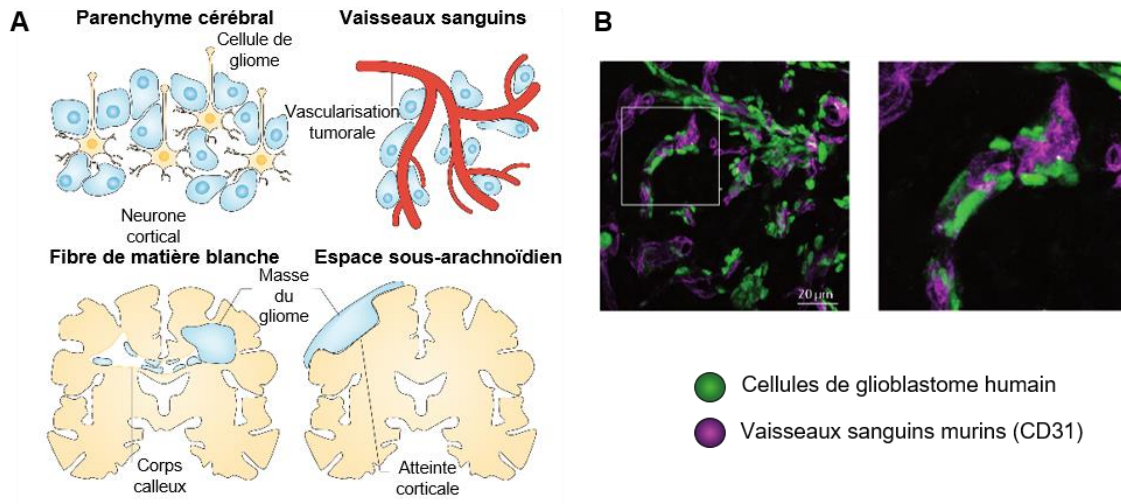


Figure 9 | Les différentes voies d'invasion. **A.** Schéma représentant les voies d'invasion possibles pour les cellules de gliome. **B.** Les cellules de gliomes s'associent aux vaisseaux sanguins dans le cerveau. Les cellules de glioblastome expriment une protéine fluorescente verte (EGFP) et les vaisseaux sont révélés par un marquage CD31. Adapté de Cuddapah *et al.* 2014.

2. LA VASCULARISATION : UN POINT FAIBLE DES GLIOBLASTOMES ?

Dans les premiers stades de l'oncogenèse, la croissance de la tumeur s'accompagne au fur et à mesure d'un éloignement des cellules des vaisseaux sanguins préexistants. A partir d'un certain point, cet éloignement provoque une diminution des apports en oxygène et en nutriments. Les cellules tumorales mettent alors en place différents mécanismes aboutissant à la formation d'une néo-vascularisation tumorale permettant à la tumeur de reprendre sa croissance.

a) Angiogenèse et soutien de la croissance tumorale

La transformation maligne du gliome vers un haut grade est accompagnée d'une augmentation marquée de la densité vasculaire et de changements importants de la morphologie micro-vasculaire aboutissant au final à une modification de la fonctionnalité vasculaire. Ce phénomène, appelé « switch angiogénique », est considéré comme un point de basculement critique pendant la croissance de la tumeur. Il est en partie induit par une augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques, de cytokines et de

récepteurs nécessaires à l'établissement de nouveaux vaisseaux sanguins (Vartanian *et al.* 2014).

Il est communément admis que les premiers stades de la croissance tumorale sont associés à un développement des cellules tumorales le long des vaisseaux sanguins préexistants (un mécanisme appelé co-option vasculaire). Ce processus est indépendant de l'angiogenèse et aboutit à un échec de l'apport des nutriments en dépit de la demande métabolique des cellules. Dans la phase suivante de la progression tumorale, lorsque les demandes métaboliques de la masse tumorale excèdent l'apport, les vaisseaux co-optés régressent et l'hypoxie se met en place (Bergers & Benjamin 2003). Il en résulte une génération de nouveaux vaisseaux à partir de la vascularisation préexistante via le bourgeonnement de nouveaux capillaires, c'est l'angiogenèse. L'angiogenèse est un phénomène complexe qui implique la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) pour ouvrir la voie aux nouveaux vaisseaux ainsi que la prolifération et la migration des cellules endothéliales et l'établissement d'une nouvelle membrane basale (Bulnes *et al.* 2012). Cependant il semble que l'angiogenèse seule soit insuffisante pour expliquer le remodelage complexe du réseau vasculaire. Pour l'expliquer, il est indispensable d'y ajouter d'autres modes d'adaptation vasculaire permettant de subvenir aux demandes métaboliques de la tumeur, comme la vasculogenèse *de novo*, c'est-à-dire la formation de vaisseaux à partir de précurseurs hématopoïétiques.

Dans ces processus de néo-vascularisation, de nombreux facteurs angiogéniques comme le VEGF-A, les MMP2 (*Matrix Metalloproteases 2*) ou l'angiopoïétine 1 coopèrent pour stimuler et maintenir la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et leur survie, ainsi que la perméabilité et la formation de la lumière intravasculaire (Vartanian *et al.* 2014).

Le tissu tumoral incorpore donc une néo-vascularisation nécessaire à sa croissance. Cependant, l'architecture des vaisseaux est souvent anarchique et fonctionnellement aberrante. Différentes techniques d'imagerie ont permis de mettre en lumière le fait que la micro-vascularisation est tortueuse, irrégulière et dilatée (**Figure 10**). En conséquence, la perfusion sanguine n'est pas uniforme et peut conduire à des situations d'hypoxie, d'ischémie et de thrombose (Jain 2005). La paroi des vaisseaux angiogéniques est immature avec une BHE dysfonctionnelle et des péricytes absents ou inactifs, ce qui

conduit à une vascularisation perméable. Ce point est détaillé ci-dessous afin d'introduire son intérêt pour la thérapie.

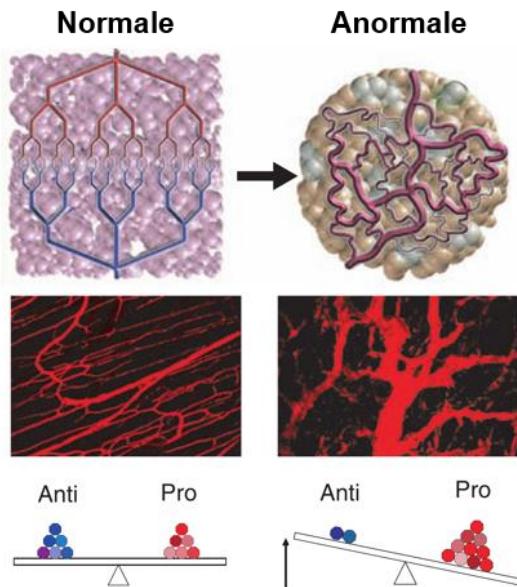


Figure 10 | La vascularisation tumorale. Schéma représentant la vascularisation dans un tissu normal (à gauche) et dans une tumeur (à droite). La dérégulation de la balance entre facteur pro- et anti-angiogénique conduit au développement d'une vascularisation structurellement et fonctionnellement anormale dans les tumeurs. Ces anomalies structurelles sont clairement visibles sur les images du milieu acquises en microscopie bi-photonique. Adapté de Jain *et al.* 2005.

b) *L'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention effect)*

Dans le tissu cérébral sain, la vascularisation est composée de trois types cellulaires : les cellules endothéliales liées entre elles par des jonctions serrées, les péricytes et les astrocytes (**Figure 11**). Ces cellules forment la BHE qui a pour fonction de restreindre les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral afin de protéger le cerveau (Abbott *et al.* 2006). Cependant, la vascularisation des GB présente une structure différente de celle du tissu sain.

En 1986, deux équipes ont publié quasi-simultanément deux articles faisant état d'une accumulation privilégiée de macromolécules dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains. Ce tropisme de la tumeur a été attribué à l'hyper-vascularisation tumorale, sa perméabilité augmentée ainsi qu'à l'absence de système lymphatique pour drainer le tissu (**Figure 12**) (Matsumura & Maeda 1986; Gerlowski & Jain 1986). Cet effet a depuis été baptisé *Enhanced Permeability and Retention effect* (EPR) (Maeda *et al.* 2013).

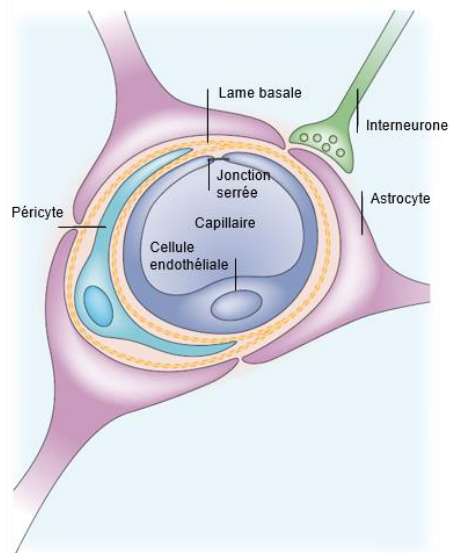


Figure 11 | La barrière hémato-encéphalique. Schéma représentant les constituants cellulaires de la BHE. Adapté d'Abbott *et al.* 2006.

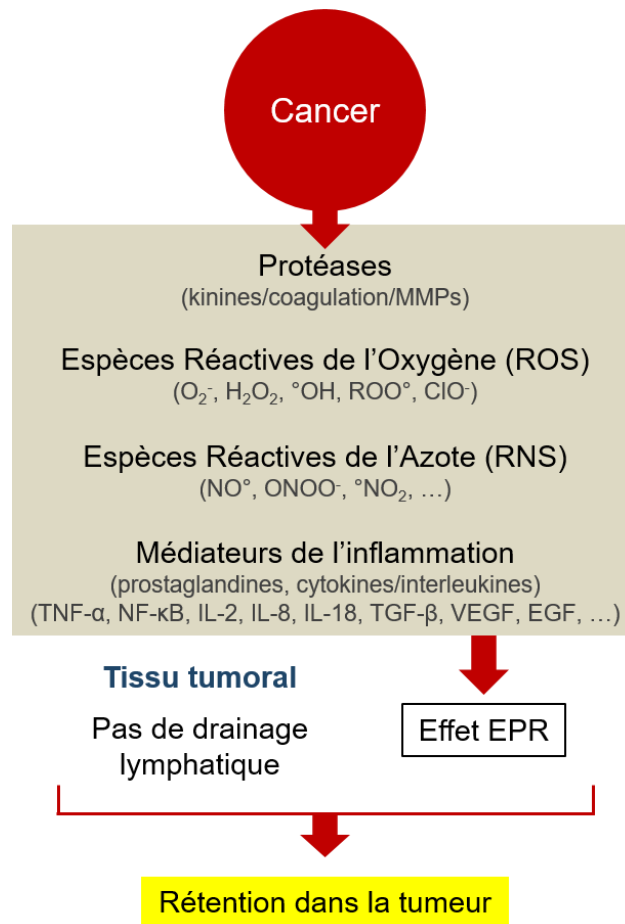


Figure 12 | Les différents médiateurs vasculaires fréquemment exprimés dans les cancers et participant à l'effet EPR. Ces médiateurs augmentent la perméabilité vasculaire. De plus, il n'y a pas de drainage lymphatique, ce qui résulte en un temps de rétention des macromolécules prolongé dans le tissu tumoral. Adapté de Maeda 2013.

Cet effet EPR a été démontré dans de nombreuses études précliniques, portant sur des modèles de GB (Karageorgis *et al.* 2016; Huhndorf *et al.* 2016; Huynh *et al.* 2011). Il a été largement utilisé pour développer des **stratégies de ciblage spécifiques et passives** de ces tumeurs basées sur des nanoparticules porteuses de thérapies (**Figure 13**).

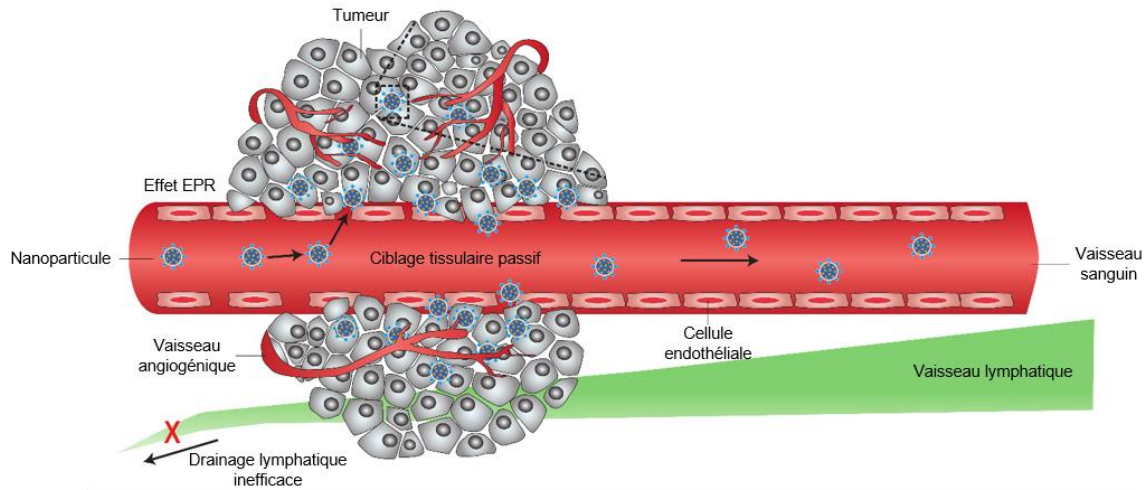


Figure 13 | Ciblage passif par le biais de l'effet EPR. Représentation schématique des différents mécanismes par lesquels les nanoparticules peuvent délivrer des molécules à la tumeur. Le ciblage passif du tissu tumoral est atteint par l'extravasation des nanoparticules, permise par une augmentation de la perméabilité vasculaire dans la tumeur et le drainage lymphatique inefficace. Adapté de Peer *et al.* 2007.

En pratique clinique l'une des manières d'évaluer la perméabilité vasculaire est une mesure de la valeur de K^{trans} par IRM, qui représente le produit de la perméabilité par la surface vasculaire. Plusieurs travaux ont étudié la perméabilité vasculaire pour différents grades de gliomes. Les auteurs ont mesuré les valeurs de K^{trans} pour des grades de gliome de II à IV et ont montré que la valeur maximale de K^{trans} augmente avec le grade des gliomes (**Figure 14**).

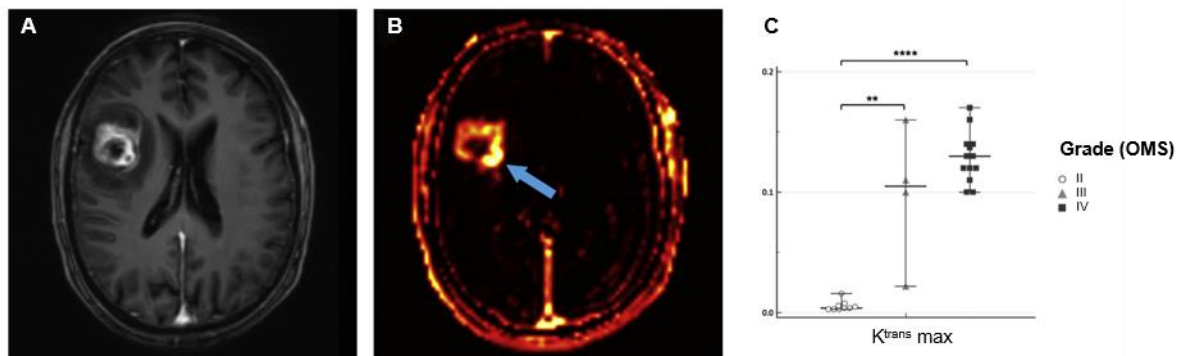


Figure 14 | La perméabilité vasculaire augmente avec le grade du gliome. A. Visualisation par IRM T1-w avec agent de contraste d'un gliome de grade IV. B. Carte de K^{trans} associée. La lésion montre un K^{trans} max élevé (flèche bleue). C. Valeurs maximales de K^{trans} mesurées dans des gliomes de grade II, III et IV. Adapté de Santarosa *et al.* 2016.

La présence de l'effet EPR dans les gliomes humains a également été utilisée en essai clinique pour cibler spécifiquement ces tumeurs à l'aide d'une molécule thérapeutique encapsulée dans des liposomes (Clarke *et al.* 2017).

3. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL

Le GB n'est pas uniquement constitué de cellules tumorales et de vaisseaux sanguins. Ceux-ci cohabitent et interagissent également avec d'autres cellules de leur microenvironnement qui servent souvent de soutien à la croissance tumorale.

a) Les cellules du parenchyme cérébral sain

Les neurones actifs exercent un effet mitogène sur les précurseurs neuronaux et les précurseurs oligodendrogliaux normaux. Plusieurs travaux ont montré que certains facteurs sécrétés dans le microenvironnement par les neurones, comme le glutamate (Blecic *et al.* 2013) ou la neurologine-3 (Venkatesh *et al.* 2015), soutiennent la croissance tumorale, ce qui va également dans le sens de l'hypothèse d'une origine neurale ou oligodendrogliale des GB.

En plus des neurones, les astrocytes, qui jouent physiologiquement un rôle de soutien des neurones et précurseurs neuronaux, favorisent la croissance des gliomes par la sécrétion de facteurs de croissance, comme l'EPO (Pérès *et al.* 2011), qui protègent la tumeur face aux traitements conventionnels (Yang *et al.* 2014; Pérès *et al.* 2014).

b) Les cellules recrutées

En dehors des cellules résidentes du SNC, la tumeur exerce un tropisme pour d'autres types cellulaires qui migrent jusque dans la masse tumorale. Parmi elles, on trouve des fibroblastes, nommés *Cancer Associated Fibroblasts* (CAF) (Madar *et al.* 2013), cellules de soutien provenant de la moelle osseuse retrouvées chez des patients et qui participent aux phénomènes d'angiogenèse et d'invasion (Clavreul *et al.* 2014). Des cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont également été trouvées chez des patients et favorisent le développement tumoral (Hossain *et al.* 2015). Elles seraient ainsi associées à un pronostic défavorable pour le patient (Yoon *et al.* 2016).

Enfin les cellules recrutées les plus abondantes sont les cellules immunitaires. Parmi elles, les plus nombreux sont la microglie et les macrophages, appelés TAM (pour *Tumor Associated Macrophages*). Il a en effet été montré que les TAM peuvent représenter de 30 à 50 % du nombre total de cellules présentes dans un GB (Franklin *et al.* 2014; Lu-Emerson *et al.* 2013). Parmi ces cellules immunitaires, on trouve également des lymphocytes, comptant pour environ 30 % d'entre-elles, et environ 10% de cellules myéloïdes suppressives ainsi que 10% de cellules dendritiques (Hussain *et al.* 2006).

Comme pour les autres cellules recrutées, la présence des TAM résulte d'un dialogue entre ces derniers et les cellules du gliome. Les macrophages sont présents dans la

circulation sanguine sous forme de monocytes issus de la moelle osseuse. Ces monocytes quittent le sang et entrent dans les tissus par extravasation lorsque les cellules endothéliales de ces tissus expriment des marqueurs de l'inflammation. Dans le tissu, les cellules se différencient en macrophages qui sont ensuite attirés par la masse tumorale par l'action de gradients de chimiokines synthétisées par la tumeur (**Figure 15A**).

Les TAM se distinguent entre eux par l'acquisition de phénotypes distincts sous l'influence de leur environnement. Ces phénotypes correspondent à des activités différentes dans la tumeur (Glass & Synowitz 2014). Au moment de leur extravasation et de leur différenciation, les macrophages acquièrent un phénotype de type M0, non activé. Les macrophages de phénotype M1, dits classiquement activés, sont pro-inflammatoires et considérés comme anti-tumoraux. Le phénotype M2, l'activation alternative, est plutôt immunosuppresseur et considéré comme pro-tumoral. Ces deux phénotypes représentent les deux extrémités d'un continuum avec des activités opposées, et il est possible pour un macrophage, sous l'action de signaux de l'environnement, de passer d'un phénotype à l'autre. L'hypoxie joue un rôle majeur puisqu'il a été montré qu'elle favorise l'acquisition du phénotype M2 pro-tumoral des TAM (Leblond *et al.* 2016; Tellier *et al.* 2015).

Il a été montré que ces macrophages de types M2 favorisent la progression tumorale par la libération de facteurs immunosuppresseurs et sont impliqués notamment dans les phénomènes d'invasion, de prolifération et d'angiogenèse (Hambardzumyan *et al.* 2016) (**Figure 15B**).

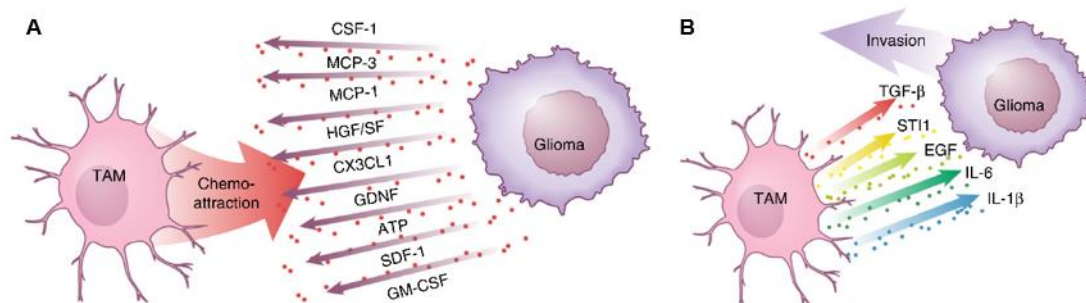


Figure 15 | Dialogue entre les macrophages et le gliome. A. Les cellules du gliome libèrent des facteurs qui attirent les macrophages (*TAM*) vers le tissu tumoral (*Glioma*). **B.** En retour les macrophages sécrètent divers facteurs qui favorisent notamment l'invasion tumorale. Adapté de (Hambardzumyan *et al.* 2016).

c) L'hypoxie

L'une des caractéristiques majeures des GB, notamment par rapport aux gliomes de bas grade, est la présence d'un gradient d'oxygénation au sein du microenvironnement

tumoral. Il en résulte la présence de zones d'hypoxie sévère au sein de la tumeur. Ce point important fait l'objet du chapitre suivant.

II. L'HYPOXIE

A. GENERALITES SUR L'HYPOXIE DANS LES GLIOBLASTOMES

1. DEFINITION DES NIVEAUX D'OXYGENE

Avant d'être distribué aux tissus, l'oxygène atmosphérique passe par la trachée, les alvéoles pulmonaires où il passe dans le sang artériel et enfin dans le réseau capillaire. Pendant ce trajet, la pression en oxygène (pO_2) passe de ~160 mmHg dans l'atmosphère à ~40 mmHg dans un organe comme le cerveau (**Tableau 2**).

Tableau 2 | Pressions normales en oxygène dans quelques organes humains. D'après Koh & Powis 2012.

Organe	pO_2 normale (mmHg)	% O_2
Trachée	150	19,7
Alvéoles	110	14,5
Sang artériel	100	13,2
Cerveau	40	5,3

Plusieurs termes sont utilisés pour décrire les différents niveaux d'oxygène (**Tableau 3**). La normoxie correspond à la pO_2 atmosphérique. Comme nous l'avons vu, dans l'organisme la pO_2 tissulaire (ptO_2) est inférieure. Lorsqu'elle est à un niveau physiologique normal, on parle de physioxie. La pO_2 en condition de physioxie peut varier d'un organe à l'autre et selon les conditions environnementales. Lorsque la pO_2 diminue en dessous des conditions physiologiques on parle d'hypoxie. Celle-ci est d'abord considérée modérée jusqu'à environ 8 mmHg d' O_2 puis sévère en dessous, jusqu'à l'anoxie qui correspond à l'absence ou quasi-absence d' O_2 , en dessous de 0,08 mmHg. D'un point de vue cellulaire, l'hypoxie correspond à une inadéquation entre l'apport d'oxygène et sa consommation.

Tableau 3 | Définitions des niveaux d'oxygène. D'après Koh & Powis 2012.

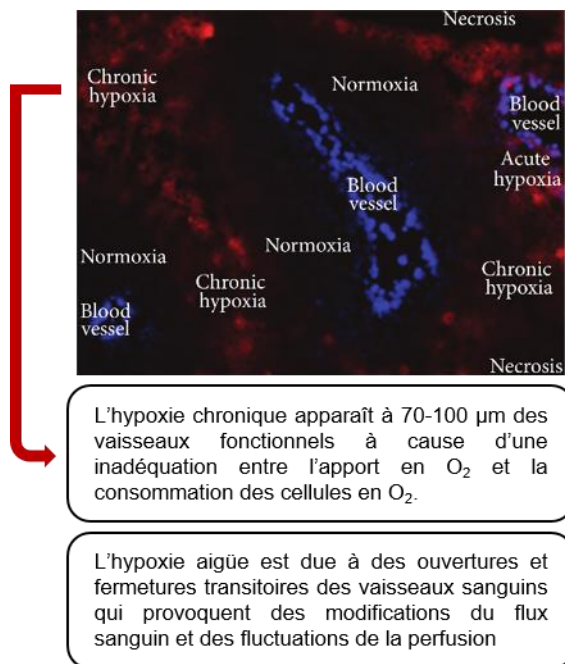
Condition	pO_2 (mmHg)	% O_2
Normoxie	159	21%
Physioxie	15-68	2-9%
Hypoxie moyenne	8-38	1-5%
Hypoxie	<8	<1%
Anoxie	<0,08	<0,1%

2. SES CAUSES AU NIVEAU TUMORAL

La présence de régions hypoxiques est une caractéristique de nombreuses situations pathologiques. C'est notamment le cas de beaucoup de tumeurs solides comme les GB. Dans le cadre des tumeurs, l'hypoxie résulte de la combinaison de plusieurs facteurs comme la prolifération rapide des cellules, la vascularisation tumorale peu fonctionnelle et l'éloignement des cellules par rapport au plus proche vaisseau. Il en résulte une grande hétérogénéité de la ptO_2 au sein de la tumeur.

L'hypoxie tumorale peut ainsi être groupée en deux catégories distinctes : l'hypoxie chronique et l'hypoxie aiguë, selon les causes et la durée pendant laquelle les cellules sont exposées aux conditions hypoxiques. Il a été vu que les cellules tumorales ont des caractéristiques particulières comme leur taux de prolifération élevé, leur immortalité répliquative et un métabolisme dérégulé. De plus, la vascularisation est peu fonctionnelle. Ces particularités, sont connues pour entraîner une inadéquation entre l'apport et la consommation en oxygène et donc une forte diminution de l'oxygénation dans certaines parties de la tumeur.

La prolifération des cellules cancéreuses est très dépendante de l'apport en oxygène et en nutriments. De ce fait, les vaisseaux tumoraux sont entourés de cellules en prolifération



active. Ce sont les régions normoxiques (ou physioxiques) de la tumeur. Au contraire, les cellules meurent inévitablement dans les régions situées à plus de 100 μm d'un vaisseau, ce sont les régions nécrotiques (ou anoxiques). Entre ces deux régions distinctes (70-100 μm du vaisseau sanguin) se trouvent des zones d'hypoxie chronique dans lesquelles les cellules tumorales ont accès à une quantité minimale d'oxygène, suffisante pour leur survie mais insuffisante pour leur prolifération active (**Figure 16**).

Figure 16 | L'hypoxie aiguë et chronique. *Chronic Hypoxia* = Hypoxie chronique, *Normoxia* = Normoxie, *Blood vessel* = Vaisseau sanguin, *Necrosis* = Nécrose, *Acute hypoxia* = Hypoxie aiguë. Adapté de Yoshimura *et al.* 2013.

L'hypoxie aiguë est, quant à elle, due à la vascularisation structurellement et fonctionnellement anormale de la tumeur qui entraîne des ouvertures et

fermetures transitoires des vaisseaux sanguins. Cela provoque des fluctuations de la perfusion et aboutit à la génération d'hypoxie transitoires, et cela même à moins de 70 μm de vaisseaux (**Figure 16**) (Yoshimura *et al.* 2012).

L'hypoxie se met en place de manière progressive au sein de la tumeur. Au début de la tumorigenèse, les cellules sont en condition de physioxie, puis l'hypoxie se met en place progressivement au fur et à mesure de la prolifération cellulaire et de l'angiogenèse tumorale. Lorsque l'hypoxie est en place, la disponibilité en oxygène suit un gradient depuis les zones de nécrose anoxiques centrales jusqu'à la périphérie, généralement bien vascularisée et perfusée (**Figure 17**) (Kempf *et al.* 2015).

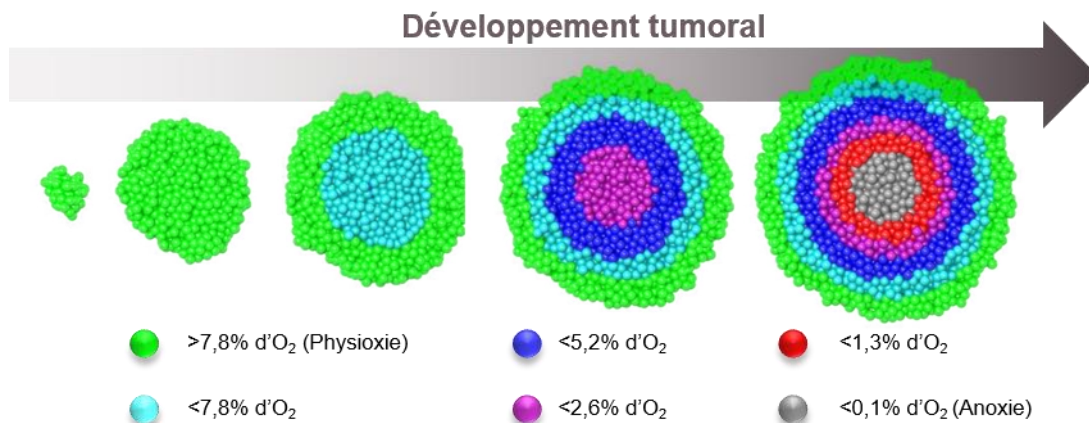


Figure 17 | La mise en place du gradient d'oxygène durant le développement tumoral. Ce schéma obtenu par analyse *in silico* résume la distribution de l'oxygène au cours de la croissance tumorale. Adapté de Kempf *et al.* 2015.

3. LA MESURE DE L'HYPOXIE INTRA-TISSULAIRE

Plusieurs méthodes plus ou moins invasives ont été mises au point pour mesurer l'oxygénation tumorale, de la cellule au compartiment vasculaire. Il faut toutefois noter que la mesure de l'oxygénation tissulaire est encore à ce jour un challenge, notamment en routine clinique.

Au niveau moléculaire, l'hypoxie peut être révélée par immunohistochimie dirigée contre les molécules activées par l'hypoxie comme le facteur HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 α*) ou ses cibles comme l'anhydrase carbonique 9 (CAIX), le transporteur au glucose 1 (GLUT1) ou le VEGF. Une autre manière de détecter l'hypoxie est de révéler la prise de molécules par les cellules, après une injection par voie systémique avant la biopsie, dont le métabolisme est modifié par la présence ou non d'oxygène tels que les dérivés imidazoles (pimonidazole, EF5, etc.). La limite de l'immunohistochimie est sa nature invasive et limitée à une petite biopsie qui ne rend pas compte de l'hétérogénéité de la tumeur.

La manière la plus directe d'évaluation de l'oxygénation tissulaire est de mesurer la pression tissulaire en oxygène (ptO_2) par des sondes directement implantées dans le cerveau. Cependant, ces sondes permettent une mesure de la ptO_2 focale, encore une fois peu représentative de l'ensemble de la tumeur. De plus, sa nature grandement invasive pose des questions quant à sa généralisation en routine clinique.

Afin de palier à ces limites, des méthodes en imagerie moins invasives ont été développées et détaillées dans la littérature (Corroyer-Dulmont *et al.* 2015). Elles permettent une mesure de l'oxygénation dans différents compartiments tumoraux. L'oxygénation du compartiment vasculaire peut être évaluée par IRM-BOLD (*Blood Oxygen Level-Dependent*). Cette approche permet de détecter les variations de la quantité sanguine de desoxyhémoglobine (desoxyHb), qui est paramagnétique. Le signal BOLD est dépendant de nombreux paramètres comme la réactivité vasculaire et l'oxygénation du tissu mais il est difficile d'en ressortir un par rapport aux autres. Cependant, à partir de la relation entre le signal BOLD et le ratio Hb/desoxyHb, une méthode a été développée pour mesurer la saturation en oxygène ($SatO_2$) et appelée qBOLD pour BOLD quantitatif. La relation entre le signal $T2^*$ et la $SatO_2$ est complexe et dépend de plusieurs paramètres comme le volume sanguin cérébral (CBV), la valeur locale d'hématocrite, la valeur de T2 du tissu ou le champ magnétique B_0 . La quantification et l'intégration de ces paramètres permet d'établir une carte de $SatO_2$ (**Figure 18**). Au niveau préclinique, Christen *et al.* ont démontré la sensibilité de cette méthode pour détecter des modifications de l'oxygénation cérébrale dans un modèle orthotopique de GB (Christen *et al.* 2014) et cette méthodologie a également été validée par rapport à d'autres méthodologies de référence dans plusieurs modèles de gliomes (Valable *et al.* 2016). L'utilisation de l'IRM qBOLD permet de corriger certaines faiblesses de l'IRM BOLD standard mais requiert encore d'être validée pour sa spécificité vis-à-vis de l'hypoxie. En effet, la relation entre la $SatO_2$ et la ptO_2 n'est pas linéaire et elle est influencée par de nombreux paramètres. Cependant l'extrapolation de la $SatO_2$ à partir de la ptO_2 est faisable en condition physiologique (Corroyer-Dulmont *et al.* 2015).

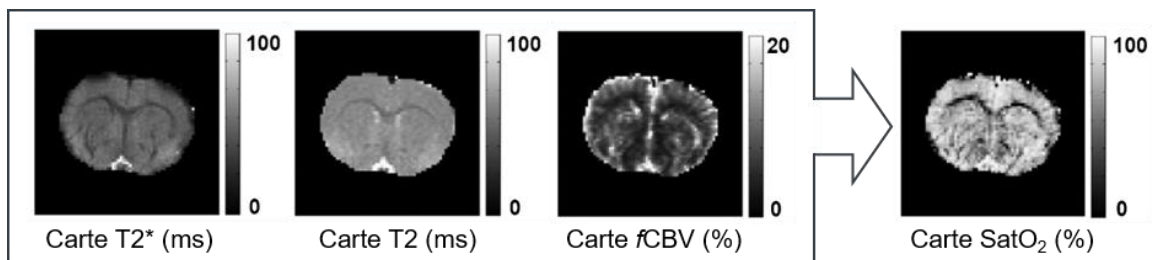


Figure 18 | Quantification de la saturation en oxygène à partir du signal BOLD. A partir d'images intermédiaires (Cartes T2*, T2 et de volume sanguin [$fCBV$]) il est possible d'extraire une carte quantitative de saturation en oxygène dans le sang. Adapté de Christen *et al.* 2011.

Au niveau cellulaire, la méthode la moins invasive pour mesurer l'hypoxie est la tomographie par émission de positons (TEP). Le premier isotope radioactif à avoir été utilisé pour mesurer le niveau d'oxygène dans le cerveau a été l'oxygène 15 (^{15}O). L'utilisation de ^{15}O a été validée pour l'utilisation de nombreuses méthodes quantitatives permettant d'établir des cartes de flux sanguin cérébral, de volume sanguin cérébral, de fraction d'extraction de l'oxygène et de métabolisme cérébral de l'oxygène avec de H_2O , du CO et de O_2 marqués. Cependant, l'utilisation de ^{15}O n'est pas adaptée à l'oncologie du fait du métabolisme particulier des cellules tumorales, indépendant de la consommation en oxygène (Effet Warburg).

Le radio-traceur le plus étudié pour évaluer l'hypoxie est le [^{18}F]-Fluoromisonidazole ([^{18}F]-FMISO). Ce radio-traceur est très sélectif de l'hypoxie sévère, autour de 7 mmHg, et de plus en plus utilisé dans le cadre des gliomes où il permet notamment de différencier les différents grades. Il a également été montré que la captation de [^{18}F]-FMISO est inversement proportionnelle à la survie des patients (**Figure 19**) (Kawai *et al.* 2014). Sa limite est sa faible sensibilité relative aux hypoxies modérées (entre 10 et 30 mmHg) (Corroyer-Dulmont *et al.* 2015).

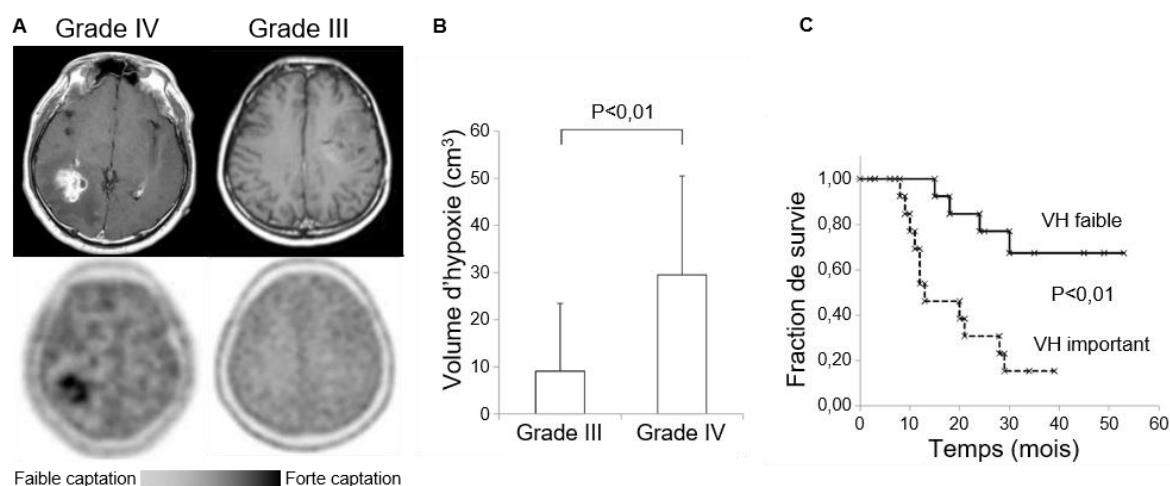


Figure 19 | Corrélation entre la captation de [^{18}F]-FMISO, le grade des gliomes et la survie des patients. **A.** Images obtenues par IRM T1-w après injection d'un agent de contraste (haut) et en TEP [^{18}F]-FMISO des tumeurs correspondantes (bas). **B.** La TEP [^{18}F]-FMISO permet d'évaluer le volume d'hypoxie associé à chaque grade de gliome. **C.** Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des patients en fonction du volume d'hypoxie de leur tumeur. VH = Volume d'hypoxie. Adapté de Kawai *et al.* 2014.

4. L'HYPOXIE EST UN FACTEUR DE MAUVAIS PRONOSTIC POUR LES PATIENTS

L'hypoxie est une caractéristique commune à tous les GB mais des disparités existent entre les patients. Plusieurs travaux ont montré que la sévérité et le volume de l'hypoxie sont corrélés à la survie des patients (**Figure 19**). Plus l'hypoxie est sévère et le volume de la région atteinte est important, moins la survie des patients est élevée (Kawai *et al.* 2014; Evans *et al.* 2010; Spence *et al.* 2008).

Pour se prémunir contre le stress induit par la diminution de la pression en oxygène, les cellules s'adaptent et mettent en place des mécanismes de survie qui, dans le cas de cellules cancéreuses, vont participer à la progression tumorale. Les études menées en imagerie notamment ont permis de montrer les relations complexes existant entre les cellules tumorales, la vascularisation et l'hypoxie (Bekaert *et al.* 2017). Il a été montré que, malgré une augmentation importante de la densité vasculaire, l'hypoxie reste très marquée dans la tumeur.

B. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF

Au niveau moléculaire la réponse à l'hypoxie est dépendante du facteur induit par l'hypoxie (HIF pour *Hypoxia Inducible Factor*). Le facteur HIF est un hétérodimère composé d'une sous-unité α sensible à l'oxygène et d'une sous-unité β exprimée de manière constitutive par la cellule (également appelée ARNT pour *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). Il existe 3 types de sous-unités α : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . Au niveau structurel, l'ensemble de ces sous-unités possède une structure basique en hélice-boucle-hélice (bHLH pour *basic-Helix-Loop-Helix*) qui permet la fixation à des séquences spécifiques de l'ADN, que l'on appelle éléments de réponse à l'hypoxie (HRE pour *Hypoxia Responsive Element*), un domaine PAS (pour Per-Arnt-Sim) impliqué dans la dimérisation et des domaines de transactivation (TAD) leur conférant leur activité transcriptionnelle. Toutefois, seules les sous-unités HIF- α possèdent un domaine riche en résidus lysines et prolines (ODDD), responsable de leur dégradation en présence d'O₂ (Masoud & Li 2015) (**Figure 20**).

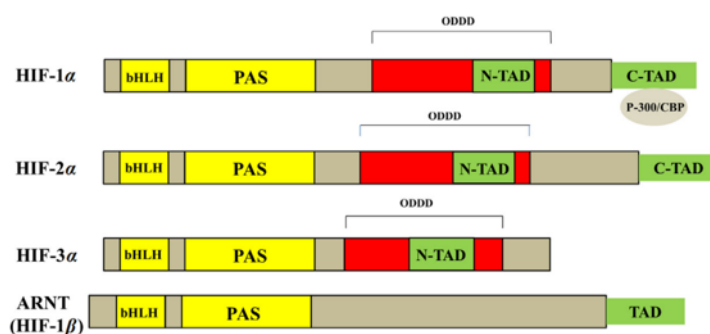


Figure 20 | | Structure des sous-unités HIF. bHLH = *basic-Helix-Loop-Helix*, TAD = *TransActivation Domain*, C-TAD = *COOH-Terminal TAD*, N-TAD = *NH₂-Terminal TAD*, ODDD = *Oxygen-Dependent Degradation Domain*, PAS = *Per-Arnt-Sim*. D'après Masoud & Li 2015.

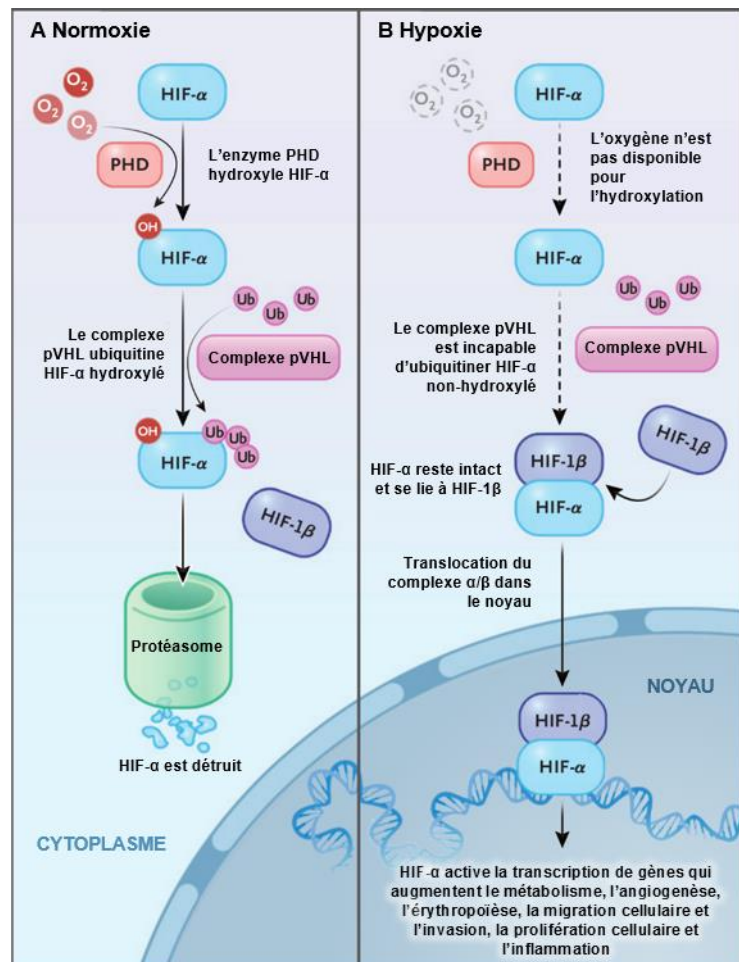
1. EFFETS MOLECULAIRES D'UNE DIMINUTION DE L'OXYGENE

L'oxygène est l'acteur majeur qui conditionne la stabilité de la sous-unité α . En présence d'oxygène (**Figure 21A**), une enzyme de la famille des PHD (*Prolyl Hydroxylases Domain*) hydroxyle la sous-unité α sur son domaine riche en proline. Ceci permet sa reconnaissance par la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL) qui entraîne son ubiquitination puis sa dégradation par le protéasome. En revanche, en condition d'hypoxie (**Figure 21B**), l'enzyme PHD ne peut pas hydroxyle HIF- α qui n'est donc plus reconnue par pVHL et par le protéasome, entraînant sa stabilisation dans la cellule. HIF- α forme alors un dimère avec HIF-1 β , ce qui entraîne la translocation de ce complexe dans le noyau de la cellule, sa fixation aux séquences HRE de ses gènes cibles et enfin l'exercice de son activité transcriptionnelle (Simon 2016).

Figure 21 | Détection de l'oxygène par la cellule.

A. La machinerie moléculaire essentielle pour la détection de l'oxygène par la cellule est mise en action lorsque l'oxygène est abondant : Les sous-unités HIF- α (*Hypoxia Inducible Factor α*) sont hydroxylées sur des résidus proline par une famille d'enzymes spécifiques de HIF, les *Prolyl Hydroxylases Domain* (PHD), ce qui permet leur reconnaissance par la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL) qui contient des complexes *ubiquitin ligase*. La sous-unité HIF- α hydroxylée est alors dégradée par le protéasome. **B.** Lorsque le niveau d'oxygène diminue, les enzymes PHD sont inhibées, ce qui permet la stabilisation de HIF- α , sa dimérisation avec HIF-1 β , et l'induction de la transcription de gènes cibles.

Adapté de Simon 2016.



Parmi les 3 types de sous-unités α , HIF-1 α et HIF-2 α sont régulées de la même manière et sont les plus étudiées. La sous-unité HIF-3 α est à ce jour moins documentée et il semble que son activité soit différente des deux premières. Bien que leur régulation soit identique et que leur cible soit les séquences HRE, il semble également qu'il existe des différences

entre les sous-unités HIF-1 α et HIF-2 α quant à leur stabilisation en fonction du temps et du degré d'hypoxie. HIF-1 α serait plutôt stabilisé lors d'hypoxies aiguës et sévères, moins de 24h, alors que HIF-2 α prendrait le relais lors d'hypoxie chroniques et moins sévères (Koh & Powis 2012). De plus, il convient de mentionner qu'il existe des différences importantes quant à l'implication respective de HIF-1 α et HIF-2 α dans l'expression de gènes induite par l'hypoxie selon le type cellulaire ou le tissu considéré. (Keith *et al.* 2011).

2. LES GENES CIBLES DE HIF

Comme nous l'avons vu, ces gènes ont en commun de posséder des séquences HRE où se fixe le facteur de transcription HIF. Ces séquences sont de la forme RCGTG (où R peut être A ou G) et présentes au sein des séquences régulatrices des gènes inductibles par l'hypoxie.

Ces gènes sont ainsi impliqués dans de nombreux processus cellulaires, notamment la glycolyse pour pallier au dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative, l'angiogenèse pour permettre un apport d'oxygène par le sang ou, comme nous le verrons plus en détails (chapitre **IV.B**), l'érythropoïèse (**Tableau 4**). De nombreux gènes cibles de HIF sont encore actuellement découverts.

Tableau 4 | Exemples de gènes cibles de HIF-1 α et HIF-2 α . Adapté de Keith *et al.* 2011.

Facteur de transcription	Gène cible	Fonction	Type cellulaire
HIF-1 α & HIF-2 α	GLUT1	Transport du glucose	CSE souris & CCR
	CAIX	Régulation du pH	CCR
	ADM	Angiogenèse	CCR
	VEGF	Angiogenèse	CCR & Hep3B
HIF-1 α	VEGF	Angiogenèse	CE et CSE souris
	BNIP3	Autophagie, apoptose	CCR
	HK1	Glycolyse	CSE souris
	HK2	Glycolyse	CSE souris & CCR
	PFK	Glycolyse	CSE souris & CCR
	ALDA	Glycolyse	CSE souris & CCR
	PGK1	Glycolyse	CSE souris & CCR
	LDHA	Glycolyse	CSE souris & CCR
HIF-2 α	EPO	Erythropoïèse, facteur de croissance	Rein et foie
	OCT4	Caractère de cellules souche	CSE souris
	TGF α	Facteur de croissance	CCR
	CCND1	Cycle cellulaire	CCR
	ANG2	Remodelage des vaisseaux sanguins	CSE souris

ADM : Adrénoméduline ; ALDA : Aldolase A ; ANG2 : Angiopoïétine 2 ; BNIP3 : BCL2/*Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3* ; CAIX : Anhydrase carbonique IX ; CCND1 : Cycline D1 ; EPO : Erythropoïétine ; GLUT1 : *Glucose transporter 1* ; HK1/2 : Hexokinase 1/2 ; LDHA : Lactate déshydrogénase A ; OCT4 : *Octamer-binding transcription factor 4* ; PFK : Phosphofructokinase ; PGK1 : Phosphoglycérate kinase 1 ; TGF- α : *Transforming growth factor alpha* ; VEGF : *Vascular endothelial growth factor*.

CSE : Cellule souche embryonnaire ; CCR : Cellule de carcinome rénal ; CE : Cellule endothéliale.

En condition physiologique, les facteurs HIF induisent ainsi l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'adaptation des cellules au stress généré par le manque d'oxygène. Cependant, l'expression de ces gènes par les cellules tumorales participe à leur survie et à leur prolifération et donc à la croissance tumorale et la résistance aux traitements. Il a été montré que l'expression du facteur HIF-1 α est fortement augmentée dans les GB par rapport au tissu sain et associée à un faible pronostic pour les patients (Cao *et al.* 2013) (**Figure 22**).

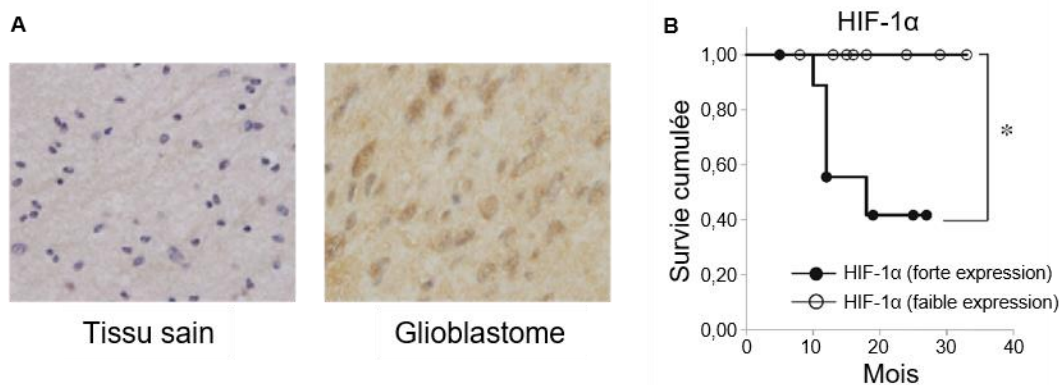


Figure 22 | L'expression de HIF-1 α dans le glioblastome est associée à un faible pronostic pour le patient. A. Coupes histologiques de tissu sain et de glioblastome avec immunohistochimie dirigée contre la protéine HIF-1 α (marquage brun). **B.** Courbe de Kaplan-Meier représentant la survie des patients en fonction du niveau d'expression de HIF-1 α . Adapté de Cao *et al.* 2013.

C. LES CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE : PHYSIOPATHOLOGIE

1. A L'ECHELLE CELLULAIRE

A travers l'expression des gènes induits par les facteurs HIF, l'hypoxie provoque de nombreuses adaptations dans le fonctionnement de la cellule.

a) Les changements métaboliques induits par l'hypoxie

La conséquence la plus fondamentale de l'activation de HIF- α est une transition du métabolisme énergétique de la cellule, induite par l'activation de voies de signalisation impliquées dans le métabolisme cellulaire et l'angiogenèse et aboutissant au final à une

régulation de l'apport de la consommation de l'oxygène et du glucose. L'hypoxie orchestre donc une adaptation au stress métabolique par l'induction de l'expression de la plupart des gènes connus codant pour les enzymes glycolytiques et les transporteurs du glucose (GLUT1 et GLUT3) ainsi que les transporteurs du lactate et les régulateurs du pH (*MonoCarboxylate Transporters* [MCT] et Anhydrases Carboniques [CA]). En parallèle, HIF- α limite le métabolisme oxydatif de la mitochondrie et inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs. HIF- α augmente également l'angiogénèse et la prolifération des cellules endothéliales en augmentant l'expression de facteurs angiogéniques comme le VEGF-A ou les angiopoïétines (**Figure 23**) (Vartanian *et al.* 2014).

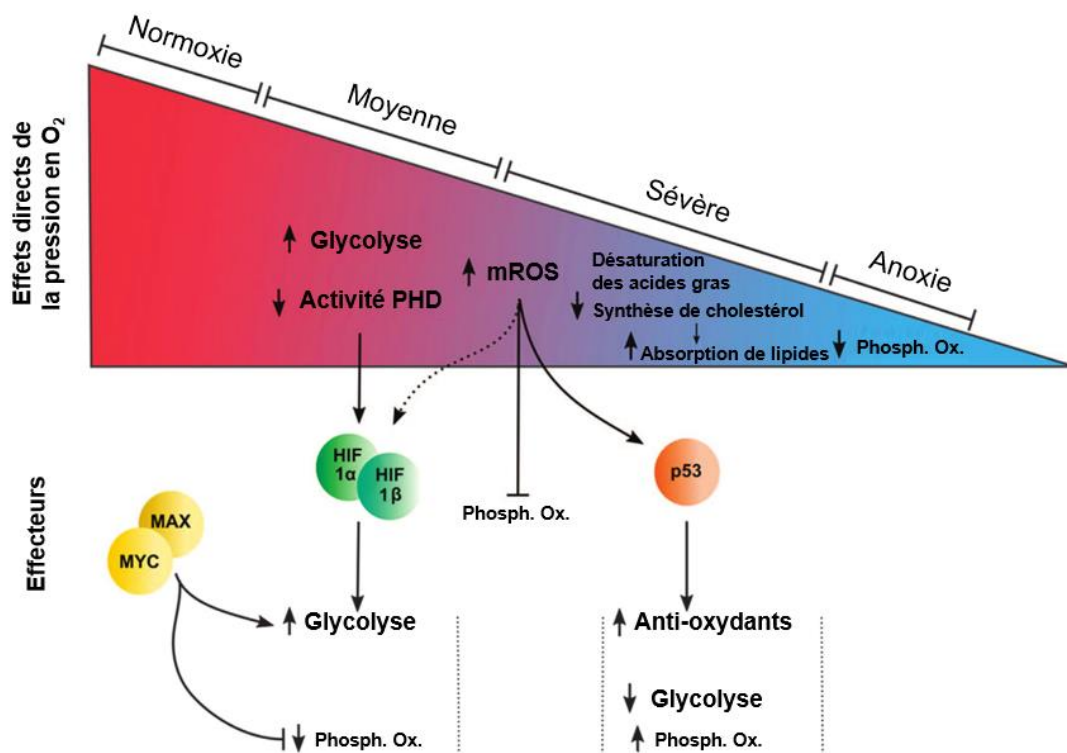


Figure 23 | Hypoxie et adaptation métabolique. La diminution de la pression en oxygène induit des modifications du métabolisme par l'intermédiaire de plusieurs mécanismes. Les effets directs de la pression en oxygène sur le métabolisme sont représentés sur la partie haute du schéma et ceux qui dépendent de voies de signalisation activées par l'hypoxie sont représentés sur la partie basse. PHD = *Prolyl-Hydroxylase Domain*, mROS = *mitochondrial Reactive Oxygen Species*, HIF = *Hypoxia Inducible Factor*, MAX = *Myc-Associated Protein X*, MYC = *V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homologue*, Phosph. Ox. = Phosphorylation Oxydative. D'après Eales *et al.* 2016.

b) Effets de l'hypoxie sur la prolifération cellulaire

Selon le degré de sévérité de l'hypoxie, les effets sur la prolifération cellulaire ne sont pas identiques. Il semble qu'une hypoxie modérée favorise la prolifération cellulaire. En

effet, parmi les cibles de HIF se trouvent plusieurs gènes codant pour des facteurs de croissance comme le facteur dérivé de l'insuline (IGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) ou l'EPO (Mori *et al.* 2016; Clara *et al.* 2014). Au contraire, une hypoxie sévère entraîne une inhibition de la prolifération cellulaire (Richards *et al.* 2016). Le facteur de transcription HIF induit également l'expression des protéines p21 et p27 (Goda *et al.* 2003), dont le rôle semble prépondérant lorsque la pression en O₂ est critique. Ces deux protéines sont des inhibiteurs de la cycline D1, protéine indispensable à la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire. L'hypoxie sévère induit donc une diminution de la prolifération alors que l'hypoxie modérée, la plus souvent observée dans les GB, est plutôt bénéfique pour la prolifération des cellules.

c) Hypoxie et niches pour cellules souches

L'hypoxie favorise l'auto-renouveaulement des CSN et des CSG *in vitro* (Li *et al.* 2009). Il a été montré que la régulation de la réponse à l'hypoxie dans les CSG passe par HIF-2 α dont l'expression est augmentée par rapport aux cellules tumorales classiques. Son expression est également associée à un mauvais pronostic chez les patients (Li *et al.* 2009). Un pourcentage élevé de cellules positives au CD133, un marqueur des cellules souches, a été observé dans les régions pseudo-palissadiques entourant le cœur nécrotique des GB. Ces régions pseudo-palissadiques étant des zones hypoxiques, elles semblent donc représenter des niches favorisant la survie et la résistance des CSG au même titre que les espaces péri-vasculaires (**Figure 24**) (Chen *et al.* 2012; Christensen *et al.* 2008).

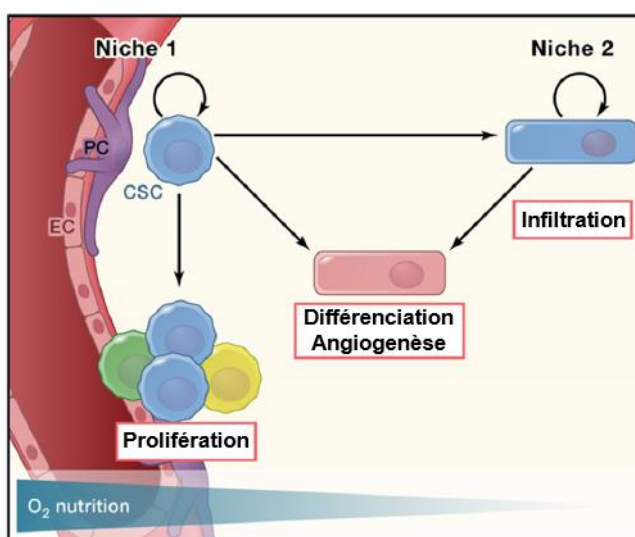


Figure 24 | Les niches pour cellules souches cancéreuses. Les niches vasculaires sont importantes pour la croissance des gliomes, probablement du fait de la sécrétion de facteurs dans cette niche par les cellules endothéliales, ainsi que du fait de l'apport de nutriments par les vaisseaux sanguins. Au contraire, les cellules souches de gliome s'infiltrent dans le tissu et maintiennent probablement leur caractère souche à travers l'activation de voies de signalisation dépendante de l'hypoxie. EC = Cellule endothéliale, PC = Péricyte, CSC = Cellule Souche Cancéreuse. D'après Chen *et al.* 2012.

2. A L'ECHELLE TISSULAIRE

a) Le gradient d'oxygène et la zone de nécrose centrale

Malgré tous les mécanismes mis en œuvre par les cellules tumorales pour s'adapter à la diminution de la disponibilité en oxygène, la prolifération extrêmement rapide de ces cellules entraîne la création de zones d'anoxie où l'oxygène est absent ou quasi-absent. La privation d'oxygène prolongée induit la mort par nécrose des cellules dans ces régions, aboutissant à la création de foyers nécrotiques. La présence de ces régions nécrotiques est une caractéristique des GB. Ces zones sont entourées de zones caractérisées par une hyper-cellularité appelée zone de pseudo-palissade (**Figure 25**). En dépit de cette hyper-cellularité, les zones de pseudo-palissades sont formées de cellules non-prolifératives car en état d'hypoxie sévère. L'hyper-cellularité s'explique par la présence de cellules ayant migré hors de la zone de nécrose pour se rapprocher d'une source d'oxygène (Brat *et al.* 2004).

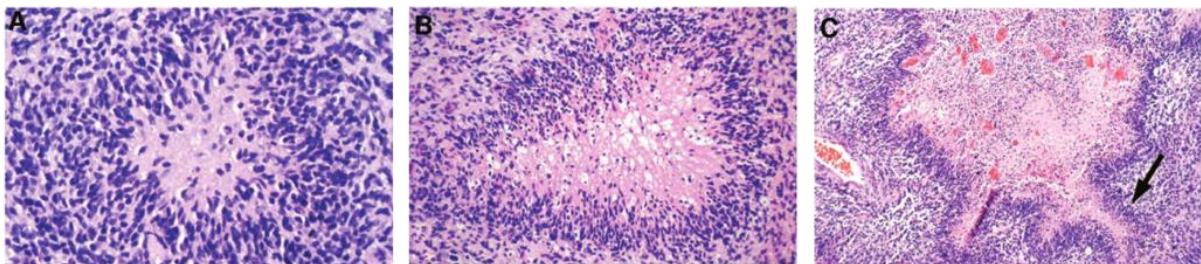


Figure 25 | Les foyers nécrotiques dans les glioblastomes. Mise en évidence des zones de pseudo-palissades et de nécroses sur des coupes histologiques de glioblastomes après marquage Hématoxyline/Eosine **A.** Zone de pseudo-palissade de petite taille (<100µm) sans foyer nécrotique. **B.** Foyer nécrotique de taille moyenne (200-400 µm) entouré d'une zone de pseudo-palissade. **C.** Foyer nécrotique de taille importante (>500 µm) entouré d'une zone de pseudo-palissade. On peut noter la présence de vaisseaux au centre de la zone de nécrose (en rouge). Adapté de Brat *et al.* 2004.

b) Les changements de pH extracellulaire

Le pH extracellulaire des GB est généralement compris entre 7,2 et 6,5 (Coman *et al.* 2016) et l'hypoxie joue un rôle important dans la mise en place de ce pH acide via le métabolisme du lactate et l'expression de la CAIX. Premièrement, suite à la fermentation lactique, les cellules tumorales libèrent du lactate et des protons dans le milieu extracellulaire, via les transporteurs MCT4, afin de maintenir leur pH intracellulaire. Deuxièmement, le gène de la CAIX est une cible de HIF et elle est donc surexprimée en condition d'hypoxie. Cette enzyme transmembranaire catalyse l'hydratation du CO₂, ce qui aboutit à la sortie de bicarbonate et de protons de la cellule. La CAIX n'est pas

exprimée dans le tissu cérébral sain mais est surexprimée dans les GB (Miranda-Gonçalves *et al.* 2013). Au final, ces deux mécanismes induisent l'acidification du milieu extracellulaire (**Figure 26**).

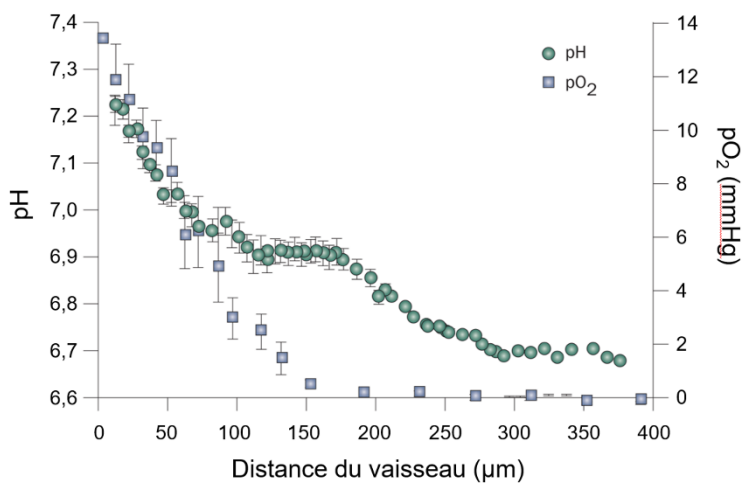


Figure 26 | Relation entre la distance aux vaisseaux, le pH et la pression en oxygène. Valeurs de pH et de pO₂ interstitielles moyennes en fonction de la distance au vaisseau le plus proche. Le pH et la pO₂ deviennent significativement bas au-delà de 100 μm depuis le vaisseau le plus proche. Adapté de Jain & Stylianopoulos, 2016.

D. LA RESISTANCE A LA RADIOTHERAPIE

L'une des conséquences les plus importantes de l'hypoxie dans les GB concerne la résistance aux traitements et plus particulièrement à la RT.

1. GENERALITES

Afin d'éradiquer les cellules cancéreuses, le mode d'action de la RT passe par un ensemble de changements physiques et chimiques induits dans les tissus tumoraux par une transmission d'énergie par le biais d'un rayonnement ionisant. Un rayonnement ionisant est un rayonnement suffisamment énergétique pour arracher des électrons à la matière et ainsi créer une ionisation.

De nombreux types de radiations ionisantes ont été employés pour le diagnostic médical ou pour des applications thérapeutiques. On peut par exemple citer les photons (rayons X, rayonnement γ), les électrons, les hadrons (neutrons, protons) et les ions lourds (carbone, hélium). Actuellement, les rayons X restent le type de rayonnement le plus communément utilisé, en partie du fait de leur faible coût de production. L'utilisation de particules plus lourdes comme les protons ou les ions carbones s'est développée car elle permettrait de pallier à certaines limites des rayons X. Ceci est dû au fait que ce type de rayonnement dépose la plus grande part de son énergie en une région spatiale relativement étroite appelée le pic de Bragg. L'énergie du faisceau définit la profondeur de celui-ci dans un tissu et peut donc être modulée, ce qui permet une plus grande précision pour ioniser le tissu tumoral et épargner le tissu sain. Cette approche est efficace pour le traitement de certains types de cancer mais est encore limitée par son coût (Kunz-Schughart *et al.* 2017).

2. LES EFFETS PHYSICO-CHIMIQUES ET L'EFFET OXYGENE

Au niveau biologique, les rayonnements ionisants vont engendrer deux types d'effets. Ils peuvent ioniser directement la molécule d'ADN, des lipides ou des macromolécules et créer des radicaux moléculaires, ce sont les effets directs. Ils peuvent également ioniser les molécules d'eau et provoquer la radiolyse de l'eau, créant ainsi des radicaux libres très réactifs et donc très cytotoxiques, ce sont les effets indirects. Ces derniers sont de loin les plus fréquents (**Figure 27**).

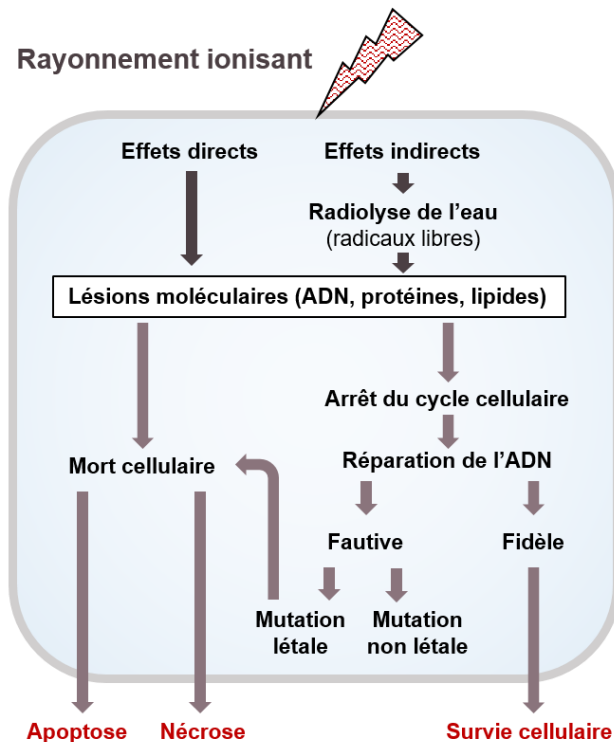
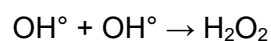
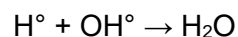
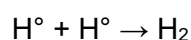


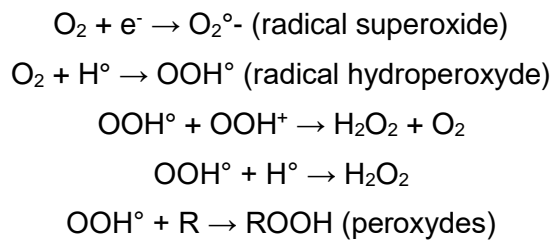
Figure 27 | La réponse biologique de la cellule aux rayonnements ionisants. Deux types d'effets distincts entrent en jeu et aboutissent à des lésions moléculaires qui peuvent entraîner la mort de la cellule.

L'effet des rayonnements ionisants sur les cellules passe donc majoritairement par la radiolyse de l'eau qui crée des espèces radicalaires. Ce sont ensuite ces espèces radicalaires, très réactives qui vont secondairement entraîner des dommages à la cellule.

Lorsque la molécule d'eau est ionisée, elle se dissocie en deux radicaux libres : OH° (radical hydroxyle) et H° (radical hydrogène). Ces radicaux libres, très instables, vont chercher à s'apparier pour former une molécule plus stable.



Dans ce processus deux radicaux hydroxyles peuvent former du peroxyde d'oxygène (H_2O_2) qui entraîne un stress oxydatif à la cellule. En présence d'oxygène, les produits de la radiolyse de l'eau peuvent former d'autres espèces radicalaires et des peroxydes.



Cette augmentation de la production de radicaux libres en présence d'oxygène est connue sous le nom d' « effet oxygène ». Ces produits secondaires de la radiolyse de l'eau vont ensuite attaquer les macromolécules dans la cellule, notamment l'ADN.

3. LA RESISTANCE TUMORALE A LA RADIOTHERAPIE

Le potentiel de l'irradiation dépend donc principalement de sa capacité à induire des lésions non réparables de l'ADN des cellules tumorales. Une caractéristique des cellules tumorales est leur tolérance aux lésions de l'ADN via l'activation de voies de signalisation qui favorisent la survie cellulaire telles que la voie des phosphatidylinositol-3 kinases (PI3K/Akt), la voie du *Nuclear Factor κB* (NF-κB) ou la voie des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK). Cette caractéristique réduit l'efficacité de la RT sur les cellules cancéreuses.

En plus de ces mécanismes intrinsèques, le microenvironnement de la cellule tumorale joue aussi un rôle important dans la réponse à la RT. Le niveau d'oxygène intra-tumoral est l'un des facteurs les plus importants. Comme nous l'avons vu précédemment, la distribution de l'oxygène est très inégale au sein de la tumeur à cause de la vascularisation désorganisée, perméable, fragile et peu fonctionnelle. Les cellules cancéreuses résidant dans ces zones hypoxiques sont protégées des lésions à l'ADN induites par les radiations ionisantes à la fois en raison d'une génération moindre d'espèces radicalaires et de l'activation de mécanismes de survie induits par la régulation de HIF-1α (**Figure 28**). Ainsi

lorsque la ptO_2 est inférieure à 5 mmHg, l'efficacité de la RT sur les cellules tumorales diminue de 2,5 à 3 fois (Wilson & Hay 2011). Cet effet est appelé *Oxygen Enhancement Ratio* (OER) et correspond au rapport entre la dose à déposer en normoxie et celle à déposer en hypoxie pour avoir un effet thérapeutique équivalent.

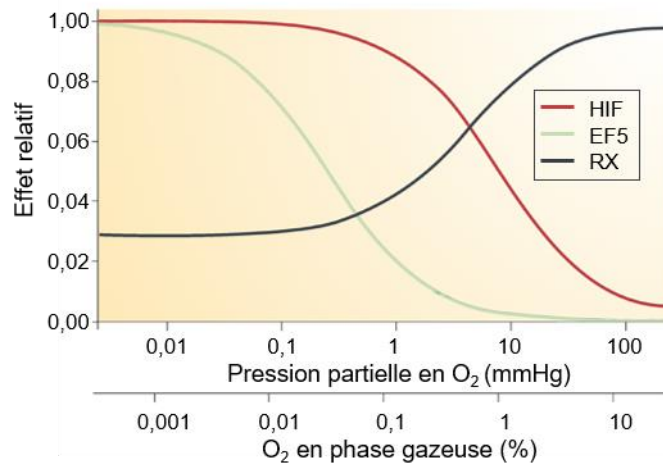


Figure 28 | L'effet des rayonnements ionisants est dépendant de l'oxygène. Représentation schématique de la dépendance à la quantité d'oxygène des rayonnements ionisants. La courbe est basée sur des études de clonogénicité après irradiation à différents niveaux d'oxygène. Le niveau d'expression de HIF et la captation d'EF5, marqueur de l'hypoxie, sont également représentés parallèlement. Adapté de Wilson & Hay 2011.

4. LES APPROCHES DE RADIO-SENSIBILISATION

Devant l'échec de la RT vis-à-vis de certains types de cancers, notamment les GB, de nombreuses stratégies de radio-

sensibilisation ont été développées. Ces stratégies ont pour but d'essayer d'améliorer l'efficacité de la RT au sein de la tumeur afin de préserver le tissu sain tout en augmentant la dose locale de RT dans les cancers. Parmi ces stratégies, comme par exemple celles utilisant des inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans la réparation des lésions de l'ADN (Kievit *et al.* 2017), beaucoup ont fait ou font actuellement l'objet d'essais cliniques (Kunz-Schughart *et al.* 2017). Nous allons détailler deux de ces approches parmi les plus étudiées dans le cadre des GB.

a) L'augmentation locale de la dose

Une première approche utilisée pour améliorer l'efficacité de la RT consiste à apporter spécifiquement au sein de la tumeur des composés susceptibles d'augmenter localement la dose de RT. Ceci permet d'avoir un effet biologique plus important au sein de la tumeur tout en épargnant le tissu sain et sans augmenter la dose globale envoyée sur le patient.

L'une des méthodes utilisées pour augmenter localement la dose de RT consiste à combiner les rayons X avec une exposition à des nanoparticules métalliques contenant des atomes avec un numéro atomique Z élevé. Cette approche, connue depuis plus de 10 ans (Mehta *et al.* 2003) est basée sur l'interaction des photons de basse énergie avec ces éléments (Berbeco *et al.* 2011). Au cours de cette interaction, les photons sont

absorbés par les nanoparticules qui relâchent par la suite des photoélectrons et des électrons Auger (**Figure 29**), ce qui conduit à une augmentation locale de la dose et la création d'espèces radicalaires, lésant les cellules avoisinantes (Sicard-Roselli *et al.* 2014).

Plusieurs études ont ainsi étudié l'intérêt d'utiliser des nanoparticules comportant des atomes d'or pour augmenter l'efficacité de la RT sur les GB. Il a ainsi été montré qu'une irradiation de cellules de GB en présence d'atomes d'or permettait d'augmenter par 2 le nombre de lésions à l'ADN (Sun *et al.* 2016).

Récemment des nanoparticules porteuses d'atomes de gadolinium ont été mises au point et ont montré des résultats prometteurs dans des études précliniques sur des modèles de tumeurs cérébrales (Kotb *et al.* 2016). Ces particules de taille nanométrique, nommées AGuIX®, sont porteuses d'atomes de gadolinium (**Figure 30A&B**). *In vitro*, il a été montré qu'elles permettent d'augmenter le nombre de lésions à l'ADN à dose d'irradiation équivalente (**Figure 30C**). *In vivo*, il a été montré qu'elles s'accumulent spécifiquement dans la tumeur, la présence de gadolinium, agent de contraste T1 étant utile pour le diagnostic des GB (**Figure 30D**). Enfin la survie

des animaux ayant été irradiés après injection d'AGuIX® est augmentée par rapport à ceux n'en ayant pas reçus (**Figure 30E**) (Kotb *et al.* 2016). Ce type de molécule permettant à la fois de diagnostiquer les tumeurs, de par la présence d'agent de contraste T1, et de les traiter est appelé agent **théranostique**. Dans le cas des radio-sensibilisants, on parle même de médicament activable puisqu'ils exercent leur effet délétère sur les cellules uniquement en présence de rayonnements. Un essai clinique de phase I réalisée avec cette nanoparticule est en cours dans le cadre du traitement de métastases cérébrales (Identifiant : NCT02820454).

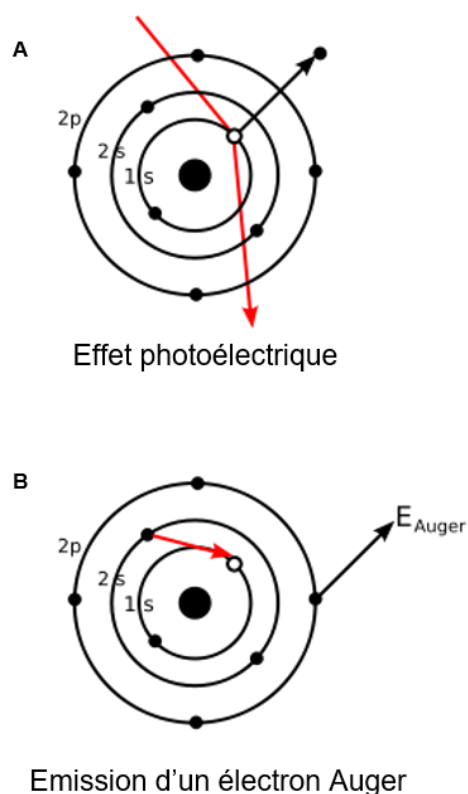


Figure 29 | L'effet Auger. A. Un électron ou un photon incident transmet son énergie à un électron d'une couche interne, alors appelé photoélectron, qui est éjecté. B. Un électron d'une couche externe vient remplir le trou laissé par le photoélectron et ce faisant il perd de l'énergie. Cette énergie de transition est soit émise sous forme de rayons X, soit transmise à un électron d'une couche encore plus externe qui est émis. Au final il y a donc 2 électrons émis par l'atome : un photoélectron et un électron Auger.

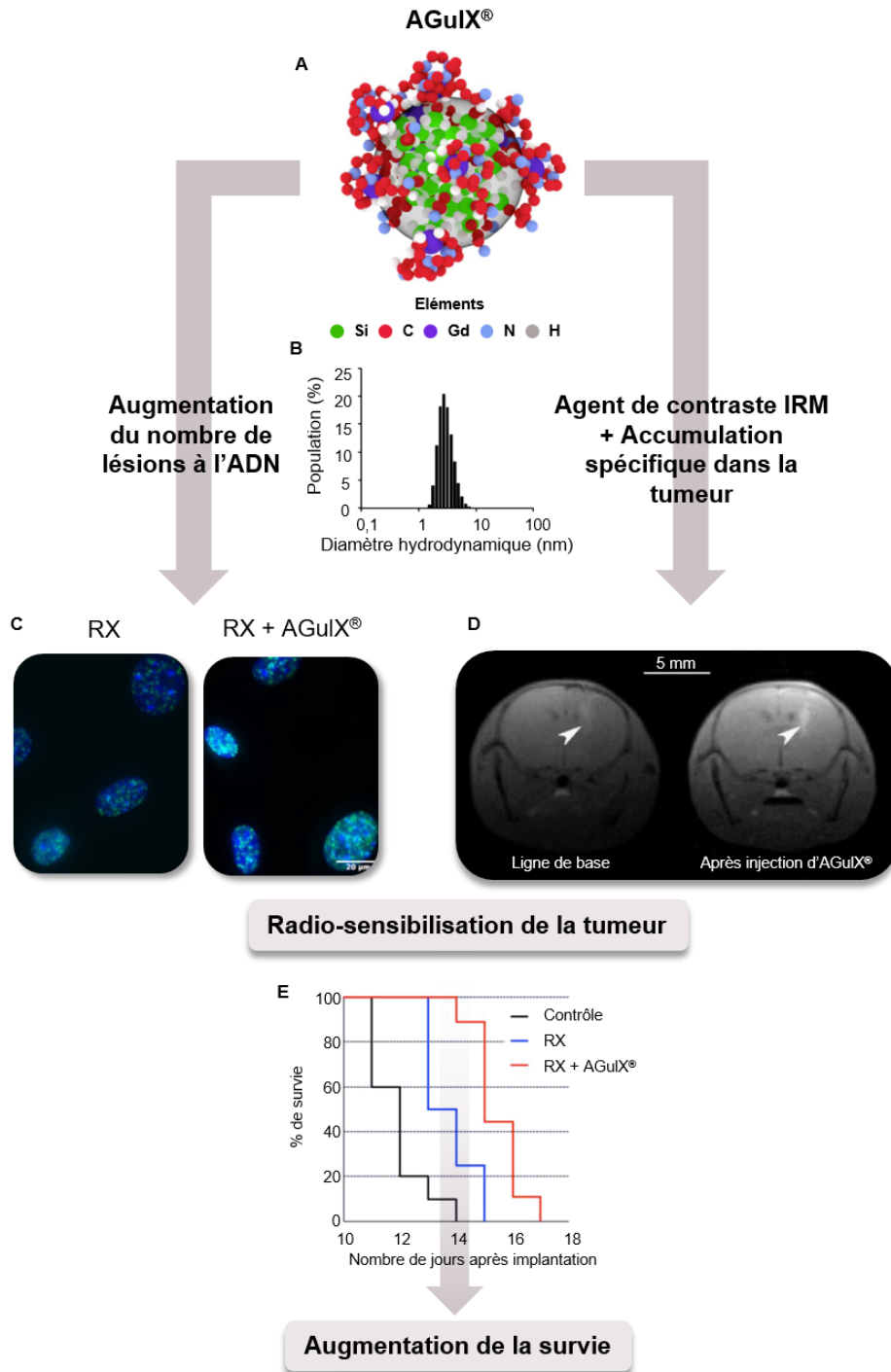


Figure 30 | Un outil théranostique pour les tumeurs cérébrales : l'exemple des AgulX®. **A.** Représentation de la nanoparticule AgulX®. **B.** Mesure de son diamètre hydrodynamique. **C.** Immunocytochimie révélant la présence de foci γ -H2AX (vert), marqueur des cassures double-brin de l'ADN, et le noyau des cellules (bleu). **D.** Images IRM T1-w du cerveau de souris porteuses de tumeurs B16F10 avant et après injection d'AgulX®. La présence de ces agents de contraste T1 est indiquée par la flèche. **E.** Courbe de survie de souris porteuses de tumeurs sans traitement, avec traitement aux RX seuls ou avec traitements aux RX avec AgulX®. Adapté de Kobt *et al.* 2016.

Les résultats obtenus avec ces nanoparticules montrent le potentiel de ces stratégies de radio-sensibilisation pour le traitement des gliomes. Cependant, ce ne sont pas les seules stratégies qui ont été développées pour améliorer l'efficacité de la RT.

b) **Stratégies de réoxygénation gazeuse**

Pour augmenter la quantité d'oxygène intra-tumorale, des stratégies basées sur l'utilisation de gaz ont également été proposées. A titre d'exemple, l'oxygénothérapie hyperbare a été expérimentée. Elle consiste à faire inhaler aux patients de l'oxygène pur sous pression (entre 2 et 4 atmosphères), notamment pendant la RT. Les premiers résultats obtenus dans les années 80 ont été encourageants, l'oxygénothérapie hyperbare permet un contrôle de la tumeur (Dische *et al.* 1983) mais les difficultés de mise en place de la technique, notamment des chambres hyperbares, ont eu raison d'un essai à plus grande échelle.

L'inhalation de carbogène, un mélange de 95% d'O₂ avec 5% de CO₂, a également été évaluée. Le CO₂ étant un puissant agent vasodilatateur, la stratégie est d'augmenter la disponibilité en oxygène dans le sang ainsi que le débit sanguin dans la tumeur. Cette approche a montré de bons résultats dans un certain nombre de modèles de tumeurs solides (Ljungkvist *et al.* 2000). Devant ces résultats prometteurs avec le carbogène, une étude multicentrique intitulée ARCON (*Accelerated Radiotherapy with Carbogen and Nicotinamide*) a été lancée dans les années 90. Le but de l'étude était de tester l'efficacité du carbogène, couplé ou non à du nicotinamide, pour améliorer les effets de la RT dans le cadre de patients présentant des tumeurs hypoxiques (cancers du sein, cancers « tête et cou », tumeurs cérébrales de haut grade). L'objectif de cette étude était de réoxygéner les tumeurs en agissant à la fois sur le débit sanguin et sur l'apport en oxygène pour augmenter l'effet oxygène durant la RT puis d'inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN avec le nicotinamide (Kaanders *et al.* 2002).

Cette approche s'est avérée efficace pour contrôler la progression tumorale des patients atteints de cancers « tête et cou » et s'est reflétée par une augmentation de la survie globale. Cependant, pour les patients atteints de tumeurs cérébrales de haut grade, l'étude a montré que l'inhalation de carbogène au moment de la RT n'améliore pas la survie des patients (Miralbell *et al.* 1999) par rapport à une population de référence ne recevant que de la RT (**Figure 31**).

Depuis la fin des années 90, les avancées réalisées dans le domaine de la mesure de l'oxygénation tissulaire ont permis d'avancer des explications quant à l'échec de cette stratégie de réoxygénation des GB. Il a ainsi été montré que l'efficacité du carbogène pour réoxygéner la tumeur semble être dépendante du volume tumoral (Hou *et al.* 2012). Dans

les premiers stades de développement, le carbogène est efficace pour augmenter la pO_2 à la fois dans le tissu tumoral et le tissu controlatéral. Cependant, rapidement le carbogène échoue à réoxygéner le tissu tumoral (Figure 32A). Ce résultat a récemment été confirmé au sein du laboratoire dans un autre modèle de GB, le

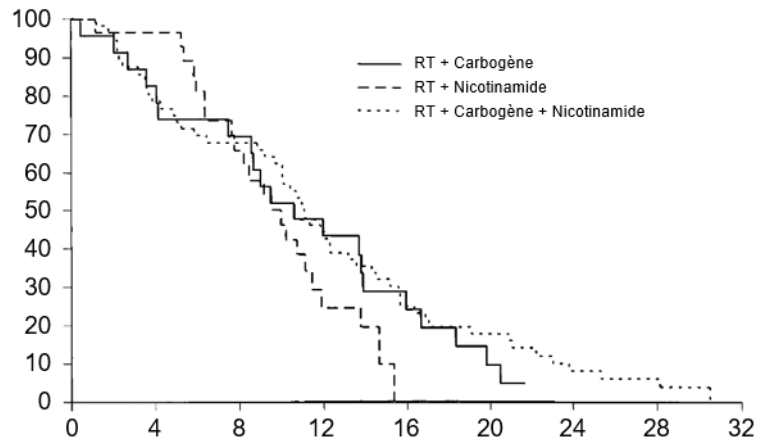


Figure 31 | Courbe de survie des patients atteints de glioblastome dans l'étude ARCON. Adapté de Mirabell *et al.* 1999.

modèle U251, en utilisant l'IRM qBOLD (Chakhoyan *et al.* 2016). Cette étude a permis de montrer que le carbogène permet d'augmenter le volume sanguin et l'oxygénation du tissu sain mais que cette augmentation est beaucoup plus limitée dans le tissu tumoral (Figure 32B). Ceci a été interprété comme un phénomène de vol hémodynamique et non comme une dysfonction de la vascularisation tumorale puisque des approches d'imagerie dynamique ont permis de montrer que dès lors que le challenge en CO_2 est arrêté, le volume sanguin diminue dans le tissu sain et augmente dans la tumeur avant de rapidement revenir à la ligne basale. Ceci montre que le sang est restitué du tissu sain vers la tumeur dans laquelle les vaisseaux sont dilatés, puis que ceux-ci reviennent à leur diamètre initial (Figure 32C).

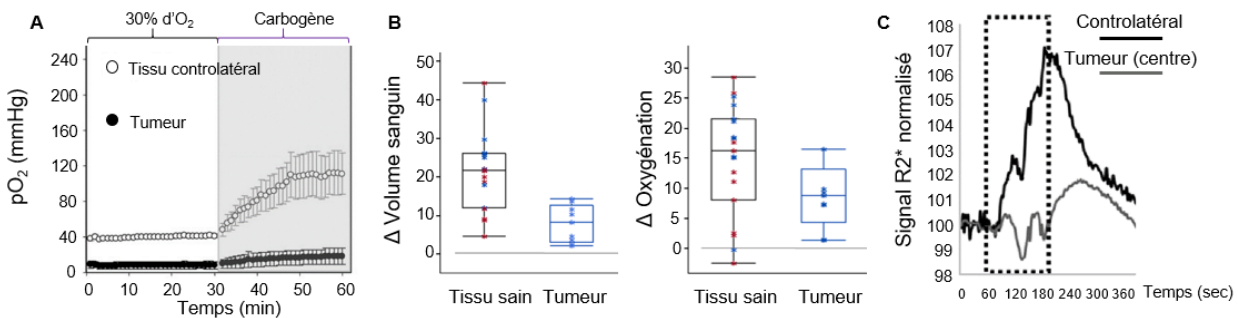


Figure 32 | L'inhalation de carbogène a une efficacité limitée pour réoxygéner le glioblastome. **A.** Evolution de la pO_2 tissulaire d'un gliome (modèle F98) et du tissu controlatéral mesurée à l'aide de sondes oxymétriques pendant 30 min d'inhalation de 30% d' O_2 puis de carbogène. Adapté de Hou *et al.* 2012. **B.** Estimation par IRM de l'évolution du volume sanguin et de l'oxygénation tissulaire dans le tissu sain et dans la tumeur chez un rat après inhalation de carbogène. **C.** Evaluation dynamique de la réponse au carbogène. Le rectangle pointillé représente l'inhalation de carbogène. Adapté de Chakhoyan *et al.* 2016.

Les résultats de ces deux études peuvent expliquer l'échec de l'étude ARCON à améliorer la survie des patients par une inaptitude du carbogène à induire une réoxygénation tumorale au profit du tissu cérébral sain. Pour contourner ce problème, des méthodes de réoxygénation ciblées sont en développement, notamment par l'utilisation de vecteurs. Ces stratégies, très originales, récemment discutées dans la littérature soulèvent cependant des questions. Dans le cas des tumeurs cérébrales, et malgré la présence de l'effet EPR, la taille des vecteurs utilisés est une limite. Les stratégies basées sur l'utilisation de nanoparticules semblent être à ce titre d'un grand intérêt. Ces stratégies sont présentées plus en détails dans le chapitre suivant.

III. STRATEGIES DE VECTORISATION PASSIVE

A. LES NANOPARTICULES POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

1. DEFINITIONS DES NANOPARTICULES

Les nanoparticules (NP) sont définies comme des objets dont au moins une des dimensions a une taille comprise entre 1 et 100 nm. Cela comprend donc à la fois les particules dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique comme les fullerènes, mais aussi celles dont seulement deux dimensions le sont comme les nanotubes et également celles dont une seule dimension l'est comme le graphène (**Figure 33**).

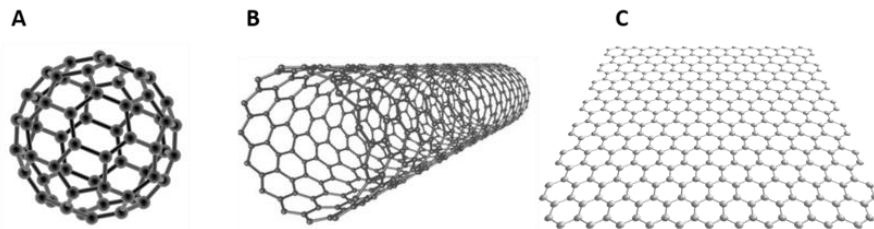


Figure 33 | Des exemples de nanoparticules à base de carbone. A. Fullerène. B. Nanotube de carbone. C. Graphène.

2. LES PROPRIETES DES NANOPARTICULES

Selon sa composition, chaque NP possède des propriétés propres gouvernant sa forme, sa taille, sa charge, etc. qui influencent grandement son interaction avec les systèmes biologiques. Ces caractéristiques sont résumées dans la **Figure 34**.

a) La taille

La taille des NP joue un rôle important sur leur interaction avec les cellules vivantes. Elle influence l'efficacité d'absorption par les cellules, la voie d'internalisation, la localisation intracellulaire et leur toxicité. Cependant, du fait de la variété des nanoparticules et des systèmes biologiques, il est très difficile de corrélérer une réponse cellulaire particulière avec une taille donnée de NP, mais il existe tout de même des tendances générales.

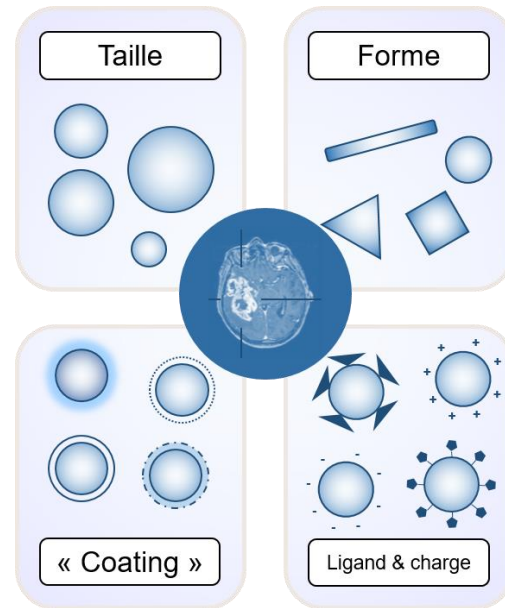


Figure 34 | Les principales propriétés des nanoparticules influençant leur biodistribution, leur élimination et leur ciblage. Adapté de Baetke *et al.* 2015 et Collet *et al.* 2015.

Il y a une taille optimale pour une endocytose efficace des NP, indépendante de leur composition. Cette taille critique peut varier en fonction des types cellulaires et des propriétés de surface des NP. De plus, les petites NP ont une probabilité plus grande d'être internalisées par absorption passive que les grandes NP (**Figure 35**). Enfin, à conditions identiques, les petites NP sont plus susceptibles d'être cytotoxiques (Shang *et al.* 2014).

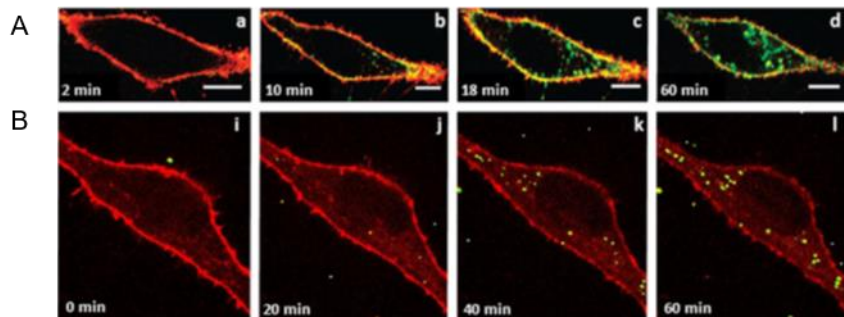


Figure 35 | Endocytose de nanoparticules. **A.** Internalisation de Quantum Dots (8 nm) par des cellules HeLa. Adapté de Jiang *et al.* 2010 *ACS Nano*. **B.** Internalisation de nanoparticules de polystyrène (100 nm) par des cellules souches mésenchymateuses. Adapté de Jiang *et al.* 2010 *Biomacromolecules*.

Parmi tous les paramètres, la taille des NP est celui qui joue le rôle le plus important pour l'effet EPR. Premièrement, seules les NP ayant une taille inférieure aux espaces entre les cellules endothéliales formant les vaisseaux tumoraux (environ 800 nm au maximum) peuvent extravaser. Cependant, les NP avec une taille supérieure à 200 nm sont rapidement éliminées du sang par la rate. Une fois que les NP sont sorties des vaisseaux, leur diffusion dans le tissu est également très dépendante de leur taille. Pour les NP avec une taille relativement faible, qui diffusent assez facilement, un équilibre entre l'extravasation et le retour dans le sang peut rapidement s'établir (Sun *et al.* 2014). De manière générale, les NP ayant une taille supérieure à 30 nm montrent une meilleure rétention dans les tissus et déplacent l'équilibre vers l'extravasation et donc la rétention dans le tissu. En conclusion, les NP ayant une taille comprise entre 30 et 200 nm semblent optimales pour bénéficier de l'effet EPR (Jain & Stylianopoulos 2010).

b) La forme

La forme des NP joue également un rôle dans l'effet EPR. Il a été montré que les NP de forme sphérique (isotrope) tendent à adopter un modèle de flux laminaire dans la circulation sanguine et que seules ces NP qui se déplacent près de la surface des vaisseaux peuvent extravaser dans la tumeur (Ferrari 2005; P. Decuzzi *et al.* 2005). Au contraire, les NP en forme de tubes sont moins stables d'un point de vue hydrodynamique et peuvent avoir du mal à suivre le flux et adopter un modèle plus turbulent lorsqu'elles se déplacent dans la circulation sanguine (Decuzzi *et al.* 2009).

c) La charge de surface et le potentiel zêta

La charge de surface des NP joue également un rôle dans leurs interactions avec les systèmes biologiques et influence notamment grandement les interactions avec les protéines. La surface des NP en contact avec un milieu biologique est en échange dynamique constant avec les biomolécules comme les protéines et les lipides. Ces molécules en interaction avec la surface forment la couronne des NP et la charge de surface de la NP joue un rôle important dans la composition de cette couronne. La nature de cette couronne, plus précisément l'identité et le temps de vie des protéines à la surface des NP affecte la manière dont les cellules interagissent, reconnaissent et traitent les NP (Lynch *et al.* 2009). A titre d'exemple, les NP cationiques, avec une charge de surface positive sont considérées plus toxiques que les NP neutres ou négatives, probablement à cause d'une forte affinité pour la membrane plasmique chargée négativement (Shang *et al.* 2014).

Une étude s'est intéressée à l'influence de la charge sur la composition de la couronne de protéine. Les auteurs ont montré que les NP neutres ou chargées négativement adsorbent plus de protéines du sérum ce qui résulte en un temps de circulation dans le sang plus long que les NP chargées positivement. Ils ont également montré que les protéines sont plus fortement liées aux NP chargées négativement qu'à celles chargées positivement ou neutres (Sakulku *et al.* 2014).

Dans le cadre des suspensions colloïdes comme les NP, la mesure qui est généralement la plus pertinente est celle du potentiel ζ (zêta). Le potentiel ζ représente la charge électrique d'une particule en suspension, qui est donnée par les ions qui l'entourent, eux-même attirés par la NP selon sa charge de surface (**Figure 36**). Le potentiel zêta est donc à la fois dépendant de la charge de surface, qui est une propriété intrinsèque d'une NP, mais également de la composition ionique du milieu de dispersion. C'est un indicateur de la stabilité d'une suspension colloïdale. Plus le potentiel ζ est fort (positif ou négatif) plus les forces de répulsion entre NP sont importantes et donc moins elles ont tendance à s'agglomérer.

d) Les ligands de surface

La taille des NP détermine leur capacité à être utilisée pour un ciblage passif. Cependant les NP peuvent également être utilisées pour du ciblage actif, via les ligands de surface. Pour utiliser au mieux les propriétés biochimiques des cellules cibles comme les cellules tumorales, ces ligands, qui peuvent être des petites molécules, des peptides, des anticorps, des fragments d'anticorps ou des acides nucléiques peuvent être ajoutés à la surface des NP pour améliorer leur efficacité de ciblage. Ce mode de ciblage nécessite une reconnaissance et implique de ce fait la fixation d'un ligand sur son récepteur, ce qui permet à la NP de se fixer spécifiquement et fortement à la surface d'un type cellulaire particulier. Cette stratégie a été testée avec succès *in vitro* et *in vivo* (Marega *et al.* 2016; Kirpotin *et al.* 2006).

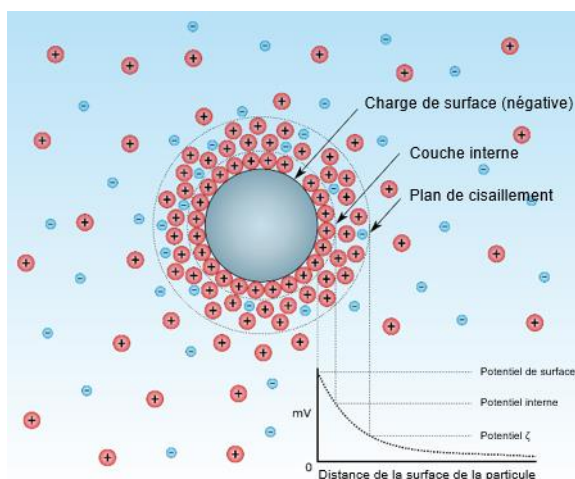


Figure 36 | Potentiel ζ des nanoparticules. Le potentiel zêta représente la charge d'une particule au niveau du plan de cisaillement. C'est la différence de potentiel entre le milieu de dispersion et la couche de fluide stationnaire attachée à la particule dispersée.

Dans le cadre des cancers, l'amélioration de l'accumulation des NP dans les tumeurs par cette méthode n'est cependant pas encore claire. Il est plutôt admis que l'accumulation des NP est dépendante en priorité du ciblage passif, qui est lui-même dépendant du temps et requiert un long temps de circulation (Pirolo & Chang 2008; Farokhzad & Langer 2009). La rétention et l'absorption des NP par les cellules tumorales peuvent effectivement être augmentées par endocytose dépendante de l'activation d'un récepteur mais seulement après que les NP aient quitté la vascularisation (Kirpotin *et al.* 2006). Ensuite, la densité de ligands présents à la surface doit être bien équilibrée pour optimiser la balance entre la pénétration dans la tumeur et l'affinité pour la cible (Sun *et al.* 2014). Des liposomes vecteurs de chimiothérapies et ciblant le récepteur à la transferrine ont par exemple été utilisés dans le cadre d'essai clinique de phase II sur des cancers gastriques et de l'œsophage. Des NP sur lesquelles ont été ajoutées des molécules de polyéthylène glycol, et ciblant la *Glutamate Carboxypeptidase II* ont été utilisées dans le cadre d'essai clinique de phase II sur différents types de tumeurs solides dont des cancers de la prostate (Chiarelli *et al.* 2015). Dans le cadre des gliomes, des immunoliposomes possédant des anticorps dirigés contre ce récepteur et contre le récepteur à l'insuline ont été utilisés sur des modèles de xénogreffes de cellules U87-MG chez des souris (Mamot *et al.* 2005). Sur ce même modèle, le ciblage du récepteur à l'EGFR par les NP permettrait d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie encapsulée (Chiarelli *et al.* 2015).

Comme nous l'avons vu, toutes ces propriétés influencent l'interaction des NP avec les systèmes biologiques. Ces principales interactions sont résumées dans la **Figure 37**.

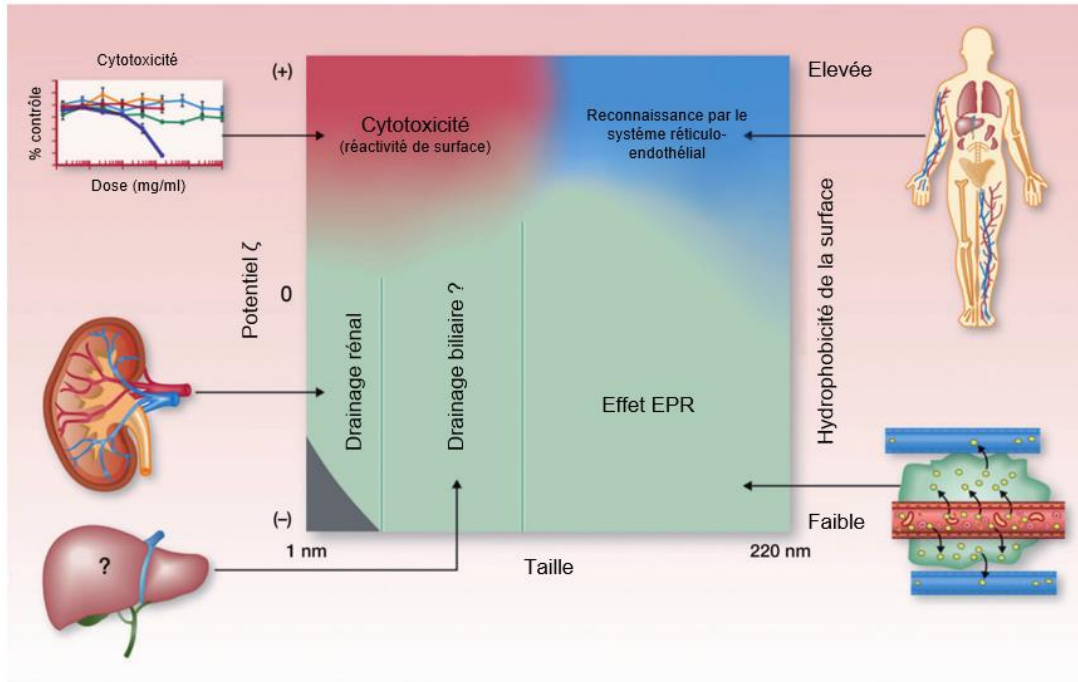


Figure 37 | Les propriétés des nanoparticules influencent leurs effets biologiques. Le Potentiel ζ , la taille et l'hydrophobicité des nanoparticules peuvent affecter leur cytotoxicité, leur reconnaissance par le système réticulo-endothélial, leur élimination et l'effet EPR. Adapté de Sun *et al.* 2014

3. LES DIFFERENTS TYPES DE NANOPARTICULES

Grâce à leurs propriétés, les NP sont dorénavant utilisées dans de nombreuses applications, du stockage d'énergie aux produits du quotidien et dans le domaine médical (Zazo *et al.* 2016). Ces NP peuvent être classées selon les caractéristiques de la matrice qui les forme.

a) Les nanoparticules organiques

Les NP organiques représentent le type de NP le plus étudié et regroupent les liposomes, formés d'une bicouche phospholipidique (**Figure 38A**), les NP polymériques formés d'une matrice de polymères qui peuvent être naturels ou synthétiques (**Figure 38E**), les micelles formées d'une seule couche de polymères ou de phospholipides avec une tête hydrophile et une queue hydrophobe (**Figure 38B**), les dendrimères formés de monomères ou d'oligomères organisés en une structure arborescente, largement utilisés dans le domaine de l'imagerie médicale (Ghobril *et al.* 2012) (**Figure 38C**) et les NP lipidiques solides, formées de lipides solides à température corporelle. Ils représentent les deux tiers des systèmes approuvés pour un usage thérapeutique chez l'humain (Schütz *et al.* 2013). Leur principal avantage est qu'elles sont généralement biodégradables et offrent une bonne biocompatibilité. Les composés produits lors de leur dégradation sont

souvent bien tolérés et facilement métabolisés. De ce fait, elles sont associées à une toxicité systémique minimale. Un autre avantage à leur utilisation est qu'elles peuvent transporter des composés hydrophiles ou hydrophobes. Cependant, elles ont certains désavantages comme une capacité de transport assez faible et une tendance à la perte des molécules transportées pendant le stockage. De plus, même si les NP polymériques et les NP lipidiques solides ont une meilleure stabilité physique et chimique, ce type de NP est souvent instable et leur caractéristique à la fois hydrophile/hydrophobe favorise leur dégradation rapide (Zazo *et al.* 2016).

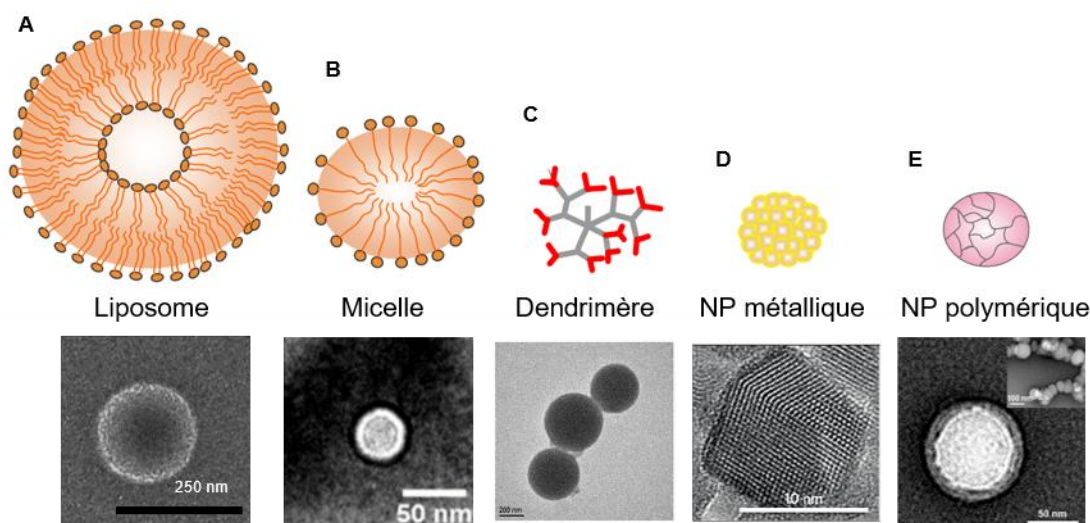


Figure 38 | Exemples de nanoparticules. Schéma représentant un liposome (A), une micelle (B), un dendrimère (C), une nanoparticule métallique (D) et une nanoparticule polymérique (E) en haut et des images acquises en microscopie électronique en bas. Adapté de Glaser *et al.* 2017; Mouro-Chanteloup *et al.* 2010; Chen *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016; Awala *et al.* 2015; Hu *et al.* 2011.

b) Les nanoparticules inorganiques

Elles sont constituées de différents oxydes inorganiques et peuvent avoir différentes tailles, formes, solubilité et stabilité (**Figure 38D**). Comparées aux NP organiques, ces NP peuvent être de taille inférieure, entre 1 et 100 nm, et leur capacité de transport est généralement supérieure (Mahajan *et al.* 2012). Cependant, ce groupe de NP n'est pas homogène et elles peuvent présenter des problèmes d'agrégation, de métabolisation, et d'accumulation. Elles peuvent également induire des réactions toxiques. Leur interaction avec des protéines peut induire des effets délétères sur des organes comme le foie ou la peau et également au niveau des érythrocytes (Arviso *et al.* 2012). Le relargage d'ions toxiques et la stimulation de la production d'espèces radicalaires et de cytokines inflammatoires peut produire des réactions immunotoxiques, cytotoxiques ou génotoxiques (Schrand *et al.* 2010). De plus, elles peuvent également induire des effets toxiques plus chroniques au niveau des reins, du foie ou des poumons via leur

accumulation dans ces tissus (Arvizo *et al.* 2012). Malgré cela, plusieurs études *in vivo* ont montré une absence d'effet toxique apparent de la part de certaines de ces NP. De plus, ces effets toxiques pourraient être réduits en modifiant la composition chimique ainsi que la charge de surface de la NP ou en réduisant les concentrations utilisées (Schrand *et al.* 2010).

Des NP à base de platine, d'aluminium, de zinc, de titane, de palladium, de fer ou de cuivre ont ainsi été développées. Elles sont utilisées en tant que vecteur de thérapie, pour leurs propriétés anti-microbienne ainsi que pour leurs propriétés magnétiques. Le silicium est le matériau le plus utilisé du fait de sa biocompatibilité, de sa synthèse aisée et sa capacité à être facilement modifiée. Ces NP à base de silicium ont une aire de surface importante avec une structure poreuse de taille et de forme variables. L'avantage principal de ce type de NP est qu'elles peuvent transporter des quantités importantes de molécules. Les NP à base d'oxyde de fer (SPION) ont été également développées pour des applications en imagerie, du fait de leurs propriétés magnétiques. On peut citer également les *Quantum dots*, des nanocristaux avec un cœur ou une enveloppe fait de matériaux semi-conducteurs comme le cadmium ou le zinc. Ces NP ont des propriétés optiques uniques qui permettent de les détecter et de les suivre notamment par fluorescence, mais la présence de métaux lourds dans leur composition limite leur utilisation (Zazo *et al.* 2016). Enfin, les plus étudiées sont les NP à base d'or et d'argent. Les NP à base d'or sont principalement utilisées pour la vectorisation de molécules ou en tant que radio-sensibilisants (voir chapitre **II.D.4.a**). Les NP à base d'argent sont, quant à elles, surtout utilisées pour leurs propriétés antibactériennes. Elles sont détaillées dans la **partie 4** de ce chapitre.

c) **Autres nanoparticules**

D'autres nano-systèmes sont actuellement en développement. Les nanotechnologies les plus étudiées sont sans doute celles impliquant des nanostructures de carbones comme les nanotubes. Un autre nano-système récemment mis au point concerne les nano-bulles. Ce sont des colloïdes renfermant un gaz encapsulé par une membrane de polymères, de protéines ou de surfactant. La libération du gaz est activée par ultrasons. Ces systèmes sont prometteurs pour des utilisations théranostiques ou dans le cadre de thérapie ciblée (Zazo *et al.* 2016).

4. **LES NANOPARTICULES D'ARGENT**

Grâce à leurs propriétés anti-microbiennes, les nanoparticules d'argent (Ag-NP) sont parmi les plus utilisées car il a été montré qu'elles ont une efficacité contre les bactéries,

les virus et d'autres micro-organismes eucaryotes. Cependant, des doutes existent quant à leur innocuité et ces NP pourraient être à l'origine d'effets délétères dans les poumons, le système cardiovasculaire et le SNC (Ge *et al.* 2014). Ceci pose des questions, puisque qu'un rapport du CNRS de 2008 montrait que 500 tonnes de Ag-NP sont produites par an dans le monde (Gaffet 2011).

Concernant les effets sur le SNC, des travaux réalisés sur des cultures primaires de neurones et d'astrocytes ont montré que les Ag-NP ont un effet cytotoxique important, dépendant de leur taille, et passant par l'induction d'un stress oxydatif (Haase *et al.* 2012). Il semble également que les Ag-NP aient un effet sur la dynamique des neurites dans les cellules souches neurales via des interactions avec le cytosquelette (Cooper & Spitzer 2015). Au niveau cellulaire, il a été montré que les Ag-NP interagissent avec de nombreuses protéines cytosoliques, induisent l'expression de médiateurs de l'inflammation ainsi qu'un stress calcique ou oxydatif (Asharani *et al.* 2012).

5. NANOPARTICULES ET CANCER

Les premières NP utilisées pour délivrer des chimiothérapies ont été les liposomes. Nous l'avons vu, les liposomes sont généralement de taille nanométrique et consistent en une bicouche lipidique renfermant un cœur aqueux qui contient la molécule thérapeutique. L'une des premières applications des liposomes a été leur utilisation pour diminuer la toxicité de la doxorubicine, un médicament anticancéreux mais présentant une toxicité au niveau cardiaque. L'encapsulation de cette drogue dans des liposomes s'est révélée efficace et sûre dans des études cliniques sur des cancers ovariens et du sein. Le Doxil®, la forme de la doxorubicine liposomale comprenant du polyéthylène glycol, a montré une amélioration de la pharmacocinétique par sa propriété à échapper au système réticulo-endothélial (RES) une barrière importante pour la circulation systémique des NP. Le polyéthylène glycol est utilisé pour de nombreuses NP car il augmente la stabilité colloïdale et réduit la capture par le RES en empêchant les protéines du sérum d'adhérer à la surface de la NP, prolongeant ainsi le temps de circulation dans le sang. Une circulation longue est nécessaire pour une délivrance efficace des NP sur le site tumoral (Banerjee & Sengupta 2011).

Depuis, le développement de stratégies pour le traitement du cancer à base de NP est en plein essor et de nombreux types de NP avec des caractéristiques propres ont été mis au point et sont en cours d'étude.

6. LES STRATEGIES DE REOXYGENATION PAR LES NANOPARTICULES

Réduire l'hypoxie est un point crucial dans la gestion des tumeurs en général et des GB en particulier. C'est pourquoi de nombreuses études se sont attachées à mettre au point des procédés permettant un apport important d'oxygène surpassant la capacité de transport de l'hémoglobine. Comme nous l'avons vu précédemment, les stratégies basées sur l'inhalation de gaz hyperoxiques se sont révélées peu concluantes dans le cas des GB. D'autres stratégies ont donc été développées et parmi celles-ci beaucoup se sont basées sur l'utilisation de NP.

Pour utiliser des NP dans le cadre de stratégies de réoxygénation, la première difficulté à surmonter est celle de l'accès à la tumeur. Plusieurs stratégies ont été utilisées pour améliorer l'efficacité de ciblage des NP. Pour une meilleure pénétration dans le tissu, il a été proposé d'utiliser des NP possédant de la collagénase, une enzyme de dégradation de la MEC. Les auteurs ont montré que cette approche permet de multiplier par 4 le nombre de NP capables de pénétrer dans un modèle de sphéroïdes tumorales multicellulaires (Goodman *et al.* 2007). Dans le même esprit, des NP ont été développées ciblant l'acide hyaluronique ou son récepteur le CD44, un constituant de la matrice fortement exprimé dans les GB (Dreaden *et al.* 2014). D'autres NP ont été développées pour pouvoir être dégradées par les métallo-protéases de la MEC, passant de NP de la taille de l'ordre de 100 nm à des NP de 10 nm plus diffusible dans la tumeur (Wong *et al.* 2011). Enfin, une autre stratégie est d'utiliser un système de « cheval de Troie » en incorporant les NP dans des cellules naturellement attirées par les régions hypoxiques de la tumeur comme les TAM (Huang *et al.* 2015) ou les cellules souches neurales (Mooney *et al.* 2014). L'intérêt de cette stratégie est de pouvoir cibler des zones peu ou pas vascularisées. Il a ainsi été montré par exemple que les macrophages de type M2 migrent préférentiellement vers les zones hypoxiques de la tumeur (Leblond *et al.* 2016).

Lorsque les NP ont atteint leur cible, le but est de corriger l'hypoxie du microenvironnement tumoral. Plusieurs stratégies ont également été développées, notamment l'utilisation de NP possédant du dioxyde de manganèse (MnO_2) à leur surface. Le MnO_2 réagit avec les protons H^+ et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), très présents dans le microenvironnement acide de la tumeur, pour former de l' O_2 et des ions Mn^{2+} (Chen *et al.* 2016). D'autres travaux ont exploré le potentiel de l'hémoglobine d'arénicole, un vers marin, nommé HEMOXYCarrier®. Cette hémoglobine géante peut porter jusqu'à 156 molécules d' O_2 et ces travaux ont montré qu'elle permettait de réduire l'hypoxie dans des modèles de tumeurs sous-cutanées (Le Gall *et al.* 2014). Cependant, elles ne permettent de transporter que de l'oxygène et non un autre gaz médical comme par exemple le carbogène. Une autre équipe a mis au point des microcapsules avec une fine enveloppe

contenant des pores. Ces capsules sont remplies d'oxygène et les pores de l'enveloppe permettent une diffusion passive de l'oxygène vers l'extérieur lorsqu'un gradient d'oxygénation existe entre l'intérieur et l'extérieur de la particule (Seekell *et al.* 2016). Ces microcapsules n'ont pas été testées dans le cadre de modèles tumoraux pour le moment mais suscitent un réel enthousiasme, bien que leur taille micrométrique puisse se révéler problématique pour cette application (Span *et al.* 2016; Kheir & Polizzotti 2016).

7. LA NANOPARTICULE IDEALE POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS

Pour résumer, à la lumière des travaux effectués dans le domaine des NP pour le traitement des cancers, Chiarelli *et al.* ont donné leur représentation d'une NP idéale, possédant toutes les caractéristiques nécessaires au ciblage et au traitement des cancers. Cette NP idéale permettrait notamment un usage théranostique, c'est-à-dire une utilisation à la fois pour le diagnostic et la thérapie (**Figure 39**). **Pour le moment une telle NP n'existe pas**. Cependant, nous allons maintenant décrire une classe de matériaux, les zéolithes, qui pourraient s'en approcher, puisqu'elles possèdent la plupart des propriétés décrites sur cette figure.

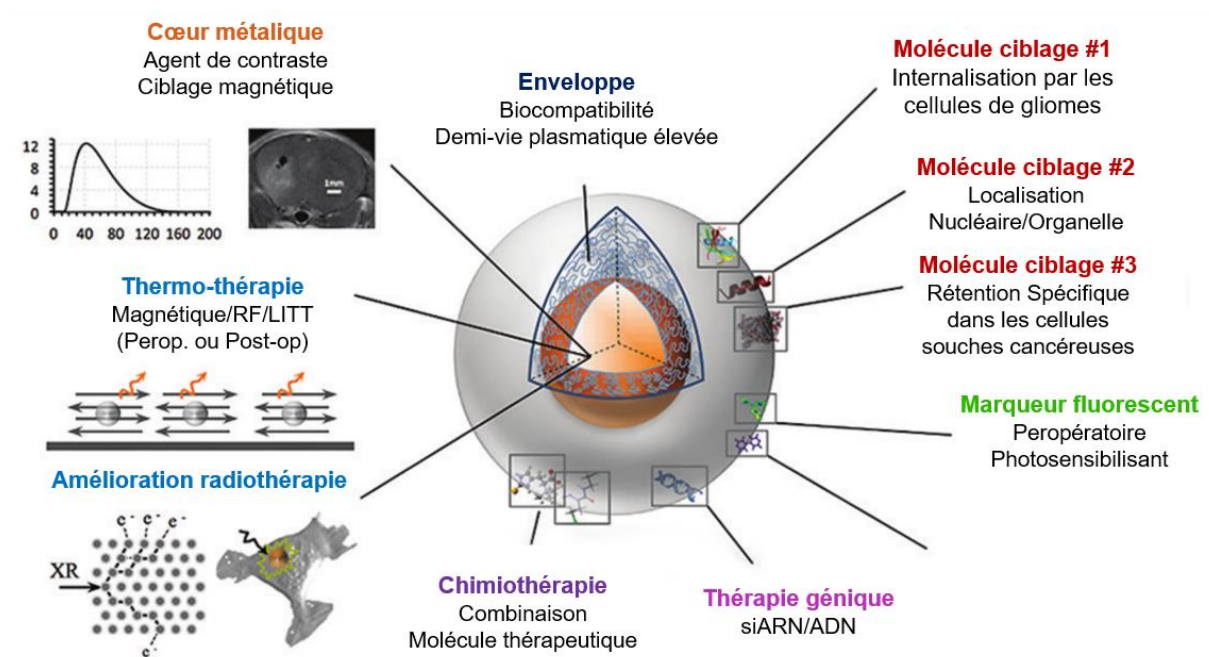


Figure 39 | Conceptualisation d'une nanoparticule idéale. Un cœur métallique est utilisé en tant qu'agent de contraste et radio-sensibilisant, alors que l'enveloppe permet une biocompatibilité et fourni des sites fonctionnels pour y attacher des molécules, des acides nucléiques, des chimiothérapies ou des marqueurs optiques. Adapté de Chiarelli *et al.* 2015.

B. LES ZEOLITHES

1. INTRODUCTION AUX ZEOLITHES



Figure 40 | Différents types de zéolithes naturelles et synthétiques.

En 1756, le Baron Crônstedt, un minéralogiste suédois, découvre un minéral appartenant à une nouvelle classe de matériau. Il observe que ce minéral perd de l'eau sous l'effet de la chaleur et baptise ce nouveau minéral « zéolithe », du grec ζέω (zeô) ou ζεῖν (zein) : « bouillir » et λίθος (lithos) : « la pierre ». Depuis la première observation du Baron Crônstedt, de nombreux types de zéolithes ont été découverts et comptent parmi les minéraux les plus abondants sur terre. A ce jour, près de 200 zéolithes différentes sont connues, dont une quarantaine de naturelles (**Figure 40**).

Les zéolithes naturelles se sont formées en plusieurs dizaines de milliers d'années à partir de cendres volcaniques qui se sont déposées dans des eaux salées. Sous les effets conjugués du temps et du milieu alcalin, les cendres ont cristallisé pour former des zéolithes. Les premiers travaux de synthèse datent quant à eux des années 1940.

Du point de vue de leur composition chimique, les zéolithes sont des aluminosilicates hydratés, au même titre que les argiles. Toutefois, ces dernières présentent une structure fibreuse ou feuilletée, comme le graphite, tandis que les zéolithes présentent une structure tridimensionnelle, comme le diamant.

Les zéolithes sont des aluminosilicates de faible densité, de structure cristalline. Leur structure comprend des cages et des canaux, avec des micropores réguliers de dimensions allant de 0,3 à 2 nm de diamètre, qui rendent possible l'accès d'espèces étrangères au squelette cristallin. Actuellement, 232 types de structures de zéolithes sont connus. En fonction du type de structure, la composition du squelette peut varier à des degrés plus ou moins importants. De ce fait, la diversité des zéolithes est extrêmement importante, tant d'un point de vue structurel que chimique (Mintova *et al.* 2016).

La structure cristalline des zéolithes implique que les cages et les canaux aient un diamètre constant et ne laissent ainsi pénétrer dans leur réseau que des molécules ayant une taille inférieure à ce diamètre. Les zéolithes permettent donc de séparer sélectivement des molécules selon leur forme et leur taille, ce qui leur vaut le surnom de « tamis moléculaire » (Figure 41). Elles sont pour cela très utilisées dans les domaines de la catalyse, des échanges d'ions et des

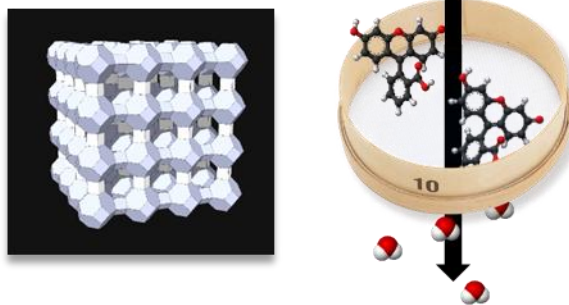


Figure 41 | Les zéolithes, véritables tamis moléculaires. Représentation schématique des propriétés de discrimination en fonction de la taille des molécules permises par la structure poreuse des zéolithes.

processus d'adsorption. En plus des différences de taille et de forme des pores, une autre caractéristique intéressante des zéolithes est leur nature à la fois hydrophile et hydrophobe qui les rend utiles pour la sorption sélective et l'encapsulation de molécules, organiques ou non, stables en phase liquide et gazeuse.

Afin de contrôler précisément le processus de synthèse et d'obtenir des zéolithes possédant des propriétés prédéterminées, depuis les années 1950, de nombreuses études se sont attelées à la compréhension des principes fondamentaux gouvernant leur synthèse et l'influence de nombreuses variables sur les propriétés physicochimiques des zéolithes (Zaarour *et al.* 2014).

2. STRUCTURE

La structure des zéolithes est basée sur un squelette tridimensionnel formé par un arrangement de tétraèdres notés SiO_4 ou AlO_4 . Ces tétraèdres correspondent à un atome de silicium ou d'aluminium entouré de quatre atomes d'oxygène. Ils s'assemblent entre eux en partageant les atomes d'oxygène, il en résulte donc que chaque atome d'oxygène est impliqué dans la formation de deux tétraèdres (Figure 42A).

Ces tétraèdres s'assemblent pour former des anneaux. Ce sont des chaînes linéaires refermées sur elles-mêmes ou chaque sommet de l'anneau correspond à un tétraèdre et les liaisons entre chaque sommet sont formées par l'atome d'oxygène partagé par deux tétraèdres. Pour simplifier, chaque sommet représente un atome de silicium ou d'aluminium et les liaisons représentent les atomes d'oxygène. Pour décrire la composition de ces anneaux, on parle de n-anneaux ou n représente le nombre de tétraèdre formant l'anneau.

Ces anneaux sont eux-mêmes assemblés pour former le squelette tridimensionnel à proprement parler. Les anneaux mettent en commun leurs arêtes pour former des cages. La plus commune est la cage de sodalite formée de six 4-anneaux et huit 6-anneaux (**Figure 42B**).

C'est la répétition de ces cages qui forme le squelette cristallin des zéolithes. Elles peuvent être assemblées ensemble selon divers agencements et généralement l'association de plusieurs cages laisse apparaître un espace de taille supérieure appelé supercage (**Figure 42C**). Selon l'agencement des cages, la structure permet le passage dans 1, 2 ou les 3 dimensions le long des cages, des supercages ou de canaux. C'est la taille des anneaux qui composent les cages qui détermine la taille des pores et donc le pouvoir discriminant des zéolithes (**Figure 42D**).

Une zéolithe est donc composée d'un squelette d'oxygène, de silicium et d'aluminium. Le rapport Al/Si peut varier entre 0 (c'est alors de la silice) et 1 et influence l'organisation des tétraèdres et donc la structure des zéolithes. De plus, pour contrebalancer les charges négatives apportées par les atomes d'aluminium, la structure incorpore des cations comme le Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , etc. Enfin, les espaces vides de la structure sont occupés par une phase adsorbée, qui peut être éliminée par traitement thermique par exemple (**Figure 42E**).

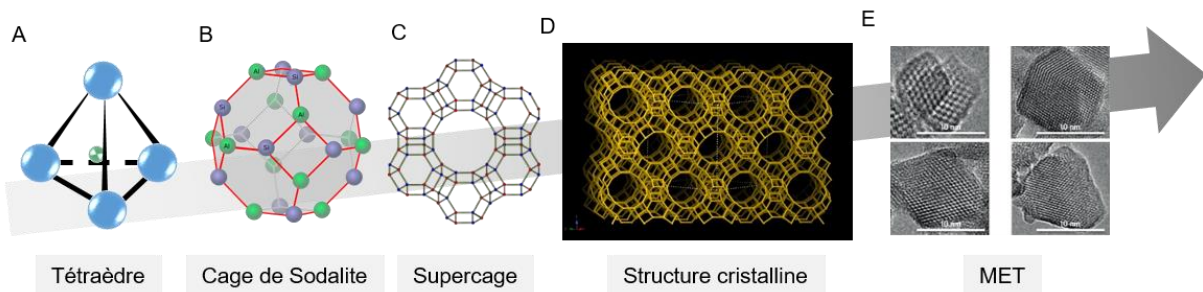


Figure 42 | Structure des zéolithes. Les zéolithes sont principalement formées de tétraèdres SiO_4 et AlO_4 (**A**) agencés en cages de sodalites (**B**). Ces cages s'assemblent pour former des supercages (**C**) qui s'assemblent elles-mêmes entre elles pour former la structure cristalline poreuse (**D** & **E**). MET = Microscopie électronique à transmission. Adapté d'Awala *et al.* 2014 & <http://europe.iza-structure.org>.

Pour résumer, une zéolithe est donc composée :

- D'un squelette d'oxygène, silicium et aluminium.
- De cations qui permettent à l'ensemble d'avoir une charge neutre.
- D'une phase adsorbée, généralement de l'eau.

3. SYNTHÈSE ET MODIFICATION POST-SYNTHESE

a) Synthèse des zéolithes

Bien que présentes à l'état naturel, il est également possible de synthétiser les zéolithes. Cette synthèse se fait à partir d'un mélange contenant les précurseurs des zéolithes. La chimie de ce mélange initial et plus précisément le type de sources d'aluminium et de silicium, leurs concentrations, le type de solvant, les additifs, etc. ont une grande influence sur la synthèse des zéolithes et sur la structure finale.

Un traitement hydrothermal à basse température (en dessous de 200°C), généralement effectué dans une enceinte fermée, est appliqué au mélange initial. Cela entraîne une nucléation spontanée et une cristallisation contrôlée. Sous l'action combinée d'agents minéralisant et structurant, le précurseur aluminosilicate initial est transformé en zéolithes cristallins. Les agents structurants peuvent être des métaux cationiques alcalins (Na^+ , K^+ , Li^+ , etc.) ou des molécules organiques de charge positive, généralement des cations tétraalkylammonium (TAA^+). Les tétraèdres de SiO_4 et AlO_4 s'arrangent alors autour de ces agents chargés (**Figure 43**) (Zaarour *et al.* 2014).

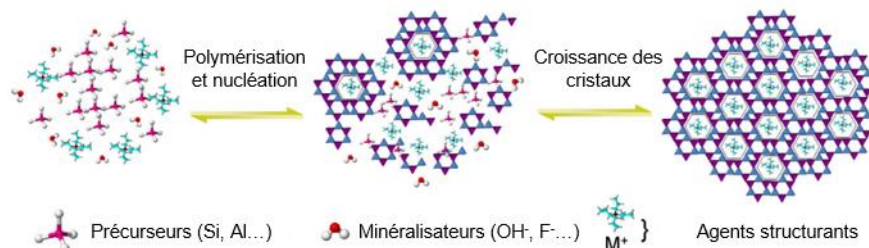


Figure 43 | Schéma général de la synthèse des zéolithes. Adapté de Zaarour *et al.* 2014.

b) L'échange d'ions

Les zéolithes contiennent donc des cations qui permettent à l'ensemble d'avoir une charge neutre et donc une plus grande stabilité. Ces cations sont incorporés dans le mélange de précurseurs initiaux et permettent de diriger la formation de la structure cristalline. Lorsque les zéolithes cristallines sont formées, ces cations sont toujours présents sur des sites bien identifiés (Frising & Leflaive 2008). Ces cations qui assurent l'électroneutralité de la matrice peuvent être échangés par d'autres de manière sélective, en fonction de l'affinité de la zéolithe avec le nouveau cation. Cette capacité d'échange cationique et cette sélectivité sont ainsi spécifiques à chaque type de zéolithe. Selon le type de zéolithes, des espèces cationiques comme le fer, le cuivre, le palladium, le platine, le lithium, le cérium, le gadolinium, l'argent, l'or, etc. peuvent être incorporés de manière

stable. Cette propriété rend les zéolithes particulièrement intéressantes et utiles pour l'élimination de polluants ou pour le traitement des eaux.

Du point de vue biomédical, ces propriétés ouvrent l'utilisation des zéolithes à de vastes champs d'application en tant qu'agent de contraste en IRM (Fe, Gd) (Csajbók *et al.* 2005), en tant qu'agent anti-bactérien (Ag) (Dong *et al.* 2014; Demirci *et al.* 2014) ou permet également de renforcer leur affinité aux gaz (Rivallan *et al.* 2009).

4. LES PROPRIETES ET LES APPLICATIONS DES ZEOLITHES

Les similitudes structurelles entre les cages des zéolithes et les sites de liaison au substrat des enzymes ont incité les chercheurs à envisager leur utilisation en tant que potentiels catalyseurs. De plus, leur structure poreuse en fait de véritables tamis moléculaires pour des applications de séparation et d'adsorption (Zaarour *et al.* 2014). Les zéolithes sont donc devenues un enjeu dans différents domaines de la recherche chimique et sont maintenant largement utilisées dans diverses technologies industrielles, agricoles, environnementales et biologiques (**Figure 44**).

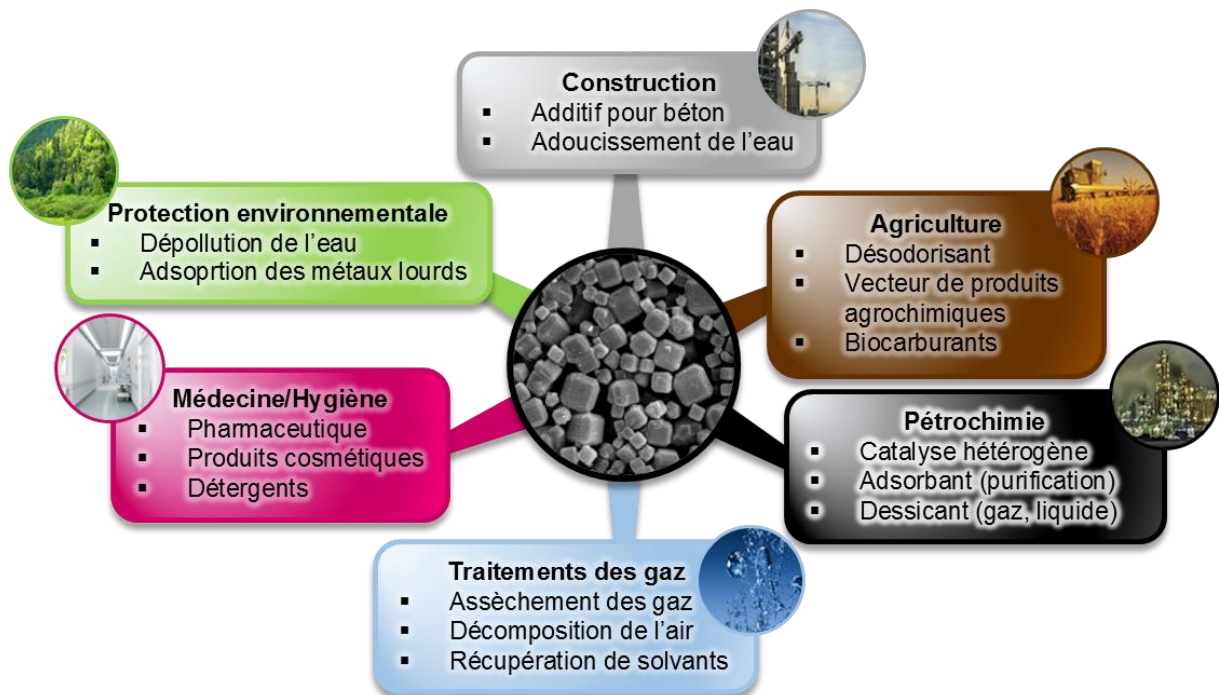


Figure 44 | Les applications des zéolithes.

a) Adsorption de gaz

Une propriété intéressante des zéolithes est leur faculté à adsorber des molécules organiques et inorganiques en phase gazeuse (Wheatley *et al.* 2006). Cette faculté d'adsorption est due à leur surface spécifique importante, à des effets de surface

hydrophobe-hydrophile et à leur structure. Différents gaz peuvent ainsi être encapsulés dans les zéolithes, notamment du NO, du CO, de l'H₂O, du NH₃ ou, de manière plus intéressante, du CO₂ voire de l'O₂ (Wagloehner *et al.* 2014; Rivallan *et al.* 2009; Malpartida *et al.* 2010; Seifu *et al.* 2011).

(1) L'oxygène

Les cristaux de zéolithes ont ainsi été utilisés pour piéger l'azote contenu dans de l'air comprimé et ainsi concentrer l'oxygène dans ce gaz. Des concentrations d'oxygène supérieures à 80% ont été obtenues grâce à ce système.

La possibilité d'utiliser des zéolithes pour un enrichissement en oxygène a également été démontrée avec des zéolithes de type LTA (*Linde Type A*). Ce système a été utilisé pour produire un air humide et enrichi en O₂ car de l'eau est adsorbé et libéré avec l'O₂. Des études se sont également penchées sur des méthodes pour augmenter la capacité de transport de l'oxygène en utilisant des zéolithes contenant des atomes de fluor intégrés dans une matrice tridimensionnelle de polyuréthane (Seifu *et al.* 2011). Il a été montré que cette matrice contenant les zéolithes peut transporter et libérer 200 fois plus d'oxygène que les érythrocytes.

(2) Le dioxyde de carbone

Du fait des intérêts industriels dans la limitation des rejets de gaz à effet de serre, de nombreuses études se sont penchées sur les capacités de sorption des zéolithes vis-à-vis du CO₂. Il a été montré que les zéolithes peuvent être utilisées pour séparer sélectivement le CO₂ d'autres gaz, même à des pressions partielles relativement faibles (75 mmHg) et que les cations jouent un rôle important dans cette propriété (Lozinska *et al.* 2012). La sélectivité du phénomène est en effet expliquée par un mécanisme de porte dépendant de la taille du cation et de son affinité pour le CO₂ (**Figure 45**) (Gibson *et al.* 2016).

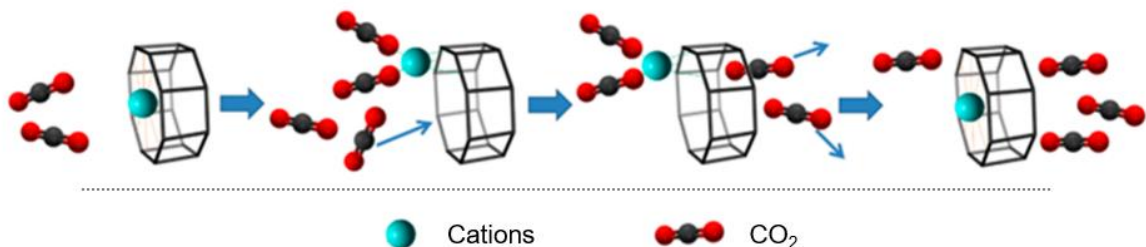


Figure 45 | Mécanisme de porte dépendant des cations pour la sélectivité des zéolithes vis-à-vis du CO₂. Ce mécanisme explique le transport sélectif du CO₂ à travers les pores des zéolithes et dans les cages. La position du cation dans les cages est dépendante de sa taille et de la pression

en CO₂. La diffusivité du CO₂ à travers les pores est relativement faible à basse pression et augmente à mesure que la pression s'élève. Adapté de Gibson *et al.* 2016.

b) Adsorption de l'eau et des molécules organiques/ inorganiques

De par leur très grande affinité pour l'eau, certaines zéolithes peuvent en adsorber jusqu'à 30% de leur poids sans variation de volume. Cette eau peut ensuite être restituée par des modifications de pressions ou par traitement thermique. Elle peut également être restituée en cas de diminution du degré d'hygrométrie, ce qui fait des zéolithes de bons stabilisateurs d'humidité.

Les zéolithes sont capables d'adsorber des molécules organiques ou inorganiques au même titre que l'eau et les gaz. Cette propriété d'adsorption est spécifique à chaque type de zéolithe, ce qui les rend très utiles pour le traitement d'effluents chargés en pesticides, en organo-chlorés, ou encore en hydrocarbures.

c) Propriétés de catalyse

La structure des zéolithes présente des sites spécifiques capables de catalyser des réactions chimiques telles que des réactions d'oxydation, de réduction ou acido-basiques. Ces réactions prennent place à l'intérieur des cages formant les zéolithes, ce qui implique que seules les molécules ayant une taille inférieure à l'espace disponible au sein de ces cavités peuvent être formées. Les zéolithes exercent donc une sélectivité de forme extrêmement utilisée dans l'industrie pétrochimique.

d) Les nouvelles avancées dans les méthodes de synthèse : génération de nanozéolithes

Une synthèse classique de zéolithe aboutit à des cristaux de taille de l'ordre du micromètre. On considère que l'échelle nanométrique commence au moins à partir d'un ordre de grandeur inférieur, c'est-à-dire inférieur à 100 nm. Cependant, l'impact de la taille de la particule sur les propriétés physicochimiques est prépondérant plutôt pour des cristaux de taille inférieure à 50 nm.

De même que pour les cristaux conventionnels micrométriques, les nanocristaux sont synthétisés sous conditions hydrothermales dans des enceintes closes, sans addition de réactif pendant la synthèse. Ainsi, après la conversion des réactifs dans le système, la croissance s'arrête. Durant la synthèse des nanozéolithes, une attention spéciale est portée à la préparation des précurseurs initiaux dans le but de favoriser le processus de nucléation. L'importance de la nucléation est due au fait que le nombre de noyaux dans le système détermine la taille finale du cristal. Une nucléation abondante conduit à une

formation de cristaux de petite taille tandis que si le système produit peu de noyaux viables, les cristaux formés sont de grande taille (Mintova *et al.* 2016).

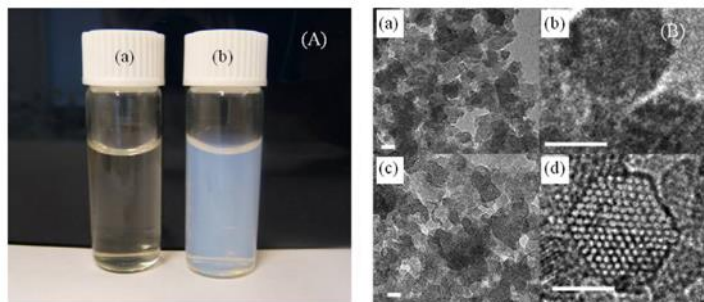


Figure 46 | Crystallisation de zéolithes de type EMT. A. Suspensions colloïdes contenant des particules amorphes (a) et cristallines (b). **B.** Images en microscopie à transmission des particules amorphes (a, b) et cristallines (c, d). Echelle = 10 nm. Adapté de Zaarour *et al.* 2014.

Le processus de synthèse est donc adapté pour favoriser la nucléation par rapport à la croissance. Ensuite, après chauffage, les particules amorphes se convertissent en nanozéolithes. L'apparence finale de la suspension dépend de la taille et de la concentration des particules et varie du blanc turbide au laiteux (**Figure 46**).

Les nanozéolithes diffèrent des microcristaux par les traitements post-synthèse qui doivent être effectués pour **éviter l'agrégation entre particules**. Les réactifs non convertis sont généralement éliminés par ultra-centrifugation et re-dispersion dans de l'eau distillée. La procédure est répétée plusieurs fois et le pH est ensuite ajusté entre 7 et 9. A cette valeur de pH, la charge négative du cristal de zéolithe est suffisamment forte pour assurer une stabilité colloïdale. Les forces répulsives dues aux charges négatives des particules les empêchent de s'agréger, et la suspension est ainsi stable pendant plusieurs mois voire plusieurs années.

La réduction de la taille des cristaux de zéolithe à l'échelle nanométrique augmente considérablement leur surface spécifique et en fait ainsi un matériau avec des propriétés nouvelles. Réduire la taille ou changer la morphologie des cristaux améliore leurs propriétés de diffusion et l'accessibilité des pores mobilisables et augmente donc leur capacité de sorption.

Dans le cadre d'applications biomédicales, et notamment le ciblage passif des tumeurs, c'est cette réduction de la taille qui les rend très attractives.

e) Les applications biomédicales des zéolithes

Du fait de leurs propriétés d'adsorption et de séparation, les zéolithes sont de plus en plus étudiées pour des applications biomédicales. A ce jour, peu d'études ont évalué l'effet des nanozéolithes sur la santé. Cependant les résultats des premières études de toxicologie ne semblent pas indiquer d'effets néfastes des zéolithes (Laurent *et al.* 2013), ce qui permet d'envisager leur utilisation pour des applications biomédicales.

L'une des applications concerne les zéolithes contenant de l'argent. Plusieurs études ont montré que ce type de matériau possède des propriétés antibactériennes (Rai *et al.* 2009). Lorsque les zéolithes sont au contact des bactéries, l'argent est libéré, forme des chélates avec l'ADN et bloque les mécanismes de transport de la cellule. Il a été montré qu'une augmentation de la quantité d'argent dans les zéolithes augmente leur activité antibactérienne (Ferreira *et al.* 2012). Les zéolithes contenant de l'argent exercent un pouvoir antibactérien en moins d'une heure sur *Escherichia Coli*, le staphylocoque doré et le bacille pyocyanique (Kwakye-Awuah *et al.* 2008). De plus, il a récemment été montré que les nanozéolithes contenant de l'argent conservent ces propriétés antibactériennes (Dong *et al.* 2014; Demirci *et al.* 2014). Toutefois, comme mentionné précédemment, les Ag-NP sont suspectées d'être à l'origine d'effets toxiques chez l'humain (Ge *et al.* 2014) et de potentiels effets toxiques des nanozéolithes contenant de l'argent sur des cellules eucaryotes n'avaient pas été évalués au début de ce travail.

De nombreux travaux se sont intéressés au potentiel des silices mésoporeuses dans le cadre d'applications d'encapsulation et de libérations de molécules thérapeutiques. Cependant, relativement peu de ces études sont consacrées aux zéolithes. La vectorisation contrôlée de molécules requiert une libération optimale dans des quantités suffisantes et avec des effets secondaires minimales. Les nanozéolithes possèdent à la fois des mésopores et des micropores qui sont potentiellement assez larges pour un éventail assez grand de molécules, comme des antibiotiques, l'ibuprofène, la doxorubicine, l'aspirine ou le 5-fluorouracil (5-FU). En comparaison des matériaux mésoporeux, les zéolithes, et notamment les nanocristaux, de zéolithes ont une meilleure capacité d'encapsulation de molécules.

Une absorption et une libération contrôlée peuvent être réalisées en choisissant un type de zéolithe approprié. Ainsi, les zéolithes semblent idéalement adaptées pour la dissolution et la libération contrôlée de molécules thérapeutiques (Amorim *et al.* 2012; Vilaça *et al.* 2013). Des études se sont notamment penchées sur la libération d'une molécule anti-cancéreuse, le 5-FU. Ces travaux ont montré qu'au moins deux paramètres sont impliqués dans la libération des molécules : la diffusion et la quantité d'aluminium présente dans la structure des zéolithes. En effet, ces études suggèrent que les molécules interagissent avec les atomes d'aluminium via des liaisons hydrogène, et ainsi une quantité d'aluminium élevée augmente la capacité d'absorption de petites molécules (Datt *et al.* 2013). Les résultats de ces études ont également montré que les zéolithes peuvent être utilisées comme adjuvant dans les thérapies anti-cancéreuses puisque les zéolithes seules n'ont pas d'effet cytotoxique alors que l'encapsulation de 5-FU dans les pores de zéolithes est plus cytotoxique que le 5-FU seul (Vilaça *et al.* 2013).

En plus de ces avantages concernant leur petite taille et la libération contrôlée, les zéolithes peuvent être fonctionnalisées par ajout de molécules comme l'acide folique, le polyéthylène glycol ou des peptides, pour des applications de ciblage actif. Une étude récente a par exemple montré que la fonctionnalisation de zéolithes par addition d'anticorps cetuximab permet un ciblage actif et une internalisation extrêmement rapide de ces zéolithes fonctionnalisés par des cellules cancéreuses exprimant le récepteur à l'EGFR (Marega *et al.* 2016).

Enfin, la propriété de ces matériaux de pouvoir incorporer des cations de manière stable permet de concentrer des radio-isotopes ou des métaux pour des applications en tant qu'agent de contraste pour la TEP ou l'IRM (Peters & Djanashvili 2012; Csajbók *et al.* 2005).

En conclusion, les nanozéolithes ouvrent des nouvelles opportunités pour la recherche biomédicale. Leur très grande capacité de sorption, notamment vis-à-vis des gaz, ainsi que leur taille nanométrique et la possibilité d'y incorporer des agents de contraste de manière stable offre des intérêts évidents dans le domaine de l'oncologie pour une utilisation théranostique. En cela, elles présentent de nombreuses caractéristiques de la NP idéale (**Figure 39**). **Ces caractéristiques permettent d'envisager de baser leur utilisation sur un ciblage passif de la tumeur, en tant qu'agent de contraste IRM associé à une vectorisation de thérapies gazeuses.** Au début de cette thèse, très peu de travaux avaient étudié le potentiel des nanozéolithes dans le domaine de l'oncologie.

Cette approche est attractive mais le ciblage passif passe nécessairement par la vascularisation tumorale. De ce fait, cette stratégie peut présenter des limites en ce qui concerne le ciblage des zones les moins vascularisées de la tumeur si la diffusion des NP hors des vaisseaux est limitée. A ce titre, il est également intéressant de se pencher sur des approches complémentaires qui permettent de cibler les zones de la tumeur les moins riches en vaisseaux en s'affranchissant de la vascularisation tumorale. Nous allons décrire dans la partie suivante une de ces approches de **vectorisation active**.

IV. STRATEGIES DE VECTORISATION ACTIVE : UTILISATION D'UN « CHEVAL DE TROIE »

Contrairement aux NP, ces approches ne permettent pas de vectoriser des thérapies gazeuses et de réoxygéner la tumeur. L'objectif ici est donc de lutter non pas directement contre l'hypoxie mais plutôt d'inhiber les facteurs dont elle induit l'expression.

A. STRATEGIE DE VECTORISATION ACTIVE : LA THERAPIE CELLULAIRE

Le principe de la thérapie cellulaire est de vectoriser un agent thérapeutique directement sur le site tumoral par le biais de cellules. Pour cela, plusieurs populations de cellules sont potentiellement intéressantes en raison de leur propension naturelle à migrer vers les sites tumoraux. Citons les CSM et les cellules souches neurales (CSN), particulièrement utilisées dans des modèles de gliome pour véhiculer des gènes thérapeutiques. A titre d'exemple, la vectorisation du S-TRAIL (*Soluble-Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand* ; une cytokine capable d'induire l'apoptose), vers les gliomes permet de réduire la croissance de la tumeur (Tang *et al.* 2014). Des CSM ont également été modifiées pour exprimer la cytosine déaminase, une enzyme qui convertit une pro-drogue, la 5-fluorocytosine. Cette stratégie a été utilisée dans un modèle animal mimant un scénario clinique où la tumeur était traitée par exérèse. Les animaux ont ensuite été injectés avec ces CSM exprimant la cytosine déaminase, ce qui a permis d'aboutir à une régression totale du GB (Altaner *et al.* 2014).

Une approche intéressante concerne également l'utilisation de macrophages. En effet, ces cellules présentent plusieurs avantages pour la **vectorisation active** de molécules thérapeutiques. Nous avons vu qu'ils peuvent représenter jusqu'à 30% des cellules de la tumeur, que la tumeur exerce un tropisme pour les macrophages exogènes (Hambarzumyan *et al.* 2016; Valable *et al.* 2007) et leur obtention est relativement aisée (**Figure 15 & Figure 47A**). Des macrophages ont ainsi été utilisés pour vectoriser un adénovirus thérapeutique dans un modèle de cancer de la prostate. Les auteurs ont montré que ces macrophages modifiés s'accumulent spécifiquement dans la tumeur. Dans cette étude, la croissance de la tumeur ainsi que la récurrence et la survenue de métastases étaient réduites en présence de ces macrophages (Muthana *et al.* 2013, 2011).

Enfin, dans le cadre de stratégies dirigées contre l'hypoxie, les macrophages semblent être un type cellulaire de choix puisqu'il a été montré qu'au sein de la tumeur ils sont trouvés principalement dans les régions hypoxiques (Leblond *et al.* 2016; Chiang *et al.* 2012) (**Figure 47B**).

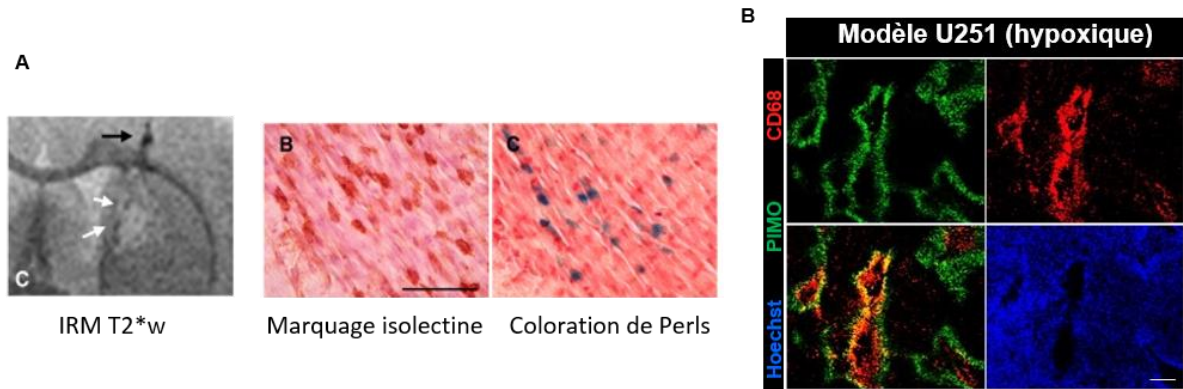


Figure 47 | Les avantages des monocytes/macrophages pour la vectorisation cellulaire. A. La tumeur exerce un tropisme pour les macrophages. Ici des macrophages exogènes préalablement marqués avec des particules de fer et détectés par IRM et histologie dans un modèle de GB. Adapté de Valable *et al.* 2007. **B.** Dans la tumeur, les macrophages sont préférentiellement retrouvés dans les régions hypoxiques. En rouge, marquage CD68, un marqueur des macrophages, en bleu les noyaux cellulaires et en vert le pimonidazole, marqueur de l'Hyoxie. Adapté de Leblond *et al.* 2016.

Le sous-chapitre suivant est consacré à l'une de ces protéines, l'**EPO**, dont l'expression est induite par l'hypoxie et qui est un bon exemple de l'implication des gènes induits pas l'hypoxie dans la progression tumorale.

B. L'ERYTHROPOÏËTINE

Parmi les nombreux gènes inductibles par l'hypoxie, l'EPO joue un rôle dans la croissance des tumeurs et leur résistance aux traitements. L'EPO est connue depuis de nombreuses années et porte son nom définitif depuis les années 50. Elle était auparavant connue sous le nom d'hémopoïétine.

1. GENERALITES

Son existence a été confirmée à la suite d'expériences montrant une augmentation de l'hématocrite chez des lapins après une transfusion de plasma de lapins anémiés ou en condition d'hypoxie. Ces observations ont permis de postuler que l'érythropoïèse, le processus de formation des érythrocytes, est sous la dépendance d'un facteur hormonal, l'EPO (Reissmann 1950). L'EPO a été plus tard purifiée à partir d'urine de patients anémiés (Miyake *et al.* 1977) ouvrant la voie au clonage du gène de l'EPO et à la production d'EPO humaine recombinante (HuEPO_r) utilisée pour le traitement de patients souffrant d'anémie.

L'EPO est donc une cytokine hématopoïétique dont le rôle principal est de réguler la production d'érythrocytes par la moelle osseuse. Durant l'hématopoïèse, le processus de

maturation des érythrocytes, l'EPO intervient à plusieurs étapes et stimule la production quotidienne des 2.10^{11} érythrocytes permettant de maintenir la capacité de transport de l'oxygène du sang (Jelkmann 1992). L'EPO est principalement synthétisée par le rein chez l'adulte. Plus précisément, 90% de la synthèse est assurée par les cellules péri-tubulaires (Pan *et al.* 2011). Cette synthèse est principalement dépendante de la pression partielle en O_2 dans les tissus. Ainsi, en condition d'hypoxie, la transcription du gène de l'EPO, qui contient des séquences HRE dans ses régions régulatrices, est activée par le facteur de transcription HIF. Plusieurs études réalisées sur différents types cellulaires ont montré que HIF-2 α serait le principal régulateur de l'expression de l'EPO (Kapitsinou *et al.* 2010).

Cependant, depuis sa découverte, de nombreuses études ont montré que la production d'érythrocytes n'est pas l'unique rôle de ce facteur de croissance. Dans un premier temps, un effet de l'EPO sur la croissance des cellules endothéliales *in vitro* a été montré. Ensuite, la présence de récepteurs à l'EPO (EPOR) a été mise en évidence sur des neurones ainsi que la production d'EPO par des astrocytes (Bernaudin *et al.* 2000). Il est maintenant établi que l'EPO est un facteur de croissance pleïotropique qui a une action anti-apoptotique sur de nombreux types de cellules et de tissus (Debeljak *et al.* 2014).

2. LE RECEPTEUR DE L'EPO

Pour exercer son action au niveau de ses cellules cibles, l'EPO se lie à des récepteurs membranaires spécifiques appartenant à la famille des récepteurs aux cytokines de type 1.

Ces récepteurs présentent la particularité de n'être activés que lorsqu'ils sont sous la forme d'homo- ou d'hétérodimères (Pradeep *et al.* 2015; Bohr *et al.* 2014). Le renouvellement de ce récepteur à la membrane est très rapide et sa demi-vie est de l'ordre de 1 à 2 heures. Il est ensuite dégradé par le réticulum endoplasmique, le protéasome et les lysosomes. Ce renouvellement rapide constitue un système de régulation de la signalisation EPO/EPOR.

L'EPOR est une protéine constituée de 484 acides aminés pour un poids moléculaire théorique de 56 kDa, dont l'expression n'est quant à elle pas régulée par l'hypoxie. Cependant, il existe une régulation post-transcriptionnelle par épissage alternatif des ARN messagers (Arcasoy *et al.* 2003; Sinclair *et al.* 2007) conduisant à trois variants de l'EPOR (**Figure 48**).

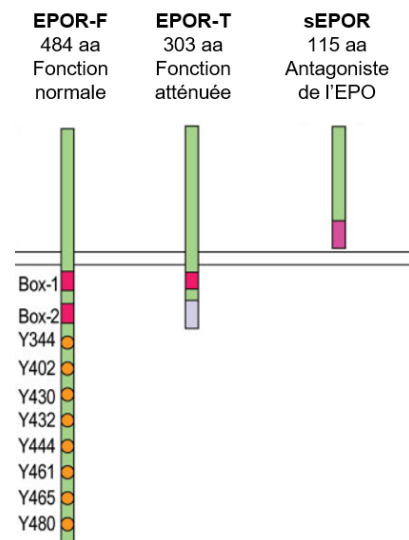


Figure 48 | Les différentes formes du récepteur à l'érythropoïétine. Adapté de Sinclair *et al.* 2007.

L'EPORF (*EPOR-full*) est la forme entière du récepteur, exprimée majoritairement. Elle possède un domaine extracellulaire sur lequel se trouve le domaine de liaison à l'EPO, un domaine transmembranaire qui assure l'ancrage à la membrane des cellules et un domaine intracellulaire responsable de l'activation des voies de signalisation. Ce dernier contient deux motifs Box1 et Box2 qui permettent la fixation de la protéine JAK2 (*Janus tyrosine kinase 2*) ce qui induit la phosphorylation des tyrosines du récepteur et l'activation des voies de signalisation, notamment les voies JAK/STAT, PI3K/Akt et MAP kinases impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire.

L'EPORT (*EPOR-truncated*) est une forme tronquée de l'EPOR à laquelle il manque une grande partie du domaine intracellulaire et notamment celle responsable de l'activation des voies de signalisation. Ce récepteur est capable de fixer l'EPO de manière efficace mais ne permet pas de transmettre de message intracellulaire en aval. Lorsqu'il est surexprimé par rapport à la forme entière, il se comporte ainsi comme un récepteur dominant négatif.

Le sEPOR (*soluble EPOR*) est un variant auquel il ne reste que la partie extracellulaire. Il lui manque donc le domaine d'ancrage à la membrane. Comme l'EPORT, il joue ainsi le rôle d'antagoniste de l'EPORF et il a été suggéré qu'il permettrait de prolonger la demi-vie de l'EPO circulante (Sakanaka *et al.* 1998).

3. IMPLICATION DE L'ERYTHROPOÏÉTINE DANS LES TUMEURS

La présence de l'EPO et de son récepteur a été identifiée dans de nombreuses cellules et tissus non-hématopoïétiques comme par exemple dans le SNC, le cœur, les reins, le système gastro-intestinal, etc. Dans ces tissus, il a été montré que l'EPO joue un rôle protecteur et anti-apoptotique. De plus, l'expression de l'EPOR a été mise en évidence dans plusieurs types de tumeurs et de cellules malignes (**Figure 49**). La présence d'EPOR fonctionnel a ainsi été démontrée dans des CSC et récemment la présence de l'axe de signalisation EPO/EPOR et son effet sur la prolifération a été démontré sur des cellules de cancer du sein, de mélanomes, de cancers du rein, de cancers tête et cou et dans des cellules de gliomes (Chan *et al.* 2017; Julius *et al.* 2017; Debeljak *et al.* 2014). Cao *et al.* ont montré que les CSG ont un niveau d'expression de l'EPOR élevé par rapport aux cellules de gliomes classiques. L'inhibition de l'expression de l'EPOR dans les CSG entraîne une diminution de la croissance, de la survie et de la capacité de formation de neurosphères (Cao *et al.* 2010).

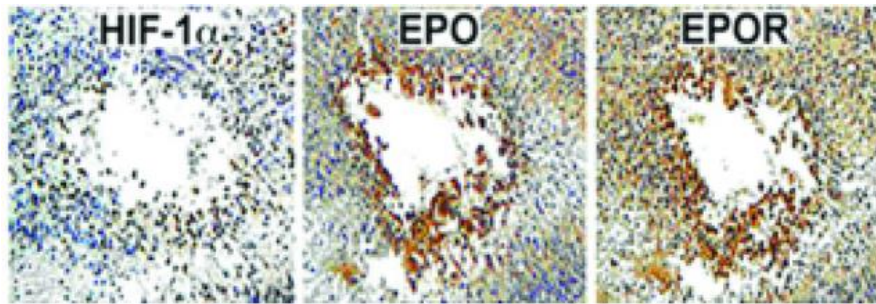


Figure 49 | L'érythropoïétine et son récepteur sont exprimés dans les régions hypoxiques des glioblastomes. Adapté de Mohyeldin *et al.* 2007.

D'autres travaux étayent ces résultats et ont montré une implication de la synthèse de l'EPO par les cellules tumorales elles-mêmes mais également par le microenvironnement, notamment les astrocytes, dans la croissance des tumeurs (Pérès *et al.* 2011). De plus des travaux ont également montré un rôle de la signalisation EPO/EPOR dans la résistance des tumeurs à la chimio- et la radiothérapie (Pérès *et al.* 2014; Todaro *et al.* 2013) (**Figure 50**).

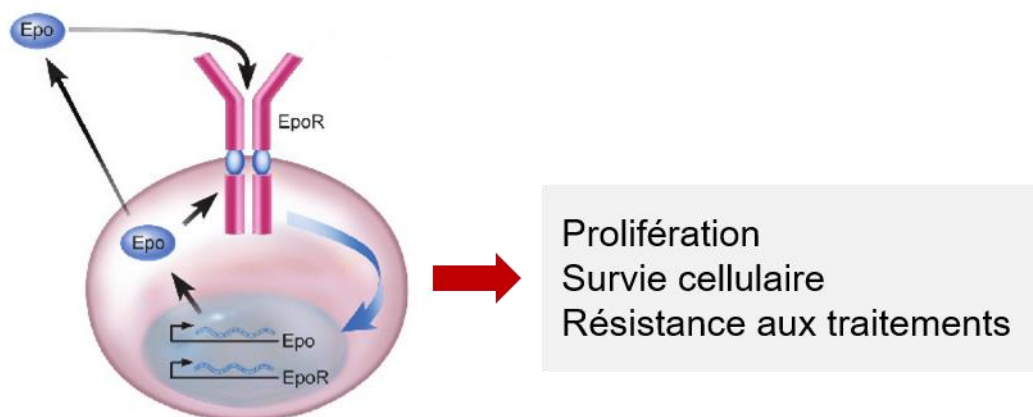


Figure 50 | Les effets et les mécanismes de la signalisation EPO/EPOR dans les tumeurs. Les cellules cancéreuses et le microenvironnement tumoral expriment l'EPO et l'EPOR. L'EPOR est activé par l'EPO circulante mais également par une boucle autocrine/paracrine venant de l'EPO synthétisée par les cellules tumorales et le microenvironnement. Ceci active des voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie et la résistance aux traitements. Adapté de Hardee *et al.* 2006.

Devant ces résultats, des premiers doutes sur l'implication de l'EPO dans la progression tumorale ont été émis suite à l'administration d'EPO recombinante chez des patients atteints de cancers souffrant d'anémie consécutive à leur traitement, bien que des études précliniques aient montré un effet bénéfique de l'administration de HuEPOr dans des modèles de GB. Ces travaux ont montré que l'administration de HuEPOr chez des souris porteuses de GB et anémiées permet à la fois de réduire l'hypoxie dans la tumeur et d'améliorer l'efficacité de la RT pour contrôler le volume tumoral. Ces études ont

également révélé un effet bénéfique de l'HuEPOr sur la survie des animaux (Scigliano *et al.* 2008; Pinel *et al.* 2004).

Cependant, des études cliniques ont été menées pour déterminer si le traitement à l'HuEPOr favorise la croissance tumorale et à terme la survie des patients. Les résultats de ces études cliniques ont montré que bien que l'EPO permette une augmentation du niveau d'hémoglobine chez les patients anémiés, il n'y a aucun bénéfice pour le contrôle de la tumeur, voire au contraire, un risque pour le patient dans certains cas. Les auteurs de ces études s'accordent donc sur le fait que la possibilité d'un effet délétère de l'HuEPOr ne peut être exclue (Shenouda *et al.* 2015; Debeljak *et al.* 2014).

C'est pourquoi des stratégies d'inhibition ciblant cette signalisation EPO/EPOR ont été proposées pour améliorer le contrôle tumoral et l'efficacité des traitements. Il a notamment été proposé sur des modèles cellulaires et *in vivo* d'utiliser l'EPORT en tant qu'antagoniste de l'EPO dans le microenvironnement tumoral. La surexpression de ce récepteur tronqué par les cellules tumorales a ainsi permis de contrôler la croissance tumorale dans un modèle de GB (**Figure 51A**). L'EPORT agit comme un dominant négatif par rapport à la forme entière et permet d'inhiber la signalisation EPO/EPOR améliorant ainsi la survie des animaux (**Figure 51B**) (Pérès *et al.* 2011).

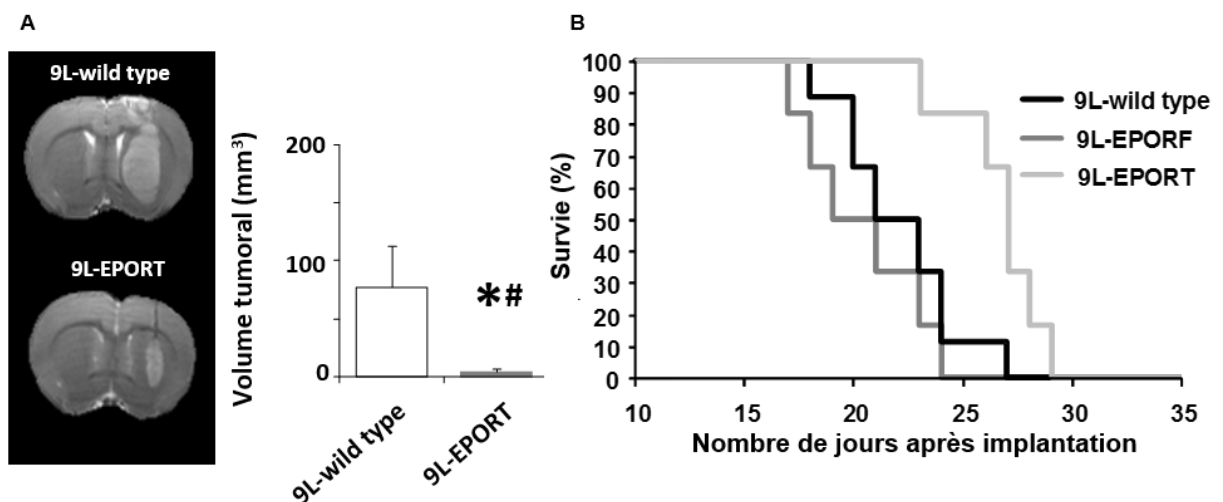


Figure 51 | La surexpression de l'EPORT permet un contrôle de la tumeur. **A.** La surexpression de l'EPORT par les cellules tumorales permet de réduire le volume tumoral. **B.** Cela se reflète sur la survie des animaux qui est augmentée. Adapté de Pérès *et al.* 2011.

Cette stratégie est efficace mais difficilement applicable en pratique clinique car elle nécessite une modification génétique des cellules tumorales afin qu'elles expriment ce récepteur tronqué. Il est donc nécessaire d'imaginer une stratégie

permettant d'apporter de grandes quantités d'EPO exogène dans le microenvironnement tumoral.

De ce fait, une approche intéressante pourrait être une stratégie de vectorisation active basée sur l'utilisation de cellules sensibles au tropisme tumoral, comme les macrophages. Cependant, il faut noter qu'au même titre que les cellules vectrices précédemment mentionnées, une grande partie des macrophages injectés par voie intraveineuse se retrouve dans le foie, la rate et les organes lymphoïdes (Valable *et al.* 2007). C'est pourquoi des travaux se sont attachés à augmenter la spécificité des thérapies proposées vis-à-vis des tumeurs en utilisant pour cela la nature hypoxique de celles-ci. Cette stratégie se justifie d'autant plus dans le cas de l'EPO dont l'expression est inductible par l'hypoxie. La stratégie consiste à mettre au point des vecteurs d'expression conditionnant l'expression de l'agent thérapeutique sous contrôle de séquences HRE (Muthana *et al.* 2011). Plus récemment, certains auteurs ont montré l'efficacité *in vitro* et *in vivo* d'une stratégie basée sur une double spécificité : vis-à-vis de l'hypoxie et vis-à-vis des cellules tumorales. Ils ont développé une construction plaçant l'expression d'un gène cytotoxique, celui de l'*Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase* (HSV-tk), sous contrôle d'un promoteur spécifique des astrocytes (promoteur de la GFAP) et de séquences HRE (Kim *et al.* 2014).

V. CONCLUSIONS DE L'INTRODUCTION

De manière générale, cette introduction permet de mettre en avant le rôle néfaste de l'hypoxie dans la progression des GB. Celle-ci favorise la croissance tumorale mais également la résistance aux traitements, notamment la RT. Il est donc d'un grand intérêt de considérer l'hypoxie en tant que cible thérapeutique et de lutter soit directement contre elle soit contre ses conséquences.

Cette lutte contre l'hypoxie nécessite une spécificité vis-à-vis de la tumeur, les stratégies de réoxygénation tissulaire non ciblées étant peu efficaces. Des stratégies ciblées de vectorisation de thérapies sont de ce fait requises. Pour les mettre en place, plusieurs points faibles des GB ont été décrits, permettant un ciblage spécifique actif, par le biais de macrophages, ou passif par le biais de NP et de l'effet EPR.

Le ciblage actif de la tumeur par le biais de macrophages permet d'envisager l'inhibition de facteurs produits par la tumeur ou son microenvironnement, comme l'EPO, décrite dans cette introduction. Cette cytokine, dont l'expression est induite par l'hypoxie, est synthétisée au sein de la tumeur et favorise l'agressivité des GB.

Enfin, le ciblage passif de la tumeur par des NP permet d'envisager des stratégies de réoxygénation ciblées des GB. A ce titre, une classe de matériaux, les zéolithes, a été

décrite. Ces NP possèdent trois caractéristiques extrêmement intéressantes pour cette application : leur taille nanométrique, leur capacité de sorption de gaz et la possibilité d'en faire des agents de contraste pour l'imagerie

OBJECTIFS

Malgré les traitements actuellement utilisés contre les GB, ces tumeurs restent incurables. Nous l'avons vu au cours de cette introduction, cette résistance aux thérapies est en grande partie imputable à leur caractère hypoxique, responsable de l'expression par les cellules tumorales de facteurs de croissance comme l'EPO ou, plus directement, responsable d'une diminution de l'efficacité de la RT.

Jusqu'ici, les tentatives de réoxygénation des GB se sont toutes basées sur des traitements systémiques que ce soit par inhalation de gaz hyperoxiques (Miralbell *et al.* 1999) ou par l'administration d'HuEPOr pour augmenter l'hématocrite et donc l'apport sanguin en O₂ (Shenouda *et al.* 2015). Cependant, dans le cadre des GB, toutes ces stratégies se sont soldées par des échecs.

Il apparaît, à la lumière de ces résultats, que les stratégies de réoxygénation non ciblées sont inefficaces et peuvent même s'avérer contre-productives comme c'est le cas avec l'HuEPOr. Cependant, l'hypoxie reste une cible attractive et il est de ce fait nécessaire de penser différemment la manière de la cibler. Les stratégies futures de lutte contre l'hypoxie devront sans doute impliquer des approches spécifiques de réoxygénation des tissus tumoraux ou cibler des facteurs inductibles par l'hypoxie comme l'EPO (Aguilera & Giaccia 2015).

Afin de cibler spécifiquement l'hypoxie dans les tumeurs ou bien les facteurs qu'elle induit, certains points faibles des GB développés en introduction peuvent être exploités. D'une part, le tropisme que les GB exercent sur les macrophages peut être mis à profit pour développer des stratégies de **vectorisation active** en modifiant ces cellules pour qu'elles transportent des molécules thérapeutiques (Muthana *et al.* 2013; Ribot *et al.* 2011; Valable *et al.* 2007). D'autre part, nous avons vu que la vascularisation des GB est perméable, ceci apparaît comme un point faible de cette tumeur qui permet de développer des stratégies de **vectorisation passive** basées sur l'effet EPR et l'utilisation de NP (Maeda *et al.* 2013).

Ces deux approches de vectorisation active et passive, permettraient un ciblage spécifique des tissus tumoraux. Par conséquent, les études menées lors de ces travaux de thèse se divisent en deux grands axes :

- Le développement d'une stratégie de vectorisation active, basée sur les macrophages, permettant une inhibition de la signalisation EPO/EPOR spécifiquement au sein des GB.

- Le développement d'une stratégie de vectorisation passive, basée sur l'utilisation de nanozéolithes vectrices de thérapies gazeuses, afin de réoxygéner spécifiquement le tissu tumoral.

La première partie des résultats de ces travaux s'intéresse ainsi i) aux effets fonctionnels de la surexpression de l'EPO d'abord sur les cellules de GB puis ii) au développement de constructions moléculaires permettant une expression de l'EPO uniquement en condition d'hypoxie pour inhiber l'EPO spécifiquement dans les GB et non dans d'autres tissus.

La deuxième partie des résultats s'intéresse aux nanozéolithes en tant que vecteurs de thérapies gazeuses. Les deux premières sous-parties sont dédiées à la sélection du type de zéolithe le plus approprié à cette application, du point de vue de la toxicité dans un premier temps puis de la capacité d'adsorption des gaz dans un deuxième temps. Enfin, la troisième sous-partie est consacrée à la mise en œuvre de la stratégie de vectorisation de gaz dans un modèle orthotopique de GB chez le rat et à l'étude des effets fonctionnels sur la tumeur en utilisant notamment l'IRM multiparamétrique.

MATERIELS & METHODES

I. CONSTRUCTIONS MOLECULAIRES

Les plasmides pGL3-HRE-SV40 et pcDNA3.1 contenant soit le gène de l'EPORF ou de l'EPORT (humain) ont été fournis par les Dr. Florent Soubrier (Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris) et Dr. Yukio Nakamura (Riken Bioresource Center, Japon) respectivement. Le plasmide pSELECT-zeo-HSV1tk a été obtenu chez InvivoGen et le plasmide pGL3-Promoter Vector chez Promega.

Trois constructions plasmidiques ont été réalisées. Dans les deux premières, le gène de l'EPORT a été cloné dans le plasmide pGL3 en aval du promoteur SV40 en présence ou non d'éléments HRE (x4). Dans la troisième, l'EPORT a été cloné dans le plasmide pSELECT en aval d'un promoteur fort EF1 (*Elongation Factor-1 α*) et à la place du gène de la thymidine kinase. Ces travaux de clonage ont été réalisés par recombinaison homologue à l'aide du kit *In-Fusion® Advantage PCR Cloning* (Clontech). Pour cela, le gène de l'EPORT a été amplifié par PCR à l'aide de la *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) en se servant du plasmide pBCMGS-Neo-EPOR-T comme matrice et en utilisant deux paires d'amorces différentes. Ces amorces possèdent sur leur partie 5' une région de 15pb complémentaire des extrémités du plasmide linéarisé, ce qui permet le clonage par recombinaison homologue. La première paire a permis d'amplifier et d'intégrer le gène de l'EPORT dans le plasmide pSELECT-zeo-HSV1tk digéré par NcoI et NheI : Sens = 5'-TCA CCG GTC ACC ATG GAC CAC CTG GGG GCG TCC CTC-3' ; Antisens = 5'-TGT CTG GCC AGC TAG TCA GAG AGG CCT GCA GTT TGG-3'. La seconde paire a permis d'intégrer le gène de l'EPORT dans les plasmides pGL3-Promoter Vector et pGL3-HRE-SV40 digérés par NcoI et XbaI : Sens = 5'-GGT AAA GCC ACC ATG GAC CAC CTC GGG GCG TCC CTC-3' ; Antisens = 5'-CCG CCC CGA CTC TAG TCA GAG AGG CCT GCA GTT TGG-3'. Les plasmides obtenus sont nommés pSELECT-EPORT, pGL3-EPORT et pGL3-HRE-EPORT.

Tous les plasmides digérés et les produits PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% avant d'être extraits du gel grâce au kit *Nucleospin® Gel and PCR Clean up* (Macherey-Nagel).

Toutes les constructions générées ont été amplifiées par transformation bactérienne en utilisant la souche *One Shot® TOP10 Chemically Competent Cells* (Invitrogen). La sélection a été réalisée en présence d'ampicilline (Sigma-Aldrich) pour les plasmides pGL3 ou en présence de zéocine (InvivoGen) pour les plasmides pSELECT. L'extraction des plasmides a ensuite été réalisée en utilisant le kit *Nucleospin® Plasmid* (Macherey-

Nagel). La quantité et la pureté de l'ADN ont été mesurées par mesure de l'absorbance à 280, 260 et 230 nm. Toutes les constructions ont été vérifiées par digestion enzymatique suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1% puis par séquençage (Genoscreen, Lille, France).

II. SYNTHÈSE DES ZEOLITHES

La synthèse des zéolithes FAU-X a été assurée par le Laboratoire Catalyse et Spectrochimie de l'ENSICAEN (UMR 6506, CNRS, Université de Caen Normandie, ENSICAEN).

Brièvement, deux solutions A et B sont préparées. La solution A est préparée en dissolvant 2,5 g de NaOH (Sigma-Aldrich) dans 3,0 g d'H₂O, puis 0,297 g de poudre d'aluminium (Alfa Aesar) est ajouté lentement au mélange. La solution B est préparée en dissolvant 1,1 g de NaOH dans 1,0 g d'H₂O, puis en mélangeant avec 10 g de Ludox HS-30 (SiO₂, Sigma-Aldrich). Ce mélange est ensuite placé dans une étuve à 100°C pendant 5 min. La solution A est ensuite ajoutée à la solution B goutte à goutte sur glace et sous agitation. Le mélange est laissé sous agitation 24h à température ambiante puis déshydraté et placé pendant 24h à 50°C pour la cristallisation. Le produit final est ensuite purifié par centrifugation/ resuspension dans de l'eau double distillée.

Le processus d'échange d'ions est réalisé pendant 1h à température ambiante en mélangeant les zéolithes avec une source d'ions selon un ratio 1:5. Le produit final est ensuite purifié par centrifugation/ resuspension dans de l'eau double distillée jusqu'à obtenir un pH de 7.

III. METHODOLOGIE *IN VITRO*

A. CULTURE CELLULAIRE

1. LIGNEES CELLULAIRES

Les lignées cellulaires U87-MG, U251-MG, HEK 293, bEnd.3 et THP1 ont été utilisées. Les lignées U87-MG (Malignant Glioma, *American Type Culture Collection*, ATCC) et U251-MG (*National Cancer Institute*) ont été établies à partir de biopsies humaines de GB et les cellules HEK 293 (ATCC) à partir de cellules de reins embryonnaires humaines. Les cellules sont maintenues en culture dans du *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*-1g/L de glucose (DMEM, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (dSVF, Eurobio), 2mM de glutamine (Sigma-Aldrich) et de la pénicilline (1000 U/ml)/ stréptomycine (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich) sous atmosphère humide, à 5%

de CO₂ et à 37°C. A confluence, les cellules sont rincées avec du tampon phosphate à 0,01M (PBS, Sigma-Aldrich). Et détachées de leur support de culture par traitement avec une solution de trypsine-EDTA (trypsine 2,5% ; EDTA 2%, Sigma-Aldrich) pendant 5 min à 37°C. L'action de la trypsine est inhibée par ajout d'un excès de milieu de culture contenant du dSVF. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300g pendant 5 min, resuspendues dans du milieu de culture frais et ensemencées sur de nouveaux supports de culture avec une densité plus faible.

Les cellules bEnd.3 (ATCC) ont été établies à partir de cellules endothéliales de cortex cérébral de souris *mus musculus*. Elles sont cultivées dans du DMEM-4,5g/L de glucose (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de dSVF (Eurobio), 2mM de glutamine (Sigma-Aldrich) et de la pénicilline (1000U /ml)/ stréptomycine (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich) sous atmosphère humide, à 5% de CO₂ et à 37°C. A confluence, la même procédure décrite ci-dessus pour les cellules humaines est appliquée.

Les cellules THP1 (ATCC) ont été établies à partir de monocytes de sang périphérique humain. Elles sont cultivées dans du *Roswell Park Memorial Institute's medium* (RPMI)-4,5g/L de glucose (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de dSVF (Eurobio), 2mM de glutamine (Sigma-Aldrich) et de la pénicilline (1000U /ml)/ stréptomycine (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich) sous atmosphère humide, à 5% de CO₂ et à 37°C.

Les expériences en hypoxie ont été réalisées en chambre à hypoxie (IN VIVO2 500, 3M) réglée au pourcentage d'O₂ souhaité, à 37°C avec 5% de CO₂, le reste étant complété avec de l'azote. A l'introduction des cellules dans la chambre, le milieu de culture est remplacé par le même milieu préalablement équilibré pendant 30 min avec le gaz de la chambre. Les ARNm totaux sont extraits immédiatement à la fin de l'hypoxie.

2. CULTURES PRIMAIRES D'ASTROCYTES

Des cortex cérébraux sont prélevés sur des nouveau-nés de souris SWISS (CURB, Université de Caen Normandie) sous une loupe binoculaire, puis les méninges en sont retirées. Les cortex sont ensuite dissociés pour obtenir une suspension cellulaire. Les cellules sont maintenues en culture dans du DMEM-4,5g/L de glucose (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de dSVF (Eurobio), 10% de sérum de cheval décomplémenté (Eurobio), 2mM de glutamine (Sigma-Aldrich) et de la pénicilline (1000U /ml)/ stréptomycine (100 µg/ml) (Sigma-Aldrich) sous atmosphère humide, à 5% de CO₂ et à 37°C. A environ 80% de confluence le milieu est remplacé par le même milieu frais.

3. CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES/ASTROCYTES CORTICAUX

Les cultures sont préparées à partir d'embryons (E14) de souris SWISS (CURB, Université de Caen Normandie) sur lesquels le cortex cérébral est prélevé. Les cortex sont ensuite dissociés dans du DMEM-4,5 g/L de glucose à 37°C pour obtenir une suspension cellulaire. Les cellules sont ensuiteensemencées sur des plaques préalablement recouvertes avec une solution de laminine à 0,02 mg/ml (Invitrogen) et de poly-D-lysine à 0,1 mg/ml (Sigma-Aldrich) et maintenues en culture dans du DMEM-4,5g/L de glucose (Sigma-Aldrich) supplémenté avec 5% de dSVF (Eurobio), 5% de sérum de cheval décomplémenté (Eurobio) et 2mM de glutamine (Sigma-Aldrich) sous atmosphère humide, à 5% de CO₂ et à 37°C. Les cultures de neurones/astrocytes sont utilisées après 12 jours de culture.

4. CULTURE DE BACTERIES

Un stock de E. Coli congelé (-80°C) dans du glycérol est inoculé dans un tube de 15 ml contenant 10 ml de milieu de culture LB liquide (Sigma-Aldrich) et mis en culture pendant une nuit à 37°C sous agitation (220 rpm). Le lendemain, la culture est diluée dans du milieu de culture LB frais contenant des concentrations croissantes de zéolithes (50, 100 et 400 µg/ml) pour obtenir des suspensions à 5% (v/v) de la culture de nuit. Ces suspensions bactériennes sont distribuées dans des plaques 96 puits (100 µl par puits) et mises en culture à 37°C sous agitation pendant le temps de l'expérience. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de la densité optique à 600 nm toutes les 15 min à l'aide d'un spectrophotomètre de plaques (Asys UVM 340, Biochrom Ltd.). Les témoins négatifs consistent en du milieu frais contenant uniquement les zéolithes.

5. TRANSFECTIONS CELLULAIRES

Pour les transfections, les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 250 000 cellules par puits. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont transfectées en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) suivant le protocole du fournisseur. Le milieu est changé 6 heures plus tard.

6. EXPOSITION AUX NANOZEOLITHES

Les cellules sont exposées aux zéolithes sous forme de suspensions colloïdales dans de l'eau pure ajoutées directement dans leur milieu de culture. L'exposition témoin a consisté à l'ajout du même volume d'eau pure dans le milieu de culture.

B. TESTS DE TOXICITE

1. ÉVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE

La viabilité cellulaire est évaluée par test colorimétrique utilisant le WST-1 (Roche) sur des cellules ensemencées en plaque 24 puits de manière à ce que les cellules de la condition témoin soient à environ 80% de confluence le jour de la réalisation du test. Brièvement, au moment du test, le milieu est remplacé par du milieu frais contenant 10% (v/v) de réactif WST-1 et les cellules sont remises à 37°C pendant 1 à 2h suivant la densité cellulaire. Le surnageant est ensuite prélevé en triplicat pour réaliser une mesure d'absorbance à 480 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom ASYS UVM 340).

2. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE PAR CYTOMETRIE EN FLUX

Les expériences de cytométrie en flux ont été réalisées sur un cytomètre en flux Gallios™ (Beckman Coulter SAS) et les données analysées avec le logiciel Kaluza® (Beckman Coulter SAS) sur la plateforme SFR ICORE (Interactions Cellules-Organismes-Environnement) de l'université de Caen-Normandie.

La préparation des cellules à l'analyse en cytométrie en flux nécessite de les détacher de leur support de culture, tel que cela a été décrit dans le paragraphe III.A.1. Néanmoins, afin de conserver les cellules mortes et les débris cellulaires, le surnageant est conservé et sert à l'inhibition de la trypsine. Les cellules sont ensuite fixées à l'éthanol 70% et conservées à -20°C. Après rinçage au PBS, l'ADN des cellules est marqué à l'iodure de propidium (IP) à l'aide du kit *DNA-prep reagents* (Beckman-Coulter) selon les instructions du fournisseur.

L'IP est un intercalant fluorescent de l'ADN qui absorbe à 450 nm et émet à 650 nm et dont l'intensité de fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN dans la cellule (**Figure 52**). Il est ainsi possible de discriminer les cellules en fonction de leur quantité d'ADN qui est directement liée à leur état d'avancement dans les différentes phases du cycle cellulaire. Les cellules en phase G0/G1 ont une certaine quantité 2n d'ADN tandis que les cellules en phase G2/M, qui ont dupliqué la totalité de leur patrimoine génétique, ont une quantité 4n d'ADN. Les cellules en phase S, en cours de réplication, ont une quantité d'ADN comprise

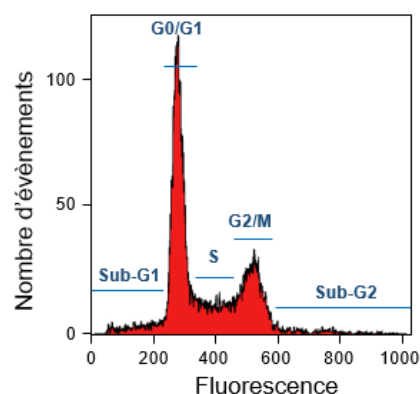


Figure 52 | Le cycle cellulaire en cytométrie en flux. Le profil obtenu représente l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cellules. Les différentes phases du cycle sont délimitées en bleu.

entre 2n et 4n. Enfin deux autres phases intermédiaires sont possibles, la phase sub-G1 où l'on trouve les cellules possédant une quantité d'ADN inférieure à 2n, ce qui correspond aux cellules en mort cellulaire dont l'ADN a commencé à être dégradé et la phase sub-G2 qui correspond aux cellules ayant une quantité d'ADN supérieure à 4n, les cellules polyploïdes.

3. TEST DE FORMATION DES MICRONOYAUX

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits sur des lamelles de verres préalablement stérilisées. A l'issue du protocole, les cellules sont rincées au PBS puis fixées dans une solution de PBS-0,2M/paraformaldéhyde-4% (PFA) pendant 1h à 4°C. Les cellules sont ensuite conservées à 4°C dans du PBS. Les noyaux des cellules sont marqués par une solution de Hoechst 33342-10µg/ml dans du PBS contenant du tween-0,1% sous agitation pendant 30 min à température ambiante. Des images des cellules sont acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DMI8, avec un objectif 40x et à raison de 5 images par lamelle. Le nombre total de cellules est déterminé par comptage des noyaux à l'aide du logiciel imageJ. Les cellules comprenant au moins 1 micronoyau sont considérées comme positives.

4. DETERMINATION DES CASSURES DOUBLE-BRIN DE L'ADN : IMMUNOCYTOCHIMIE γ H2AX

Les cellules sont préparées et fixées comme décrit dans le paragraphe III.B.3. Les liaisons non spécifiques sont bloquées avec une solution de PBS, tween-0,1%, et d'albumine de sérum bovin-3% (BSA). Les cellules sont ensuite mises en contact d'anticorps primaires de lapin anti- γ H2AX (Cell signalling Technology) dilué 400 fois dans une solution de PBS, tween-0,1%, et BSA-1% pendant une nuit sous agitation à 4°C. Après avoir été rincées, les cellules sont mises en contact d'anticorps secondaires d'ânes anti-anticorps de lapin conjugués à un fluorochrome, un Alexa Fluor® 488 (Invitrogen), dilué 200 fois dans une solution de PBS, tween-0,1%, BSA-1% et du hoechst 33342 (10 µg/ml) pendant 1h sous agitation à température ambiante. Après avoir été rincées, les lamelles sont montées sur une lame de verre. Des images des cellules sont acquises à l'aide d'un microscope à fluorescence Leica DMI8 et avec un objectif 40x à raison de 5 images par lamelle. Le nombre total de cellules est déterminé par comptage des noyaux à l'aide du logiciel imageJ. Les cellules comprenant au moins 10 foci γ H2AX dans leur noyau sont considérées comme positives.

C. PCR EN TEMPS REEL

Les ARN totaux sont extraits en utilisant le Kit *Nucleospin[®] RNA* (Macherey-Nagel) en suivant le protocole du fournisseur. La transcription inverse est ensuite réalisée à partir d'1 µg d'ARN de chaque échantillon en utilisant le kit *Promega RT* (Promega, transcription inverse 1h à 42°C) en présence d'oligo-dT (0,5 µg). L'amplification par PCR en temps réel est réalisée avec des amorces sens et antisens (Eurogentec) dessinées pour chaque gène grâce au logiciel *Custom Primers – OligoPerfectTM Designer* (life technologies): EPORT humain Sens = 5'-CTG ACG CCT AGC GAC CTG GAC C-3' and Antisens = 5'-GCA GTT TGG CTG CAA GAA GCA-3' ; cyclophiline humaine: Sens = 5'-TAT TCC AGG ATT CAT GTG CAG G-3' ; Antisens = 5'-ACA AGA TGC CAG GAC CTG TAT GC-3'. Les tests sont réalisés en triplicats sur un appareil Chromo 4 (Bio-Rad). Le profil d'amplification est le suivant : activation, 95 °C pendant 3 min; PCR 40 cycles à 95 °C, 15 s et 60 °C, 1 min. La qPCR est faite suivant le protocole du fournisseur en utilisant le kit *IQTM SYBR[®] Green Universal Supermix* (Bio-Rad). Les résultats sont analysés en utilisant une méthode comparant le nombre de cycles nécessaires au gène pour atteindre un seuil fixé et le nombre de cycles nécessaires au gène de la cyclophiline pour atteindre ce seuil. Ils sont ensuite exprimés en utilisant la formule $2^{(-\Delta Ct)}$.

IV. EXPERIMENTATION ANIMALE

Des rats Wistar et des rats *nude* athymiques, des souris Swiss et Swiss *nude* athymiques et des marmousets ont été utilisés lors des expériences. Les rats et les souris *nude*, les souris SWISS et les marmousets proviennent d'un élevage interne du Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB) de Caen. Les rats Wistar proviennent de chez Janvier Labs. Les rats et les souris *nude* sont élevés dans un environnement répondant aux normes EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) et nourris avec des aliments irradiés aux rayonnements γ .

Tous les animaux sont manipulés sous anesthésie profonde à l'isoflurane (5% pour l'induction, 2% pendant les expériences) dans un mélange de 70% de protoxyde d'azote et 30% d'oxygène. La température est mesurée à l'aide d'une sonde rectale et maintenue à $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durant toutes les procédures. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées sous couvert et après acceptation du comité régional d'éthique et du ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation.

A. ETUDE DES PARAMETRES PHYSIOLOGIQUES APRES INJECTION DE ZEOLITHES CHEZ DES ANIMAUX SAINS

Des injections intrapéritonéales de 100 µl de solutions de Na-X ou de Gd-X à 1% ou d'eau pure en tant que témoin, sont réalisées sur des souris SWISS saines pendant 5 jours consécutifs. Dès la première injection, le poids des animaux est mesuré tous les jours pendant 30 jours.

Des injections intraveineuses de 300 µl d'une solution de Fe-X à 1% ou d'eau pure en tant que témoin sont réalisées sur des rats Wistar sains. Un ou 3 jours plus tard, la rate, le foie et les reins sont prélevés, fixés avec du PFA à 4% et immergés dans une solution de sucrose -30% cryoprotectrice (Sigma-Aldrich) pendant 48h avant stockage à -80°C. La présence de Fe-X est détectée sur des coupes de tissus de 20 µm d'épaisseur, obtenues à l'aide d'un microtome à congélation, en utilisant une coloration de Perl. Les coupes sont mises en contact d'une solution de ferricyanure de potassium-2% (réactif de Perl, Sigma-Aldrich) dans 2% de HCl, rincées et colorées à l'éosine.

Une solution de 1% de Gd-X ou de l'eau pure en tant que témoin est dans un premier temps saturée en CO₂ (**Figure 53**). Des injections intraveineuses de 300 µl de ces solutions sont réalisées sur des rats Wistar sains. Des échantillons sanguins sont ensuite prélevés toutes les 5 min via un cathéter artériel et la pression partielle en CO₂ et le pH du sang de ces échantillons sont mesurés en utilisant un analyseur RapidLab 348 (Siemens).

Une solution de 1% de Gd-X ou de l'eau pure en tant que témoin sont injectées par voie intraveineuse chez un marmouset mâle de 309 g. La pression artérielle et le rythme cardiaque sont mesurés pendant toute la durée de l'expérience.

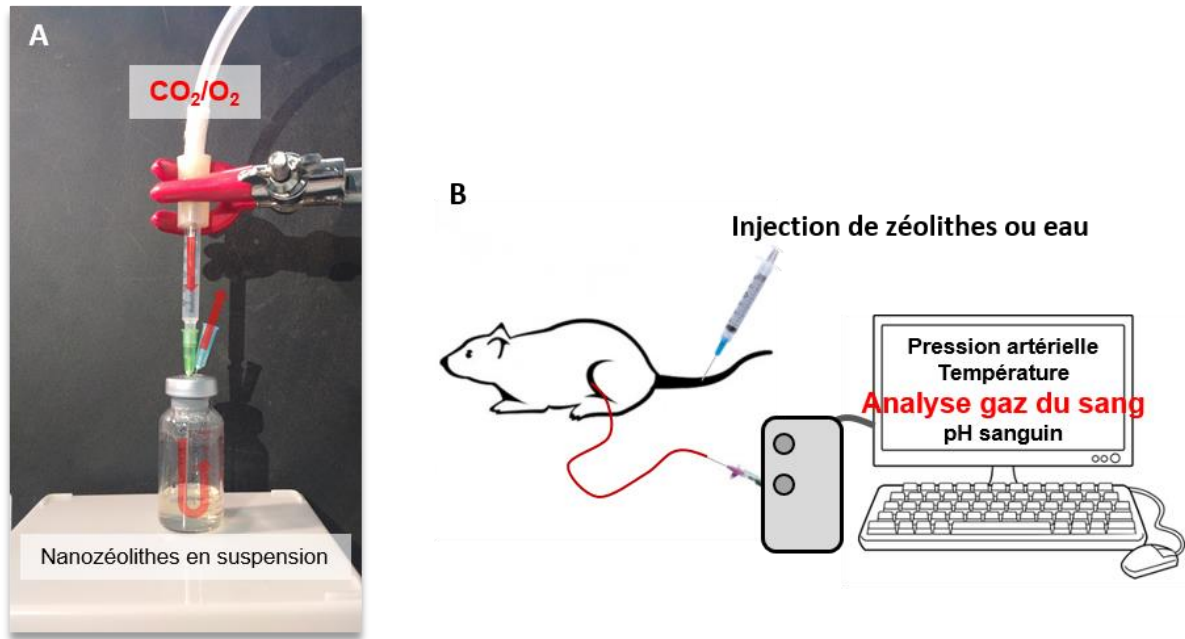


Figure 53 | Saturation des zéolithes en gaz et suivi physiologique des animaux. **A.** Les zéolithes en suspension dans de l'eau pure sont placées dans un flacon fermé par un bouchon en caoutchouc hermétique. Une aiguille à laquelle est reliée une arrivée de gaz plonge dans la solution et une deuxième permet la sortie du gaz de la bouteille. Ce dispositif est maintenu pendant au moins 30 min. **B.** Schéma de l'installation permettant le suivi des paramètres physiologiques des animaux après injection de zéolithes chargées en CO₂.

B. MODELES ORTHOTOPIQUES DE GLIOBLASTOME

De manière générale, les cellules sont préparées comme décrit dans le chapitre III.A.1, puis suspendues dans du PBS avant l'implantation dans le striatum droit de rats ou de souris. Les animaux sont anesthésiés et placés dans un cadre stéréotaxique et le scalp est incisé le long de la suture sagittale. Un trou de 1 mm de diamètre est percé dans le crâne selon les coordonnées stéréotaxiques indiquées dans le **Tableau 5** pour les rats et les souris, ce qui permet une injection dans le *caudato-putamen* droit. Les cellules sont ensuite injectées en 6 min via une aiguille fine (30G) connectée à une seringue Hamilton. L'aiguille est ensuite lentement retirée et la craniotomie scellée.

Tableau 5 | Coordonnées stéréotaxiques pour l'implantation de tumeurs dans le striatum droit de rats et souris.

	Rat	Souris
Latéral	3	2,2
Profondeur	5,5	4,5
Bregma	0	0

V. IMAGERIE PAR RESONANCE MAGNETIQUE

Les études en IRM ont été réalisées sur un appareil Pharmascan® (Bruker) de 7T présent sur la plateforme d'imagerie biomédicale Cyceron. Cet appareil dédié au petit animal est équipé d'un aimant horizontal, d'un berceau et de deux antennes d'émission/réception adaptées aux têtes de rats et souris. Les données ont été acquises avec le logiciel Paravision 6.0.1 (Bruker).

A. MESURES DE RELAXIVITE

Les zéolithes Fe-X et Gd-X ainsi que le Dotarem® (Guerbet) sont dilués dans de l'eau pure à des concentrations en gadolinium allant de 0,127 à 0,3175 mM pour les Gd-X et 6,35 à 0,635 mM pour le Dotarem® et des concentrations en fer allant de 4,529 à 7,548 pour les Fe-X. Les solutions sont placées dans des microtubes montés sur un support en plastique. Les acquisitions par IRM sont effectuées à température ambiante. Une séquence FLASH (*Fast Low Angle Shot* ; TR [temps de répétition]/TE [temps d'écho] = 100/4 ms) est tout d'abord réalisée afin de positionner les séquences suivantes. Les images pondérées T1 (T1-w) sont acquises à l'aide de séquences FAIR-RARE (*Flow Sensitive Alternating Inversion Recovery and Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) avec des paramètres différents pour les Gd-X (TR: 780 ms, TE: 4.73 ms, TI: augmentation de 6,16 ms à 750 ms suivant une fonction géométrique, facteur RARE de 4, matrice image: 128 × 128, 1 coupe avec une épaisseur de 3 mm pour un temps total d'acquisition de 16 min 38 sec) et les Fe-X (TR: 5,157 ms, TE: 4.73 ms, TI: augmentation de 6,2 ms à 5000 ms suivant une fonction géométrique facteur RARE de 32, matrice image: 128 × 128, 1 coupe avec une épaisseur de 3 mm pour un temps total d'acquisition de 13 min 45 sec). Les images pondérées T2 (T2-w) sont acquises à l'aide de séquences MSME (*Multi-Slice Multi-Echo*) avec des paramètres différents pour les Gd-X (TR: 1500 ms, TE entre 10 et 100 ms par paliers de 10 ms (total = 10 échos), matrice image: 192 × 192, 1 coupe avec une épaisseur de 5 mm pour un temps total d'acquisition de 4 min 48 sec) et Fe-X (même chose, TE entre 6,8 et 68,11 ms par palier de 6,81 ms (total = 10 échos)).

L'analyse des images est réalisée à l'aide des logiciels Paravision 6.0.1 (Bruker), MATLAB R2012b et imageJ. Les valeurs de R1 et R2 (qui correspondent à l'inverse des valeurs T1 et T2 calculées respectivement) sont exprimées graphiquement en fonction de la concentration de fer et de gadolinium par point expérimental et la pente de la courbe obtenue correspond à la relaxivité du composé étudié (en s⁻¹.mM⁻¹).

B. IMAGERIE DU VOLUME TUMORAL

Pour déterminer le volume tumoral, des examens IRM sont réalisés une fois par semaine. Les tumeurs sont imagées à l'aide d'une séquence RARE (*Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*, facteur d'accélération de 8, TR/TE = 5000/62.5 msec, nombre d'expériences (NEX) = 2, 20 coupes contiguës, résolution = 0,15x0,15x0,50 mm, temps d'acquisition = 4 min). Les tumeurs sont ensuite délimitées manuellement sur le logiciel imageJ.

C. DETECTION DES FE-X ET DES GD-X PAR IRM

Les expériences sont menées sur des rats porteurs de tumeurs. Après une séquence FLASH et une séquence RARE, 300 µl d'une solution à 1 % de Fe-X ou Gd-X est administrée aux animaux par voie intraveineuse. Des séquences T2*-EPI (*Echo Planar Imaging*) (TR/TE=20 000/12 ms, NEX=3, 50 coupes, résolution = 0.3x0.3x0.3 mm) ou T1-w-FLASH (TR/TEeff=500/10,32 ms; NEX=1; 10 coupes; résolution=0.15x0.15x1.5 mm; temps d'acquisition=2 min) sont utilisées pour acquérir des images avant et toutes les 2 minutes après l'injection de Fe-X ou Gd-X respectivement.

D. CARTES DE VOLUME SANGUIN CEREBRAL ET DE SATURATION EN OXYGENE

En ce qui concerne le protocole d'imagerie pour évaluer les effets fonctionnels sur la vascularisation et l'oxygénation tissulaire, avant l'injection de l'agent de contraste, 5 images T2*-w (TR=20 000 ms, NEX=3, 50 coupes, résolution = 0.3x0.3x0.3 mm) et 4 images T2-w-EPI (TR=20 000 ms, NEX=3) sont acquises avec différents temps d'écho (TE pour le T2*-w=12, 15, 18, 21 et 24 ms et pour le T2-w=40, 60, 80 et 100 ms). Une injection intraveineuse de P904® (200 µmol.kg⁻¹, Guerbet Research) est ensuite réalisée suivie d'acquisitions d'images T2*-w (TE=12 ms) avant et toutes les 5 minutes après injection intraveineuse de 300 µl de zéolithes (Na-X ou Gd-X et chargées en CO₂, en Carbogène ou sans gaz) à 1% wt. En conséquence, pour chaque animal, les cartes de volume sanguin cérébral sont obtenues sous deux conditions : ligne de base et après administration de zéolithes (**Figure 54**). L'analyse des images est réalisée sur le logiciel ImageJ à l'aide de macros développées au sein du laboratoire (Chakhoyan *et al.* 2016).

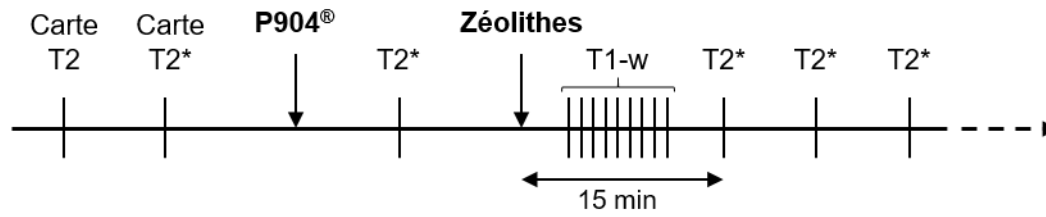


Figure 54 | Protocole expérimental pour l'acquisition des cartes de volume sanguin cérébral et de saturation en oxygène.

Les cartes de saturation en oxygène sont dérivées de l'équation publiée par Christen et Lemasson (Christen *et al.* 2014). Brièvement, les cartes sont calculées en fonction du signal T2*-w après correction des inhomogénéités de champs magnétique (B0), du volume sanguin, et des valeurs de T2. Des cartes de saturation en oxygène sont générées pour chaque animal avant et après administration de zéolithes.

VI. ANALYSES STATISTIQUES

Les données ont été analysées avec le logiciel JMP (SAS) en fixant un seuil de significativité à 0,05. Les tests utilisés sont décrits sous chaque figure.

RESULTATS

I. DEVELOPPEMENT DE CONSTRUCTIONS INDUCTIBLES PAR L'HYPOXIE POUR L'INHIBITION DE L'ERYTHROPOÏËTINE DANS LES GLIOBLASTOMES

A. OBJECTIFS

L'objectif de cette première partie est de mettre au point une stratégie de vectorisation active permettant d'inhiber les facteurs induits par l'hypoxie, plus particulièrement l'EPO. Nous avons vu en introduction que les macrophages représentent une population cellulaire de choix dans le cadre du ciblage actif des GB notamment du fait du tropisme que la tumeur exerce sur ceux-ci (**Figure 55**).

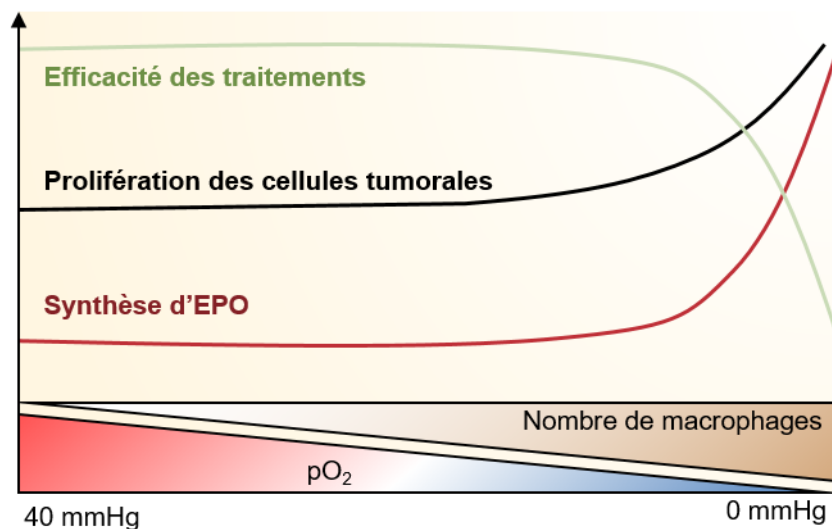


Figure 55 | Représentation schématique du lien entre l'hypoxie et la synthèse d'EPO, la prolifération cellulaire, la résistance aux traitements et le tropisme pour les macrophages. La synthèse d'EPO est plus importante à mesure que l'hypoxie se fait plus sévère, participant ainsi à la prolifération des cellules tumorales, à leur chimio- et radio-résistance. Adapté de Todaro *et al.* 2013; Pérès *et al.* 2014, 2011 et Leblond *et al.* 2016.

Nous avons également décrit dans l'introduction une forme tronquée de l'EPOR, qui permet la fixation de l'EPO mais ne transmet aucun signal intracellulaire. Nous avons vu que lorsqu'il est surexprimé dans le microenvironnement tumoral, l'EPOR agit comme **un dominant négatif** par rapport à la forme entière et permet ainsi d'inhiber la signalisation EPO/EPOR et de réduire la croissance tumorale (Pérès *et al.* 2011).

Ainsi, la stratégie développée ici est de mettre au point des constructions moléculaires permettant une surexpression de l'EPOR par les macrophages. Ces macrophages modifiés seraient injectés dans la circulation systémique d'où ils migraient vers la tumeur

afin d'inhiber la signalisation EPO/EPOR dans le microenvironnement tumoral. Cependant, il a été montré que la tumeur n'est pas le seul tissu qui exerce un tropisme pour les macrophages exogènes (Valable *et al.* 2007) et une inhibition non spécifique et systémique de l'EPO apparaît problématique en raison du rôle hématopoïétique de cette cytokine. La stratégie est donc de conditionner l'expression de l'EPOR dans les macrophages aux seules conditions d'hypoxie en plaçant l'expression du gène sous contrôle d'un promoteur inducible par l'hypoxie puisque contenant des séquences HRE, cibles du facteur de transcription HIF. Les macrophages ne surexprimeraient ainsi l'EPOR que lors de conditions d'hypoxie sévère, situation rencontrée dans les GB (Figure 56).

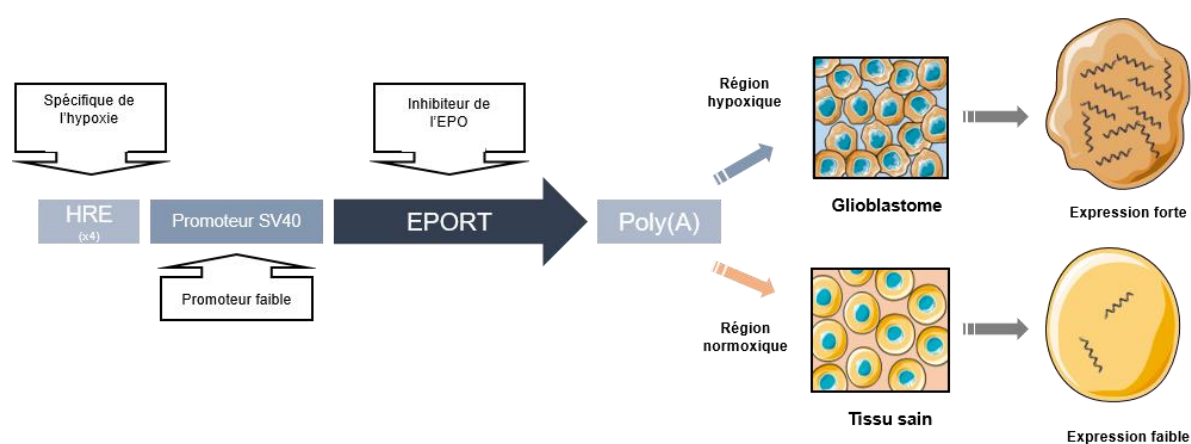


Figure 56 | Schéma représentatif du principe de fonctionnement des constructions inducibles par l'hypoxie. Le gène de l'EPOR est régulé par un promoteur faible contenant des séquences HRE. Ceci doit permettre une expression forte de l'EPOR dans des conditions d'hypoxie sévère comme dans les glioblastomes et une expression plus faible dans les tissus sains normalement oxygénés.

L'objectif est ainsi de mettre au point des constructions inducibles par l'hypoxie véhiculées par des macrophages pour inhiber l'EPO spécifiquement dans les GB et plus particulièrement dans les zones les plus hypoxiques (Figure 57).

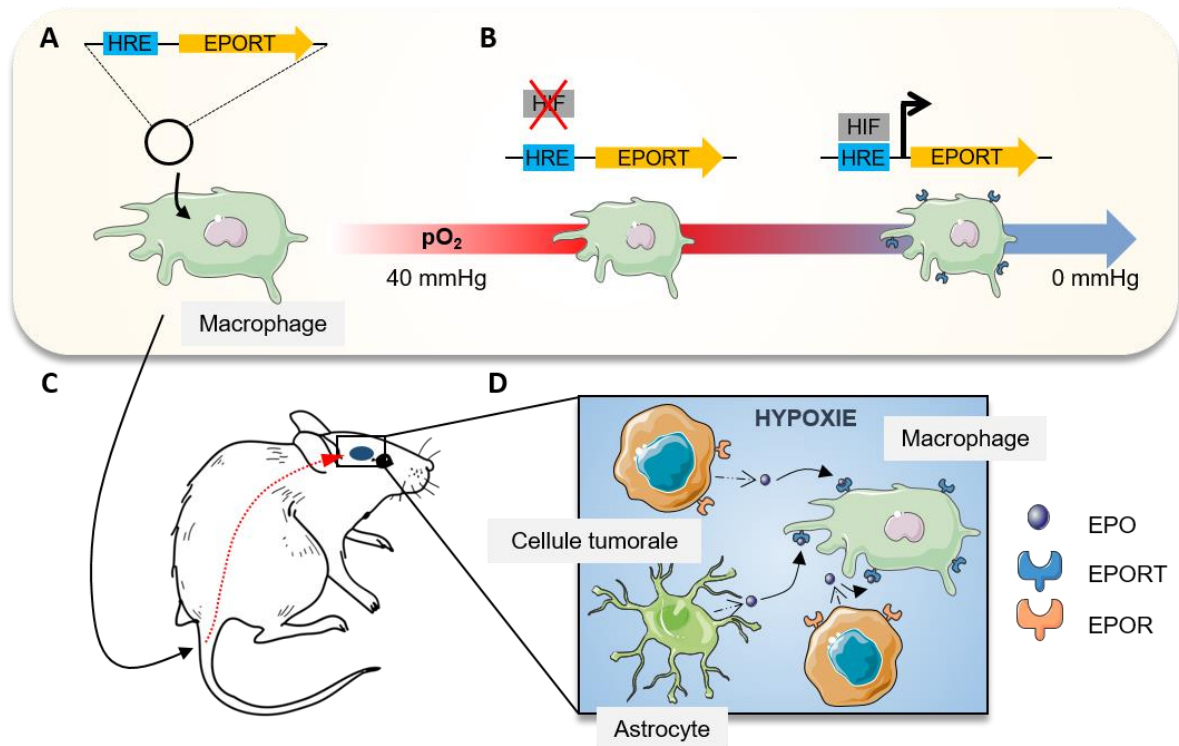


Figure 57 | Schéma représentatif de la stratégie de mise au point de constructions inducibles par l'hypoxie pour l'inhibition de l'érythropoïétine dans les glioblastomes. Les macrophages sont génétiquement modifiés avec les constructions inducibles par l'hypoxie (A) permettant une surexpression de l'EPORT spécifique des conditions d'hypoxie (B). Ces macrophages modifiés sont ensuite injectés dans la circulation systémique (C) d'où ils migrent vers les régions hypoxiques de la tumeur et surexpriment l'EPORT qui agit en tant que dominant négatif par rapport à la forme entière exprimée par les cellules tumorales (D).

Dans un premier temps, l'effet d'une surexpression de l'EPORT a été testé sur des lignées cellulaires de GB afin de valider nos constructions moléculaires. Dans un deuxième temps, des constructions inducibles par l'hypoxie ont été mises au point. Elles ont d'abord été testées sur les lignées cellulaires de GB avant d'être utilisées sur des macrophages.

B. EXPRESSION DE L'EPORT INDUCIBLE PAR L'HYPOXIE

L'expression de l'EPO a tout d'abord été évaluée dans les lignées cellulaires issues de GB humains U87-MG et U251-MG. L'analyse de l'expression d'ARNm de l'EPO dans ces deux lignées cellulaires a montré que ces cellules ont un niveau d'expression basal de l'EPO. De manière intéressante, cette expression augmente lorsque les cellules sont cultivées 24h en hypoxie, de 46% et de 97% pour les cellules U251-MG et U87-MG respectivement (Figure 58). En accord avec les résultats de Pérès *et al.* (Pérès *et al.* 2011), les cellules U87-MG et U251-MG surexpriment l'EPO en hypoxie.

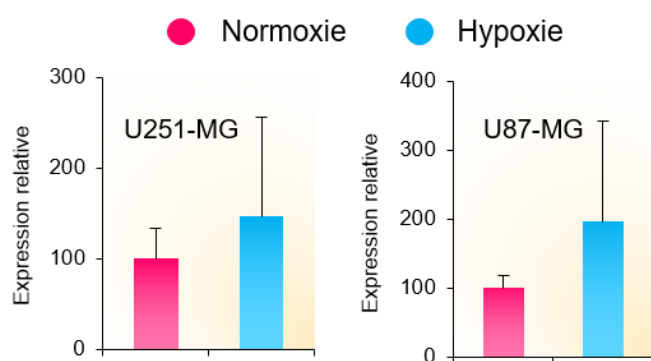


Figure 58 | Expression de l'érythropoïétine dans les cellules de gliomes U87-MG et U251-MG. Quantification par RT-qPCR de l'expression d'ARNm de l'EPO après 24h de culture en normoxie et en hypoxie dans des cellules de gliomes U87-MG et U251-MG. Moyenne \pm SD, N=3.

L'effet de l'inhibition de l'EPO sur des cellules de GB en situation d'hypoxie a ensuite été évalué. De manière intéressante, lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie en présence de récepteur soluble à l'EPO (sEPOR), la prolifération des cellules U251-MG et U87-MG est réduite de 23% et de 14% respectivement (**Figure 59A**).

Dans un deuxième temps, des constructions moléculaires permettant une expression de l'EPOR inductible par l'hypoxie ont été mises au point. Pour cela le gène de l'EPOR a été cloné dans un plasmide contenant un promoteur faible SV40 et 4 séquences HRE de réponse à l'hypoxie car permettant la fixation du facteur de transcription HIF (**Figure 59B**). Un témoin négatif ne contenant pas de séquences HRE ainsi qu'un témoin positif contenant un promoteur fort ont également été générés.

Des cellules U87-MG et U251-MG ont été transfectées de manière transitoire avec ces constructions et cultivées en normoxie ou en hypoxie (1% d'O₂) (**Figure 59C**). L'analyse de l'expression d'ARNm de l'EPOR par RT-qPCR montre qu'en condition de normoxie, les cellules transfectées avec le plasmide inductible expriment l'EPOR à un niveau similaire au témoin négatif. Le témoin positif exprime quant à lui de manière importante l'EPOR, plus de 35 fois le niveau du témoin négatif. En revanche, en condition d'hypoxie l'expression de l'EPOR dans les cellules U87-MG transfectées avec le plasmide inductible atteint le niveau du témoin positif alors que le niveau d'expression du témoin négatif reste équivalent à celui observé en normoxie. Ces résultats sont également observés pour les cellules U251-MG (6 fois plus d'expression en hypoxie) bien que l'expression n'atteigne pas le niveau du témoin positif en condition d'hypoxie (**Figure 59D**). De manière intéressante, lorsque les cellules sont cultivées en hypoxie, on retrouve un effet de la surexpression de l'EPOR sur la viabilité cellulaire avec une diminution de 16,4% pour le témoin positif. Une diminution comparable de la viabilité cellulaire est observée pour les cellules exprimant l'EPOR de manière inductible par l'hypoxie tandis qu'une diminution de seulement 2,4% est observée pour le témoin négatif (**Figure 59E**).

RESULTATS - Développement de constructions inducibles par l'hypoxie pour l'inhibition de l'érythropoïétine dans les glioblastomes

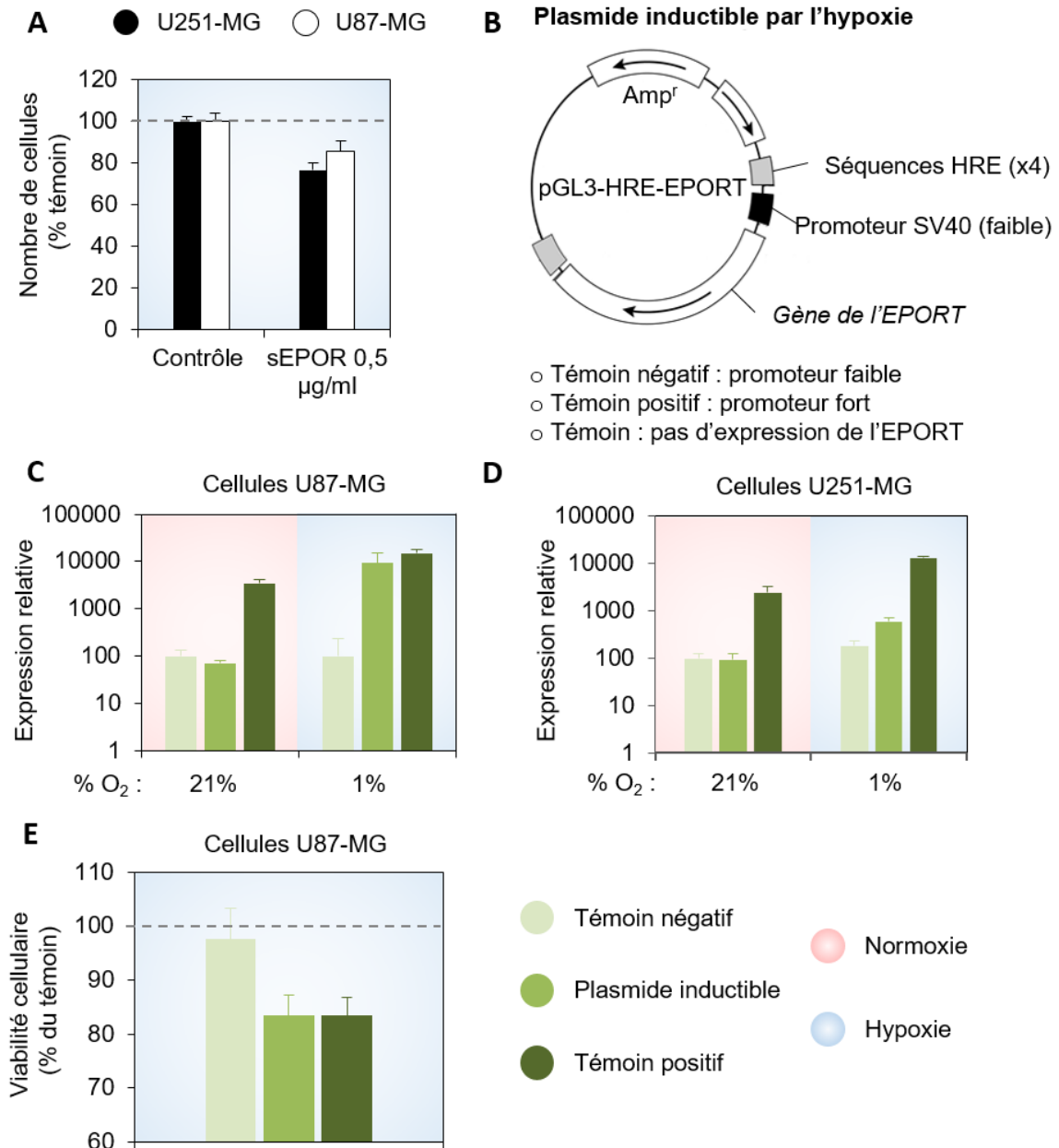


Figure 59 | Expression inducible par l'hypoxie du gène de l'EPO. **A.** Evaluation de la prolifération de cellules U87-MG et U251-MG en hypoxie en présence de récepteur soluble de l'EPO. Moyenne \pm SD, N=3. **B.** Schéma représentant la structure du plasmide pGL3-HRE-EPORT permettant l'expression inducible par l'hypoxie du gène de l'EPO. Des cellules U87-MG (**C**) et U251-MG (**D**) ont été transfectées avec ce plasmide pGL3-HRE-EPORT, son témoin négatif sans séquences HRE (pGL3-EPORT) ou son témoin positif contenant un promoteur constitutif (pSELECT-EPORT) puis cultivées en normoxie (21% O₂) ou en hypoxie (1% O₂). L'expression d'ARNm de l'EPO a été analysée par RT-qPCR. Moyenne \pm SD, N=3. **E.** Les cellules U87-MG transfectées ont été cultivées sous hypoxie (1% O₂) pendant 72h. La prolifération a été évaluée par test WST-1. Moyenne \pm SD, N=3.

Ces résultats permettent de valider la fonctionnalité des constructions inducibles par l'hypoxie. Le plasmide permet une surexpression de l'EPOR en condition d'hypoxie et celle-ci a un effet fonctionnel sur les cellules de GB *in vitro*. Par la suite, les expériences ont ainsi pu être conduites en utilisant cette fois-ci des macrophages, dans une logique de vectorisation de l'EPOR vers les cellules de GB.

C. VECTORISATION DE L'EPOR PAR LES MACROPHAGES

Des macrophages humains de la lignée THP1 ont été infectés par des lentivirus pour qu'ils surexpriment l'EPOR, sans spécificité vis-à-vis de l'hypoxie dans un premier temps. Des analyses en immunocytochimie ont permis de confirmer cette surexpression (**Figure 60A**). Ces macrophages ont été préalablement marqués au BrdU et injectés par voie intraveineuse chez des souris porteuses de GB. Les cerveaux des souris ont ensuite été prélevés et des coupes ont été analysées en microscopie à fluorescence après que les noyaux des cellules aient été marqués au Hoechst 33442. Les images acquises montrent qu'une partie des macrophages marqués a migré vers la tumeur (**Figure 60B**). Enfin, des souris porteuses de tumeurs U87 ou U251 ont subi deux injections de ces macrophages et la croissance tumorale a été suivie par IRM. Les résultats montrent que l'injection de macrophages surexprimant l'EPOR est efficace pour réduire la croissance tumorale du modèle de GB U251 de près de 50%, mais pas le modèle U87 (**Figure 60C**).

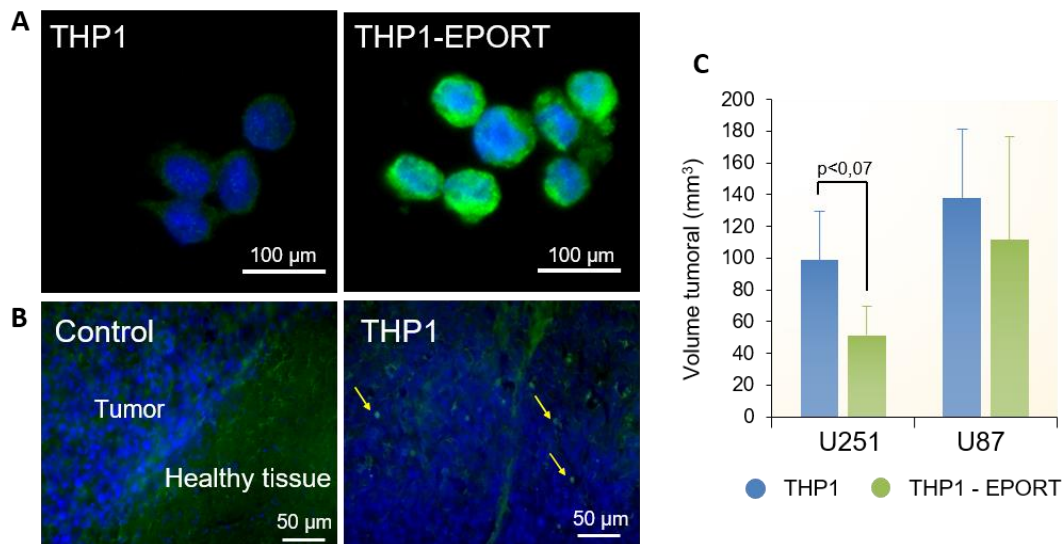


Figure 60 | Vectorisation de l'EPOR par des macrophages. **A.** Des macrophages humains de la lignée THP1 ont été infectés par des particules lentivirales vectrices du gène de l'EPOR. Marquage en Immunocytochimie de l'EPOR (vert) et des noyaux au Hoechst 33442 (bleu). **B.** Des cellules THP1 marquées au BrdU (vert) ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris porteuses de tumeurs U87. **C.** Des cellules THP1-EPOR ou THP1 témoin ont été injectées par voie intraveineuse chez des souris porteuses de tumeurs U87 et U251 à J21 et J28. La croissance

tumorale a été mesurée par IRM T2-w. Moyenne \pm SD, N=4. $p < 0,07$ après une ANOVA. Travaux de Master 2 du Dr. Aurélie Gérault.

Cependant dans ces expériences, il n'y a pas de spécificité d'expression de l'EPORT vis-à-vis de la tumeur. Des macrophages de la lignée humaine THP1 ont ainsi été transfectés avec les constructions moléculaires inducibles par l'hypoxie et placées en co-culture avec des cellules U251-MG *wild-type* (**Figure 61A**). En condition de normoxie, la présence de ces macrophages surexprimant l'EPORT pendant 72h permet une diminution du nombre de cellules U251-MG de près de 9 % seulement pour le témoin positif. Le témoin négatif et les macrophages exprimant l'EPORT de manière inducible par l'hypoxie n'ont pas d'influence sur le nombre de cellules U251-MG. En revanche lorsque la co-culture est réalisée en condition d'hypoxie, les macrophages exprimant l'EPORT de manière inducible permettent une diminution du nombre de cellules U251-MG comparable à celle obtenue avec le témoin positif, avec une diminution de 19 % (**Figure 61B**). Il est intéressant de noter que l'inhibition de l'EPO par l'EPORT est plus efficace pour réduire la prolifération cellulaire en condition d'hypoxie qu'en condition de normoxie lorsque l'on s'intéresse au témoin positif.

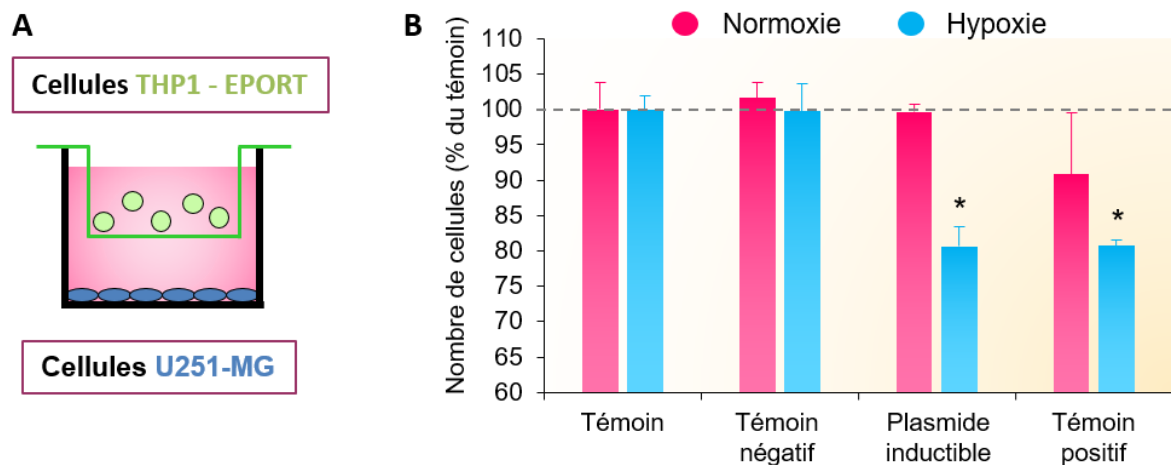


Figure 61 | Effet de la vectorisation de l'EPORT par des macrophages (THP1) sur la prolifération de cellules de gliome (U251-MG) *in vitro*. **A.** Schéma représentant la méthodologie employée pour la co-culture. Les cellules THP1 ont été transfectées avec le plasmide pGL3-HRE-EPORT, son témoin négatif sans séquences HRE (pGL3-EPORT) ou son témoin positif contenant un promoteur constitutif (pSELECT-EPORT) puis cultivées en normoxie ou en hypoxie (1% O₂) avec des cellules U251-MG. Après 72h de co-culture, les cellules THP1 ont été éliminées et les cellules U251-MG ont été dénombrées. **B.** Quantification de la viabilité cellulaire à l'issue de l'expérience. Moyenne \pm SD, N=3; (* $p < 0,0001$, test t de Student après une ANOVA significative).

Il semble donc que le plasmide inducible permet une expression fonctionnelle de l'EPORT par les macrophages spécifiquement en condition d'hypoxie et que celle-ci

permet une inhibition de l'EPO conduisant à un ralentissement de la prolifération des cellules tumorales *in vitro*.

D. CONCLUSIONS & DISCUSSION

Ces résultats confirment le rôle de la signalisation EPO/EPOR dans la prolifération des cellules de GB *in vitro*. En cela, ils corroborent les études qui ont montré le rôle majeur que pouvait jouer l'EPO dans la progression et la croissance des GB (Pérès *et al.* 2011; Mohyeldin *et al.* 2007; Hardee *et al.* 2006). Les résultats soulignent également l'intérêt de la surexpression de l'EPORT pour inhiber cette signalisation.

Cependant, cette approche utilisant l'EPORT en tant que récepteur dominant négatif souffre d'un manque de spécificité car elle nécessite une injection de macrophage par voie intraveineuse et il a été montré que des macrophages ainsi administrés se retrouvent, en plus du site tumoral, dans d'autres organes tels que le foie, les reins ou la rate qui participent à la synthèse d'EPO chez l'adulte (Valable *et al.* 2007). Les travaux présentés dans la deuxième sous-partie visent à trouver une stratégie permettant d'augmenter cette spécificité de l'inhibition de l'EPO vis-à-vis de la tumeur en utilisant son caractère hypoxique. C'est dans ce but qu'ont été développées les constructions inductibles par l'hypoxie présentées ci-dessus.

Le plasmide pGL3-HRE-EPORT s'est bien avéré inductible par l'hypoxie. On observe en effet une augmentation de l'expression du gène de l'EPORT pour des cellules transfectées avec ces plasmides par rapport aux témoins sans séquences HRE et ce, seulement en condition d'hypoxie. Ces résultats, qui restent à confirmer, sont en accord avec ceux observés par Muthana *et al.* et Kim *et al.* (Kim *et al.* 2014; Muthana *et al.* 2013), la présence de ces séquences dans les régions régulatrices des gènes permet de rendre leur expression spécifique des conditions d'hypoxie.

La transfection de cellules avec ce plasmide inductible et la mesure de la prolifération ont permis de montrer que l'induction de l'expression de l'EPORT par l'hypoxie se traduisait, *in vitro*, au niveau fonctionnel. Les résultats montrent que l'ajout de motifs HRE dans les séquences régulatrices des gènes permet de réduire la prolifération cellulaire par rapport au témoin sans motifs HRE en condition d'hypoxie. Il faut toutefois mentionner que l'effet observé *in vitro* sur la réduction de la prolifération demeure relativement faible.

In vivo, les premières expériences de vectorisation de l'EPORT par les macrophages ont été efficaces pour réduire la croissance du modèle de GB U251 mais pas pour le modèle U87. De manière intéressante, une étude en TEP [¹⁸F]-FMISO réalisée dans le

laboratoire a montré que ces deux modèles ne présentent pas le même statut hypoxique. Le modèle U87 est un modèle bien vascularisé et peu hypoxique en comparaison du modèle U251, moins bien vascularisé (Corroyer-Dulmont *et al.* 2013). De plus, une autre étude a montré que les macrophages sont retrouvés principalement dans les zones hypoxiques des tumeurs. Ces travaux ont ainsi montré qu'un nombre plus important de macrophages est retrouvé dans le modèle U251 en comparaison au modèle U87 (**Figure 62**) (Leblond *et al.* 2016).

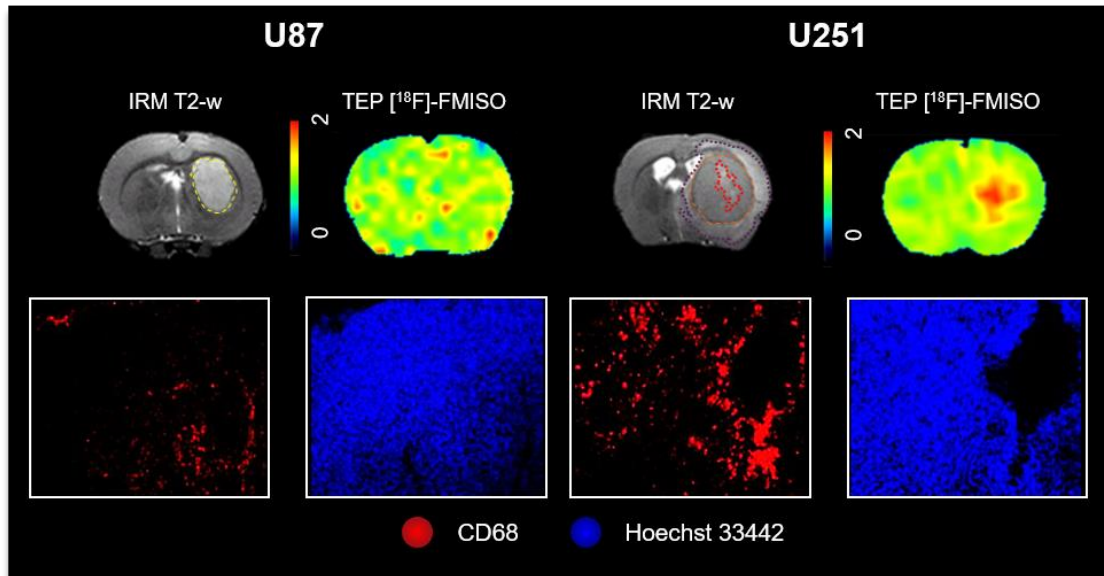


Figure 62 | Relation entre hypoxie et présence de macrophages dans les modèles de glioblastome U87 et U251. L'hypoxie est détectée par TEP [¹⁸F]-FMISO dans les deux modèles de glioblastome U87 et U251. La présence de macrophages, révélée par le marqueur CD68 en immunohistochimie, est plus importante dans le modèle U251 qui est le plus hypoxique. Adapté de Corroyer-Dulmont *et al.* 2013 et Leblond *et al.* 2016.

Ce tropisme plus important de la tumeur pour les macrophages lorsque celle-ci est hypoxique pourrait ainsi expliquer pourquoi la stratégie de vectorisation de l'EPORT par les macrophages est plus efficace pour réduire la croissance du modèle de tumeur U251.

Ces résultats sont extrêmement encourageants mais cependant, dans ces expériences, la surexpression de l'EPORT par les macrophages n'était pas spécifique de la tumeur. Le risque avec cette approche est donc d'inhiber de façon systémique la signalisation EPO/EPOR au risque de créer de graves anémies.

C'est pour améliorer la spécificité qu'ont été mises au point les constructions inductibles par l'hypoxie. La co-culture de macrophages transfectés avec ces constructions inductibles permet d'inhiber la prolifération des cellules de GB en condition d'hypoxie, de manière modérée toutefois. Ces résultats permettent d'envisager l'application de cette stratégie *in vivo* pour vectoriser de manière active l'EPORT sur le site tumoral. Cependant,

l'une des limites techniques de cette étude repose sur la modification du génome des macrophages qui doit être stable pour envisager une application *in vivo*, ce qui n'a pas été le cas ici lors des transfections qui n'étaient que transitoires et qui permettent d'avoir de grandes quantités de plasmides. Les macrophages sont particulièrement difficiles à transfecter, notamment les cultures primaires. La suite de cette étude repose donc probablement sur le développement d'autres stratégies de biologie moléculaire telle que l'infection lentivirale afin de pallier à la faible efficacité de transfection. Afin d'initier cette approche, une formation à la production de lentivirus a pu être mise en place en collaboration avec le laboratoire « Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire » (IMoPA) (UMR 7365, CNRS, Université de Lorraine) dans le but de développer cette méthodologie au sein de notre unité. Cependant, les constructions moléculaires qu'implique la combinaison de la production lentivirale avec la surexpression de l'EPORT inducible par l'hypoxie sont particulièrement difficiles à réaliser. De ce fait, cette approche en est encore au stade de mise au point à l'heure actuelle.

II. UTILISATION DE NANOVECTEURS DE THERAPIES GAZEUSES POUR REOXYGENER LES GLIOBLASTOMES

Nous venons de voir une stratégie de vectorisation active visant à inhiber un facteur de croissance induit par l'hypoxie. Cependant, bien qu'extrêmement attractives, ces stratégies nécessitant des modifications génétiques peuvent se heurter à des difficultés techniques pour une mise en place à l'échelle clinique. De plus, la tumeur se repose sur une multitude de facteurs pendant sa croissance. L'échappement des GB aux stratégies anti-angiogéniques ciblant le VEGF montre bien la capacité d'adaptation de la tumeur et la nécessité de ne pas se focaliser sur un seul facteur. C'est pourquoi il s'avère intéressant de développer en parallèle des stratégies agissant plus en amont dans le processus hypoxique, en s'attaquant aux causes, c'est-à-dire le manque d'oxygène, plutôt qu'aux conséquences. Cette deuxième partie des résultats est ainsi dédiée au développement d'une stratégie de vectorisation passive de **thérapies gazeuses basée sur des nanovecteurs pour réoxygéner spécifiquement les GB.**

Cette étude est divisée en trois parties. Premièrement nous avons sélectionné les nanozéolithes les plus appropriées pour cette application biomédicale. Nous avons vu en introduction qu'il existe une grande variété de structures au sein des zéolithes, leur conférant des propriétés différentes. Le choix s'est porté sur deux types de zéolithes, les zéolithes de type FAU et EMT. Ces zéolithes sont proches d'un point de vue structural, les zéolithes EMT étant la forme hexagonale des zéolithes FAU (**Figure 63**). En

concertation avec nos collaborateurs du Laboratoire Catalyse et Spectrochimie (UMR 6506), ce choix a été orienté à la fois par des questions de chimie, ces deux types de structures possédant un système de pores communiquant dans les trois dimensions, relativement larges en comparaison à d'autres matériaux microporeux. Cette propriété leur confère d'excellentes capacités d'adsorption et de sélectivité, notamment vis-à-vis des gaz (Ng *et al.* 2012; Lievens *et al.* 1992). D'autre part, elles ont également été sélectionnées pour leur taille nanométrique, aux alentours de 20 nm de diamètre, ce qui les rend potentiellement éligibles pour

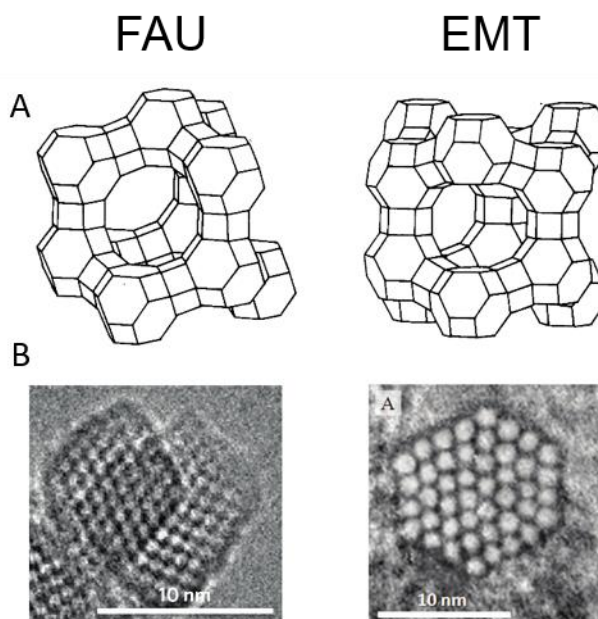


Figure 63 | Structure des zéolithes FAU et EMT. A. Structure topologique des zéolithes FAU et EMT. **B.** Images en microscopie électronique à transmission. Adapté de Lievens *et al.* 1992, Awala *et al.* 2015 et Ng *et al.* 2012.

bénéficier de l'effet EPR (Maeda *et al.* 2013). De plus, les modifications post-synthèses, notamment l'ajout de cations, permettent de créer un nombre considérable de types de zéolithes différents avec chacune des propriétés uniques (Pérez-Ramírez 2012).

Dans un premier temps, il était nécessaire d'éliminer les nanozéolithes modifiées pour augmenter leur affinité vis à vis des gaz d'intérêt mais qui risquaient de présenter une toxicité trop importante. Cette première partie des travaux a permis d'identifier des zéolithes contenant de l'argent comme étant extrêmement toxiques vis-à-vis des cellules eucaryotes. Cet aspect a fait l'objet d'une publication dans *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2017, Anfray C *et al.* (doi: 10.1021/acsami.7b00265).

Dans un deuxième temps, les capacités d'adsorption des gaz, notamment l'O₂ et le CO₂, ont été étudiées pour identifier les nanozéolithes permettant de transporter la plus grande quantité de gaz. Cet aspect a fait l'objet d'une publication dans *Microporous and Mesoporous Materials*, 2016, Georgieva V & Anfray C *et al.* (doi:10.1016/j.micromeso.2016.06.015).

Enfin les nanozéolithes les plus appropriées ont été utilisés dans un modèle de GB *in vivo*. Préalablement chargées en CO₂ ou en carbogène, ces zéolithes ont été injectées par voie intraveineuse et leur capacité à moduler le volume sanguin et à réoxygéner

spécifiquement le tissu tumoral a été évaluée par IRM. Ce travail fait l'objet d'un dépôt de brevet et une publication est en cours de finalisation (Anfray C *et al.*).

A. ETUDE DE LA TOXICITE DES NANOZEOLITHES

1. LES PARTICULES D'ARGENT LIBRES OU ENCAPSULEES DANS DES NANOZEOLITHES PRESENTENT UNE TOXICITE AIGÛE POUR LES CELLULES EUCARYOTES (ARTICLE 1)

La première partie de cette étude a consisté à sélectionner les nanozéolithes les plus adaptées vis-à-vis de la toxicité, notamment sur les cellules cérébrales saines et tumorales qui nous intéressent particulièrement. En effet, l'objectif étant de véhiculer des gaz, plusieurs expériences d'échange d'ions ont été réalisées avec des cations susceptibles d'augmenter l'affinité des zéolithes vis-à-vis de l'oxygène et/ou du CO₂. Au cours de ces tests, la toxicité de nanocristaux de type EMT contenant de l'argent a été évaluée. Nous avons vu en introduction que les Ag-NP, et notamment les zéolithes, possèdent des propriétés antibactériennes (Dong *et al.* 2014). Toutefois, il a été montré que ces NP pourraient être à l'origine d'effets délétères dans les poumons, le système cardiovasculaire et le SNC (Ge *et al.* 2014).

Cependant, jusqu'à présent, la toxicité des nanozéolithes contenant de l'argent n'avait jamais été évaluée sur des cellules eucaryotes. Les objectifs de cette étude ont donc été d'évaluer la toxicité de ces Ag-NP sur des cellules eucaryotes. Dans un premier temps, les zéolithes ont été caractérisées et la présence d'argent confirmée. Puis, leur toxicité a été évaluée à la fois sur des cellules procaryotes mais aussi sur des lignées cellulaires humaines et des cultures primaires de neurones et d'astrocytes murins.

Les résultats de cette étude montrent que les zéolithes de type EMT non modifiées ne présentent aucune toxicité sur les bactéries E. Coli, sur les cellules tumorales et sur les cultures primaires de neurones et d'astrocytes. Cependant, la présence d'argent, introduit dans les zéolithes par processus d'échange d'ions, induit une toxicité massive sur ces différents types cellulaires. Il apparaît également que, vis-à-vis des cellules, la forme cationique de l'argent (Ag⁺) est plus toxique que la forme réduite (Ag⁰).

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans *ACS Applied Materials & Interfaces* 2017, 9 (16), pp 13849–13854 ([doi: 10.1021/acsami.7b00265](https://doi.org/10.1021/acsami.7b00265)).

a) **Article 1**

**“Acute Toxicity of Silver Free and Encapsulated in Nanosized Zeolite for
Eukaryotic Cells”**

Clément Anfray, Biao Dong, Sarah Komaty, Svetlana Mintova, and Samuel Valable

ACS Applied Materials & Interfaces

2017

Acute Toxicity of Silver Free and Encapsulated in Nanosized Zeolite for Eukaryotic Cells

Clément Anfray,[†] Biao Dong,^{‡,§} Sarah Komaty,[‡] Svetlana Mintova,^{*,‡,§} and Samuel Valable^{*,†}

[†]ISTCT/CERVOxy Group, Normandy University, UNICAEN, CEA, CNRS, 14000 Caen, France

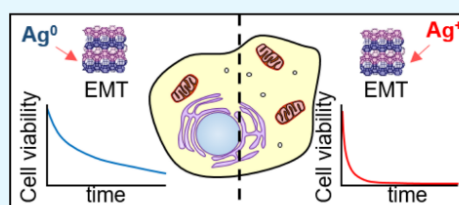
[‡]Laboratoire Catalyse et Spectrochimie (LCS), CNRS, ENSICAEN, Normandy University, 6 boulevard du Maréchal Juin, 14050 Caen, France

[§]State Key Laboratory on Integrated Optoelectronics, College of Electronic Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China

S Supporting Information

ABSTRACT: The potential toxicity of encapsulated silver in EMT-type nanosized zeolites on prokaryotic cells, human tumor cell lines from various origins, and primary cultures of neurons and astrocytes was investigated. Silver in cationic form (Ag^+) was encapsulated in EMT-type nanosized zeolites via an ion exchange process (Ag^+ -EMT) and compared with the reduced silver (Ag^0) in the zeolite (Ag^0 -EMT). As reference samples for the toxicity measurements, pure EMT-type zeolite and silver perchlorate were used. Cells were exposed to silver-containing zeolites (50, 100, and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 and 48 h. After exposure to Ag^+ -EMT (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h, a loss in cell viability independent of the cell type was observed, ranging from $-34.37 \pm 23.90\%$ for astrocytes to $-99.5 \pm 0.24\%$ for U87-MG cells. These results were comparable with the toxicity for silver perchlorate. The Ag^0 -EMT sample showed lower toxicity on human cell lines in comparison to that of Ag^+ -EMT. A decrease in cell viability, i.e., $-73.46 \pm 20.78\%$ and $-62.3 \pm 17.96\%$ for U87-MG and HEK 293 cells, respectively, under exposure only to high concentration of Ag^0 -EMT (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h was measured. However, the Ag^0 -EMT was as toxic as the Ag^+ -EMT for astrocytes and neurons ($-97.95 \pm 3.31\%$ and $-100 \pm 1.11\%$, respectively, after exposure to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h). No decrease in cell viability exposed to pure EMT zeolite was found. The results demonstrate the severe toxicity of silver cations, either free or encapsulated, in comparison to reduced silver encapsulated in zeolite nanocrystals. Therefore, silver cations, either free or encapsulated, must be used with great caution regarding their toxicity on eukaryotic cells.

KEYWORDS: silver cations, silver nanoparticles, zeolite, tumor cell, brain, toxicity



INTRODUCTION

Nanoparticles (NP) defined as objects ranging from 1 to 100 nm are being used for various applications from medical treatments to energy storage and daily life products.¹ Thanks to their antimicrobial properties, silver nanoparticles (SNP) are one of the most widely used because they have been proven to have excellent antimicrobial efficacy against bacteria, viruses, and other eukaryotic micro-organisms.^{2–4} In 2008, approximately 500 tons of silver in the form of silver ions, silver proteins, and colloids worldwide were produced.⁵ However, serious concerns have arisen because NP may be at the origin of adverse effects in pulmonary, cardiovascular, and central nervous systems.⁶

Concerning the effects on the central nervous system, SNP have demonstrated a huge, size-dependent cytotoxicity elicited by a strong oxidative stress on primary cultures of neurons and astrocytes.⁷ This vast toxicity has, interestingly, been proposed as an original cancer therapy for glioblastoma.⁸

At the cellular level, SNP have been described to interact with various intracellular cytosolic proteins to induce the expression of inflammatory mediators on cell lines of various origins, elicit calcium, or induce oxidative stress.⁹

Among NP, studies for biomedical applications have focused on zeolite nanocrystals, which possess exceptional sorption properties and the possibility to precisely control the synthesis process and thus predetermine their properties.¹⁰ Zeolites are crystalline inorganic microporous materials with unique framework structures consisting of interconnected channels and cages with variable sizes and shapes. Interest in zeolites for environmental and biological applications is constantly growing. Several studies report on the use of zeolites as a host for the encapsulation and delivery of anticancer drugs using, for instance, 5-fluorouracil,^{11,12} but also as a hemostatic agent to prevent uncontrolled bleeding after injuries.¹³ The development of these biomedical applications raises, however, the question of a potential toxicity of zeolites.

Recently, pure ultrasmall zeolites with EMT- and LTL-type structures, both with high alumina content and large pores (above 0.7 nm), showed no sign of toxicity on the cell.¹⁴ In addition to the unique properties of zeolites, the introduction

Received: January 6, 2017

Accepted: April 6, 2017

Published: April 6, 2017

of different cations and further stabilization of metal (Fe, Cu, Pd, Pt, etc.) and semiconducting (CdS, ZnS, PbS, etc.) clusters within the nanosized zeolites change their properties. As an example, the preparation of the EMT-type nanosized zeolite from organic template-free suspensions, followed by iron ion-exchange procedure directly in suspensions for brain applications was reported.¹⁵ The iron incorporated in the zeolite nanoparticles did not cause any cell toxicity for both tumor cell line and primary cell culture of astrocytes.

The high porosity, low Si/Al ratio, and high concentration of sodium of the EMT-type ultrasmall crystals also permitted the introduction of a high amount of silver.¹⁶ The antibacterial activity of the silver cations incorporated in the zeolites was discussed. The induced toxicity has been proposed via mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species release, and oxidative damage.⁸ Until now, the potential toxicity of silver-containing zeolites has never been investigated for eukaryotic cells.

The primary objective of this study was to assess the potential toxicity of encapsulated silver in nanosized zeolite crystals on tumor cell lines from various origins but also on primary cultures of neurons and astrocytes. Tumor cell lines as highly proliferating cells were used, while both neurons and astrocytes with almost no proliferation were used *in vitro*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Silver-Containing Nanosized Zeolite Crystals: Synthesis and Properties. EMT-type zeolite nanocrystals were prepared from organic template-free precursor mixture with a molar composition $5.15 \text{ SiO}_2 : 1 \text{ Al}_2\text{O}_3 : 18.45 \text{ Na}_2\text{O} : 240.3 \text{ H}_2\text{O}$; the precursor mixture was aged for 14 h at room temperature prior hydrothermal treatment at 38°C for 36 h in a conventional oven.¹⁷ The EMT-type zeolite nanocrystals with a diameter of 10–20 nm were stabilized in water suspensions (sample EMT, solid concentration of 2 wt %). The encapsulation of silver in the EMT-type zeolite was performed via ion exchange in aqueous medium to avoid agglomeration. The ion-exchange process was performed as follows: 20 mL of silver perchlorate solutions with a concentration of 0.05 M were added to EMT zeolite suspensions (7.5 wt %, 12 mL) and kept for 4 h, followed by purification using a high-speed centrifugation and finally redispersion in water (sample Ag^+ -EMT). The reduction of silver cations (Ag^+) to silver nanoparticles (Ag^0) in the EMT zeolite suspensions (2 wt %, 7 mL) were obtained under microwave reduction (120°C , 10 min, 1000 W) in the presence of a triethylamine ($\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$, 2 mL) as a reducing agent. The reduced suspensions were additionally purified and dispersed in water. The silver-containing zeolite suspensions before and after reduction were abbreviated as Ag^+ -EMT and Ag^0 -EMT, correspondingly.

The crystalline structure of nanosized zeolite was confirmed by recording the powder X-ray diffraction (XRD) patterns using a PANalytical X'Pert Pro diffractometer with $\text{Cu K}\alpha$ monochromatized radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). The crystal size, morphology, and crystallinity of solids were determined by a transmission electron microscopy (TEM) using a Titan 80–300 operating at 300 kV. Energy dispersive spectrometry (EDS) coupled with microscopy was used to characterize the chemical composition of the EMT zeolite nanocrystals. In addition, the chemical composition of the zeolites was determined by inductively coupled plasma (ICP) optical emission spectroscopy using a Varian ICP-OES 720-ES.

Cell Lines. A human glioblastoma cell line, U87-MG, purchased from American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, United States) and HEK 293 cells (Human Embryonic Kidney cells) were used. Cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich), and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). Cells were seeded in 24-well plates at a concentration of

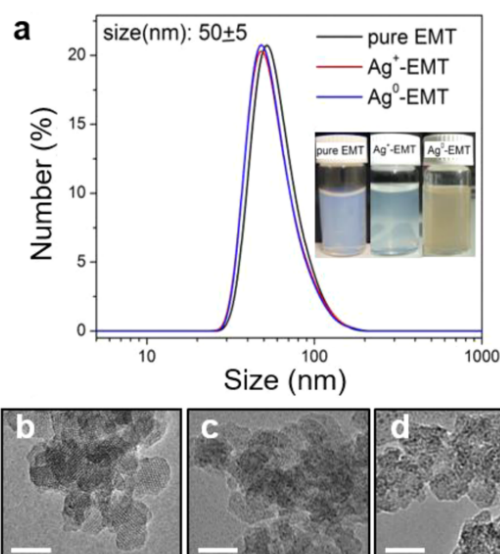


Figure 1. (a) Dynamic light scattering (DLS) curves of pure EMT, Ag^+ -EMT, and Ag^0 -EMT suspensions. Inset: photographs of the 3 suspensions with solid concentration of 7.5 wt %. TEM pictures of (b) pure EMT, (c) Ag^+ -EMT, and (d) Ag^0 -EMT samples. Scale bar = 20 nm.

Table 1. ICP Results of Silver-Containing EMT Zeolite Samples

sample	Ag (wt %)	Si (wt %)	Al (wt %)	Na (wt %)
pure EMT	0	13.4	11.9	12.1
Ag^+ -EMT	9.0	15.0	12.9	7.5
Ag^0 -EMT	9.0	14.3	12.9	7.5

5×10^4 cells/mL and maintained in culture at 37°C with 5% CO_2 and 95% humidity.

Ethical Approval and Animal Issues. Animal investigations were performed under the current European directive (2010/63/EU) as incorporated in national legislation and in authorized laboratories (B14118001). Ethical approval was sought and obtained by the principal investigators (C.A. and S.V.) from the French Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche (study authorization: N/04-01-13/04/01-16). The animals were obtained from an in-house breeding stock at the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB, A14118015).

Primary Culture of Astrocytes. Cerebral cortices were isolated from neonatal (1–3 day old) mice (Swiss, CURB) carefully stripped of the meninges and dissociated to generate a single-cell suspension as described.¹⁸ Cultures were allowed to grow in a humidified 5% CO_2 incubator at 37°C to confluence (15–20 days) prior to use in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio), 10% horse serum (Eurobio), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich), and 100 U/mL penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). At about 80% confluence, the growth medium was replaced by the same medium.

Primary Cultures of Cortical Neurons/Astrocytes. Cultures were prepared from E15–E16 mouse embryos (Swiss mice, CURB). Microdissection of cortices was followed by a dissociation of the tissue in DMEM at 37°C (Sigma-Aldrich). Cells grew on plates coated with poly D-lysine (0.1 mg/mL) and laminin (0.02 mg/mL) in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 5% horse serum (Eurobio), and 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich). Cells were maintained in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C . Neurons/astrocytes were used after 12 d *in vitro*.

Cell Treatment. Suspensions of pure EMT, Ag^+ -EMT, Ag^0 -EMT, and silver perchlorate were diluted in culture medium to obtain concentrations of 50, 100, or 400 $\mu\text{g/mL}$. Cells were exposed to these suspensions for 24 and 48 h.

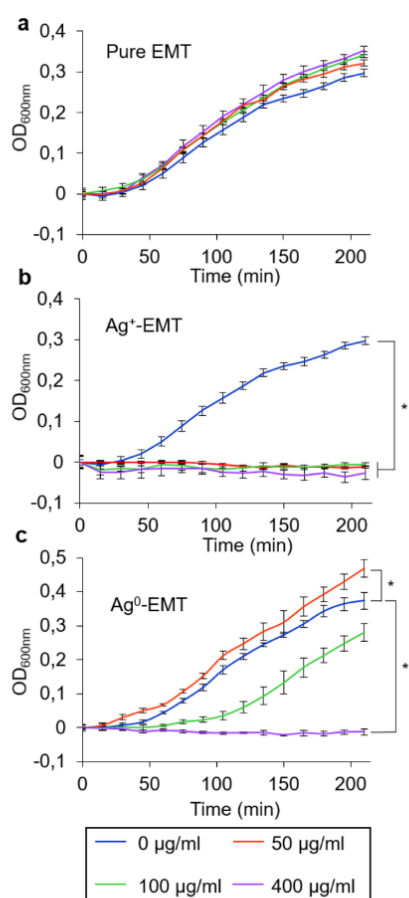


Figure 2. Growth quantification of bacteria exposed to various concentrations of (a) pure EMT, (b) Ag⁺-EMT, and (c) Ag⁰-EMT samples for 3.5 h. Bacterial growth was assessed by measuring the OD₆₀₀. Mean ± SD, *n* = 3; HSD Tukey posthoc test after a significant ANOVA (**p* < 0.0001 vs control group).

Cell Viability. Cell viability was analyzed for 24 or 48 h following exposure to zeolites with the WST-1 assay (Roche) according to the manufacturer's instructions.

Bacterial Culture. Frozen glycerol stock (−80 °C) of *Escherichia coli* was inoculated in a 15 mL tube containing 10 mL of liquid LB culture medium (Sigma-Aldrich) grown overnight on a rotating shaker (220 rpm) at 37 °C. The culture was transferred into fresh LB medium containing 50, 100, or 400 µg/mL zeolites to obtain 5% solutions (v/v) of the overnight culture. These solutions were distributed in a 96-well plate (300 µL per well) and incubated at 37 °C under constant shaking (220 rpm) during the time of the experiment. Bacterial growth was assessed by measuring the OD₆₀₀ every 15 min for 3.5 h using a spectrophotometer (Asys UVM 340, Biochrom Ltd.). Blank wells contained the fresh LB medium with zeolites.

Time Lapse Microscopy. The experiments were conducted on U87-MG cells. 24 h after seeding, 20 mM of HEPES buffer (Sigma-Aldrich) was added into the wells, and 2h later cells were exposed to 25 µg/mL of Ag⁺-EMT or Ag⁰-EMT; water was used as a control sample. The acquisition started immediately after exposure to zeolites. Time-lapse images were obtained for 2h, every minute an image was taken with a Leica DMi8 videomicroscope equipped with an i8 Incubator (Pecon).

Statistical Analyses. Data were presented as mean ± SD. Statistical analyses were obtained with JMP programs (SAS Institute) and detailed on each caption.

RESULTS AND DISCUSSION

General Characteristics of Silver-Containing Nano-sized EMT-type Zeolite. Pure EMT and silver-containing

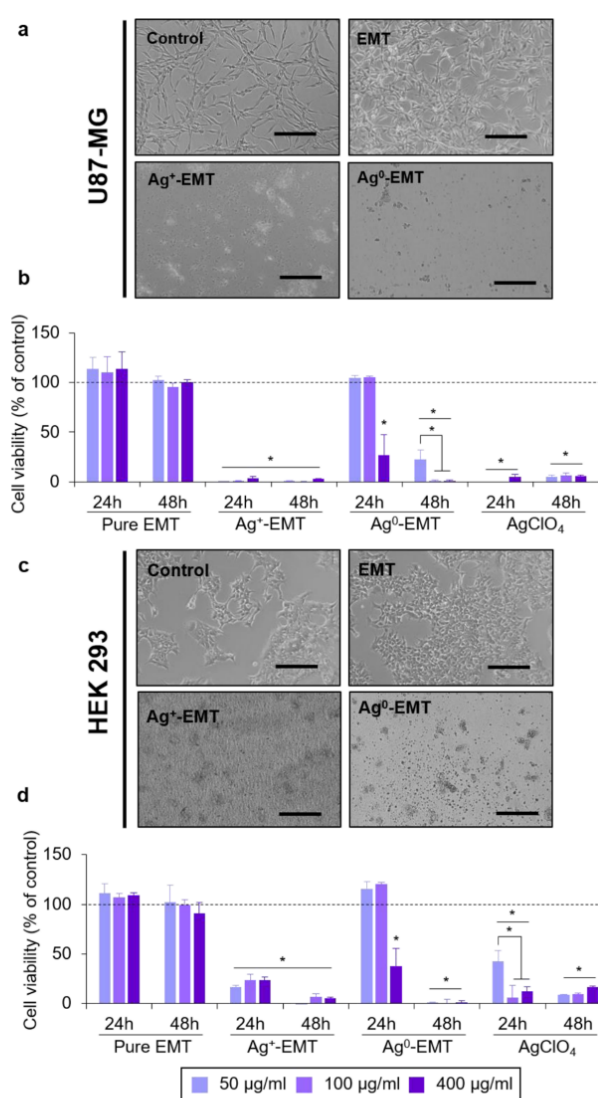


Figure 3. (a) Representative photographs (phase contrast) of U87-MG cells following a 48 h exposure to 400 µg/mL of zeolites. Scale bar = 200 µm. (b) Quantification of U87-MG cell viability exposed to increasing concentrations of pure EMT, Ag⁺-EMT, Ag⁰-EMT, and silver perchlorate (AgClO₄) for 24 and 48 h. (c) Representative photographs (phase contrast) of HEK 293 cells exposed to 400 µg/mL of zeolites for 48 h. Scale bar = 200 µm. (d) Quantification of HEK 293 cell viability exposed to increasing concentrations of pure EMT, Ag⁺-EMT, Ag⁰-EMT, and silver perchlorate (AgClO₄) for 24 and 48 h. Cell viability was analyzed using the WST-1 test. Mean ± SD, *n* = 3; two-way ANOVA (**p* < 0.0001 (vs control group when unspecified)).

zeolite samples (Ag⁺-EMT and Ag⁰-EMT) are highly stable in water suspensions at ambient conditions for two years. Pictures of suspensions containing pure EMT and silver-containing zeolites with a concentration of 2 wt % are presented in Figure 1. As can be seen, the suspensions have colloidal appearance with no sedimentation, and a slight color change from white to yellow and gray is observed for pure EMT, Ag⁺-EMT, and Ag⁰-EMT, respectively. The particle size distribution curves of the three suspensions are similar, and only one peak centered at 50 nm is present (Figure 1a). The chemical compositions of the samples are summarized in Table 1. The silver concentration for the sample subjected to ion exchange is 9 wt % according to the ICP analysis. The same chemical composition is measured for

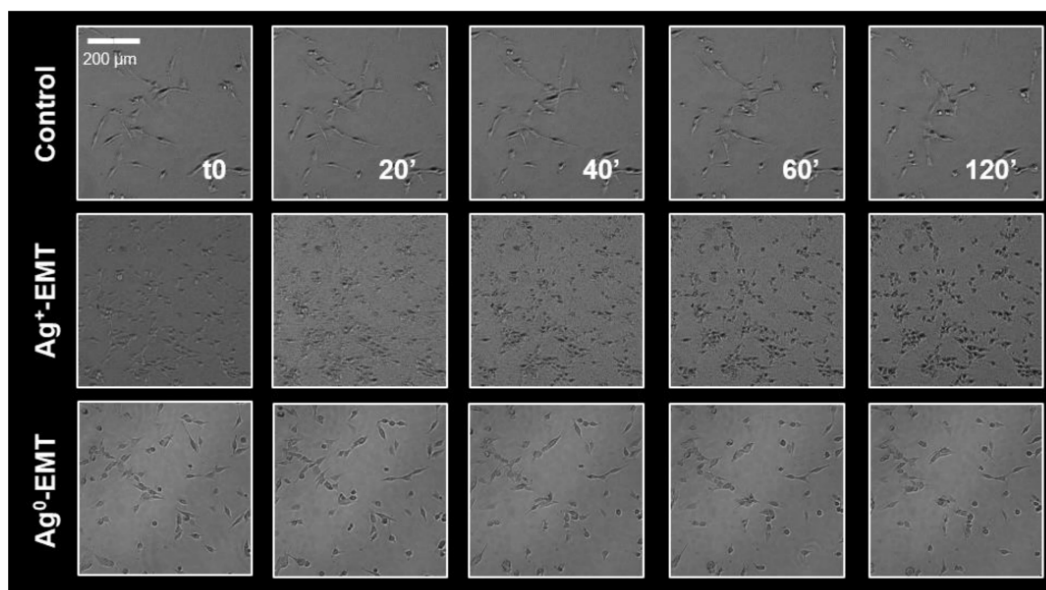


Figure 4. Time lapse of U87-MG cells exposed to Ag^+ -EMT and Ag^0 -EMT ($25 \mu\text{g/mL}$) compared to that of water (control sample) for 2h.

the reduced sample (Ag^0 -EMT). The high crystallinity of the ion-exchanged and reduced samples is confirmed by recording the XRD patterns. Only the Bragg peaks corresponding to the EMT-type zeolite are present, and no signature for silver oxides was observed.

The morphology and size of the zeolite crystals do not change under ion exchange and reduction in the suspensions. The highly crystalline EMT zeolite nanoparticles preserve their identity; no agglomeration and amorphization are observed after encapsulation of silver (Figure 1b). The presence of silver nanoparticles is clearly seen in the TEM pictures; the black spots correspond to silver encapsulated in the sodalite cages of the EMT zeolite. The presence of silver in the zeolite nanocrystals is also confirmed by EDS, and the results are consistent with the ICP (Supporting Information, Figure S1). The dispersion of the silver nanoparticles is homogeneous. The color change of the Ag^0 -EMT suspension is the first evidence for the presence of silver nanoparticles encapsulated in the zeolite crystals, and this color is preserved, thus confirming the high crystallinity of the samples (Figure 1a, inset).

Antibacterial Properties of Silver-Containing Nanosized EMT-type Zeolite. *E. coli* growth was unaffected by the presence of pure EMT zeolite independently on concentrations used (Figure 2a). In contrast, a very acute toxicity toward *E. coli* cells exposed to Ag^+ -EMT was observed. Indeed, bacteria were unable to grow in the medium containing Ag^+ -EMT, even at the lowest concentration used ($50 \mu\text{g/mL}$) (Figure 2b). The Ag^0 -EMT sample was found to be significantly less toxic. Losses of *E. coli* cell growth of 20.2 and 40.2% for Ag^0 -EMT with concentrations of 50 and $100 \mu\text{g/mL}$, respectively, in comparison to the control sample were obtained. However, at a high concentration of Ag^0 -EMT ($400 \mu\text{g/mL}$), bacteria were also unable to grow (Figure 2c). These results confirm the antibacterial efficacy of silver-containing EMT zeolites toward *E. coli*, as previously reported.¹⁶ In the current experiment, the cationic silver (Ag^+ -EMT) was more toxic than the reduced silver (Ag^0 -EMT), as expected.

Acute Toxicity of Silver-Containing EMT Nanosized Zeolites for Human Cells. As shown in Figures 3a and b,

U87-MG cell viability was not affected by exposure to pure EMT zeolite nanocrystals after 24 or 48 h as compared to the control sample. The Ag^+ -EMT sample was extremely toxic to the cells. No viable cells after exposure to the Ag^+ -EMT sample (24–48 h) with any concentration were detected. Exactly the same effect for pure silver perchlorate (Figure 3b, AgClO_4) was observed, supporting the idea that this acute toxicity is due to the silver and not to the zeolite or the association between zeolite and silver.

Interestingly, no decrease in cell viability after exposure to Ag^0 -EMT with concentrations of 50 and $100 \mu\text{g/mL}$ for 24 h was observed (Figure 3b). A decrease in cell viability was seen only at a high amount of Ag^0 -EMT ($400 \mu\text{g/mL}$) with a loss of $73.5 \pm 20.51\%$ compared to that of the control. However, after 48 h, a dramatic loss in cell viability was observed. No viable cells at concentrations of 100 and $400 \mu\text{g/mL}$ were detected, and a decrease of $78 \pm 9.22\%$ in cell viability for $50 \mu\text{g/mL}$ was observed.

A similar profile for HEK 293 cells was observed (Figures 3c and d). While HEK 293 cells exposed to pure EMT zeolite were unaffected, a significant loss in cell viability (more than 80%) after exposure to Ag^+ -EMT (50 – $400 \mu\text{g/mL}$) for 24 or 48 h was detected (Figure 3d). The same result for pure silver perchlorate was obtained. It may be noted that HEK 293 cells were more resistant to the Ag^+ -EMT. The cell viability decreased by 83.64 ± 2.31 , 76.22 ± 6.09 , and $76.04 \pm 3.02\%$ after exposure to 50, 100, and $400 \mu\text{g/mL}$ of Ag^+ -EMT for 24 h, respectively, and by $57.19 \pm 10.77\%$ after exposure to $50 \mu\text{g/mL}$ silver perchlorate for 24 h.

The toxicity of the Ag^0 -EMT was evident after long exposure time (Figure 3d). A decrease in cell viability at high concentration of Ag^0 -EMT ($400 \mu\text{g/mL}$) after 24 h was measured. A loss of $62.3 \pm 17.96\%$ in the cell viability in the presence of the Ag^0 -EMT in comparison to the control sample was measured. However, after 48 h, a dramatic loss in cell viability was observed.

To better characterize the kinetics standing behind this acute toxic effect, a time-lapse experiment was conducted. U87-MG cells were exposed to Ag^+ -EMT or Ag^0 -EMT ($25 \mu\text{g/mL}$) for 2 h, and images were acquired every minute. While control cells

kept a classic morphology and activity during the time of the experiment, the cells exposed to Ag^+ -EMT began to die after 20 min. After 40 min, no viable cells remained, showing the extreme toxicity of the Ag^+ -EMT zeolites. After exposure to Ag^0 -EMT, the majority of the cells kept a classic morphology, but some adopted a round morphology typical of dying cells, which is not seen in the control sample (Figure 4, see Supporting Information Video).

These results show the toxicity of silver-containing zeolites for highly proliferating cells in vitro. With these experiments, we confirm that the reduced silver (Ag^0) is less toxic than the ionic silver (Ag^+). Interestingly, the effect was independent of cellular origin because cell lines originating from the brain or kidney were equally sensitive to the presence of SNPs. Given the lower stability of ionic silver in the zeolite nanocrystals (Ag^+ -EMT) compared to that in reduced silver (Ag^0 -EMT), the difference in toxicity may be due to a partial release of free Ag^+ from the zeolite structure, resulting in a severe toxicity similar to that observed for pure silver perchlorate.

Acute Toxicity of Silver-Containing Zeolite Nanoparticles toward Primary Cultures of Mouse Brain Cells.

Several studies showed that nanoparticles with sizes between 1 and 100 nm can cross the blood brain barrier and therefore be retrieved in the brain. Therefore, the effects of silver-containing nanosized zeolites on two cell types originating from the brain, namely neurons and astrocytes, were investigated; these cell cultures were carefully characterized.¹⁸ Relative to bacteria and tumor cell lines, these cells show almost no proliferation in vitro.

An acute toxic effect for both cells types was observed (Figure 5). It is interesting to note that astrocytes appeared to be more resistant to Ag^+ -EMT at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with a decrease in cell viability of 34.37 ± 23.90 and $58.32 \pm 19.08\%$ after 24 and 48 h, respectively (Figures 5a and b). For neurons, no viable cells were detected regardless of the concentration of Ag^+ -EMT used (Figures 5a, and c).

Unlike human cell lines, the Ag^0 -EMT (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h) was toxic for primary culture of astrocytes and neurons. For both cells types, a dramatic loss in cell viability of 97.95 ± 3.31 and $100 \pm 1.11\%$ for astrocytes and neurons, respectively, was observed. The same results were obtained for higher concentrations and longer exposure time to Ag^0 -EMT.

These results also demonstrate a toxicity of silver-containing zeolites for nonproliferating eukaryotic cells. They are in line with Haase et al.⁷ who already published results on neurons and astrocytes with other SNPs. In their study, however, astrocytes were more sensitive than neurons to the presence of SNPs, while in our experiments, no neurons were alive even with the lowest concentration used (i.e., 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). This difference can be due to various intracellular localization or various induced side effects, as reported before.¹⁹ In the current experiments, cells derived from mice were used, while cells from rats were tested before.¹⁴ Indeed, our results agree with the previous findings, i.e., a huge toxicity was elicited by SNP independent of the cell proliferation rates because both glioblastomas (transformed astrocytes with elevated proliferation) and primary astrocytes were sensitive to the SNPs. These results suggest that membrane turnover or the cytoskeleton were not the main targets of SNP but rather intracellular processes such as calcium waves or reactive oxygen species may be involved, as suggested by Haase et al.⁷

CONCLUSION

The results provide clear evidence for a severe toxicity of cationic silver encapsulated in zeolite nanoparticles for

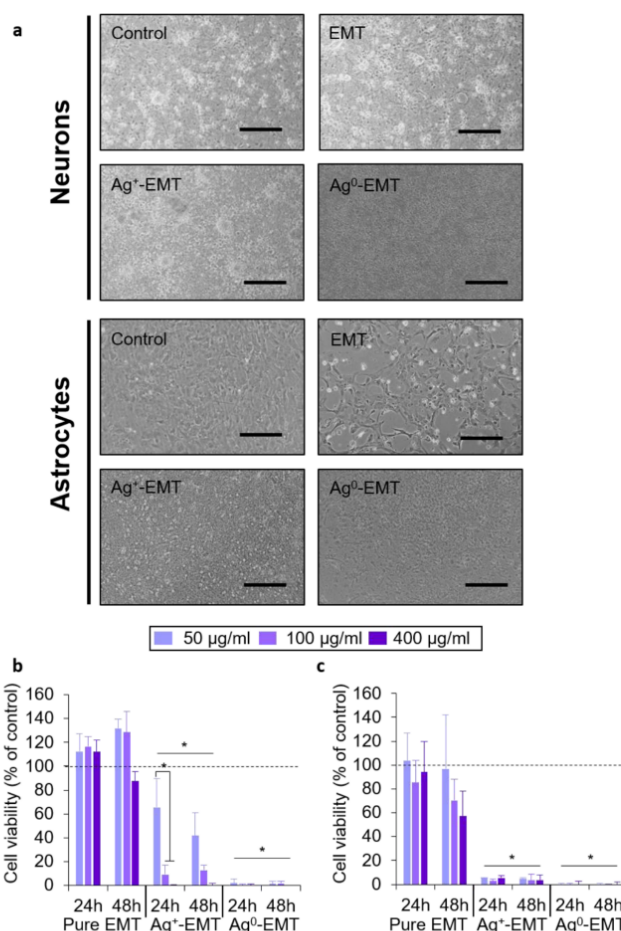


Figure 5. (a) Representative photographs (phase contrast) of astrocytes and neurons/astrocytes exposed to pure EMT, Ag^+ -EMT, and Ag^0 -EMT (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h. Scale bar = 200 μm . Quantification of (b) astrocytes and (c) neurons/astrocyte viability exposed to pure EMT, Ag^+ -EMT, and Ag^0 -EMT zeolites (50, 100, or 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after 24 and 48 h. Cell viability was analyzed using the WST-1 test. Mean \pm SD, $n = 3$ per condition. Two-way ANOVA ($*p < 0.0001$ group effect). Cell viability was analyzed using the WST-1 test. Mean \pm SD, $n = 3$; HSD Tukey posthoc test after a significant two-way ANOVA ($*p < 0.0001$ vs control group and dose effects).

eukaryotic cells. The toxicity of the silver for eukaryotic cells as an original cancer therapy for glioblastoma was considered before. However, this study shows that the severe toxicity of the cationic silver is independent of the cell type, origin, and proliferation. A lower toxicity of the reduced silver (Ag^0 -EMT) in comparison to the cationic silver (Ag^+ -EMT) encapsulated in zeolite nanoparticles on prokaryotic and human cells was measured. The encapsulated reduced silver (Ag^0) in the zeolite has lower toxicity in comparison to that of the freestanding silver in water solution. Therefore, cationic silver with vast toxicity for eukaryotic cells as a cancer therapy and as antibacterial material must be used with great caution.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acsami.7b00265.

Experimental procedures for ICP-AES analysis and Figure S1, EDS spectrum of Ag^+ -EMT (PDF)

Time lapse of U87-MG cells exposed to Ag⁺-EMT and Ag⁰-EMT nanosized zeolites (AVI)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: svetlana.mintova@ensicaen.fr.

*E-mail: valable@cyceron.fr.

ORCID

Clément Anfray: 0000-0002-7118-974X

Svetlana Mintova: 0000-0002-0738-5244

Funding

This study was supported by the Conseil Régional de Basse-Normandie (Projet Emergence ZEOXY), the European Union-Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), and by the Fédération pour la Recherche sur le Cerveau par l'opération Rotary (Espoir en tête) (FRC).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ABBREVIATIONS

NP, nanoparticles

SNP, silver NP

DLS, dynamic light scattering

TEM, transmission electron microscopy

REFERENCES

- (1) Zazo, H.; Colino, C. I.; Lanao, J. M. Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *J. Controlled Release* **2016**, *224*, 86–102.
- (2) Chinnammal Janaki, A.; Sailatha, E.; Gunasekaran, S.; Sekar, T.; Gopalakrishnan, M. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of Ag nanoparticles. *IJASTEMS-ISSN* **2016**, *2*, 10–17.
- (3) Jegatha Christy, A.; Kevin, A.; Nehru, L. C.; Umadevi, M. Optical, structural and morphological properties of silver nanoparticles and their antimicrobial activity. *Int. J. ChemTech Res.* **2014**, *7*, 1191–1197.
- (4) Savithramma, N.; Linga Rao, M.; Rukmini, K.; Suvarnalatha devi, P. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by using medicinal plants. *Int. J. Chem.Tech Res.* **2011**, *3*, 1394–1402.
- (5) Gaffet, E. Nanomaterials: a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development. *C. R. Phys.* **2011**, *12*, 648.
- (6) Ge, L.; Li, Q.; Wang, M.; Ouyang, J.; Li, X.; Xing, M. M. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 2399–2407.
- (7) Haase, A.; Rott, S.; Manton, A.; Graf, P.; Plendl, J.; Thünemann, A. F.; Meier, W. P.; Taubert, A.; Luch, A.; Reiser, G. Effects of Silver Nanoparticles on primary mixed neural cell cultures: uptake, oxidative stress and acute calcium responses. *Toxicol. Sci.* **2012**, *126*, 457–468.
- (8) AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveettil, S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279–290.
- (9) Asharani, P.; Sethu, S.; Lim, H. K.; Balaji, G.; Valiyaveettil, S.; Hande, M. P. Differential regulation of intracellular factors mediating cell cycle, DNA repair and inflammation following exposure to silver nanoparticles in human cells. *Genome Integr.* **2012**, *3*, 2.
- (10) Mintova, S.; Gilson, J. P.; Valtchev, V. Advances in nanosized zeolites. *Nanoscale* **2013**, *5*, 6693–6703.
- (11) Spanakis, M.; Bouropoulos, N.; Theodoropoulos, D.; Sygellou, L.; Ewart, S.; Moschovi, A. M.; Siokou, A.; Niopas, I.; Kachrimanis, K.; Nikolakis, V.; Cox, P. A.; Vizirianakis, I. S.; Fatouros, D. G. Controlled release of 5-fluorouracil from microporous zeolites. *Nanomedicine* **2014**, *10*, 197–205.
- (12) Vilaça, N.; Amorim, R.; Machado, A. F.; Parpot, P.; Pereira, M. F.; Sardo, M.; Rocha, J.; Fonseca, A. M.; Neves, I. C.; Baltazar, F. Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for *in vitro* models of colorectal carcinoma. *Colloids Surf, B* **2013**, *112*, 237–244.
- (13) Neidrauer, M.; Ercan, U. K.; Bhattacharyya, A.; Samuels, J.; Sedlak, J.; Trikha, R.; Barbee, K. A.; Weingarten, M. S.; Joshi, S. G. Antimicrobial efficacy and wound-healing property of a topical ointment containing nitric-oxide-loaded zeolites. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 203–209.
- (14) Laurent, S.; Ng, E. P.; Thirifays, C.; Lakiss, L.; Goupil, G. M.; Mintova, S.; Burtea, C.; Oveisi, E.; Hébert, C.; de Vries, M.; Motazacker, M. M.; Rezaee, F.; Mahmoudi, M. Corona protein composition and cytotoxicity evaluation of ultra-small zeolites synthesized from template free precursor suspensions. *Toxicol. Res.* **2013**, *2*, 270–279.
- (15) Georgieva, V.; Anfray, C.; Retoux, R.; Valtchev, V.; Valable, S.; Mintova, S. Iron loaded EMT nanosized zeolite with high affinity towards CO₂ and NO. *Microporous Mesoporous Mater.* **2016**, *232*, 256–263.
- (16) Dong, B.; Belkhair, S.; Zaarour, M.; Fisher, L.; Verran, J.; Tosheva, L.; Retoux, R.; Gilson, J. P.; Mintova, S. Silver confined within zeolite EMT nanoparticles: preparation and antibacterial properties. *Nanoscale* **2014**, *6*, 10859–10864.
- (17) Ng, E. P.; Chateigner, D.; Bein, T.; Valtchev, V.; Mintova, S. Capturing ultrasmall EMT zeolite from template-free systems. *Science* **2012**, *335*, 70–73.
- (18) Valable, S.; Bellail, A.; Lesné, S.; Liot, G.; MacKenzie, E. T.; Vivien, D.; Bernaudin, M.; Petit, E. Angiotensin-1-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation prevents neuronal apoptosis. *FASEB J.* **2003**, *17*, 443.
- (19) Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *J. Nanobiotechnol.* **2014**, *12*, 5.

b) Informations supplémentaires de l'article 1

Experimental procedures

ICP-AES analysis: Samples for ICP were prepared by dissolving 50 mg of zeolite powder in 0.5 mL of solution consisting (HNO₃ (65%)/HCl (37%) = 1:3) and 3 mL of hydrofluoric acid (HF ≤ 40 %). The solution was then heated at 110 °C for one hour and cooled down to room temperature. Then 2.8 g of boric acid (H₃BO₃, 99.8%) and deionized water (10 mL) were added. Each sample was measured two times, and a reference sample (commercial FAU-type zeolite) with known chemical composition was measured in order to fulfill the QA/QC requirements. The standard deviation of the ICP results was 1%.

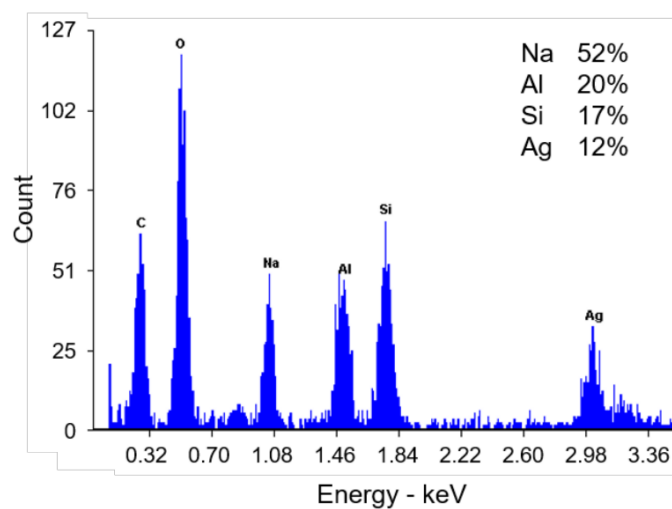


Figure S1. EDS spectrum of Ag-EMT.

2. ETUDE DE LA TOXICITE DES ZEOLITHES DE TYPE FAU

Il a été vu en introduction que différents cations peuvent être ajoutés aux zéolithes par un processus d'échange d'ions. Les résultats ayant fait l'objet de la publication montrent que c'est l'ajout d'ions argent dans la structure qui confère aux zéolithes Ag-EMT leurs propriétés anti-bactériennes ainsi que leur caractère toxique vis-à-vis des cellules eucaryotes. En revanche, les zéolithes non modifiées ne semblent pas posséder ces propriétés de toxicité aux concentrations étudiées.

La multitude de structures de zéolithes existantes et la possibilité de modifier la composition en cation de chacune d'elles permet d'obtenir une diversité extrêmement importante de types de zéolithes. Au vu de la toxicité observée avec les zéolithes contenant de l'argent, il est intéressant d'évaluer la toxicité de divers types de zéolithes afin de sélectionner ceux qui seraient utilisables pour des applications biomédicales. Une étude de toxicité vis-à-vis des cellules procaryotes et eucaryotes a ainsi été réalisée avec d'autres types de zéolithe. La toxicité de zéolithes de type Faujasite (FAU) contenant différents cations (Na, qui correspond à la forme native, Ce, F, Gd, Fe et Li) a été évaluée. Le choix des cations a été à nouveau établi en concertation avec nos collaborateurs du Laboratoire Catalyse et Spectrochimie en fonction de critères physico-chimiques. Certains cations pouvant théoriquement améliorer les capacités de sorption des zéolithes vis-à-vis des gaz (Ce, F, Li) tandis que d'autres permettent de les rendre visibles en IRM (Gd) ou bien les deux à la fois (Fe).

Dans un premier temps, l'effet de ces différents types de zéolithes sur la croissance bactérienne a été évalué (**Figure 64**). Au même titre que les zéolithes EMT (**Article 1**), les zéolithes FAU non modifiées (Na-X) n'induisent pas de ralentissement majeur de la croissance bactérienne (**Figure 64A**). L'ajout de cerium (Ce-X) entraîne un ralentissement de la croissance bactérienne de 26,94% \pm 4,35 par rapport au témoin uniquement lorsque ces zéolithes Ce-X sont utilisées à forte concentration (400 μ g/ml) (**Figure 64B**). L'ajout de fluor, de gadolinium ou de fer n'a en revanche aucune influence sur la croissance bactérienne (**Figure 64C, D & E**). Enfin comme pour le cerium, l'ajout de lithium (Li-X) entraîne un ralentissement de la croissance bactérienne de 27,17% \pm 3,66 par rapport au témoin et ce, uniquement lorsque ces zéolithes Li-X sont utilisées à forte concentration (400 μ g/ml) (**Figure 64F**).

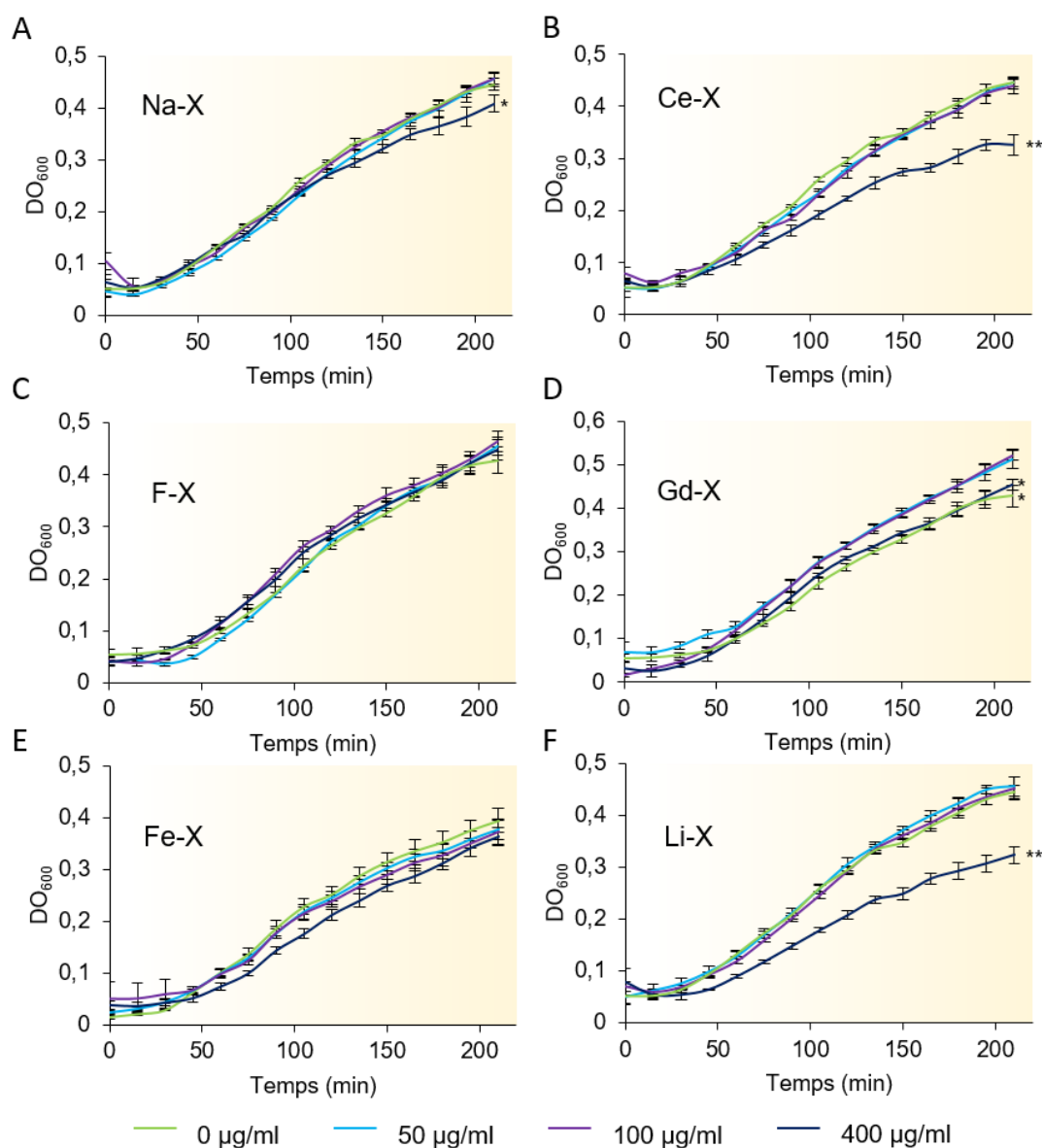


Figure 64 | Effet des nanozéolithes de type FAU contenant différents cations sur la croissance de bactéries (Gram négatif) *Escherichia Coli*. Quantification de la croissance de bactéries exposées à des concentrations croissantes de Na-X (A), Ce-X (B), F-X (C), Gd-X (D), F-X (E) et Li-X (F) pendant 3,5 heures. La croissance bactérienne a été évaluée par mesure de la densité optique de la suspension à 600 nm. Moyenne \pm écart-type, N=3. Test post-hoc HSD Tukey après une ANOVA significative (** $p < 0,0001$; * $p < 0,01$ vs groupe témoin (0 $\mu\text{g/ml}$)).

La toxicité de ces mêmes types de zéolithes a ensuite été évaluée sur des cellules eucaryotes : des cellules de GB humain U87-MG, des cellules de reins humaines HEK 293 et des cultures primaires d'astrocytes murins (Figure 65). Ces cellules ont été sélectionnées pour couvrir un éventail de types cellulaires différents avec des caractéristiques propres : lignées cellulaires humaines (U87-MG, HEK 293) et culture primaire murine (astrocytes), cellules du SNC (U87-MG, astrocytes) et d'organes

périphériques impliqués dans l'élimination (HEK 293). Ces types cellulaires pouvant être potentiellement en contact avec des zéolithes après une injection intraveineuse.

Les résultats montrent que les zéolithes n'ont aucune incidence sur la viabilité des cellules U87-MG. Quel que soit le cation incorporé dans les nanozéolithes, il ne semble pas y avoir de toxicité sur ces cellules que ce soit après 24 ou 48h d'exposition (**Figure 65A**). Les cellules HEK 293 semblent, quant à elles, plus sensibles à la présence des zéolithes. Une diminution de la viabilité cellulaire dépendante de la dose de nanozéolithes et du temps d'exposition est observée. La diminution de viabilité maximale est obtenue après une exposition de 48h à 400 µg/ml de zéolithes Fe-X (-43,16% ±3,12) (**Figure 65B**). Concernant les cultures primaires d'astrocytes, une exposition de 24h aux nanozéolithes n'a pas d'influence sur la viabilité cellulaire, quel que soit le cation incorporé. Après 48h d'exposition, une diminution de la viabilité cellulaire est observée pour tous les types de zéolithes à 400 µg/ml avec un maximum de -54,76% ±3,97 pour les zéolithes F-X. Une diminution de la viabilité moins marquée est également observée à 100 µg/ml pour les Na-X et F-X avec des diminutions de -17,69% ±8,77 et -20,78% ±6,94 respectivement (**Figure 65C**).

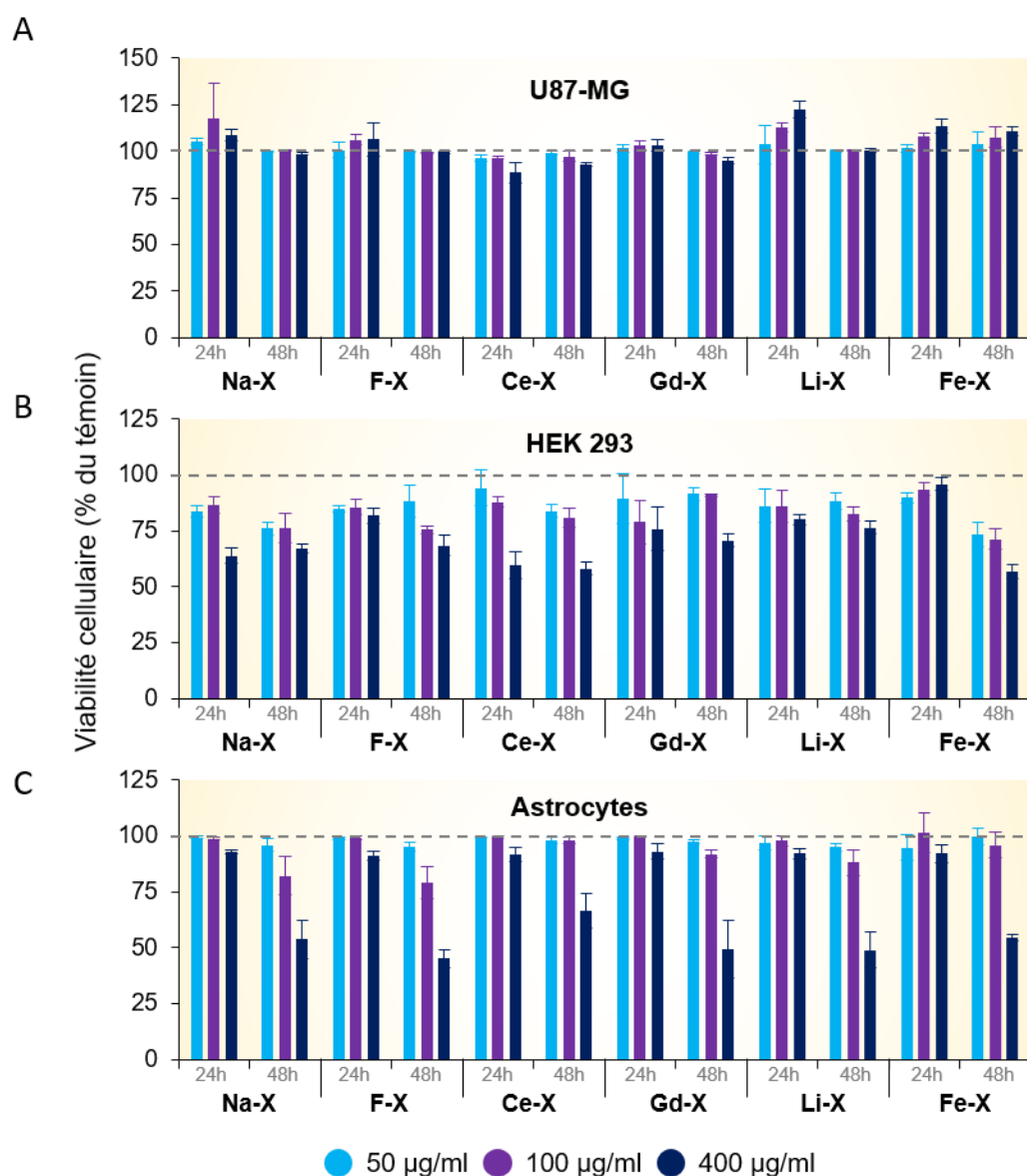


Figure 65 | Viabilité cellulaire après exposition aux nanozéolithes de type FAU. Quantification de la viabilité de cellules U87-MG (A), de cellules HEK 293 (B) et d'astrocytes murins (C) après exposition pendant 24h et 48h à des concentrations croissantes (50, 100 ou 400 µg/ml) de nanozéolithes contenant différents cations. Moyenne \pm écart-type, N=3.

Globalement, ces résultats indiquent que les nanozéolithes de type FAU n'exercent pas de toxicité importante sur ces cellules eucaryotes. En effet, il faut exposer les cellules à des concentrations importantes de zéolithes Na-X pour observer une diminution significative de la viabilité cellulaire. De plus, ces résultats montrent que, contrairement aux ions argent, les différents cations ne semblent pas avoir d'influence néfaste sur la toxicité de ces zéolithes.

Afin d'obtenir une vision plus fine de la toxicité induite par les nanozéolithes, une étude des valeurs de concentration inhibitrice médiane (IC50) a été réalisée pour les zéolithes Na-X, Gd-X et Fe-X. Ces zéolithes ont été sélectionnées pour leurs propriétés vis-à-vis de la sorption des gaz et de l'IRM, qui seront exposées dans les **parties B et C**. Les types cellulaires précédemment utilisés l'ont été à nouveau en y incluant des cultures primaires de neurones murins, qui comptent parmi les cellules les plus sensibles à une potentielle toxicité et des cellules de la lignée bEnd.3, cellules endothéliales de rat. Ces dernières ont été choisies pour évaluer la toxicité des nanozéolithes sur le compartiment vasculaire. Les cellules ont été exposées à des concentrations de nanozéolithes de 1, 10, 50, 100 et 400 µg/ml pendant 96h (**Tableau 6**).

Tableau 6 | Valeurs de concentration inhibitrice médiane (IC50, en µg/ml) des zéolithes Na-X, Gd-X et Fe-X sur différents types cellulaires après 96h d'exposition. Moyenne ±écart-type, N=3.

	Types cellulaires				
	U87-MG	bEnd.3	HEK 293	Astrocytes	Neurones
Na-X	N/A	152 ±23	301 ±21	90 ±15	125 ±1700
Gd-X	531 ±136	250 ±63	304 ±23	196 ±31	249 ±801
Fe-X	702 ±430	168 ±14	167 ±7	199 ±27	N/A

Il ressort de cette analyse qu'après 96h d'exposition, la concentration médiane nécessaire pour inhiber la survie cellulaire est assez homogène d'un type cellulaire à l'autre et entre les différents types de zéolithes. La concentration minimale est de 90 ±15 µg/ml de zéolithes Na-X pour inhiber la survie cellulaire des astrocytes de 50% après 96h. Il est intéressant de noter que les cultures primaires de neurones ne semblent pas plus sensibles aux nanozéolithes que les lignées cellulaires. Ces résultats confirment également que les cellules U87-MG sont les moins sensibles aux nanozéolithes. En effet, c'est pour ces cellules que sont obtenues les valeurs d'IC50 les plus élevées, supérieures à 500 µg/ml. Par comparaison, les valeurs d'IC50 obtenues avec le TMZ sur les cellules U87-MG après des temps d'exposition supérieurs à 48h sont généralement inférieures à 10 µg/ml (Elhag *et al.* 2015; Karpel-Massler *et al.* 2014).

3. CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Cette étude confirme les propriétés antibactériennes des zéolithes de types EMT contenant de l'argent et met en évidence leur forte toxicité vis-à-vis des cellules eucaryotes. Elle permet également de mettre en évidence l'absence de toxicité des

nanozéolithes de type EMT ne contenant pas d'argent. C'est donc bien la présence d'argent au sein de ces NP qui rend celles-ci toxiques et non la NP en elle-même. Il est donc indispensable d'évaluer le caractère potentiellement toxique des nanozéolithes à la fois après leur synthèse mais également après les éventuelles modifications post-synthèse. Les résultats supplémentaires obtenus sur les zéolithes de type FAU permettent d'exclure une toxicité majeure de ce type de NP sur les cellules eucaryotes et procaryotes. Les différents cations incorporés dans ces nanozéolithes FAU ne modifient que très peu les propriétés de toxicité de ces zéolithes.

En conclusion, cette étude illustre l'importance des modifications post-synthèse des zéolithes sur leur toxicité. On voit ici que l'ajout d'argent dans des zéolithes EMT, non toxiques par eux-mêmes, les rend extrêmement nocifs pour les cellules. En revanche, l'ajout d'autres cations dans des nanocristaux de FAU, notamment le fer ou le gadolinium, ne rend pas ce type de zéolithe toxique. Du point de vue de la toxicité, ces derniers semblent donc appropriés pour le développement d'applications biomédicales.

B. ETUDE DE L'AFFINITE DES NANOZEOLITHES VIS-A-VIS DES GAZ

La deuxième partie de l'étude vise à déterminer quels nanozéolithes sont les plus adaptées vis-à-vis du transport des gaz, notamment l'oxygène et le CO₂. Nous l'avons vu, l'intérêt de ces gaz réside dans le fait que l'oxygène permet d'augmenter l'oxygénation tissulaire, le CO₂ permet d'augmenter le volume sanguin et la perfusion alors que le carbogène permet de combiner ces deux propriétés. Nous avons également vu en introduction que les zéolithes ont la propriété de pouvoir piéger des gaz et que les modifications post-synthèse, notamment l'ajout de cations par échange d'ions permet de modifier ces propriétés et en particulier cette faculté de transport de gaz.

Deux cations ont ainsi été étudiés : le gadolinium et le fer. Ils ont premièrement été sélectionnés pour leurs propriétés magnétiques qui les rendent intéressants en tant qu'agent de contraste pour l'IRM, dans le cadre d'une utilisation théranostique de ces nanozéolithes. De plus, plusieurs études ont montré que l'incorporation de fer dans les zéolithes permet d'accroître leur capacité de sorption vis-à-vis des gaz (Malpartida *et al.* 2010; Rivallan *et al.* 2009). Enfin, les études de toxicité décrites dans le chapitre **II.A.2** ont montré que l'incorporation de ces cations dans les nanozéolithes ne les rend pas toxiques vis-à-vis des cellules eucaryotes.

1. **SYNTHÈSE DE ZEOLITHES DE TYPE EMT AVEC UNE GRANDE AFFINITÉ POUR LE CO₂ ET LE NO (ARTICLE 2)**

L'objectif de la première partie de cette étude a donc été de déterminer les modifications post-synthèse permettant d'améliorer la capacité de transport de gaz. Parmi ces modifications, l'ajout de fer dans les nanozéolithes de type EMT a été testée. Dans un premier temps, les capacités de sorption de CO₂ ont été mesurées puis la toxicité de ces nanozéolithes contenant du fer a été évaluée sur des cellules U87-MG, des cellules HEK 293 et des cultures primaires d'astrocytes murins.

Les résultats de cette étude démontrent que la capacité de sorption des nanozéolithes EMT vis-à-vis du CO₂ est améliorée par l'ajout de fer. Plus la quantité de fer dans les zéolithes augmente, plus la capacité de sorption est améliorée. De plus, il est montré que ces zéolithes EMT ne présentent pas de toxicité *in vitro* sur des cellules U87-MG, HEK 293 et sur des cultures primaires d'astrocytes murins.

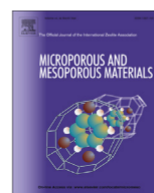
Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans *Microporous and Mesoporous Materials* **2016**, 232, pp 256-263 ([doi:10.1016/j.micromeso.2016.06.015](https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.06.015)).

“Iron loaded EMT nanosized zeolite with high affinity towards CO₂ and NO”

Veselina Georgieva, Clément Anfray, Richard Retoux, Valentin Valtchev, Samuel
Valable and Svetlana Mintova

Microporous and Mesoporous Materials

2016



Iron loaded EMT nanosized zeolite with high affinity towards CO₂ and NO



Veselina Georgieva^a, Clément Anfray^b, Richard Retoux^c, Valentin Valtchev^a, Samuel Valable^{b, **}, Svetlana Mintova^{a, *}

^a Laboratoire Catalyse et Spectrochimie, Normandie Université, ENSICAEN, CNRS, 14050 Caen, France

^b CERVOxy Group, CYCERON, Normandie Université, UMR 6301 ISTCT, CNRS, CEA, 14050 Caen, France

^c CRISMAT, Normandie Université, ENSICAEN, CNRS, 14050 Caen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2016

Received in revised form

7 June 2016

Accepted 10 June 2016

Available online 15 June 2016

Keywords:

Nanosized zeolite

Cytotoxicity

Gas carrier

ABSTRACT

The preparation of iron-loaded nanosized zeolite with EMT-type structure (Fe-EMT) is reported. The sorption capacity of the Fe-EMT zeolite crystals for NO and CO₂ is evaluated. The application of Fe-EMT zeolite as a gas delivery system with high capacity for CO₂ and NO in biomedicine is considered. Therefore the toxicity of the pure EMT and Fe-EMT zeolite nanocrystals is studied. Primary culture of astrocytes was exposed to zeolite nanocrystals. In addition, two human cell lines, U87-MG glioblastoma and HEK-293T were used. Cells were exposed to zeolites nanocrystals with concentrations of 50, 100 and 400 µg/ml for 24 h and 48 h. Cytotoxicity was assessed by a cell viability assay and no alteration of cell viability exposed to zeolite nanoparticles was observed.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Zeolites are among the most important inorganic porous materials owing to their unique framework structure of interconnected channels, with variety of pore sizes and shapes [1]. The interest in zeolites for environmental and biological application is constantly growing [2,3].

Several studies report on the use of zeolites as a host for the encapsulation and delivery of anti-cancers drugs using for instance 5-fluorouracil [4] but also as an hemostatic agent to prevent uncontrolled bleeding after injuries [5]. The development of these biomedical applications raises, however, the question of a potential toxicity of zeolites. Decreasing the zeolite particle size to nanoscale range (10–50 nm), while avoiding the use of organic templates both harmful and expensive, is crucial for reaching practical uses of nanosized zeolites. Additional advantages of nanosized zeolites are due to their unique properties such as tunable crystal size and chemical composition, larger surface areas, reduced diffusion path lengths and more exposed active sites compared to zeolites with

micrometer-sized crystals [6–8]. In addition to the common applications, the nanosized zeolites free of organic template are considered for biomedical use due to their biocompatibility and low cytotoxicity [9–12]. Up to now, several studies reported on their low cytotoxicity [13–16]. For instance, for nanosized ZSM-5 and silicalite-1, and A zeolites was found that toxicity depends on their size and shape, their Si/Al ratio and the dose introduced to the cell [14]. Recently, pure ultra-small zeolites EMT and LTL, both with low silica content and large pores, showed no sign of toxicity on the cell [17].

In this work the major part of the experiments are performed on nanosized low silica EMT zeolite, which is synthesized in precursor suspension free of organic template. Zeolite EMT is the hexagonal form of faujasite (FAU) [18]. Firstly, a high silica FAU-type zeolite commonly named EMC-1 (Elf Mulhouse Chemistry One) by using the 18-crown-6 ether as organic template was synthesized [19]. Similar to the FAU-type material, the EMT framework topology has a three-dimensional large (12-membered ring) pore system. The EMT structure possesses two type of cages: a hypocage (0.61 nm³) and a hypercage (1.24 nm³) [20]. This difference in the arrangement of zeolite building units leads to different pore connectivity and, thus, different properties [21,22].

In addition to the unique properties of zeolites, the introduction of different cations, and further the stabilization of metal (Fe, Cu,

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: valable@cyeron.fr (S. Valable), svetlana.mintova@ensicaen.fr (S. Mintova).

Pd, Pt, etc.) and semiconducting (CdS, ZnS, PbS, etc.) clusters within the nanosized zeolites *via* post-synthesis treatment can change their functioning [23–30]. Moreover, the surface area, micropore volume and CO₂ capacity of zeolites strongly depend on their surface functionalization using solvents with different polarity for grafting of amino-propylsilanes [28].

In particular the interest is in iron-loaded zeolites, which are extensively investigated in the area of catalysis and gas delivery [31]. Among the most important catalytic reactions with iron-containing zeolites are reduction of NO by hydrocarbons [32], isomerization, conversion and dehydrogenation [33–35], and selective oxidations [36,37]. In addition, high adsorption capacity for iron containing zeolites (silicalite-1, ZSM-5, beta, ferrierite, faujasite) towards NO, CO, H₂O and NH₃ are reported [31,38–42]. Moreover, several authors showed a dramatic effect of α -oxygen on the rate of O₂ exchange with iron loaded ZSM-5 [43]. Due to iron surface, a mechanism of N₂O decomposition to oxygen is also observed [31].

Furthermore, the preparation of magnetic zeolite materials for use as magnetic adsorbents and for biomedical applications has also been described [44,45]. They have enhanced adsorptive properties, which are combined with facile recovery of the adsorbent *via* the magnetic iron oxide component of the composite material. The high adsorption capacity of the iron containing zeolites and possible control delivery of biologically active gas molecules is also envision for future applications in biochemistry and medicine [46]. More precisely, the metal-containing nanosized zeolites are used in the medical diagnostics, for instance, magnetic resonance imaging (MRI) [47]. However, in order to be applied for MRI and industry or commercial products, nanosized zeolites should meet several requirements. The first requirement is the amount of iron introduced in the zeolite structure has to be sufficient in order to facilitate MRI tracking of the particles. The second condition is the particles with or without iron to be harmless.

Thus, toxicity is an important issue regarding the use of iron-containing zeolites for biological applications [46–49]. The cytotoxicity of iron containing zeolites, depend on several factors, such as the physicochemical features (particle size, shape, zeta potential, etc.), cell uptake, cell viability, and the aggregation rate of the nanoparticles [50]. Cell toxicity may however be dependent on the cell type, nature and origin. For instance, cell toxicity is often assessed on tumor cells, which are known to exhibit a high rate of proliferation *in vitro* but also to exhibit various systems to repair DNA damage or membrane alterations. When assessing, cell toxicity, one should also include primary cells. In the present study, we were interested to assess such a potential toxicity on both cell lines and primary cell culture withdrawn from the brain (astrocytes), which is known to be one of the most sensitive tissues to external violations.

This work reports the preparation of EMT type nanosized zeolites from organic template free colloidal suspensions, followed by iron loading using ion-exchange procedure directly in suspensions. The pure EMT and iron ion-exchanged (Fe-EMT) zeolites in the suspension and as powders are studied *via* different techniques. A key factor for the application of the Fe-EMT zeolites for magnetic resonance imaging (MRI) or gas delivery is their toxicity to the cell. Therefore toxicity tests for Fe containing zeolites were performed showing the potential use of iron containing nanosized zeolites in medicine. Moreover, the iron loaded nanosized zeolites with regular micropores are considered as appropriate carriers for NO and/or CO₂ which could be applied as a hemostatic agent to prevent uncontrolled bleeding after injuries [5]. The sorption capacity and selectivity of iron containing nanosized zeolites to CO₂ and NO, is studied by in-situ IR spectroscopy.

2. Material and methods

2.1. Preparation of nanosized zeolites

Stable discrete nanosized EMT zeolite free of organic template was prepared according to the Ng et al. [51] procedure. The precursor suspension has the following molar composition: 18.45 Na₂O: 1 Al₂O₃: 5.15 SiO₂: 240 H₂O. The precursor system was hydrothermally treated at 30 °C for 36 h. The zeolite nanoparticles were purified by several steps centrifugation (20000 rpm, 30 min), decanting of supernatant and dispersion in distilled water until the pH value of the suspension reached 8. The ion-exchange experiments was performed as follows: 20 ml Fe(NO₃)₃·9H₂O (Aldrich, 99.9%) with a concentration in the range of 5.0–5.1·10⁻⁵ M was added to 20 ml EMT zeolite suspension (5 wt% zeolite) and kept for 1 h. The zeolite was purified by one cycle centrifugation and redispersion in distilled water. The procedure was repeated two or three times; the obtained samples were denoted Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2, respectively. The final ion-exchanged samples were purified three times with distilled H₂O by consecutive high-speed centrifugation and redispersion in distilled water until the pH value reached 7.

2.2. Characterizations of zeolite samples

The crystallinity of initial and ion exchange samples was determined using a PANalytical X'Pert Pro diffractometer with Cu K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, 45 kV, 40 mA).

The crystal size and morphology of the samples were studied by SEM. Electron micrographs were taken on a MIRA-LMH (TESCAN) scanning electron microscope equipped with a field emission gun.

Additionally, crystal size and morphology of the samples were studied using transmission electron microscopy (TEM). The TEM analysis was performed on 200 kV JEOL 2010 FEG electron microscopes (tilt $\pm 42^\circ$) equipped with an EDS (Energy Dispersive Spectrometer, Si/Li detector) and fitted with double tilt sample holder.

The stability of the zeolite suspensions prior and after ion exchange was studied by dynamic light scattering (DLS) analysis. The hydrodynamic diameters of the nanoparticles in the suspensions were determined with a Malvern Zetasizer Nano. The analyses were performed on samples with original concentrations without any pre-treatment of the colloidal suspensions (scattering angle 173°, HeNe laser with 3 mW output power at 632.8 nm wavelength). Zeta potential measurements were performed for the zeolite suspensions at pH = 7 and concentration of 1 wt%.

Elemental analysis of crystalline samples was performed by inductively coupled plasma–atomic emission spectroscopy (ICP-AES) using an OPTIMA 4300 DV (Perkin–Elmer) instrument.

The porosity of the samples was determined by recording the nitrogen adsorption/desorption isotherms using a Micrometrics ASAP 2020 volumetric adsorption analyzer. Samples were degassed at 250 °C under vacuum overnight prior to the measurement. The external surface area and micropore volume were estimated by t-plot method using Silica-1000 (22.1 m² g⁻¹) as a reference. The micropore and mesopore size distributions of solids were estimated by Nonlocal Density Functional Theory (NLDFT) and Barret-Joyner-Halenda (BJH) methods, respectively.

The IR spectra of zeolite samples were recorded on a Nicolet Impact 410 FTIR spectrometer equipped with a DTGS detector in the range 400–4000 cm⁻¹. Self-supporting pellets (ca. 10 mg cm⁻²) were prepared from zeolite powders and treated directly in an in-situ IR cells. The cell was connected to a vacuum-adsorption apparatus allowing a residual pressure below 10⁻⁶ torr. Prior the

Table 1
Chemical composition of EMT zeolite samples.

Sample	Fe (wt %)	Si (wt %)	Al (wt %)	Na (wt %)
EMT	0	36.5	35.1	12.0
Fe-EMT-1	2.8	35.9	34.7	11.5
Fe-EMT-2	5.5	35.8	34.3	10.9

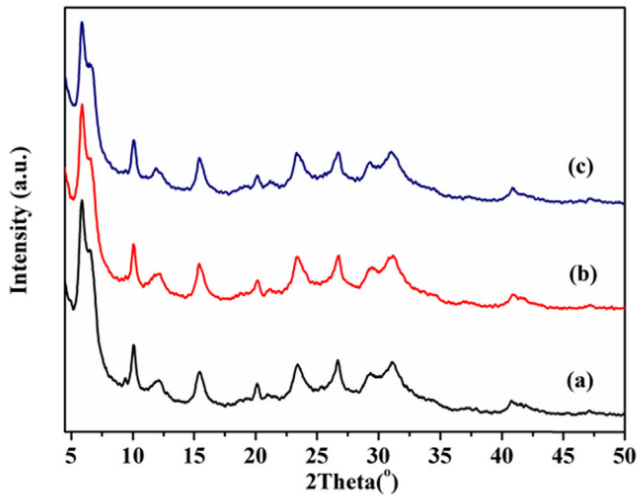


Fig. 1. XRD patterns of (a) EMT, (b) Fe-EMT-1, (c) Fe-EMT-2 zeolite samples in the regions 5–50° 2 Theta.

adsorption of CO₂ and NO gases, the Fe-EMT samples were thermally activated at 250 °C under dynamic vacuum.

2.3. Materials and methods for the toxicity test

Cell lines. A human glioblastoma cell line, U87-MG purchased from American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA) and a human kidney cell line, HEK-293T cells (Human Embryonic Kidney cells, ATCC, Manassas, VA, USA) were used. Cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France). Cells were seeded in 24-wells plates at a concentration of 5.104 cells/ml and maintained in culture at 37 °C with 5% CO₂ and 95% humidity.

Primary culture of astrocytes. Cerebral cortices were isolated from neonatal (1 to 3-day-old) Swiss mice (CURB, France) carefully stripped of the meninges and dissociated to generate a single-cell suspension [52]. Cultures were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France), 10% horse serum (Eurobio, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France) in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C to confluence (15–20 days) prior to use.

Cells treatment. Cells were exposed to zeolite suspensions (pure EMT or Fe-EMT samples) for 24 h or 48 h. Zeolites were diluted in the culture medium with a concentration of 50, 100, or 400 µg/ml and added directly in the wells.

Cells viability. Cell viability was analysed for 24 h or 48 h following exposure to zeolites with the WST-1 assay (Roche, France) according to manufacturer's instructions.

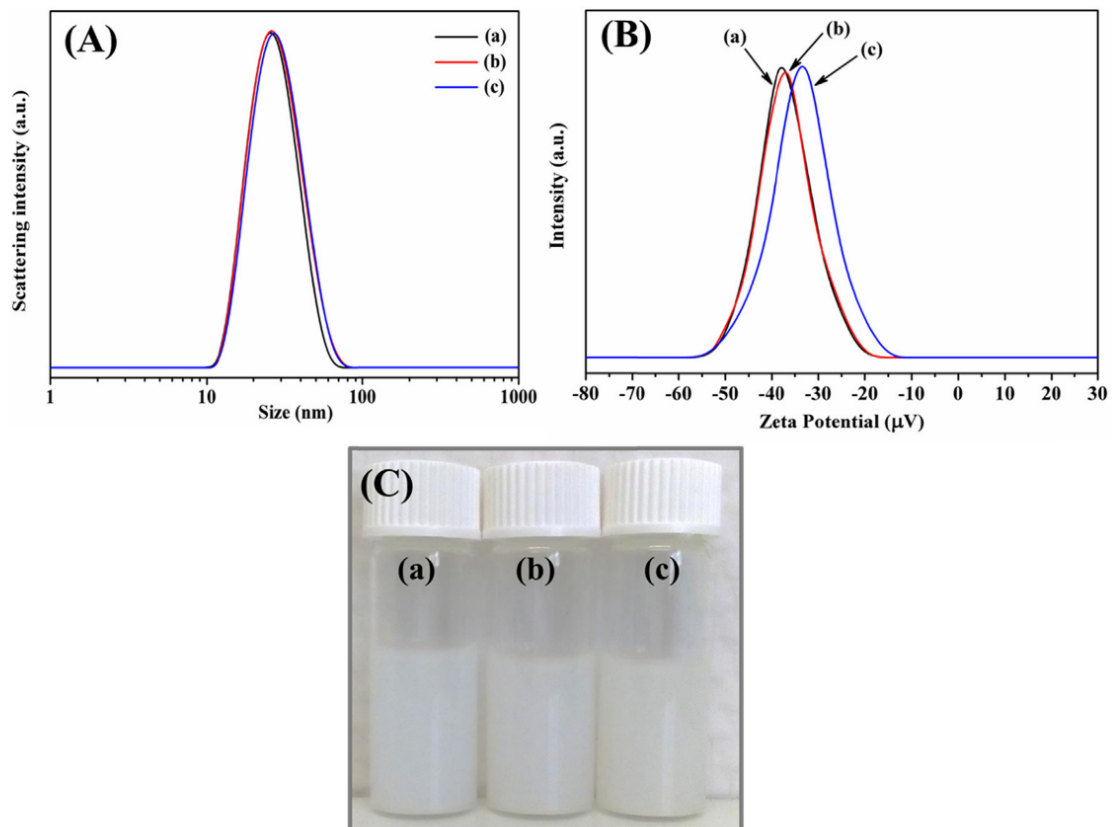


Fig. 2. (A) DLS, (B) Zeta potential curves and (C) appearance of water suspensions containing (a) EMT, (b) Fe-EMT-1 and (c) Fe-EMT-2 zeolite samples.

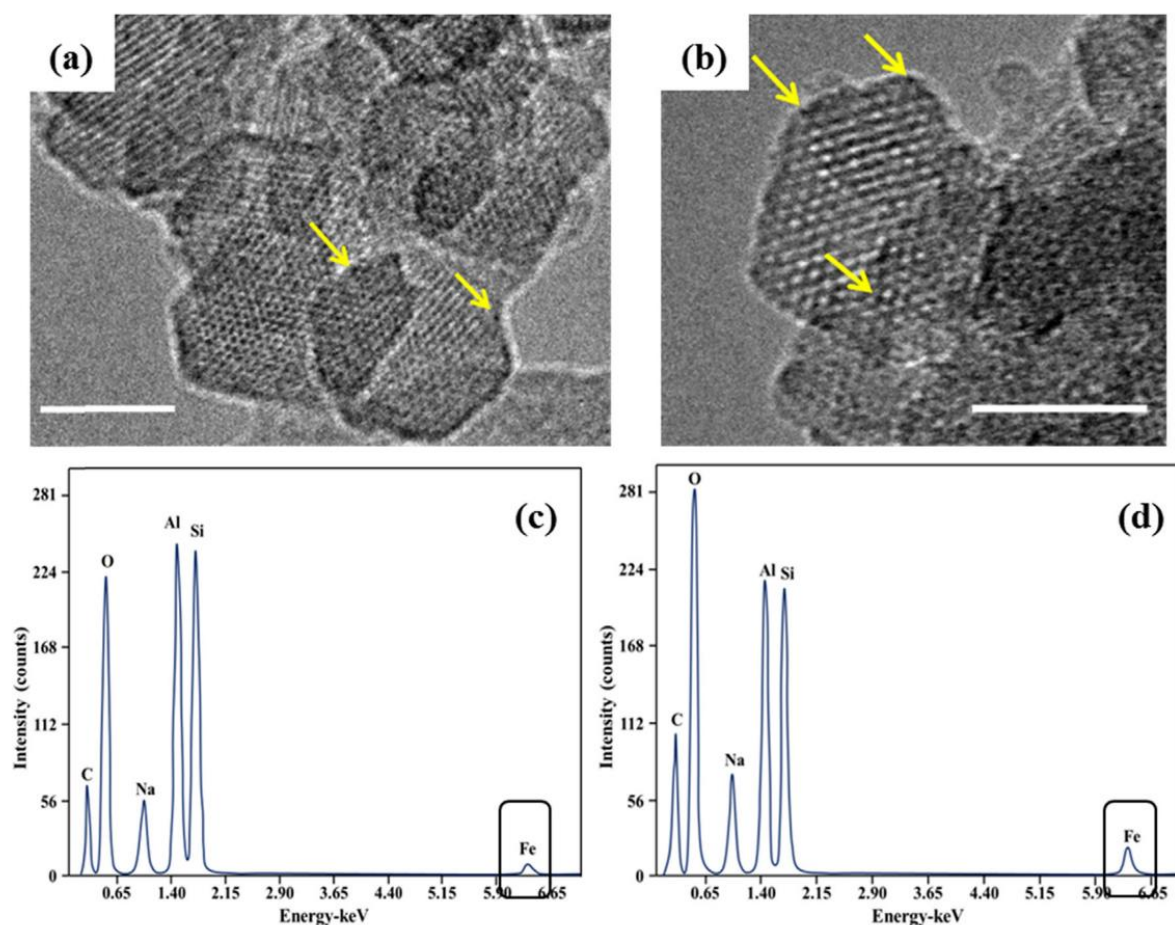


Fig. 3. HRTEM images of (a) Fe-EMT-1 and (b) Fe-EMT-2 zeolite nanoparticles. Scale bar ($M = 20$ nm) Elemental composition of (c) Fe-EMT-1 and (d) Fe-EMT-2 measured by EDX-HRTEM (Carbon (C) corresponds to the holey carbon film used in the TEM experiment).

Statistical analyses: Data are presented as mean \pm SD. Statistical analyses were obtained with JMP programs (SAS Institute). Each test used is detailed in the corresponding legend.

3. Results and discussion

3.1. Nanosized EMT and Fe-EMT zeolites

The pure (EMT) and iron-containing EMT (Fe-EMT) zeolite samples after the synthesis were stabilized in the form of colloidal suspensions and used in all subsequent procedures, including toxicity tests. The chemical composition of the EMT and Fe-EMT zeolite samples is presented in Table 1. The amount of iron increased from 2.8 to 5.5 wt % after 2 (sample Fe-EMT-1) and 3 (sample Fe-EMT-2) steps ion-exchange, respectively. This result shows that samples Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 stay intact, and the iron loading does not affect their Si/Al ratio (Table 1). In other words, there is no extraction of framework aluminium during the ion-exchange procedure.

The XRD patterns of pure EMT and iron-containing EMT zeolite crystals are shown in Fig. 1. All samples have identical XRD patterns corresponding to the EMT-type framework topology. The three characteristic peaks for EMT zeolite in the 2θ region $5-7^\circ$ are overlapped due to an anisotropic particle size or stacking disorder, and their small sized results in relative broadening of the peaks.

Further the zeolite samples were studied by DLS in order to determine their particle size. The particle size distribution (PSD) of the EMT zeolite in water suspensions is shown in Fig. 2A. The PSD

curves of the iron-containing samples are similar to the pure EMT zeolite. In all cases, a monomodal particle size distribution curves are measured with a diameter centered at 25 nm (Fig. 2A). This demonstrates that the iron is integrated in zeolite crystals and does no presence as separated Fe particles in the suspensions. No change of the DLS peak position or intensity for the iron-exchanged samples was observed. Consequently, the colloidal stability and surface

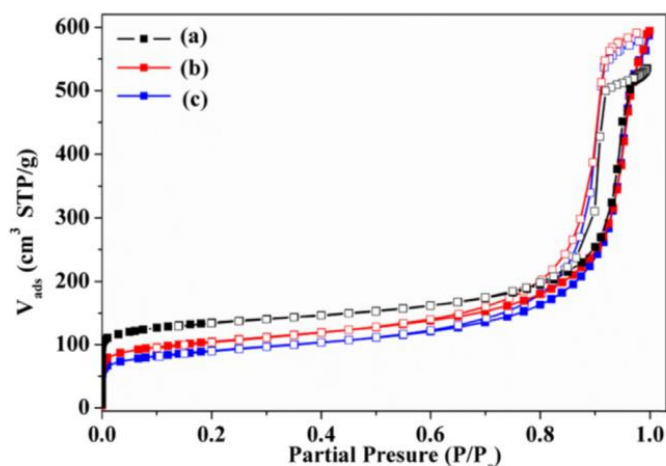


Fig. 4. Nitrogen adsorption-desorption isotherms of (a) EMT (b) Fe-EMT-1 and (c) Fe-EMT-2 zeolite samples.

properties of the samples were studied via Zeta potential measurements (Fig. 2B). The Zeta potential depends on pH and ionic strength and represents the surface charge of the nanoparticles [53]. The results reveal that the zeta potential values of all samples are below -30 mV, indicating high colloidal stability for all samples. However, a small shift in the peak from -37.5 mV for EMT to -36.8 mV for Fe-EMT-1, and to -32.5 mV for Fe-EMT-2 zeolite samples is measured. The introduction of iron can cause slight increase in the Zeta potential, which is negligible and could not lead to coalescence of the nanoparticles. Zeta potential value of the nanoparticles is of significant importance for their cytotoxicity. For high positive zeta potential value of nanoparticles severe cytotoxicity is usually observed, whereas neutral and negative charged nanoparticles did not show harmful effect on the cell as reported previously [54].

A slight difference in the color of the Fe-EMT suspensions due to the loading of iron was observed; the color changed from white for initial EMT to yellowish for Fe-EMT-1 and -2 was detected (Fig. 2C).

The state and location of iron in the EMT zeolite crystals was studied by HRTEM. Representative images of Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 zeolite samples are shown in Fig. 3. The three samples contain discrete nanoparticles with a size of about 10–30 nm and crystalline fringes corresponding to the EMT type structure (Fig. 3a). The presence of iron within the EMT zeolite crystals is noticeable for both Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 samples (Fig. 3a, b). The iron is predominantly located within the zeolite cages, and the size is less than 1 nm. As expected the amount of iron is higher in the Fe-EMT-2 sample, which is confirmed by the EDS-TEM data (Fig. 3c, d). The results are in good agreement with the ICP analysis, revealing that the amount of iron in samples Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 is 2.8 and 5.5 wt %, respectively.

The porosity of the EMT zeolite before and after iron loading was studied by N_2 sorption measurements. The N_2 adsorption and desorption isotherms for all samples are shown in Fig. 4. All samples exhibit a combination of type I and IV isotherms due to the presence of micropores and textural mesopores. The hysteresis

Table 2

Results from the nitrogen sorption measurements for pure and iron-containing EMT zeolite samples.

Sample	S_{BET}^a (m^2/g)	S_{EXT}^b (m^2/g)	V_{mic}^b (cm^3/g)	V_{meso}^c (cm^3/g)	V_{total}^c (cm^3/g)
EMT	578	220	0.16	0.67	0.83
Fe-EMT-1	474	166	0.14	0.55	0.69
Fe-EMT-2	450	152	0.12	0.42	0.54

The specific surface area is calculated by the ^aBrunauer–Emmett–Teller method; micropore volume is calculated by ^bt-plot; the mesoporous volume is the difference between total- and micro-pore volumes ^c $V_{\text{meso}} = V_{\text{total}} - V_{\text{mic}}$.

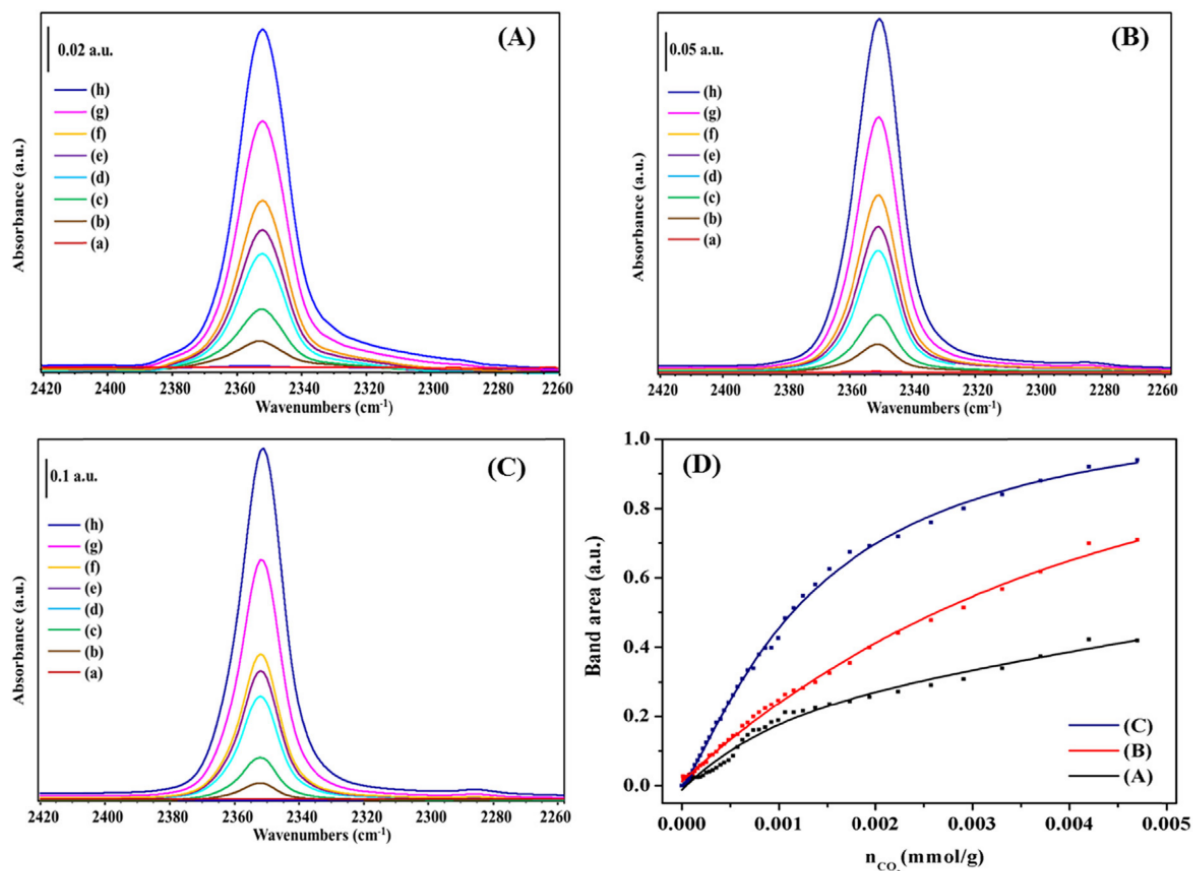


Fig. 5. FTIR spectra of CO_2 adsorbed on (A) pure EMT (B) Fe-EMT-1 (C) Fe-EMT-2 zeolites sample after outgassing under vacuum at 250°C . Introduction of CO_2 increased in small doses: (a) 0.5, (b) 2.5, (c) 3, (d) 5, (e) 7, (f) 10, (g) 30, and (h) 3 torr (saturation point). For clarity, all spectra were subtracted from the corresponding sample after activation. CO_2 adsorption isotherms (D) retrieved from the area of the IR peak at 2349.3 cm^{-1} are presented in Fig. 5D.

loop at high partial pressure ($P/P_0 > 0.8$) corresponds to the presence of inter-particle mesopores. The results from the nitrogen sorption measurements are summarized in Table 2. The high micropore volume and the BET specific surface area correspond to highly crystalline EMT zeolite with nanosized dimensions, which is in a good agreement with the X-ray diffraction data and TEM observations (Figs. 1 and 3). Decreasing of the specific surface area for iron containing samples is most probably due to the irreversible agglomeration of zeolite nanoparticles after drying prior N_2 sorption measurements. The micropore volume (V_{mic}) is decreased from $0.20 \text{ cm}^3/\text{g}$ to $0.14 \text{ cm}^3/\text{g}$ with increasing the iron content for samples (Fe-EMT-1 vs. Fe-EMT-2). Although the ionic radius of Fe^{3+} (0.78 \AA) is smaller than Na^+ (1.02 \AA), a decrease of the micropore volume for both Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 samples is measured. This can be due to formation of iron clusters and thus a decrease in micropore volume of the zeolite is observed [55].

3.2. CO_2 and NO adsorption measurements

In situ IR spectroscopy was applied to follow the adsorption kinetics of CO_2 and NO on pure and iron-containing EMT zeolite samples. Fig. 5 shows the IR spectra recorded at room temperature under high vacuum for samples EMT, Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 exposed to small concentrations of CO_2 . Two IR regions at $2400\text{--}2200 \text{ cm}^{-1}$ and $1800\text{--}1000 \text{ cm}^{-1}$ representative of physisorbed and chemisorbed CO_2 species are evaluated [56]. Clear evidence for the physisorbed CO_2 on the three samples (EMT, Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2) is seen, i.e. the most intense band at 2352 cm^{-1} corresponds to asymmetric stretching (ν_3) vibration mode. This infrared band is mainly attributed to the carbon dioxide linearly adsorbed on the cationic sites of the zeolite [57]. Therefore

the band at 2352 cm^{-1} was chosen for quantitative evaluation of physisorbed CO_2 on the zeolite samples. With increasing the concentration of CO_2 , an increase in the amount of CO_2 adsorbed in zeolites is measured. The adsorption isotherms are presented in Fig. 5 (D). The amount of physisorbed CO_2 for pure EMT is lower compare to the Fe-containing EMT zeolites.

In addition, weaker bands at 1648 cm^{-1} , 1362 cm^{-1} and 1705 cm^{-1} appear in IR spectra (Supporting information, Fig. S1). These bands are assigned to carbonate-like species ($Fe^{\delta+}CO_3^{\delta-}$) such as strongly perturbed (i.e. no more linear) CO_2 species [58]. The evolution of the intense band at 1362 cm^{-1} during introducing of CO_2 is similar to that of a sharp band at 1648 cm^{-1} (Figs. S1 A, B, C). These bands are associated to the ν_1 vibrational symmetric stretching mode of adsorbed CO_2 . Clearly, the intensity of these bands is different for the three EMT zeolite samples. In the case of pure-EMT zeolite the adsorption is relatively low compare to iron-containing samples. Additionally several components in the $1700\text{--}1500 \text{ cm}^{-1}$ region (individual maxima at 1705 , 1648 , 1643 and 1580 cm^{-1}) are attributed to bidentate or chelating carbonate species. Interestingly, the peak at 1705 cm^{-1} appears only in Fe-EMT spectra (Figs. S1 B,C). For Fe-EMT-2 sample the intensity of this band is significantly higher compare to Fe-EMT-1 sample. This band is associated with Fe- CO_2 adduct [58] and confirms that with increasing of the amount of iron in the EMT zeolite the adsorption capacity to CO_2 increases. In other words, small amounts of iron introduced in the zeolite framework will improve the adsorption capacity of the EMT zeolite considerably, and thus can be considered as a gas (CO_2) carrier for medical applications.

Nitric oxide is often used as a probe molecule to characterize oxidation and coordination state of iron. The adsorption of NO on the iron-loaded EMT zeolite samples resulted in the appearance of a

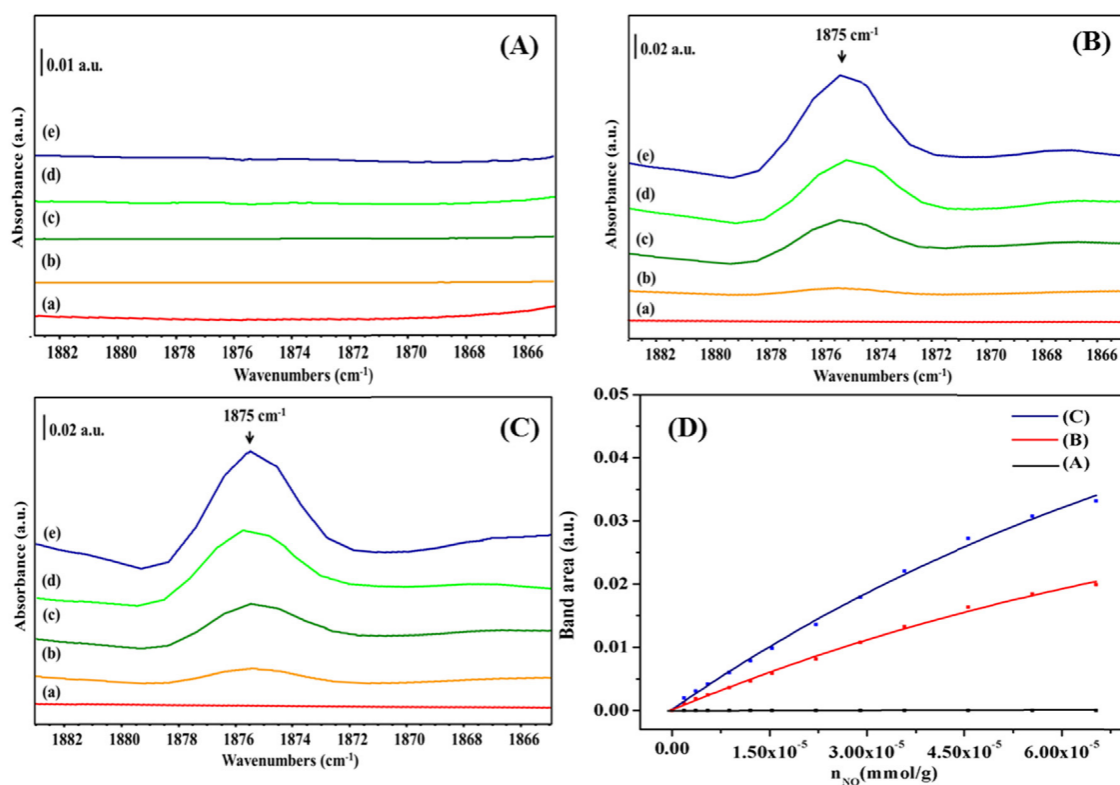


Fig. 6. FTIR spectra of NO adsorbed on (A) pure EMT (B) Fe-EMT-1 (C) Fe-EMT-2 zeolite samples after outgassing under vacuum at $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Introduction of NO increased in small doses ca. (a) 0.5, (b) 9, (c) 15, (d) 67 and (h) 3 torr (saturation point). For clarity, all spectra were subtracted from the spectrum of the corresponding sample after activation. NO adsorption isotherms (D) retrieved from the area of the peak at 1875 cm^{-1} .

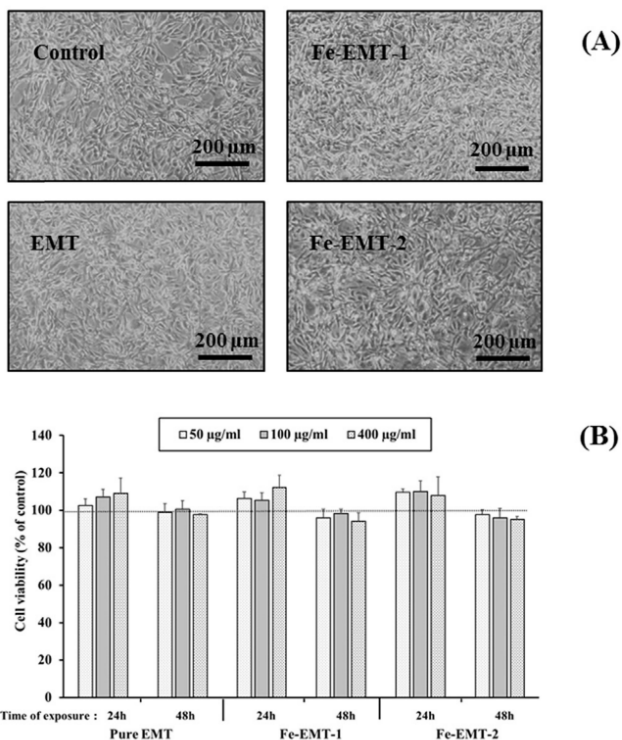


Fig. 7. (A) Representative photographs (phase contrast) of U87-MG cells (48 h exposure to 400 µg/ml of zeolites). (B) Quantification of U87-MG cells viability after 24 h or 48 h exposure to different concentrations of pure EMT, Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 zeolite crystals. Cell viability was analysed using the WST-1 test. $N = 3$ for each conditions. A two-way ANOVA (for concentration and zeolite type) was used.

symmetric band at 1875 cm^{-1} (Fig. 6 (B) and (C), spectra (c)–(e)). According to previous results [31, 59–61], this band is assigned to Fe^{2+} –NO species originating from possible redox reaction ($\text{Fe}^{3+} + \text{NO} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{NO}^+$). Hadjiivanov et al. [62] studied the adsorption kinetics and oxidation ability of NO over iron-loaded zeolites. According to this work, Fe^{3+} sites cannot adsorb NO molecules, therefore the adsorption sites can be only Fe^{2+} . No band at 1875 cm^{-1} for pure EMT sample is measured (Fig. 6A). Furthermore, the slight difference in the intensities of this peak for Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 samples shows that an increase of the

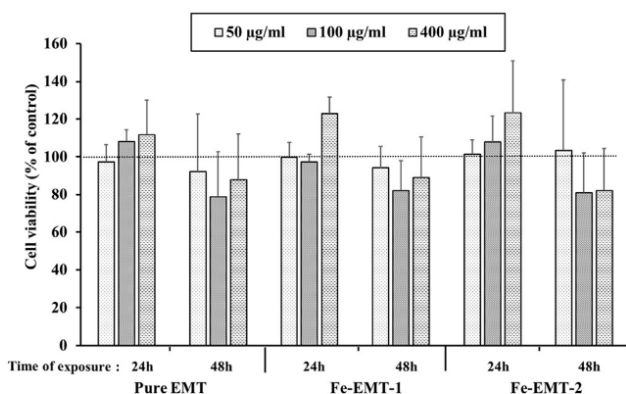


Fig. 8. Quantification of HEK-293T cells viability after 24 h and 48 h exposure to different concentrations of pure EMT, Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2. Cell viability was analysed using the WST-1 test. $N = 3$ for each conditions. A two-way ANOVA (for concentration and zeolite type) was used.

amount of iron leads to higher amount of NO adsorbed in Fe-EMT-2. This conclusion is confirmed by the adsorption isotherms presented in Fig. 6 (D), which are calculated by the area of the band at 1875 cm^{-1} .

According to DLS and TEM measurements the iron is predominantly located in the zeolite cages. However, at the conditions of activation, a migration of the iron cations to the surface of porous materials is highly possible, and this has been reported earlier [63]. Due to the small amount and small size of iron particles we are not able to detect them, however, they may exist on the surface of the zeolite crystals after the activation step. The results presented above show that iron exchanged EMT nanosized zeolites are very sensitive towards CO_2 . The NO and CO_2 adsorption increases with increasing the Fe loading, which makes possible the application of iron loaded nanosized zeolites as an appropriate gas carrier to the cells.

3.3. Toxicity measurements

Important step before applying nanosized zeolites for medical application is their potential toxicity to the cells. Therefore, cell viability exposed to the zeolite samples with different concentrations was assessed at 24 h and 48 h. For U87-MG and HEK-293T cell lines concentrations of 50, 100 and 400 µg/ml zeolite were used (Figs. 7 and 8). No toxicity was observed as compared to the negative control.

Concerning primary cultures of astrocytes (Fig. 9), cell viability was not affected at zeolite concentration of 50 and 100 µg/ml. At the highest dose, 400 µg/ml of zeolite nanocrystals, a significant decrease in cell viability was observed ($34 \pm 12\%$). It is important to note that this effect was also observed for the pure EMT sample. As described above, astrocytes are primary cells originating from the brain, which are very sensitive tissue to cytotoxic agents.

In most of the paper addressing cytotoxicity with nanomaterials and more importantly, when using iron oxide particles, the concentration used do not exceed 40 µg/ml [64]. More importantly, the effects observed (cytotoxicity or genotoxicity) were dependent on the size of the particles but were never subjected to *in vivo* study. The size dependent effect on cell toxicity has been proposed to reflect on intracellular/extracellular localization [65].

In the present study, we did not confirm the localization of the particles since no main toxicity was observed. In summary, our results clearly demonstrate the absence of toxicity of the nanocrystals with the concentration commonly used *in vivo*.

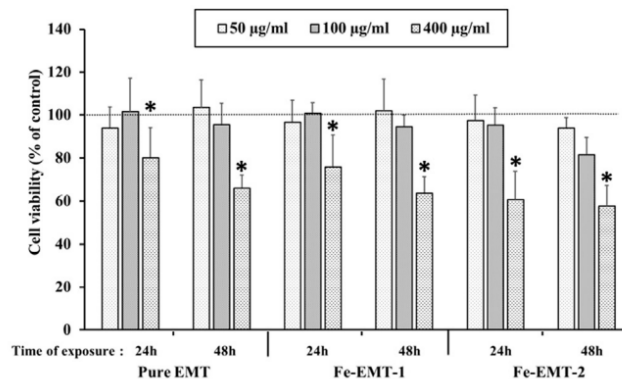


Fig. 9. Quantification of astrocytes viability after 24 and 48 h exposure to different concentrations of pure EMT, Fe-EMT-1 and Fe-EMT-2 zeolite samples. Cell viability was analysed using the WST-1 test. $N = 3$ for each conditions. A significant two-way ANOVA (Concentration effect $p < 0.001$; zeolite type $p < 0.001$; interaction $p < 0.05$) was used followed by an HSD-Tukey post-hoc test. * $p < 0.05$ vs 50 and 100 µg/ml.

4. Conclusions

The preparation of template free EMT type zeolite loaded with iron is presented. The high capacity of the iron containing zeolites for CO₂ is demonstrated. The safe nature of the zeolite nanoparticles (10–30 nm) with and without iron is proven by cytotoxicity measurements with a series of cells including two human cell lines, one originating from the brain U87-MG glioblastoma and one originating from the kidney HEK-293T. Interestingly, even with a primary astrocyte culture, the zeolite nanocrystals show only a slight decrease in cell viability at a very high dose (400 µg/ml) for both pure EMT and iron-loaded EMT zeolites. Thus, the iron containing zeolite nanoparticles are envisioned as effective NO and CO₂ carrier but also as an MRI contrast agent.

Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. These authors contributed equally: Veselina Georgieva, Clément Anfray.

Acknowledgment

The financial support provided by ZEOXY project (Conseil Régional de Basse Normandie) is acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.06.015>.

References

- [1] M.E. Davis, *Chem. Mater* 26 (2014) 239–245.
- [2] M.E. Davis, *Nature* 417 (2002) 813–821.
- [3] M. Hadzija, K. Pavelic, in: S.M. Auerbach, K.A. Carrado, P.K. Dutta (Eds.), *Handbook of Zeolite Science and Technology*, CRC Press, New York, 2003, pp. 1141–1172.
- [4] N. Vilaça, R. Amorim, A.F. Machado, P. Parpot, M.F.R. Pereira, M. Sardo, J. Rocha, A.M. Fonseca, I.C. Neves, F. Baltazar, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 112 (2013) 237–244.
- [5] S. Mortazavi, A. Tavasoli, M. Atefi, N. Tanide, N. Radpey, P. Roshan-Shomal, H. Moradi, S. Taeb, *World J. Emerg. Med.* 4 (2013) 123–127.
- [6] L. Tosheva, V.P. Valtchev, *Chem. Mater* 17 (2005) 2494–2513.
- [7] S. Mintova, V. Valtchev, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 125 (1999) 141–148.
- [8] S. Mintova, J.-P. Gilson, V. Valtchev, *Nanoscale* 5 (2013) 6693–6703.
- [9] M.J. Harbottle, M.D. Mantle, M.L. Johns, R. van Herwijnen, A. Al-Tabbaa, T.R. Hutchings, A.J. Moffat, S.K. Ouki, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 3444–3448.
- [10] S. Mintova, M. Jaber, V. Valtchev, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 7207–7233.
- [11] S. Mintova, J.-P. Gilson, V. Valtchev, *Nanoscale* 5 (2013) 6693–6703.
- [12] V. Valtchev, L. Tosheva, *Chem. Rev.* 113 (2013) 6734–6760.
- [13] L.C.J. Thomassen, D. Napierska, D. Dinsdale, N. Lievens, J. Jammaer, D. Lison, C.E.A. Kirschhock, P.H. Hoet, J.A. Martens, *Nanotoxicol* 6 (2012) 472–485.
- [14] T. Kihara, Y. Zhang, Y. Hu, Q. Mao, Y. Tang, J. Miyake, J. Biosci. Bioeng. 111 (2011) 725–730.
- [15] A. Petushkov, J. Intra, J.B. Graham, S.C. Larsen, A.K. Salem, *Chem. Res. Toxicol.* 22 (2009) 1359–1368.
- [16] M. Rahimi, E.-P. Ng, K. Bakhtiari, M. Vinciguerra, H.A. Ahmad, H. Awala, S. Mintova, M. Daghighi, F. Bakshandeh Rostami, M. de Vries, M.M. Motazacker, M.P. Peppelenbosch, M. Mahmoudi, F. Rezaee, *Sci. Rep.* 5 (2015) 17259.
- [17] S. Laurent, E.-P. Ng, C. Thirifays, L. Lakiss, G.-M. Goupil, S. Mintova, C. Burtea, E. Oveisi, C. Hébert, M. de Vries, M.M. Motazacker, F. Rezaee, M. Mahmoudi, *Toxicol. Res. (Camb)* 2 (2013) 270.
- [18] J.L. Lievens, J.P. Verduijn, A.-J. Bons, W.J. Motier, *Zeolites* 12 (1992) 698–705.
- [19] F. Delprato, L. Delmotte, J.L. Guth, L. Huve, *Zeolites* 10 (1990) 546–552.
- [20] F. Dougnier, J. Patarin, J.L. Guth, D. Anglerot, *Zeolites* 12 (1992) 160–166.
- [21] B.L. Su, D. Barthomeuf, *Appl. Catal. A Gen.* 124 (1995) 73–80.
- [22] B.L. Su, J.-M. Manoli, C. Potvin, D. Barthomeuf, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89 (1993) 857.
- [23] J. Kecht, Z. Tahri, V. De Waele, M. Mostafavi, S. Mintova, T. Bein, *Chem. Mater* 18 (2006) 3373–3380.
- [24] I. Yordanov, R. Knoerr, V. De Waele, P. Bazin, S. Thomas, M. Rivallan, L. Lakiss, T.H. Metzger, S. Mintova, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 20974–20982.
- [25] M. Rozic, *Water Res.* 34 (2000) 3675–3681.
- [26] P. Saint-Cricq, Y. Kamimura, K. Itabashi, A. Sugawara-Narutaki, A. Shimojima, T. Okubo, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012 (2012) 3398–3402.
- [27] T. Frising, P. Leflaive, *Microporous Mesoporous Mater* 114 (2008) 27–63.
- [28] O.G. Nik, B. Nohair, S. Kaliaguine, *Microporous Mesoporous Mater* 143 (2011) 221–229.
- [29] Z. Tahri, F. Luchez, I. Yordanov, O. Poizat, A. Moissette, V. Valtchev, S. Mintova, M. Mostafavi, V. De Waele, *Res. Chem. Intermed.* 35 (2009) 379–388.
- [30] S. Demirci, Z. Ustaoglu, G.A. Yilmazer, F. Sahin, N. Baç, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 1652–1662.
- [31] M. Rivallan, G. Ricchiardi, S. Bordiga, A. Zecchina, *J. Catal.* 264 (2009) 104–116.
- [32] E. Kikuchi, K. Yogo, S. Tanaka, M. Abe, *Chem. Lett.* 20 (1991) 1063–1066.
- [33] G. Vorbeck, M. Richter, B. Parltitz, E. Schreier, K. Szulzewsky, B. Zibrowius, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 65 (1991) 631–644.
- [34] Q. Kan, Z. Wu, R. Xu, X. Liu, S. Peng, *J. Mol. Catal.* 74 (1992) 223–231.
- [35] T. Inui, M. Hirokazu, Y. Osamu, N. Hideo, F. Koichi, U. Takayo, M. Akira, *J. Catal.* 98 (1986) 491–501.
- [36] G.I. Panov, G.A. Sheveleva, A.S. Kharitonov, V.N. Romannikov, L.A. Vostrikova, *Appl. Catal. A Gen.* 82 (1992) 31–36.
- [37] A.S. Kharitonov, G.A. Sheveleva, G.I. Panov, V.I. Sobolev, Y.A. Paukshtis, V.N. Romannikov, *Appl. Catal. A Gen.* 98 (1993) 33–43.
- [38] G. Spoto, A. Zecchina, G. Berlier, S. Bordiga, M. Clerici, L. Basini, *J. Mol. Catal. A Chem.* 158 (2000) 107–114.
- [39] Z.-X. Gao, Q. Sun, W.M.H. Sachtler, *Appl. Catal. B Environ.* 33 (2001) 9–23.
- [40] I. Malpartida, E. Ivanova, M. Mihaylov, K. Hadjiivanov, V. Blasin-Aubé, O. Marie, M. Daturi, *Catal. Today* 149 (2010) 295–303.
- [41] S. Wagloehner, J.N. Baer, S. Kureti, *Appl. Catal. B Environ.* 147 (2014) 1000–1008.
- [42] P.S. Metkar, N. Salazar, R. Muncrief, V. Balakotaiah, M.P. Harold, *Appl. Catal. B Environ.* 104 (2011) 110–126.
- [43] M.V. Parfenov, E.V. Starokon, S.V. Semikolenov, G.I. Panov, *J. Catal.* 263 (2009) 173–180.
- [44] J. Cao, X.-W. Liu, R. Fu, Z. Tan, *Sep. Purif. Technol.* 63 (2008) 92–100.
- [45] X. Chen, K.F. Lam, Q. Zhang, B. Pan, M. Arruebo, K.L. Yeung, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 9804–9813.
- [46] M. Mahmoudi, H. Hofmann, B. Rothen-rutishauser, A. Petri-fink, *Chem. Rev.* 112 (2011) 2323–2338.
- [47] I. Bresinska, K.J.J. Balkus, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 12989–12994.
- [48] V. Mahendran, J. Philip, *Langmuir* 29 (2013) 4252–4258.
- [49] M. Mahmoudi, S. Laurent, M.A. Shokrgozar, M. Hosseinkhani, *ACS Nano* 5 (2011) 7263–7276.
- [50] Y. Miyamoto, Y. Koshidaka, H. Noguchi, K. Oishi, H. Saito, H. Yukawa, N. Kaji, T. Ikeya, H. Iwata, Y. Baba, K. Murase, S. Hayashi, in: R. Nagarajan (Ed.), *Nanomaterials for Biomedicine*, American Chemical Society, Washington DC, 2012, pp. 191–208.
- [51] E.-P. Ng, J.-M. Goupil, A. Vicente, C. Fernandez, R. Retoux, V. Valtchev, S. Mintova, *Chem. Mater* 24 (2012) 4758–4765.
- [52] A. Kaasik, V. Veksler, E. Boehm, M. Novotova, R. Ventura-Clapier, *FASEB J.* 17 (2003) 708–710.
- [53] T. Kuzniatsova, Y. Kim, K. Shqau, P.K. Dutta, H. Verweij, *Microporous Mesoporous Mater* 103 (2007) 102–107.
- [54] G. Huang, J. Diakur, Z. Xu, L.I. Wiebe, *Int. J. Pharm.* 360 (2008) 197–203.
- [55] D. Das, G. Ravichandran, D.K. Chakrabarty, S.N. Piramanayagam, S.N. Shringi, *Appl. Catal. A Gen.* 107 (1993) 73–81.
- [56] T. Belin, C. Mve Mfoumou, S. Mignard, Y. Pouilloux, *Microporous Mesoporous Mater* 182 (2013) 109–116.
- [57] O. Cheung, Z. Bacsik, Q. Liu, A. Mace, N. Hedin, *Appl. Energy* 112 (2013) 1326–1336.
- [58] G. Ramis, G. Busca, V. Lorenzelli, *Mater. Chem. Phys.* 29 (1991) 425–435.
- [59] L. Aparicio, W.K. Hall, S.-M. Fang, M.A. Ulla, W.S. Millman, J.A. Dumesic, *J. Catal.* 246 (1987) 233–246.
- [60] E. Ivanova, M. Mihaylov, K. Hadjiivanov, V. Blasin-Aubé, O. Marie, A. Plesniar, M. Daturi, *Appl. Catal. B Environ.* 93 (2010) 325–338.
- [61] M. Mihaylov, E. Ivanova, N. Drenchev, K. Hadjiivanov, *J. Phys. Chem. C* 114 (2010) 1004–1014.
- [62] K. Hadjiivanov, E. Ivanova, R. Kefirov, J. Janas, A. Plesniar, S. Dzwigaj, M. Che, *Microporous Mesoporous Mater* 131 (2010) 1–12.
- [63] A.D. Carbó, *Electrochemistry of Porous Materials*, CRC Press, 2009.
- [64] N. Bayat, V.R. Lopes, J. Schölermann, L.D. Jensen, S. Cristobal, *Biomater* 63 (2015) 1–13.
- [65] L. Shang, K. Nienhaus, G.U. Nienhaus, *J. Nanobiotechnol.* 12 (2014) 1–11.

2. ETUDE DE L’AFFINITE DES ZEOLITHES DE TYPE FAU VIS-A-VIS DE L’OXYGENE ET DU CO₂

La deuxième partie de l’étude s’est focalisée sur les nanocristaux de type FAU et l’effet de l’incorporation d’ions gadolinium et fer sur leur capacité d’adsorption de l’oxygène et du CO₂.

Avant de détailler les résultats, il peut être utile de noter que deux types d’adsorption existent en fonction de la nature des interactions entre la molécule adsorbée et la surface de l’espèce adsorbante : la physisorption et la chimisorption. La physisorption met en jeu des liaisons de faible énergie, la structure de l’atome ou de la molécule adsorbée étant ainsi peu perturbée. Elle est observée à des températures relativement basses et la liaison est généralement facilement rompue. Au contraire, la chimisorption met en jeu des énergies de liaison importantes de type covalente ou ionique et implique de ce fait un profond changement dans la structure électronique de la molécule adsorbée. Elle est ainsi plus difficilement réversible (Belin *et al.* 2013).

a) Capacité de sorption du CO₂

Dans un premier temps, la capacité de sorption des zéolithes vis-à-vis du CO₂, avec ou sans incorporation de gadolinium, a été évaluée par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, *Fourier Transform InfraRed spectroscopy*). Cette technique permet de déterminer la composition d’un échantillon grâce à l’analyse de la quantité d’énergie absorbée à chaque longueur d’onde d’un faisceau de lumière infrarouge. Le spectre obtenu présente des bandes d’absorption pour certaines longueurs d’ondes caractéristiques de la présence de composés moléculaires particuliers. Les spectres infrarouges ont été enregistrés à température ambiante et sous vide pour des zéolithes exposées à une faible pression en CO₂ (1,8 mmHg) pendant 3 min et 60 min. Deux régions du spectre, situées à 2400-2200 cm⁻¹ et 1800-1000 cm⁻¹, sont prises en compte. Elles correspondent respectivement aux deux types d’adsorption du CO₂, la physisorption et la chimisorption (Belin *et al.* 2013).

Un pic intense est ainsi observé à 2352 cm⁻¹ et correspond au CO₂ physisorbé. L’aire sous la courbe du pic permet de quantifier et d’établir des comparaisons entre les différents types de zéolithes (**Figure 66**). Les résultats mettent en évidence que l’incorporation de gadolinium dans les nanozéolithes diminue la quantité de CO₂ pouvant être physisorbée de près de 2 fois par rapport aux zéolithes Na-X (**Figure 66A&B**). L’incorporation de fer diminue légèrement la physisorption après 3 min mais n’a en revanche pas d’influence significative après 60 min (**Figure 66C**). Ces résultats montrent

également que l'adsorption de CO₂ est très rapide puisqu'après seulement 3 min, la quantité de CO₂ adsorbée est déjà sensiblement équivalente à celle obtenue après 60 min.

De plus, des pics d'une intensité plus faible sont observés à 1705, 1648 et 1362 cm⁻¹. Ces pics sont attribués à des espèces carbonées issues d'une perturbation de la structure électronique du CO₂ par chimisorption (Ramis *et al.* 1991). De manière intéressante, les spectres ne sont pas identiques entre les zéolithes Na-X, Fe-X et Gd-X, le pic à 1705 cm⁻¹ est par exemple absent pour les zéolithes Gd-X. De la même manière que pour le CO₂ physisorbé, l'introduction de Gd-X dans les zéolithes diminue la quantité de CO₂ adsorbé par chimisorption et cette adsorption est très rapide (**Figure 66B**). L'incorporation de fer ralentit légèrement la cinétique de chimisorption et diminue légèrement la quantité finale de CO₂ chimisorbé (**Figure 66C**).

L'incorporation de gadolinium dans les nanozéolithes entraîne donc une diminution de la capacité d'adsorption du CO₂ alors que le fer n'a que peu d'effet.

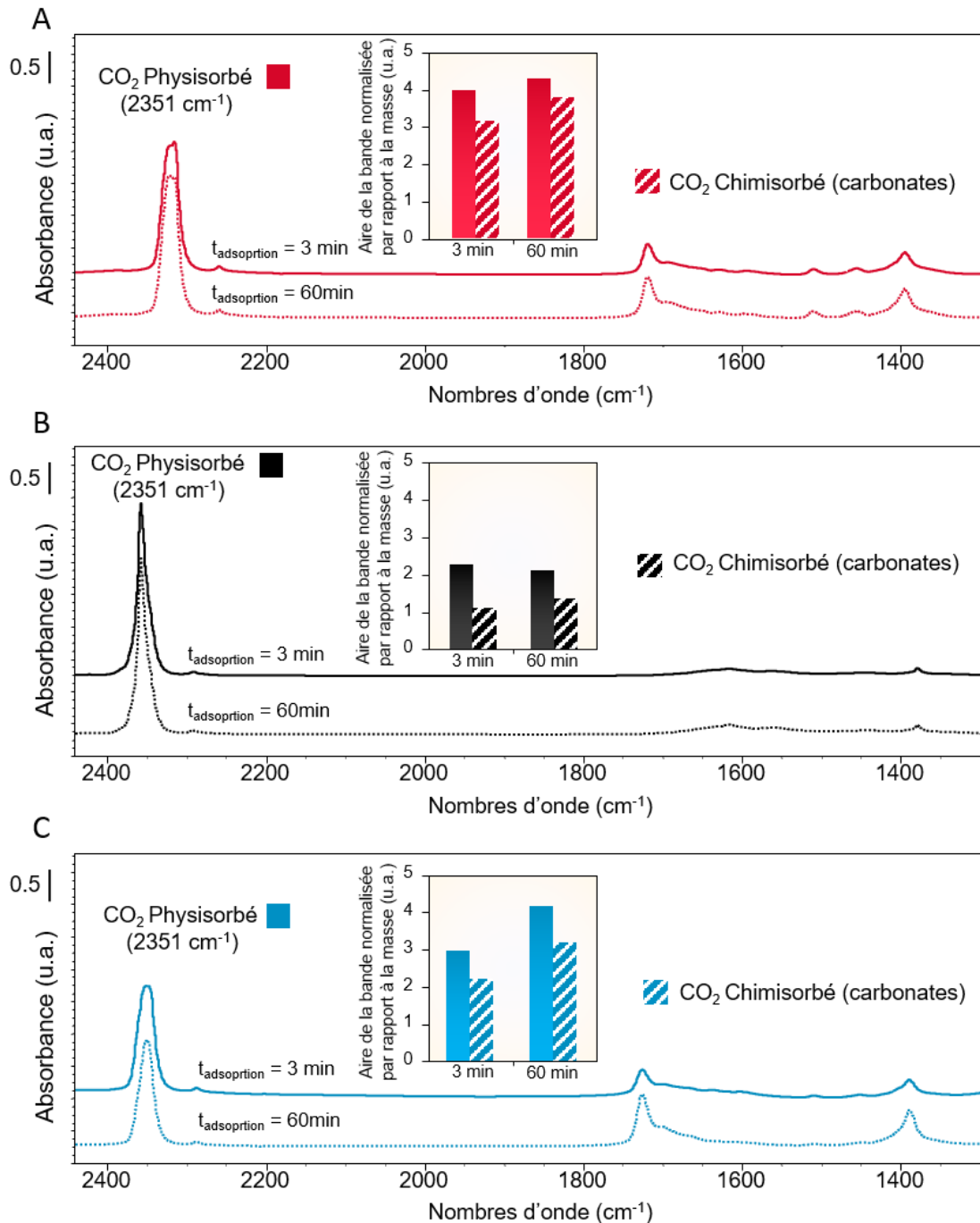


Figure 66 | Capacité de sorption des zéolithes Na-X, Gd-X et Fe-X vis-à-vis du CO₂. Spectre FTIR et aire normalisée des bandes (en insert) correspondant au CO₂ **physisorbé** et **chimisorbé** par les zéolithes Na-X (**A**), Gd-X (**B**) et Fe-X (**C**) après 3 min et 60 min d'adsorption de CO₂ à une pression de 1,8 mmHg.

b) Capacité de sorption de l'O₂

La cinétique d'adsorption de l'oxygène sur les zéolithes Na-X, Gd-X et Fe-X a été étudiée par spectroscopie FTIR. L'adsorption de l'O₂ est plus rapide dans les zéolithes contenant du gadolinium ou du fer par rapport aux zéolithes Na-X, d'après la pente des

courbes d'adsorption. C'est-à-dire que l'adsorption d'O₂ dans ces zéolithes nécessite une pO₂ plus faible. De plus, la quantité d'oxygène adsorbée est plus importante de près de 70% dans les zéolithes Fe-X par rapport aux zéolithes Na-X (**Figure 67**).

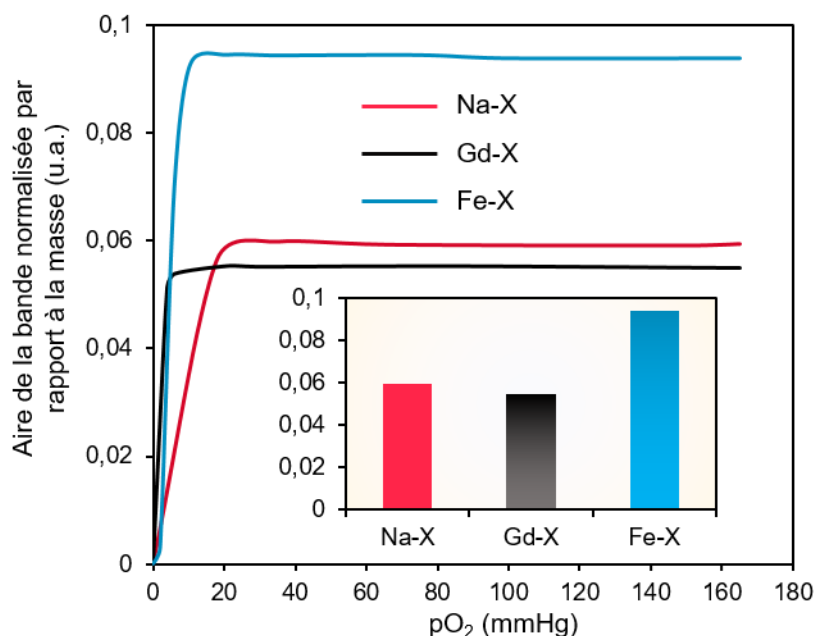


Figure 67 | Capacité de sorption des zéolithes Na-X et Gd-X vis-à-vis de l'oxygène. Evolution de l'aire de la bande du spectre FTIR correspondant à l'O₂ physisorbé par les zéolithes Na-X (a) et Gd-X (b) en fonction de la pression en O₂. *Insert:* Aire normalisée par rapport à la masse de la bande à une pression de 70 mmHg d'O₂.

c) Etude de la libération de l'oxygène

Les nanozéolithes ont une bonne capacité de sorption vis-à-vis de l'oxygène et l'incorporation de fer permet de l'augmenter. Cependant, dans le cadre d'applications de réoxygénation tissulaire, ce processus de sorption doit être réversible. En d'autres termes, le gaz transporté dans la zéolithe doit pouvoir être libéré.

La capacité des zéolithes à libérer l'oxygène a donc été évaluée. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques, l'expérience a été conduite en milieu aqueux, dans du tampon phosphate à pH 7,4 et à 37°C, et à un pourcentage d'oxygène de 0,1% dans une enceinte hermétique. Les nanozéolithes chargées en oxygène ont ensuite été injectées dans ce système anoxique et la concentration en O₂ a été mesurée au cours du temps (**Figure 68A**).

Les résultats montrent que le témoin, constitué d'eau saturée en oxygène, est par lui-même capable d'apporter de l'oxygène dans le système. La quantité d'oxygène augmente au maximum de $2,82 \pm 0,13$ fois par rapport à la ligne de base après l'injection d'eau saturée. Le milieu de dispersion des zéolithes constitue donc par lui-même un réservoir d'oxygène. Cependant, lorsque les zéolithes non modifiées (Na-X) chargées en O₂ sont injectées, la quantité d'oxygène apportée dans le système est significativement plus élevée par rapport au témoin puisque la concentration augmente au maximum de 3,13

$\pm 0,14$ fois par rapport à la ligne de base (**Figure 68B**). Ces résultats montrent que les zéolithes en suspension dans l'eau constituent donc un réservoir en oxygène supplémentaire, mobilisable en condition d'hypoxie.

Les nanozéolithes contenant du gadolinium et du fer ont également été évaluées. Les résultats montrent que l'ajout de gadolinium ne modifie pas significativement la quantité d'O₂ libérée par rapport aux zéolithes Na-X (3,30 et 3,11 respectivement). En revanche, l'ajout de fer dans les zéolithes augmente fortement leur capacité à libérer de l'oxygène. La concentration en oxygène augmente ainsi au maximum de $4,76 \pm 0,38$ fois par rapport à la ligne de base (**Figure 68B**).

Concernant la cinétique de libération du gaz, le profil est sensiblement le même pour les quatre conditions. La libération du gaz intervient très rapidement, le maximum est atteint environ 2 min après l'injection dans le système puis la concentration diminue lentement, probablement du fait de fuites dans l'enceinte.

Plusieurs éléments pourraient intervenir dans le contrôle de la libération de l'oxygène. Parmi ceux-ci, nous avons émis l'hypothèse que c'est le gradient d'oxygène entre les zéolithes et leur environnement qui pourrait contrôler en partie cette libération. Afin de déterminer si ce gradient d'oxygène influence la cinétique et la quantité d'oxygène libérée, la même expérience a été réalisée avec les zéolithes Na-X en variant le pourcentage en oxygène initial du système. Les expériences ont ainsi été réalisées à 21, 5, 1 et 0,1% d'oxygène. Les résultats montrent que plus le pourcentage en oxygène du milieu externe est élevé, moins la quantité d'oxygène libérée par les zéolithes est importante. La concentration en oxygène augmente au maximum de $0,05 \pm 0,03$, $0,46 \pm 0,07$, $2,67 \pm 0,11$ et $3,13 \pm 0,14$ fois par rapport à la ligne de base à 21, 5, 1 et 0,1% d'oxygène respectivement. De plus, si l'on s'intéresse à la pente de la partie initiale de la courbe, on remarque que celle-ci est plus élevée à mesure que le pourcentage en oxygène diminue ($0,04$; $0,21$; $0,55$ et $0,82$ à 21, 5, 1 et 0,1% d'oxygène respectivement). La vitesse et la quantité d'oxygène libérée sont donc plus importantes quand la pression en oxygène extérieure est faible (**Figure 68C**).

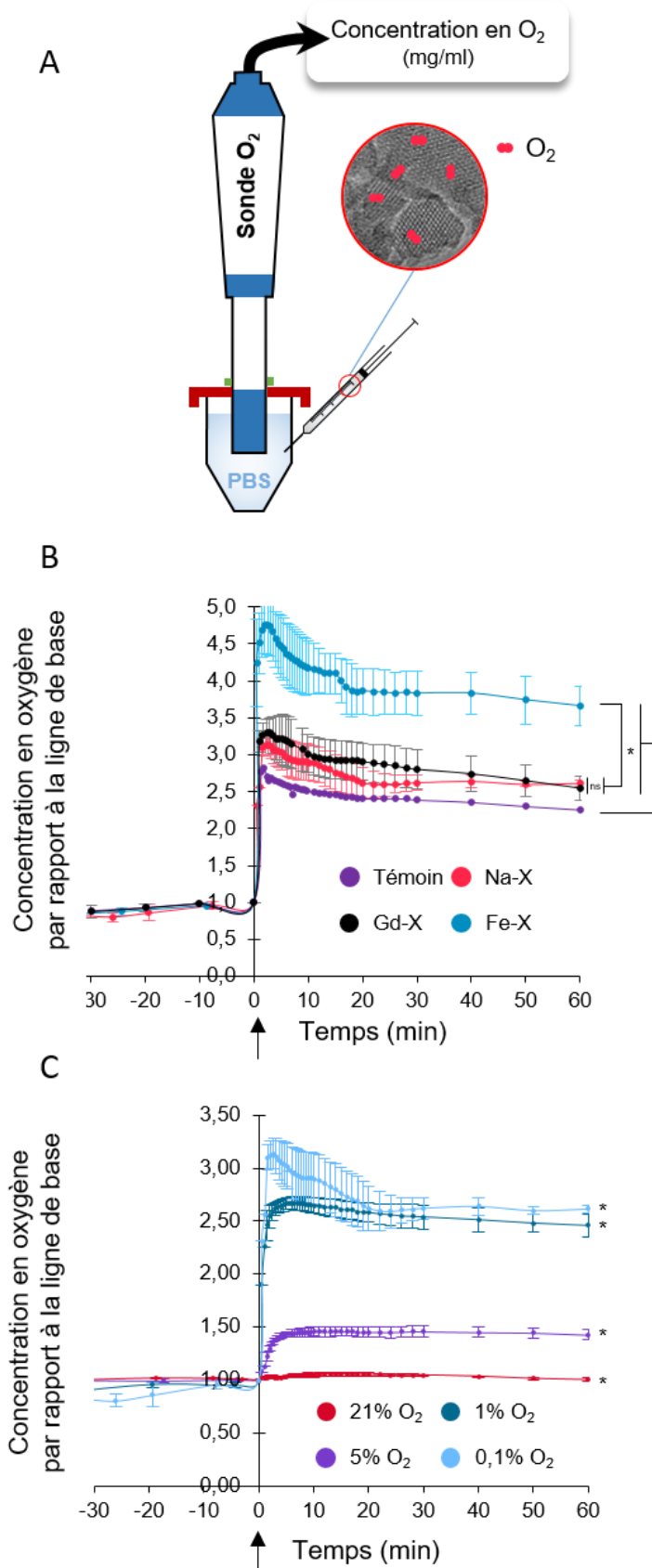


Figure 68 | Libération de l'oxygène par les nanocristaux de zéolithes.

A. Schéma représentatif du protocole utilisé. Les nanozéolithes saturées en oxygène sont injectées dans une enceinte hermétique contenant du PBS (*Phosphate Buffered Saline*) à 21, 5, 1 ou 0,1% d'oxygène, à 37°C et à pH 7,4. La concentration en oxygène du milieu est mesurée avant et après l'injection des zéolithes dans le système à l'aide d'une sonde. **B.** Quantification de la concentration en oxygène au cours du temps. Un volume de 500 µl de zéolithes Na-X, Gd-X et Fe-X saturées en oxygène ou d'eau pure saturée en oxygène en tant que témoin a été injecté dans un volume de PBS de 12 ml. La flèche indique le moment de l'injection. *Moyenne ±SEM, N=3. Test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test HSD de Tukey (*p<0,05). **C.** Quantification de la concentration en oxygène au cours du temps. Un volume de 500 µl de zéolithes Na-X saturés en oxygène ou d'eau pure saturée en oxygène en tant que témoin a été injecté dans un volume de PBS de 12 ml à 21, 5, 1 ou 0,1% d'oxygène. La flèche indique le moment de l'injection. Moyenne ±SEM, N=3. Test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test HSD de Tukey (*p<0,001 par rapport aux autres groupes).

3. CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Cette étude met en évidence la possibilité de moduler la capacité de transport de gaz des zéolithes en jouant sur les modifications post-synthèse. **Il est ici montré que l'ajout de fer permet d'augmenter significativement la capacité de sorption des nanozéolithes vis-à-vis des gaz, et notamment le CO₂ et de l'O₂.**

Concernant la libération des gaz, la fraction d'oxygène chimisorbée semble difficile à mobiliser compte tenu de la force des liaisons mises en jeu. Néanmoins, la fraction physisorbée peut quant à elle être libérée de façon beaucoup plus aisée. Cette libération intervient très rapidement, en quelques minutes, après que les zéolithes chargées en gaz sont injectées dans un système anoxique et le gradient d'oxygène existant entre les zéolithes et le milieu influence la cinétique et la quantité d'oxygène libérée. Plus la pression en oxygène de l'environnement est faible, plus la vitesse et la quantité d'oxygène libéré sont importantes.

De manière intéressante, les résultats concernant la caractérisation chimique de la sorption d'oxygène par les zéolithes, obtenus par spectroscopie FTIR sont retrouvés dans l'étude de la libération du gaz, réalisée dans des conditions plus proches de la physiologie (milieu aqueux, 37°C, pH 7,4). En effet, la spectroscopie FTIR permet de montrer que ce sont les zéolithes contenant du fer qui possèdent la meilleure capacité de sorption vis-à-vis de l'oxygène. Les analyses de la libération de l'O₂ montrent que ce sont ces mêmes zéolithes qui permettent la libération la plus importante de ce gaz. Il pourrait également être intéressant de réaliser des analyses plus quantitatives de la libération d'oxygène en utilisant notamment la résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'Oxygène 17.

C. UTILISATION DE NANOZEOLITHES X CONTENANT DES ATOMES METALLIQUES POUR DIMINUER L'HYPOXIE DANS DES TUMEURS CEREBRALES AGRESSIVES (ARTICLE 3)

1. AVANT-PROPOS DE L'ARTICLE 3

La troisième partie de cette étude est consacrée à l'évaluation de la capacité de réoxygénation des nanozéolithes vectrices de thérapies gazeuses vis-à-vis des GB. Les études préliminaires concernant la toxicité et la capacité de sorption des gaz ont permis d'éliminer les types de zéolithes et les modifications post-synthèses qui n'étaient pas appropriées pour cette application et de sélectionner les plus performants.

Dans cette étude, le choix s'est ainsi porté sur des nanozéolithes de type Faujasite (FAU) (Awala *et al.* 2015). Deux modifications y ont été apportées en ajoutant des atomes

de Fer ou de Gadolinium par échange d'ions. La caractérisation des nanozéolithes a permis de montrer que l'échange d'ion n'a aucune influence sur la taille, la morphologie, la charge ou la structure des particules. La suite de l'étude s'est intéressée aux capacités de vectorisation de CO₂ et de carbogène des nanozéolithes dans un modèle de GB. Pour cela, l'IRM multiparamétrique a été utilisée afin de mesurer simultanément les modifications de volume sanguin (CBV) et de saturation en O₂ (SatO₂) *in vivo*. Ainsi, malgré le fait que les zéolithes contenant du fer soient les plus performantes vis-à-vis du transport et de la libération de CO₂ et d'O₂ (**Figure 68**), celles-ci n'ont pas été utilisées pour ne pas créer d'interférence avec l'agent de contraste à base de fer utilisé dans le protocole d'imagerie (**Figure 54**). A la place, les nanozéolithes contenant du gadolinium ont été utilisées pour évaluer leur potentiel usage théranostique. Les résultats montrent que les nanozéolithes transportant du CO₂ permettent d'augmenter le CBV dans la tumeur par rapport au tissu sain. Après une injection intraveineuse, ces nanozéolithes semblent libérer une partie de leur contenu en CO₂ dans la circulation sanguine. Cependant, la présence de gadolinium permet de les suivre par IRM et de montrer qu'elles s'accumulent préférentiellement dans la tumeur, ce qui résulterait en une libération plus importante de gaz dans la tumeur et en cette augmentation de CBV dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain. La vectorisation de carbogène montre quant à elle des effets plus limités. Au-delà du cerveau, les nanozéolithes s'accumulent également dans des organes périphériques comme la rate et le foie après avoir quitté le sang en moins d'une heure. Enfin, elles ne semblent pas présenter de toxicité importante à la fois *in vivo* et *in vitro*. Cette étude démontre qu'une utilisation théranostique des nanozéolithes en tant que vecteurs de gaz est envisageable.

2. **ARTICLE 3**

**“Metal containing nanosized zeolites applied to alleviate hypoxia in
aggressive brain tumors”**

Clément Anfray, Sarah Komaty, Moussa Zaarour, Kamila Goldyn, Aurélien Corroyer-
Dulmont, Clélia Allieux, Jérôme Toutain, Karim Bordji, Myriam Bernaudin, Omar Touzani,
Svetlana Mintova and Samuel Valable.

To be submitted

**METAL CONTAINING NANOSIZED ZEOLITES APPLIED TO ALLEVIATE
HYPOXIA IN AGGRESSIVE BRAIN TUMORS**

Anfray C¹, Komaty S², Zaarour M², Goldyn K², Corroyer-Dulmont A¹, Allioux C¹, Toutain J¹, Bordji K¹, Bernaudin M¹, Touzani O¹, Mintova S² and Valable S¹.

¹*Normandie Univ. UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group. 14000 Caen, France.*

²*Laboratoire Catalyse et Spectrochimie (LCS), Normandie Université, CNRS, ENSICAEN, 6 boulevard du Maréchal Juin, 14050 Caen, France.*

Corresponding author : Dr Samuel Valable

UMR 6301-ISTCT, GIP Cyceron

Bd Henri Becquerel, BP 5229, 14074 Caen Cedex

Phone: 33 2 31 47 01 08

E-mail: valable@cyceron.fr

Keywords: Glioblastoma, FAU nanosized zeolites, oxygenation

Despite an aggressive conventional therapy for the treatment of glioblastoma (GB), the most devastating primary brain tumor¹, recurrence inevitably occurs and the survival median of patients remains around 15 months². Hypoxia is one of the main causes of resistance to treatments in solid tumors such as GB. Approaches that aim to reduce hypoxia in tumors are highly desired.

Although breathing a mixture composed of 5% CO₂ balanced in 95% oxygen (Carbogen) was thought to alleviate tumor hypoxia, the overall results were unsatisfactory in terms of sensitization to radiotherapy in brain tumors³⁻⁴. Using multiparametric magnetic resonance imaging (MRI) to simultaneously assess cerebral blood volume (CBV) and tissue oxygenation, we recently demonstrated that carbogen rather increased the CBV and the oxygenation in the healthy tissue but not in the tumor⁵. Therefore, it is necessary to develop a way to precisely deliver a hyperoxic gas into the hypoxic tumor.

To target specifically the tumor, nanoparticles (NP) are investigated as vectors of contrast agents and anti-cancer compounds⁶⁻⁷. One of the reasons for using NP is their preferential delivery to tumors through the enhanced permeability and retention effect (EPR) which is due to the abnormal organization and structure of the tumor vasculature leading to leaky vessels and the lack of functional lymphatic vessels⁸.

Among nanoparticles, zeolites, which possess exceptional selective sorption properties are now increasingly considered for biomedical use. According to the new definition, zeolites refers to any silica-based crystalline microporous solid in which some of the silicon is replaced by other elements (T): trivalent elements T = Al, Fe, B, Ga, etc., or tetravalent T = Ti, Ge, etc. Zeolites have regular framework structures composed of cages and pores with various size and shape⁹. Depending on the Si/T molar ratio, the materials are classified in two groups: zeolites with Si/T < 500 and zeosils with the Si/T > 500. The interest in the preparation of zeolites with nanosized dimensions has gradually increased, but only 20 from the 235 structures known to date have so far been synthesized with nanosized dimensions and stabilized in colloidal suspensions¹⁰. The regular porous structure of zeolites opened to the exterior allows adsorption and desorption of guest molecules, rendering them real molecular sieves and hosts the encapsulation of different guest molecules including NO, CO₂ and O₂¹¹⁻¹². Besides, the tunable chemical composition of these highly crystalline materials provides a high stability in acidic and alkaline media.

Herein, we present an original approach to specifically and efficiently deliver oxygen and/or carbon dioxide to tumor to further improve oxygenation and /or blood content by processing of highly microporous nanosized materials. Various cations, such as

gadolinium (Gd) and iron (Fe) have been added to the structure via ion-exchange in the nanosized zeolite crystals. The main physicochemical properties of the zeolite nanocrystals are presented in **Figure 1**.

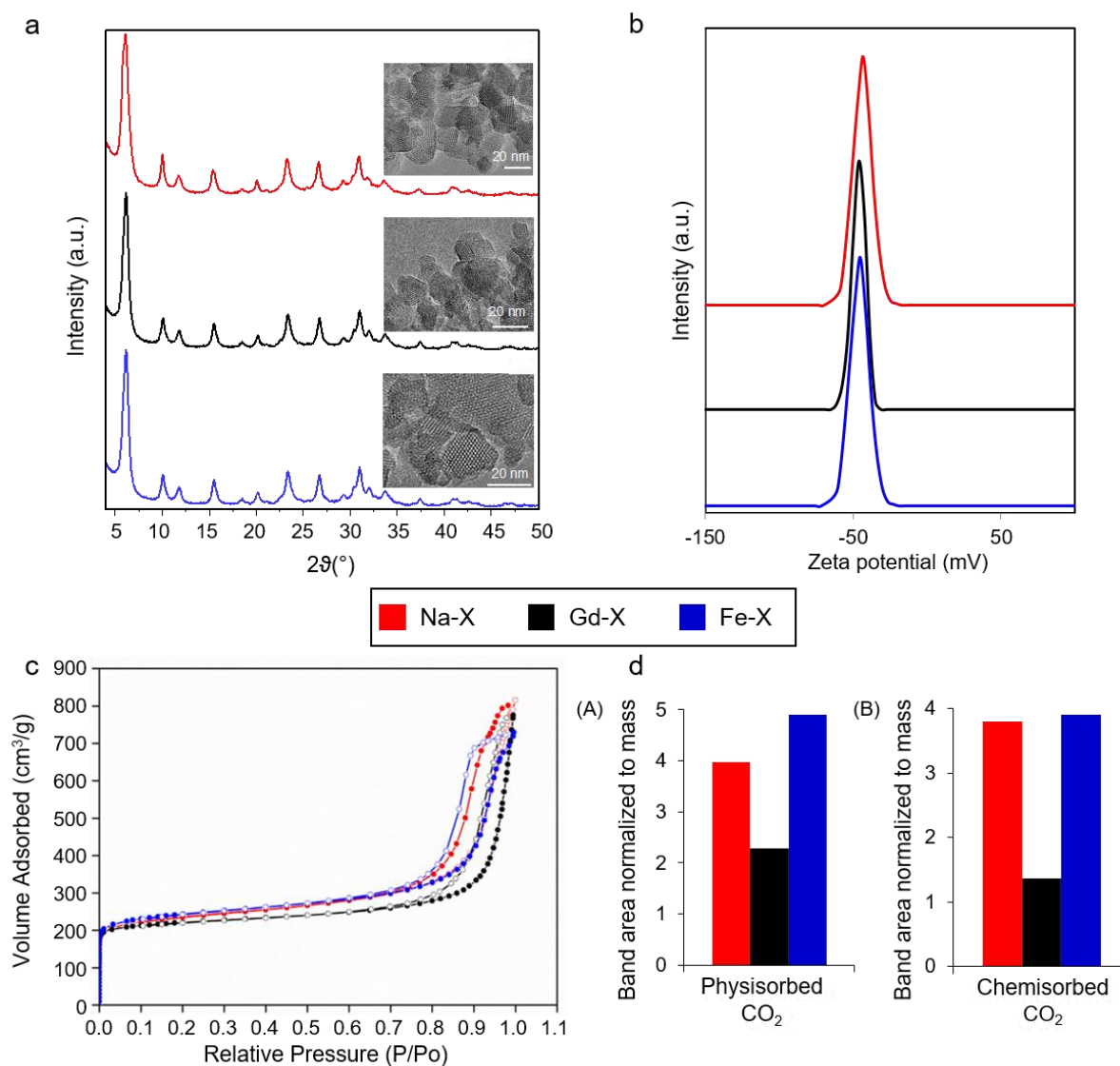


Figure 1 | Main physicochemical properties of zeolite nanocrystals: (a) XRD patterns of Na-X, Gd-X, and Fe-X zeolites; *Inset:* TEM images of Na-X and Gd-X, and Fe-X. (b) Zeta potential curves of Na-X, Gd-X, and Fe-X zeolite suspensions. (c) Nitrogen adsorption/desorption isotherms of Na-X, Gd-X, and Fe-X zeolite suspensions. (d) CO₂ physisorbed (A) and chemisorbed (B) measured at 298 K on Na-X, Gd-X, and Fe-X zeolite samples.

Nanosized zeolite as a gas carrier specifically oriented to the tumor

In order to evaluate the functional benefit of using zeolite nanoparticles as gas carrier, multiparametric MRI in a rat orthotopic model of GB was employed. The changes in cerebral blood volume (CBV) following an intravenous (IV) injection of Gd-X carrying CO₂

was quantified as a readout of vasodilation. Results reveal an increase in CBV inside the tumor compared to the healthy tissue (**Fig 2a, b**) leading to a difference of 15% between the two tissues after 15 min from the injection of Gd-X carrying CO₂. Water saturated with CO₂, which served as a control, only moderately increased CBV in the tumor compared to the healthy tissue (**Fig 2a, b**).

Upon replacing pure CO₂ of the first test by Carbogen (5% CO₂ and 95% O₂) to simultaneously increase CBV and tissue oxygenation, the difference between the healthy and tumor tissue was decreased to 5.36% (**Fig 2a, c**).

The tissue saturation in oxygen (SatO₂) before and after injection of Gd-X zeolite suspension carrying CO₂ or carbogen was quantified to verify a possible reoxygenation of the tumor (**Fig. 2a-c**). With Gd-X zeolites carrying CO₂ or carbogen, the Δ SatO₂ between the tumor and the healthy tissue increased by 3.62% and 2.07% respectively but was not significantly different from the control.

Further, the release of gas in the blood was studied by monitoring the arterial partial pressure of CO₂ (paCO₂) after injection of Gd-X loaded with CO₂ (**Fig. 2d**). An increase in the paCO₂ by 4 mmHg was observed reaching a peak after 10min, simultaneously followed by a slight acidification (**Fig. 2e**). Importantly, these changes were not identified for the experiments carried out with pure water saturated with CO₂ and pure Gd-X zeolite suspension. These results clearly show an increase in the paCO₂ that should lead to a vasodilation and changes in blood flow. Dynamic BOLD MRI was consequently performed and the changes in the signal of large vessels such as the venous sinus were analyzed to assess a modification of the blood flow. While the breathing of 5% of CO₂ (used as a control) induced an increased in the BOLD signal of $7.06 \pm 2.25\%$, the intravenous injection of nanosized zeolites carrying CO₂ resulted in an increase in the BOLD signal of $5.05 \pm 2.65\%$. Injection of water saturated with CO₂ or nanosized zeolites without CO₂ did not modify the BOLD signal (**Fig. 2f**). **Based on these findings, we propose that a release of gas occurs into the systemic circulation, however, the specific accumulation of nanosized zeolites into the tumor tissue may be sufficient to successfully deliver gas within the tumor which in turn increases blood volume and oxygenation.** These results further suggest that nanosized zeolites accumulate specifically within the tumoral tissue, while they were not available in the healthy brain.

To further confirm this hypothesis, we investigated the distribution of Gd-X zeolite crystals in the brain after an intravenous injection, The nanosized zeolites with average size of 15-20 nm and surface charge (ζ) of -37.7 mV (Supplementary **Table Sa** and **Fig. Sa**), are likely to extravasate and accumulate in the tumor tissue but not to cross the blood brain

barrier¹³ To verify this assumption, dynamic T1-weighted MRI was used to detect Gd-X after an IV injection (**Fig. 2g, h** and **Fig. Sb**). A hyper-signal appears inside the tumor, the difference between the T1-w images acquired before and after the injection attests that the Gd-X zeolite crystals efficiently reached the tumor and not the surrounding healthy tissue (**Fig. 2g**). Based on the quantification of the intensity of the signal with time, it can be concluded that the increase of the signal is slightly delayed, and it occurs after 30 s from the injection of Gd-X zeolite suspension. The maximum increase of the signal (3.67 ± 1.36 %) was reached 100s after the injection (**Fig. 2h**). Thus, the location of the Gd-X zeolite nanocrystals specifically in the brain tumors has been evidenced.

Functional effect of nanosized FAU-X carrying hyperoxic gases in the tumor

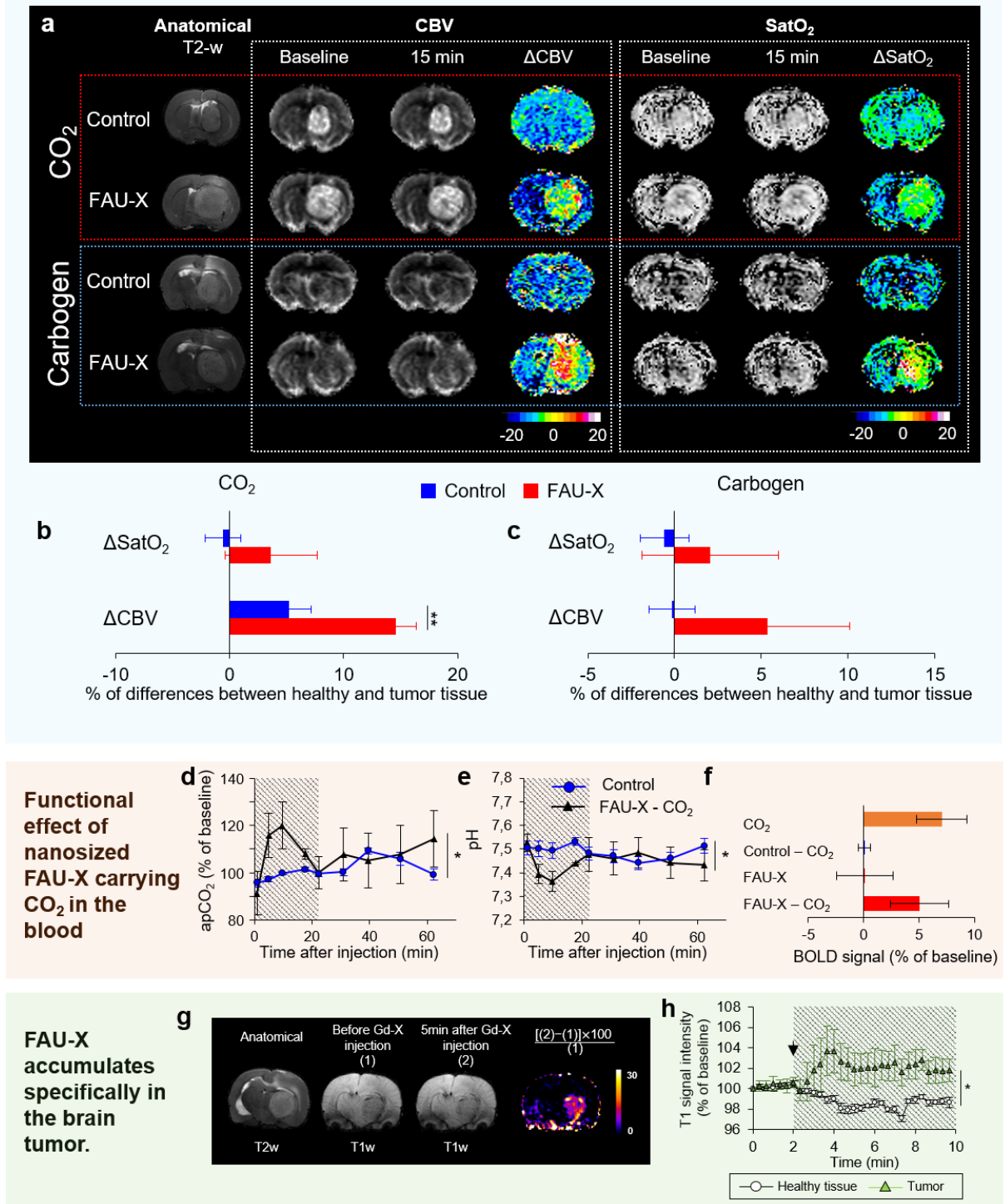


Figure 2 | FAU-X carrying hyperoxic gases influence CBV and SatO₂ in the tumor. (a) Representatives CBV and SatO₂ maps, obtained before and 15 min after an intravenous injection of Gd-X carrying CO₂ solution, T2-w anatomic image of the corresponding tumor and a map of the differences of signal between the two maps (ΔCBV and ΔSatO₂ respectively). Control consisted of an injection of H₂O saturated with CO₂ or Carbogen. (b, c) Quantification of the ΔCBV and ΔSatO₂ between the healthy and the tumor tissue in percentage. Mean ±SEM, n=5 for control groups; n=8 for FAU-X-CO₂ group; n=5 for FAU-X-Carbogen group (*p<0.02; **p<0.0001, following an ANOVA).

(d, e) Evolution over the time of the pCO₂ and the pH respectively in the blood of healthy Wistar rats following injection of a solution of Gd-X carrying CO₂ or H₂O saturated with CO₂ as a control. Mean ±SEM, n=5 per group (*p<0.05, following a two-way ANOVA). (f) BOLD signal measured in the venous sinus of healthy Wistar rats 3 min following an intravenous injection of Gd-X carrying CO₂. Mean ±SEM, n=5. (g) Representatives T1-w images acquired before (1) or 5 min after (2) intravenous injection of 300 µl of a Gd-X solution ; T2w anatomic image of the corresponding tumor (left) and a map of the differences of signal between the two T1-w images (right). (h) Quantification over the time of the T1-w signal intensity in the healthy and the tumor tissue following an intravenous injection of 300 µl of a Gd-X solution (1%). The arrow indicates the time of injection. Mean ±SEM; n=5. Two-way ANOVA (*p<0.0001, tissue effect and time effect). See also movies in figure S2.

It is important to note that the gadolinium was in a very low concentration exchange in the zeolite nanocrystals (1.24 wt. %), and is still adequate detectable with MRI (**SI Table S1**). Indeed, the r1 parameter of the Gd-X nanosized zeolites (measured at 7 teslas and room temperature) was 74.2 mM⁻¹.s⁻¹ which is higher than Dotarem[®] (4.03 mM⁻¹.s⁻¹), a FDA (Food and Drug Administration) approved gadolinium-based MRI contrast agent, measured in the same conditions (**Fig. Sc**). **Thus, the quantity of gadolinium in the Gd-X injected to obtain an equivalent signal to the classical Dotarem[®] is lower, which is due to a better access of water molecules to gadolinium atoms.** This is of great importance in a context of concerns that are now being raised about the stability of gadolinium chelates complex currently in use, and a link with suspected adverse effects as well as accumulation of gadolinium in various tissues including the brain¹⁴.

Overall, the new data show the ability of nanosized zeolites to carry CO₂ or carbogen resulting in functional effects on blood volume and oxygenation between the healthy and the tumor tissue.

Biodistribution of the nanosized zeolites

The next step of this study was dedicated to biodistribution assays. Gd-X zeolite suspensions were intravenously injected in healthy rats, and blood samples were collected at various times before and after the injection. The quantification of the Gd-X zeolite nanocrystals in the blood was performed through the detection of gadolinium with ICP-AES (**Fig. 3a**). The blood half-life of Gd-X zeolite crystals was calculated to be approximately 12 min, which is consistent with the maximum increase in paCO₂ (**Fig. 2d**).

To further characterize the biodistribution of the nanosized zeolites iron instead of gadolinium was introduced in the zeolite by ion exchange, which enables their detection in the tissues using Perl's staining. The ion exchange of zeolite with iron (Fe) did not change the properties of the nanocrystals including their size, shape and surface charge

(**Fig. 1, Table Sa**). The nanosized crystals with average particle size of 15-20 nm (**Fig. 1a**) tends to agglomerate in bigger entities (**Fig. Sa**) preserving completely their surface properties (**Fig. Sd**) (zeta potential values varied from -43 to -40 mV, **Fig. 1b**). Histological analyses revealed that the injected Fe-X is cleared from the blood and is accumulated preferentially in the spleen and the liver. In contrast, **no accumulation in the healthy brain was detected (Fig 3b)**.

Toxicity of nanosized zeolites in living animals.

Although some studies revealed a potential toxicity of nanosized zeolites¹⁵⁻¹⁷, possible adverse effects of Gd-X have not been investigated, especially in the context of the brain. Therefore, the potential adverse effect associated with a chronic injection of nanosized zeolites was studied. The nanosized zeolites were injected to mice for five consecutive days, for a total dose of 5 mg per mouse (**Fig. 3c**). The weight curves of the animals under injection of nanosized zeolites did not encounter a relevant change compared to the control (mice with injection of pure water). Independently from the group considered, mice gained 7g (37% of their initial weight) during the time of the experiment.

These results evidently suggest no adverse effects of nanosized zeolites on rodents. To further confirm this finding, the Gd-X nanosized zeolites suspension was then injected intravenously to a non-human primate, and physiology was monitored especially for arterial blood pressure. A slight decrease in arterial blood pressure was observed following the injection, from 63.11 mmHg to 42.08 mmHg, nevertheless, it was fully reversed in less than 2 min (**Fig. 3d**).

These results support the absence of acute and chronic toxicity of zeolites nanocrystals applied to living animals.

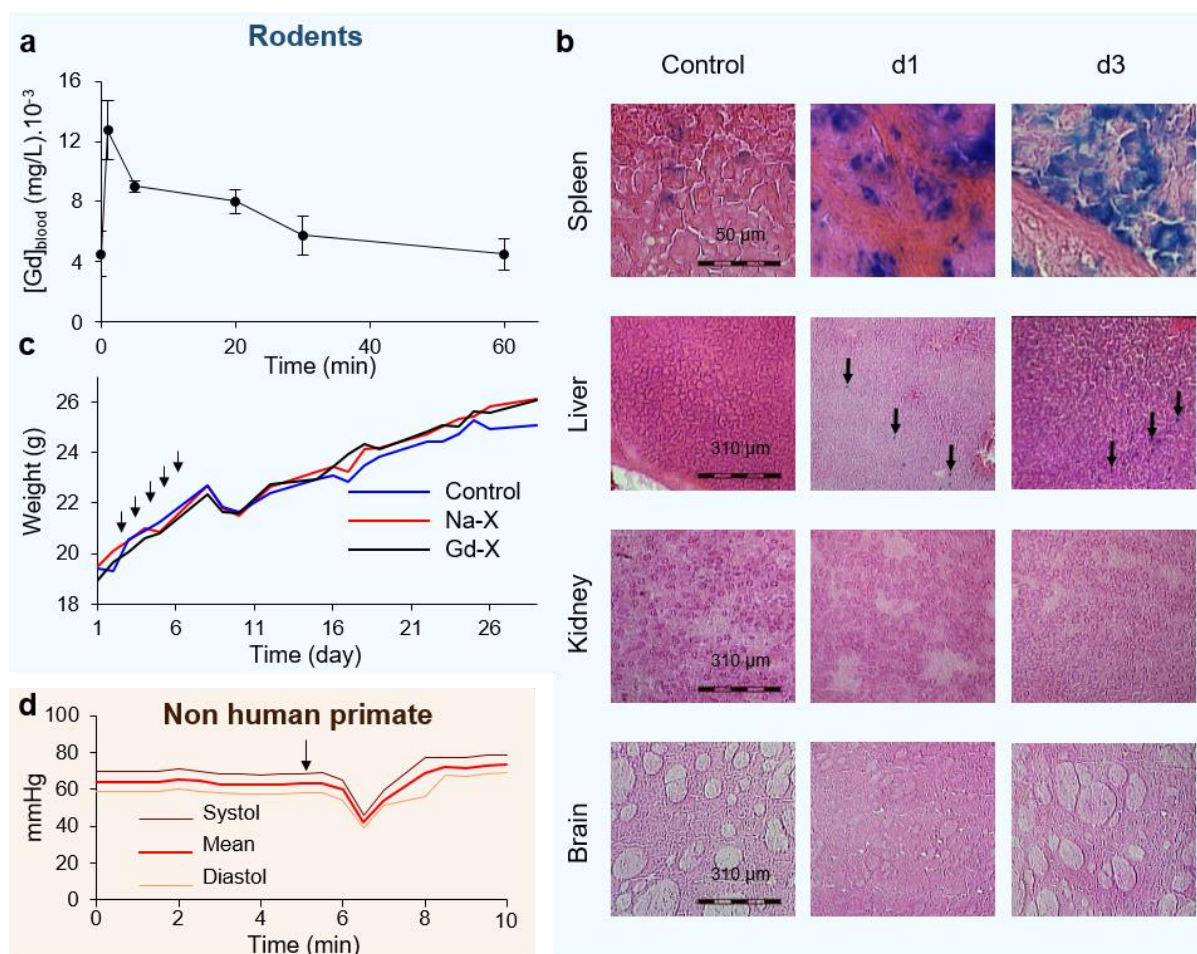


Figure 3 | FAU-X are found in the spleen, the liver and not in the healthy brain but do not influence physiology in rodents and monkeys. (a) Quantitative measure of gadolinium content in the blood at different time points following an intravenous injection of Gd-X. Mean \pm SEM; n=4. (b) Prussian blue staining after eosin counterstaining on spleen, liver, kidney and brain sections taken from a control rat, or 1 and 3 days after an injection of Fe-X zeolites. Blue spots in Prussian blue-stained images indicate iron. Pink eosin staining refers to cytosol. Representative examples from three independent experiments. (c) Weight curves of Swiss mice following injections (IP) of Na-X and Gd-X zeolites or saline as a control during 5 consecutive days (from day 1 to day 5, represented with arrows). Mean; n=4 per group. (d) Arterial pressure of a marmoset after an intravenous injection of Gd-X carrying CO₂ (arrow indicates the time of injection).

Assessment of possible *in vitro* cell damage induced by nanosized zeolites.

To verify that nanosized zeolites do not induce any *in vitro* cell damage, multiple cell types originating from various organs, namely, mouse brain endothelial cells (bEnd.3 cell line), mouse astrocytes and neurons (primary culture), human glioma cells (U87-MG), and HEK 293 cell line (cells derived from the human kidney), were exposed to nanosized zeolites. Na-X, Fe-X and Gd-X zeolite suspensions with concentrations ranging from 1 μ g/ml to 100

$\mu\text{g/ml}$ for 48h (**Fig. 4a**). A slight dose-dependent decrease in cell viability following the exposure to concentrations exceeding 10 $\mu\text{g/ml}$ for all cell types was observed, except for the U87-MG cells whatever the concentration used. Neurons appeared to be the most sensitive cell type since the maximum loss in cell viability ($65.8 \pm 2.1\%$) was achieved when exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ of Na-X. The presence of gadolinium did not induce any further toxicity relative to the original Na or Fe cations no matter the cell type and the concentration used. (**Fig. Se**). These results show that a dramatic effect of nanosized zeolites on the cell viability can be utterly excluded.

To further analyze whether the nanosized zeolites are harmless, we focused on cell lines, because of their high proliferative rates. The effect of nanosized zeolites on the cell cycle of U87-MG and HEK 293 cells was assessed using flow cytometry after exposure to 100 $\mu\text{g/ml}$ of Na-X and Gd-X for 14h and 48h, while water was used as a control (**Fig. 4b**, quantifications are provided in **Fig. Se**). No difference of the cell distribution in the different phases of cell cycle between the control group and cells exposed to nanosized zeolites was noticed (Na-X, Fe-X or Gd-X) for both cell types and for the two exposure times.

Genotoxic effects of nanosized zeolites

A potential genotoxic effect of nanosized zeolites using an immunofluorescent labeling of γH2AX as a marker of DNA double strand breaks and a micronucleus formation assay as a marker of mitotic death was investigated. Both the U87-MG and HEK 293 cells were exposed to 100 $\mu\text{g/ml}$ suspensions of zeolite nanocrystals for various times. U87-MG cells showed almost no γH2AX positive cells for control conditions and after exposure to Na-X, Gd-X, and Fe-X suspensions. A slight decrease in the marker was observed after 24h of experiment at all conditions. HEK 293 cells exhibited a higher proportion of γH2AX positive cells compared to the U87-MG cells, and the percentage of γH2AX positive cells slightly increased after 24 and 72h of experiment. However, no change in the proportion of the γH2AX positive cells after exposure to the Na-X, Fe-X and Gd-X zeolite suspensions as compared to the control condition are detected (**Fig. 4c**). These results are also supported by the micronuclei formation assay. Both for the U87-MG and HEK 293 cells, the number of cells forming micronucleus was below 10% no matter the duration of the experiment. Furthermore, there is no significant increase in the formation of micronuclei after exposure to the Na-X, Fe-X and Gd-X zeolite suspensions in comparison to the control sample (**Fig. 4d**). **In term of DNA damage, our results clearly show that the Na-X, Fe-X and Gd-X zeolite suspensions do not have a genotoxic effect.**

Overall the results clearly indicate the absence of acute toxicity of zeolite nanocrystals in different cationic forms (Na-X, Fe-X and Gd-X) *in vitro* on a wide range of cell types.

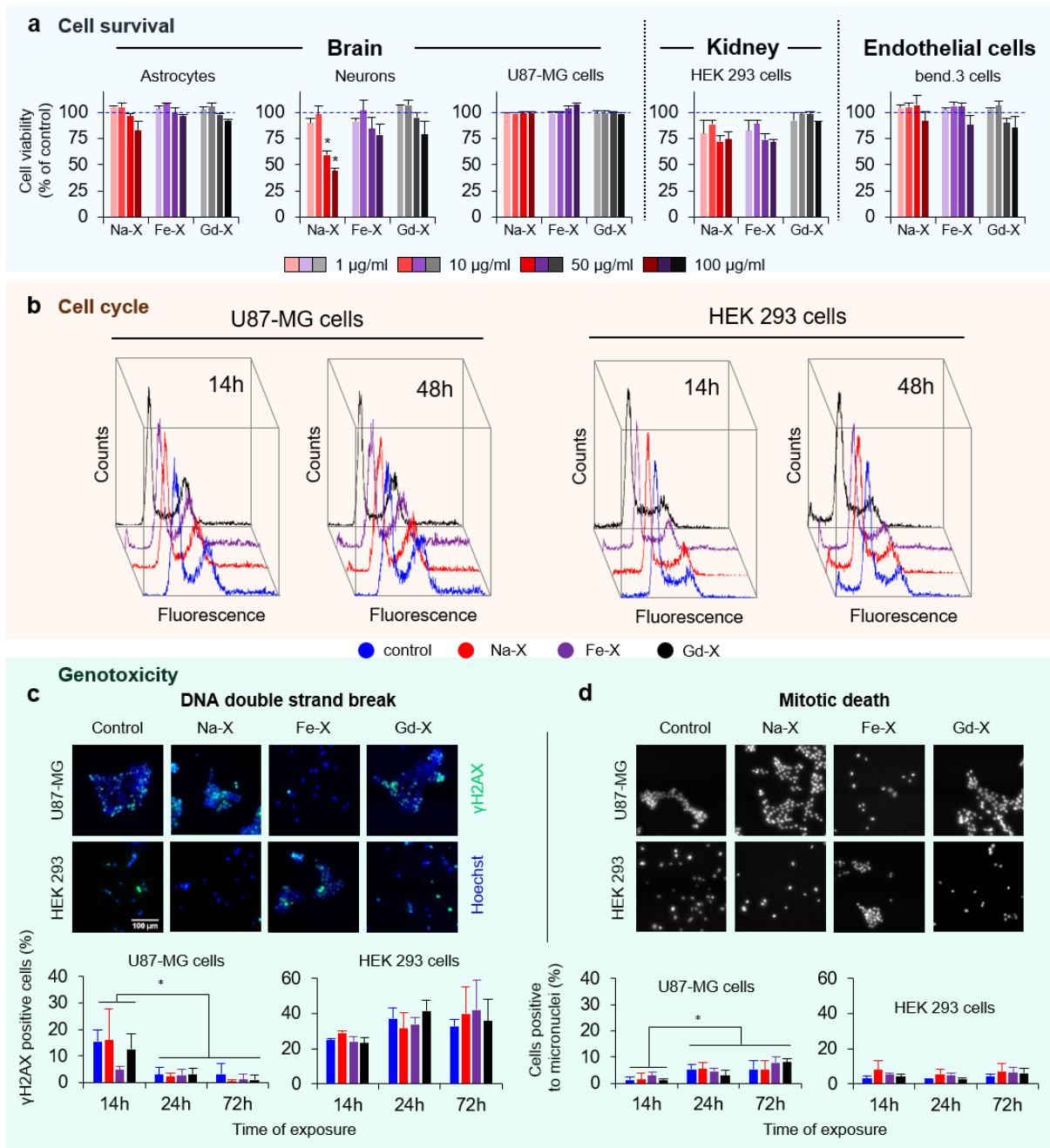


Figure 4 | FAU-X do not influence cell survival, cell cycle nor genome stability *in vitro*. (a) Quantification of astrocytes, neurons, U87-MG, HEK 293 and Bend3 cells viability following a 48h exposure from 1 to 100 µg/ml of Na-X, Fe-X or Gd-X zeolites. Cell viability was assessed using WST-1 test. Mean ±SD, n=3; HSD Tuckey post-hoc test after a significant two-way ANOVA (*p<0.05 vs control, a significant dose effect vs control (p<0.001) is obtained for astrocytes (dose 100µg/ml), neurons (dose 50 and 100µg/ml), bend.3 (dose 100µg/ml) and HEK 293 cells (dose 100 µg/ml)). (b) Cell cycle analysis by flow cytometry. Representative profiles from 3 independent experiments of U87-MG and HEK 293 cells distribution in the phases of cell cycle after a 14 or 48h exposure to 100 µg/ml of Na-X, Fe-X, Gd-X or water as a control. (c) Representative photographs of DNA double-strand breaks on U87-MG and HEK 293 cells identified with γH2AX immunostaining

(green) 14h after an exposure to 100 µg/ml of zeolites. Cell nuclei were identified with Hoechst 33342 staining (blue). Quantification 14, 24 or 72h after an exposure to 100 µg/ml of zeolites. The proportion of γH2AX positive cells was measured relative to total cell number counted by Hoechst 33342 staining. Mean ± SD, n=3 (3 different experiments, 1 coverslip for each experiment, 5 representative fields per coverslip). HSD Tuckey post-hoc test after a significant two-way ANOVA (*p<0.0001). (d) Representative photographs of micronuclei formation on U87-MG and HEK 293 identified with Hoechst 33342 staining to determine mitotic death 72h after an exposure to 100 µg/ml of zeolites. Quantification of micronuclei 14, 24 or 72h after an exposure to 100 µg/ml of zeolites. The proportion of micronuclei positive cells was measured relative to total cell number counted by Hoechst 33342 staining. Mean ± SD, n=3 (3 different experiments, 1 coverslip for each experiment, 5 representative fields per coverslip). HSD Tuckey post-hoc test after a significant two-way ANOVA (*p<0.0002).

Conclusions

Hypoxia represents an independent poor prognostic factor for solid tumors, and therefore strategies aiming on alleviating of this phenomenon are exceedingly desired.

Here we present the first results on using zeolite nanoparticles as a specific carrier of hyperoxic gases acting as a vasoactive agent to increase both the blood and the oxygen supply for reoxygenation of glioblastoma. The nanosized zeolites loaded with CO₂ or carbogen successfully increased blood volume and oxygenation in the tumor tissue relative to the healthy tissue. Moreover, the low amount of Gd introduced in the zeolite nanoparticles was used as contrast agent that allows the visualization of the tumor area. The specific accumulation of the Gd-X zeolites nanocrystals in the tumor was determined by MRI. The MRI was applied to screen the release of the gas (CO₂ and O₂) within the tumor, and not in the surrounding healthy tissue (**Fig. 5**). The absence of toxicity *in vitro* and *in vivo* of the nanosized zeolites was undoubtedly confirmed.

Therefore, the theranostic use of nanosized zeolites has a great potential. Now, nanoparticles containing gadolinium are undergoing a phase I clinical trials as a theranostic tool to increase the efficiency of radiotherapy¹⁸. In the future, nanosized zeolites loaded with Gd would be applied. Moreover, hypoxia is a well-known factor of resistance to radiotherapy. It would be interesting to use Gd-X carrying carbogen to reoxygenate tumor before radiotherapy, thus bringing specifically to the tumor site two factors known to increase the efficacy of radiotherapy, (i) high-Z containing elements and (ii) oxygen, with specific delivery improved by the increase in CBV due to the presence of CO₂.

The current results verify the development of creative strategy using nanosized zeolites to target specifically brain tumors.

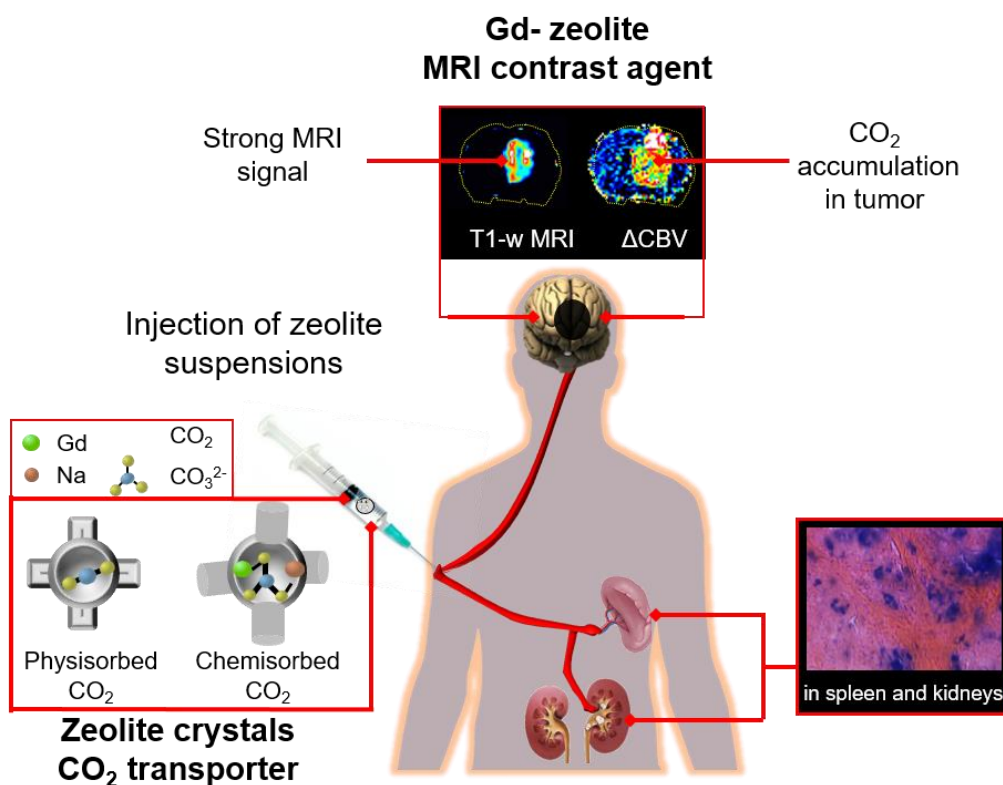


Figure 5 | Schematic representation of the study.

Methods

Synthesis and characterization of nanosized FAU types zeolites.

Materials

Al powder (325 mesh, 99.5 %, Alfa Aesar).

NaOH (Sigma-Aldrich, 97 %).

SiO₂ (Ludox-HS 30, 30 wt. % SiO₂, pH=9.8, Aldrich).

Double distilled (dd) water.

Preparation of nanosized faujasite X (Na-X) type zeolite

Stable suspensions of discrete nanosized zeolite (Na-X framework zeolite type) from colloidal precursor suspension under hydrothermal condition is prepared according to a recently published procedure¹⁹. The as-prepared precursor suspension for Na-X zeolite was aged at room temperature for 24 hours prior dehydration using freeze dried method followed by hydrothermal treatment at 50 °C for 26 h. After the hydrothermal treatment, the zeolite nanoparticles were purified by six steps centrifugation (24.500 rpm, 45 min) and redispersed in double distilled water.

Ion exchange of nanosized faujasite X (Na-X) type zeolite

The as-prepared zeolite suspensions were ion exchanged by gadolinium (III) nitrate hexahydrate ($\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) and iron nitrate nonahydrate $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

25 mL of $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ or $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (3 mM) were added on 5 mL of Na-X suspension (2.5 %). The solutions were then kept under stirring at room temperature for 1 h and then washed by double distilled water. This procedure was repeating three times to obtain finally the suspensions of Gd-X and Fe-X zeolite.

Powder X-ray diffraction (XRD) analysis

Powder samples were measured using a PANalytical X'Pert Pro diffractometer with CuK α monochromatized radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$). The samples were scanned in the range 4-50 $^\circ 2\theta$ with a step size of 0.02 $^\circ$.

Transmission electron microscopy (TEM)

The crystal size, morphology and crystallinity of sample were determined by a transmission electron microscopy (TEM) using a JEOL 2010 FEG and a FEI LaB6 TECNAI G2 30UT operated at 200 kV and 300 kV, respectively. Energy Dispersive Spectrometer (EDS) coupled with both microscopes was used to determine the chemical composition of the zeolite nanocrystals.

Dynamic light scattering (DLS) and zeta potential analysis

The hydrodynamic diameter of the zeolite nanoparticles in water was determined with a Malvern Zetasizer Nano. The analyses were performed on samples after purification with a solid concentration of 1 wt. %. Additionally, the surface charge of zeolite nanocrystals was determined by measuring the zeta potential value of the same suspensions.

N₂ sorption analysis

Nitrogen adsorption/desorption isotherms were measured using Micrometrics ASAP 2020 volumetric adsorption analyzer. Samples were degassed at 250 $^\circ\text{C}$ under vacuum overnight prior to the measurement. The external surface area and micropore volume were estimated by alpha-plot method using Silica-1000 (22.1 $\text{m}^2 \text{ g}^{-1}$ assumed) as a reference. The micropore and mesopore size distributions of solids were extracted from adsorption branch by the Nonlocal Density Functional Theory (NLDFT) and from the desorption branch using the Barret-Joyner-Halenda (BJH) algorithm, respectively.

In-situ adsorption of CO₂ on nanosized zeolites

Powder samples of as prepared and ion-exchanged zeolites were pressed ($\sim 10^7 \text{ Pa}$) into self-supported disks (2 cm^2 area, 20 $\text{mg} \cdot \text{cm}^{-2}$). IR spectra were recorded using a Nicolet 6700 IR spectrometer equipped with a mercury cadmium telluride (MCT) detector and an extended KBr beam splitter. Spectra were recorded in the 400–5500 cm^{-1} range at 4 cm^{-1}

with 128 scans. A homemade cell that can be evacuated or flooded with different gases and also heated up to 850 K was used. The activation of the samples was performed at 498 K for 2 h under vacuum. Various amounts of CO₂ were introduced into the cell and kept in equilibrium for 5 minutes before recording each spectrum. The spectra were collected using the plain zeolite spectrum as a background.

Cell lines

A human glioblastoma cell lines, U87-MG purchased from American Type Culture Collections (ATCC, Manassas, VA, USA) and HEK 293 cells (Human Embryonic Kidney cells) were used. Cells were cultured in DMEM (Sigma-Aldrich, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France).

Bend 3 mouse brain endothelial cells were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured in high glucose (4.5 g/l) DMEM (Sigma-Aldrich, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France). Cells were maintained in culture at 37°C with 5% CO₂ and 95% humidity.

Primary culture of astrocytes

Cerebral cortices were isolated from neonatal (1 to 3-day-old) mice (Swiss, CURB, France) carefully stripped of the meninges and dissociated to generate a single-cell suspension. Cultures were allowed to grow in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C to confluency (15-20 days) prior to use in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, France), 10% horse serum (Eurobio, France), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich, France) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, France). At about 80% confluence, the growth medium was replaced by the same medium.

Primary cultures of cortical neurons/astrocytes

Cultures were prepared from E15–E16 mouse embryos (Swiss mice, CURB, France). Microdissection of cortices was followed by a dissociation of the tissue in a 37°C DMEM (Sigma-Aldrich, France). Cells grew on plates coated with poly-d-lysine (0.1 mg/ml) and laminin (0.02 mg/ml) in DMEM supplemented with 5% fetal bovine serum, 5% horse serum (Eurobio, France), and 2 mm glutamine (Sigma-Aldrich, France). Cells were maintained in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Neurons were used after 12 d *in vitro*.

Cells exposure to nanosized zeolites

Cells were exposed to zeolites (Na-X used as a reference and Gd-X) for various times. Zeolites were diluted in culture medium at a concentration of 1, 10, 50 or 100 µg/ml and

added directly into the wells. The control condition consisted of an addition of pure water only into the wells with the same volume as for zeolites solutions.

Cells viability

Cells were seeded in 24-wells plates to achieve 80% confluency for the control on the day of the analysis. Cell viability was assessed 48h following exposure to zeolites with the WST-1 assay (Roche, France) according to manufacturer's instructions.

Cell cycle analysis

At various time points following cell exposure to 100 µg/ml of nanosized zeolites, cell cycle of U87-MG and HEK 293 cells was studied by flow cytometry with Coulter DNA Prep Reagents kit according to manufacturer's instructions (Beckman Coulter SAS, France). Propidium iodide staining was analysed using the Beckman Coulter's Gallios flow cytometer (Beckman Coulter SAS, France) with 10 000 events per determination. Analysis and determination of cell distribution in each phase of cell cycle was performed using the Kaluza software (Beckman Coulter SAS, France).

DNA double strands breakdown and micronuclei formation analysis by immunocytochemistry

Cells were plated in 24-well plates on coverslips and one day later were exposed to 100 µg/ml of zeolites for 14, 24 or 48h. The positive controls consisted of cells 30 min after irradiation with a dose of 4Gy (XRad225Cx, PXi, CYCERON platform). Cells were then fixed for 1h at 4°C with 4% PFA. Non-specific bindings were blocked with a solution of 3% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, France) -PBS-0.1% Tween (Sigma-Aldrich, France) for 1 hour at room temperature. Then, cells were incubated overnight at 4°C with a primary antibody. The following primary antibodies was used: phospho-histone H2AX (ser139) (1/200; Cell Signalling Technology, D175, 2577S) in 1% BSA-PBS-0.1% Tween. The revelation was achieved by an Alexa-555-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1/200; Molecular Probes, A21429). Cells were counterstained with Hoechst 33342 (10 µg/ml; Sigma-Aldrich, France) for nuclear staining. All immunocytochemistry markers were observed on a Leica DMI8 microscope with a 40X objective. For each condition, at least 3 coverslips were analyzed and images from 5 representative fields per slide were acquired.

Relaxometry

Gd-X nanocrystals were dissolved in distilled water in concentration ranging from 0.127 to 0.3175 mM in Gd. Solutions were placed in vials placed in a polystyrene support. MRI images of the phantoms were acquired at room temperature. MRI was performed on a 7 teslas horizontal magnet (Pharmascan, Bruker, Ettlingen). A cross coil configuration was used (volume/surface coil, Bruker, Ettlingen). For T1-weighted (T1w) images, a flow

sensitive alternating inversion recovery and rapid acquisition with relaxation enhancement (FAIR-RARE) sequence was used (TR: 780 ms, TE: 4.73 ms, TI: increasing from 6.16 ms to 750 ms following a geometrical function, RARE factor of 4, image matrix: 128 × 128, 1 slice with a thickness of 3 mm and total acquisition time of 16 min 38 sec). Image analysis was carried out with Bruker software Paravision (version 6.0.1), MATLAB R2012b software and imageJ (version 1.50f) software. The R1 value (inverse of the calculated T1 value) was plotted as a function of the Gd concentration for each experimental point, and the slope of the line corresponded to the compound relaxivity ($s^{-1} mM^{-1}$).

Ethical approval and animal issues

Animal investigations were performed under the current European directive (2010/63/EU) as incorporated in national legislation and in authorized laboratories (B14118001). Ethical approval was sought and obtained by the principal investigators (C.A and S.V.) from the French Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche (study authorization: N/04-01-13/04/01-16). The animals were obtained from an inhouse breeding stock at the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB, A14118015). The male athymic *nude* rats (250–300 g, three to four months) were maintained in specific pathogen free housing and were fed with γ -irradiated laboratory food and given water *ad libitum*.

Animals were manipulated under deep anaesthesia (5% isoflurane for induction, 2% for maintenance in 70% N₂O/30% O₂). Body temperature was monitored and maintained at 37.5±0.5°C with a feedback-controlled heating pad connected to a rectal probe.

Injection in healthy animals

Intraperitoneal injection of 100 μ l of a 1% solution of Na-X or Gd-X or water as a control were performed in Swiss mice (Janvier laboratory, France) for 5 consecutive days. Animals were weighted every day for 30 days. At the end of the experiment, the spleen, the liver and the kidneys were removed and weighted.

300 μ l of a 1% Fe-X solution or water as a control were intravenously injected in healthy Wistar rats (Charles-River laboratory, France). 1 or 3 days later, the liver, the spleen, kidneys and the brain were fixed and then cryoprotected by immersion in a 30% sucrose solution (Sigma, France) for 48 h, before storage at -80 °C. Fe-X crystals were detected on 20- μ m-thick slices using Prussian blue staining. Slices were incubated with 2% potassium ferrocyanide (Perl's reagent, Sigma, France) in 2% HCl, washed and counterstained with eosin.

A 1% solution of Gd-X was loaded with CO₂ and 300 µl of this CO₂-loaded Gd-X solution or water as a control were intravenously injected in healthy Wistar rats (Charles-River laboratory, France). Blood samples were then collected every 5 minutes via an arterial catheter and the CO₂ partial pressure and the pH of the collected sample was measured using a RapidLab 348 analyzer (Siemens, Germany).

Orthotopic glioma cells implantations

U87-MG cells were stereotactically injected into the caudatoputamen of rats. Briefly, animals were anesthetized, body temperature was monitored and maintained around 37.5°C. Rats were placed in a stereotactic head holder and a scalp incision was performed along the sagittal suture. A 1mm diameter burr hole was drilled in the skull. U87-MG cells (5.10⁴ cells in 3µl PBS-glutamine 2mM) were injected over 6 min via a fine needle (30G) connected to a Hamilton syringe. The injection site was the right caudatoputamen with stereotactic coordinates: AP=0, L=3 and D=6mm. The needle was then slowly removed and the craniotomy sealed.

Imaging experiments

For determination of tumor volume, Magnetic Resonance Imaging (MRI) experiments were done once a week. MRI was performed on a 7 teslas horizontal magnet (Pharmascan, Bruker, Ettlingen). A cross coil configuration was used (volume/surface coil, Bruker, Ettlingen). The tumor was detected using an accelerated T2w sequence (RARE, acceleration factor of 8; TR/ TE_{eff}=5000/62.5 msec; number of experiments (NEX=2; 20 contiguous slices; resolution=0.15 × 0.15 × 0.50 mm³, acquisition time=4 min). Tumor volumes were delineated manually with ImageJ software.

Detection of Gd-X with MRI

Experiments were performed on tumor bearing rats on a 7 teslas horizontal magnet (Pharmascan, Bruker, Ettlingen). After a scout view and a T2w-RARE8 scan, 300 µl of a 1% solution of Gd-X solution was administered intravenously and T2*w-EPI (TR/TE=20,000/12 ms, Number of EXcitation: NEX=3, 50 contiguous slices, resolution = 0.3×0.3×0.3 mm) or T1w-FLASH images (TR/TE_{eff}=500/10.32 ms; NEX=1; 10 slices; resolution=0.15×0.15×1.5 mm³; acquisition time=2 min,) were obtained prior to and every 2 min following the injection.

Fractional cerebral blood volume maps

For the imaging protocol, after a scout view and a T2w-RARE8 scan, fractional cerebral blood volume (fCBV) was measured at equilibrium as previously described(Chakhoyan et al. 2016). Prior to the injection of the contrast agent, five T2*w (TR=20,000 ms, Number of EXcitation: NEX=3, 50 contiguous slices, resolution = 0.3×0.3×0.3 mm) and four T2w

(TR=20,000 ms, NEX=3) images (echo planar imaging: EPI) were acquired with various echo times (TE for T2*=12, 15, 18, 21, and 24 ms and for T2w=40, 60, 80, and 100 ms, respectively). An intravenous administration of P904[®] (200 mmol.kg⁻¹, Guerbet Research) was performed and T2*w images (TE=12 ms) were acquired before and every 5 min for 1h after intravenous administration of 300µl of gas loaded Gd-X (1%). Consequently, for each animal, fCBV maps were obtained under two conditions: baseline and after administration of gas loaded Gd-X. Image analysis was performed with in-house developed macros based on the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2014) as previously described⁵.

Following the injection, the T2* signal in the healthy and tumor tissue decreased for all groups. This was certainly due to an elimination of the contrast agent used in the protocol for the quantitative measure, resulting in an artefactual decrease of the CBV. Therefore, we were interested in the comparison with the control group. Thus, the data were standardized against this control group.

Oxygen saturation maps

Oxygen saturation (SMRIO₂) maps were derived from the equation published by Christen and Lemason. Briefly, SMRIO₂ maps were calculated as a function of the T2*w signal after correction of inhomogeneities of magnetic field (B₀), blood volume fraction, and T2 effects. SMRIO₂ maps before and after administration of gas loaded Gd-X were generated for each animal.

Statistical analyses

Data are presented as mean ±SD or SEM. Statistical analyses were obtained with JMP programs (SAS Institute).

References

1. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **131**, 803–820 (2016).
2. Chinot, O. L. *et al.* Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370**, 709–722 (2014).
3. Kaanders, J. H., Bussink, J. & van der Kogel, A. J. ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy. *Lancet Oncol.* **3**, 728–737 (2002).
4. van der Maazen, R. W. M. *et al.* Conventional radiotherapy combined with carbogen breathing and nicotinamide for malignant gliomas. *Radiother. Oncol.* **35**, 118–122 (1995).
5. Chakhoyan, A. *et al.* Carbogen-induced increases in tumor oxygenation depend on the vascular status of the tumor: A multiparametric MRI study in two rat glioblastoma models. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **37** (6), 2270–2282 (2016).

6. Baetke, S. C., Lammers, T. & Kiessling, F. Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *Br. J. Radiol.* **88**, 20150207 (2015).
7. Hernández-Pedro, N. Y. *et al.* Application of Nanoparticles on Diagnosis and Therapy in Gliomas. *BioMed Res. Int.* **2013**, 351031 (2013).
8. Maeda, H., Nakamura, H. & Fang, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 71–79 (2013).
9. Zaarour, M., Dong, B., Naydenova, I., Retoux, R. & Mintova, S. Progress in zeolite synthesis promotes advanced applications. *Microporous Mesoporous Mater.* **189**, 11–21 (2014).
10. Mintova, S., Jaber, M. & Valtchev, V. Nanosized microporous crystals: emerging applications. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 7207–7233 (2015).
11. Seifu, D. G., Isimjan, T. T. & Mequanint, K. Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors. *Acta Biomater.* **7**, 3670–3678 (2011).
12. Georgieva, V. *et al.* Iron loaded EMT nanosized zeolite with high affinity towards CO₂ and NO. *Microporous Mesoporous Mater.* **232**, 256–263 (2016).
13. Karageorgis, A. *et al.* An MRI-based classification scheme to predict passive access of 5 to 50-nm large nanoparticles to tumors. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
14. Rogosnitzky, M. & Branch, S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *BioMetals* **29**, 365–376 (2016).
15. Laurent, S. *et al.* Corona protein composition and cytotoxicity evaluation of ultra-small zeolites synthesized from template free precursor suspensions. *Toxicol. Res.* **2**, 270–279 (2013).
16. Thomassen, L. C. J. *et al.* Investigation of the cytotoxicity of nanozeolites A and Y. *Nanotoxicology* **6**, 472–485 (2012).
17. Bhattacharya, K., Naha, P. C., Naydenova, I., Mintova, S. & Byrne, H. J. Reactive oxygen species mediated DNA damage in human lung alveolar epithelial (A549) cells from exposure to non-cytotoxic MFI-type zeolite nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **215**, 151–160 (2012).
18. Kotb, S. *et al.* Gadolinium-Based Nanoparticles and Radiation Therapy for Multiple Brain Melanoma Metastases: Proof of Concept before Phase I Trial. *Theranostics* **6**, 418–427 (2016).

3. INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 3

Supplementary table a | Summary of the main characteristics of nanosized FAU-X

Main Characteristics of FAU-X zeolites nanocrystals								
	Chemical composition (wt. %)					Size	Zeta potential	Half-life (blood)
	Si (wt. %)	Al (wt. %)	Na (wt. %)	Fe (wt. %)	Gd(wt. %)			
Na-X	18.10	14.59	13.41	0	0			
Gd-X	16.62	12.59	6.71	0	1.24	10-30 nm	-37.7 mV	12 min
Fe-X	17.6	14.35	11.96	1	0			

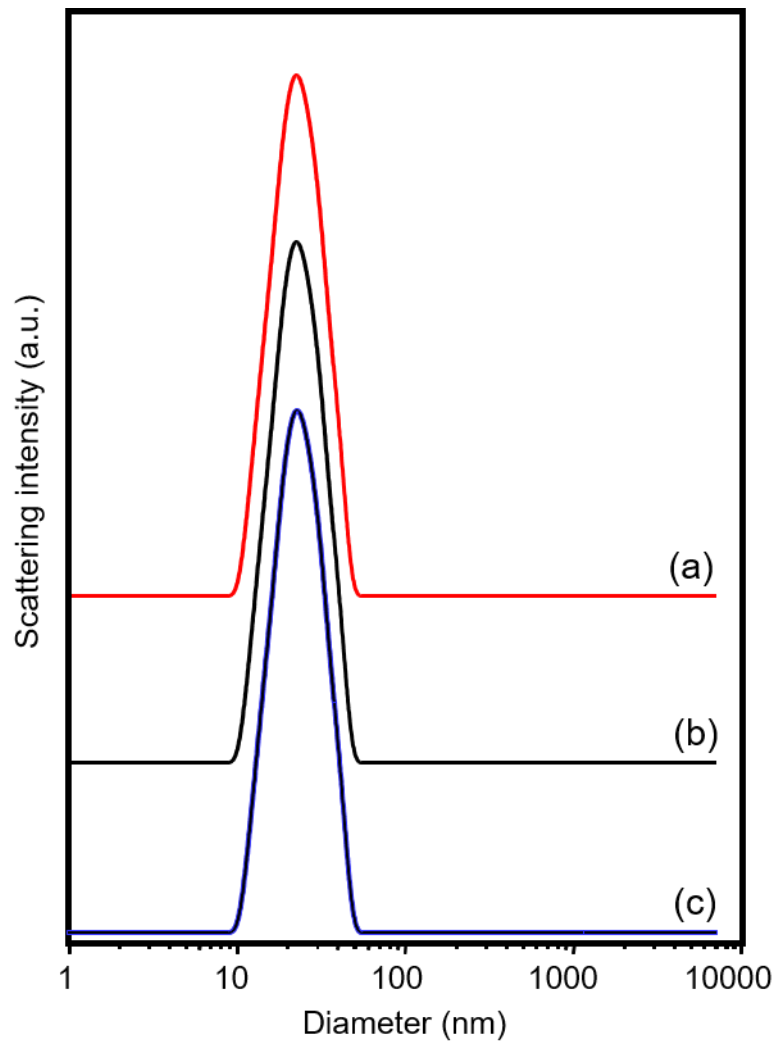


Figure Sa | Dynamic Light Scattering of (a) as prepared (Na-X), (b) gadolinium ion-exchanged (Gd-X) and (c) iron ion-exchanged (Fe-X) zeolite samples.

(Movies)

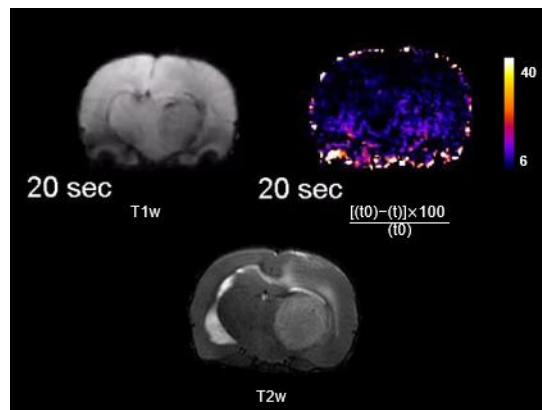
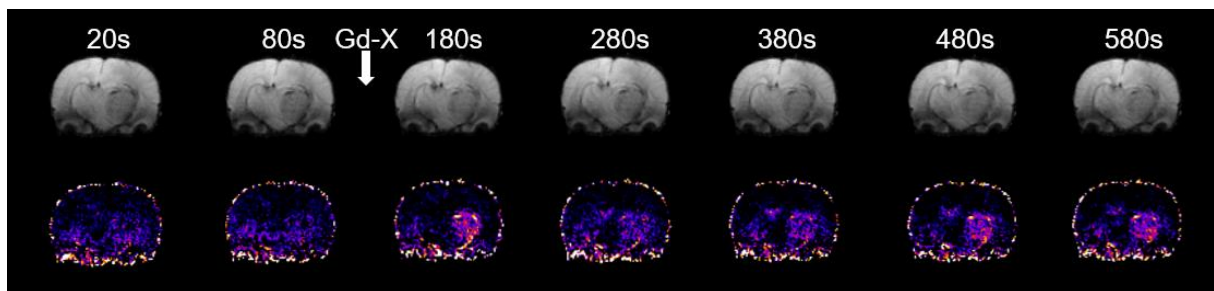


Figure Sb | T1-w images of a rat brain acquired during an intravenous injection of a Gd-X solution. The injection started at 120 s. Map of the differences of signal between the first T1-w image and the following images. T2-w anatomic image of the corresponding tumor.



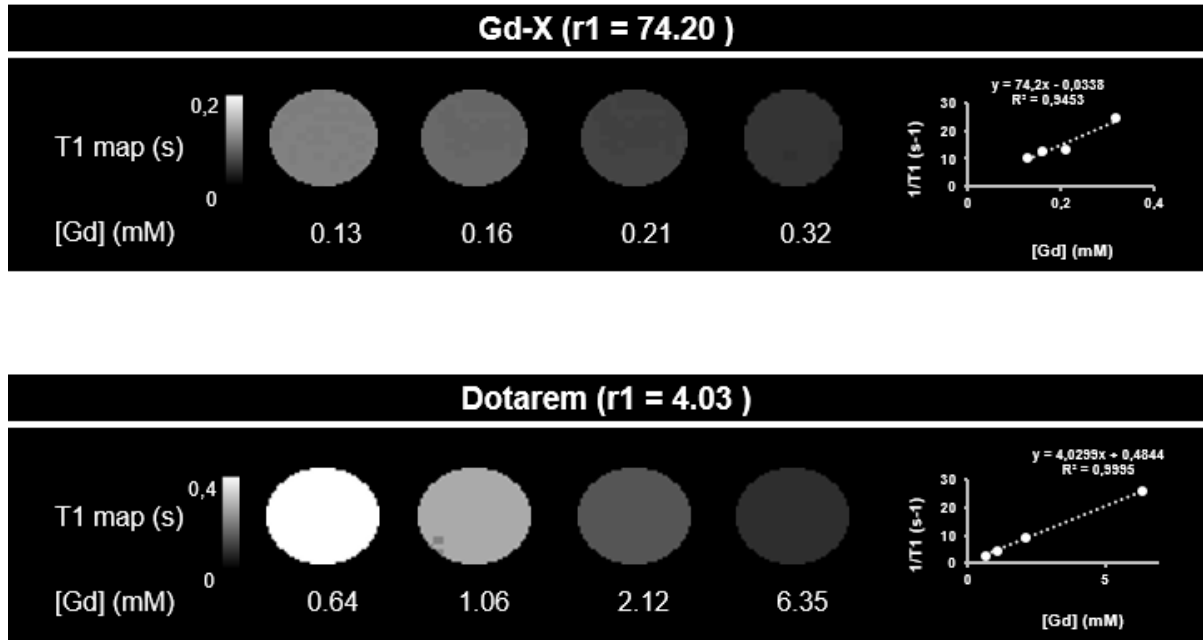


Figure Sc | Comparison of the r_1 values (in $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) between Gd-X and Dotarem® obtained at 7t and room temperature. T1 maps obtained to calculate the r_1 value are shown with their corresponding concentrations in gadolinium (left). The r_1 value is given by the slope of the linear fit of the R1 value ($1/T_1$) as a function of the concentration of gadolinium (right).

	S_{BET} ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	V_{mic} ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	V_{total} ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)
Na-X	777	0,29	1,26
Gd-X	738	0,27	1,25
Fe-X	798	0,28	1,15

Figure Sd | BET specific surface area (S_{BET}), micropore volume (V_{mic}) and total pore volume (V_{total}) of as prepared (Na-X), gadolinium ion-exchanged (Gd-X) and iron ion-exchanged (Fe-X) zeolite samples.

RESULTATS - Utilisation de nanovecteurs de thérapies gazeuses pour réoxygéner les glioblastomes

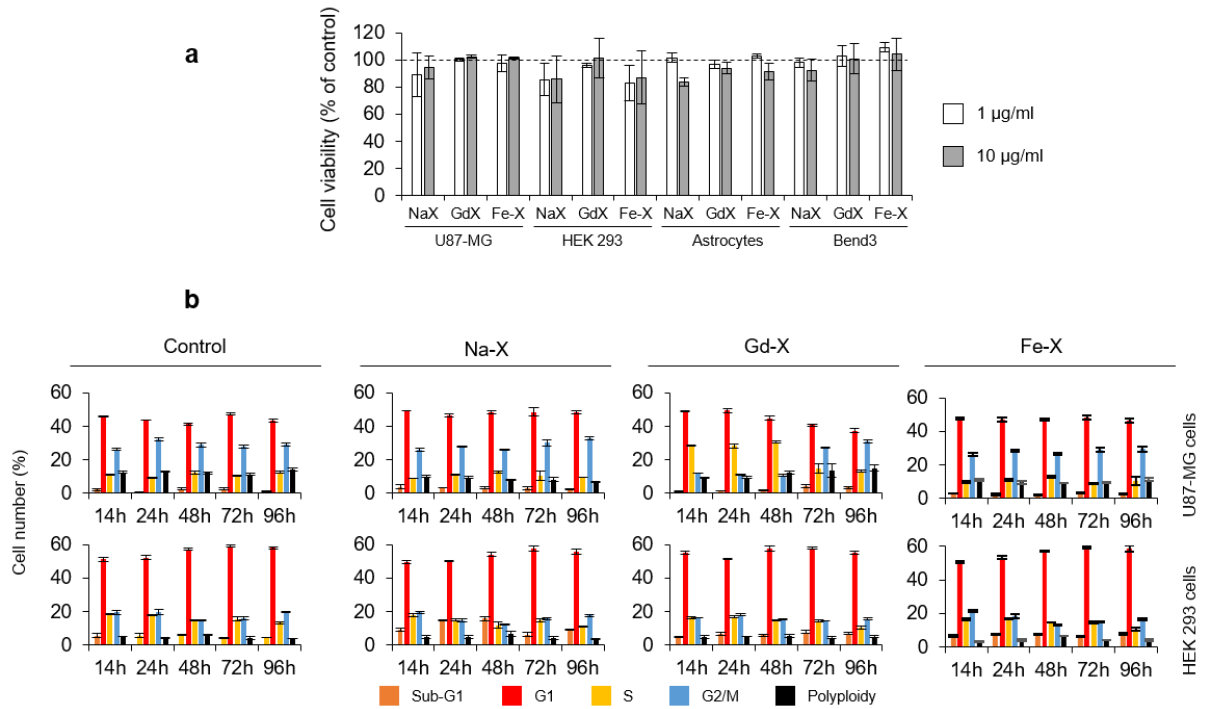


Figure 5e | (a) Quantification of astrocytes, U87-MG, HEK 293 and Bend3 cells viability following a 96h exposure to 1 and 10 µg/ml of Na-X, Fe and Gd-X zeolites. Cell viability was assessed using the WST-1 test. Mean ±SD, n=3. (b) Cell cycle analysis by flow cytometry. Quantification of U87-MG and HEK 293 cells distribution in different phases of cell cycle after different times of exposure to 100 µg/ml of Na-X, Fe-X, Gd-X or water as a control. Representative profiles obtained after a 14h exposure are shown. Mean ± SD, n=3 for each time point.

4. EFFET DE LA VECTORISATION DE CARBOGENE SUR L'EFFICACITE DE LA RADIOTHERAPIE

L'objectif général de ce projet est de réoxygéner les GB dans un contexte de traitement par RT pour en améliorer l'efficacité. Afin d'étudier la faisabilité d'un tel protocole, une première expérience a été réalisée. Des souris porteuses de GB U87 ont été soumises à un protocole d'irradiation de 3x 6 Gy après avoir préalablement reçu une injection IV de zéolithes chargées en carbogène 15 min avant chaque irradiation. Cet intervalle de temps a été déterminé en fonction d'expériences préliminaires portant sur un suivi dynamique des variations de volume sanguin chez des souris après injection de nanozéolithes vectrices de CO₂. Le volume tumoral et la survie des animaux ont alors été comparées à des souris témoins n'ayant reçu qu'une injection d'eau ou de zéolithes sans carbogène (**Figure 69A**).

Suite à l'irradiation, un arrêt de la croissance tumorale est observé puis après environ 15 jours, les tumeurs reprennent leur croissance. Ainsi, les animaux recevant de l'eau ou des zéolithes sans gaz sont euthanasiés à 38 jours. Les animaux recevant une injection de zéolithes transportant du carbogène sont euthanasiés à 46 jours. Il n'est bien entendu pas possible de tirer des conclusions définitives d'une telle expérience impliquant un faible nombre d'animaux par groupe (N=3 par groupe). Toutefois, cette première expérience permet de montrer la faisabilité du protocole. Les animaux supportent bien le protocole d'irradiation qui comprenait également la pose d'un cathéter et une injection IV pendant 3 jours consécutifs. Il est donc envisageable de répéter cette expérience pour déterminer si la réponse plus soutenue observée pour un des animaux ayant reçu du carbogène par le biais de zéolithes est confirmée ou non (**Figure 69B**).

RESULTATS - Utilisation de nanovecteurs de thérapies gazeuses pour réoxygéner les glioblastomes

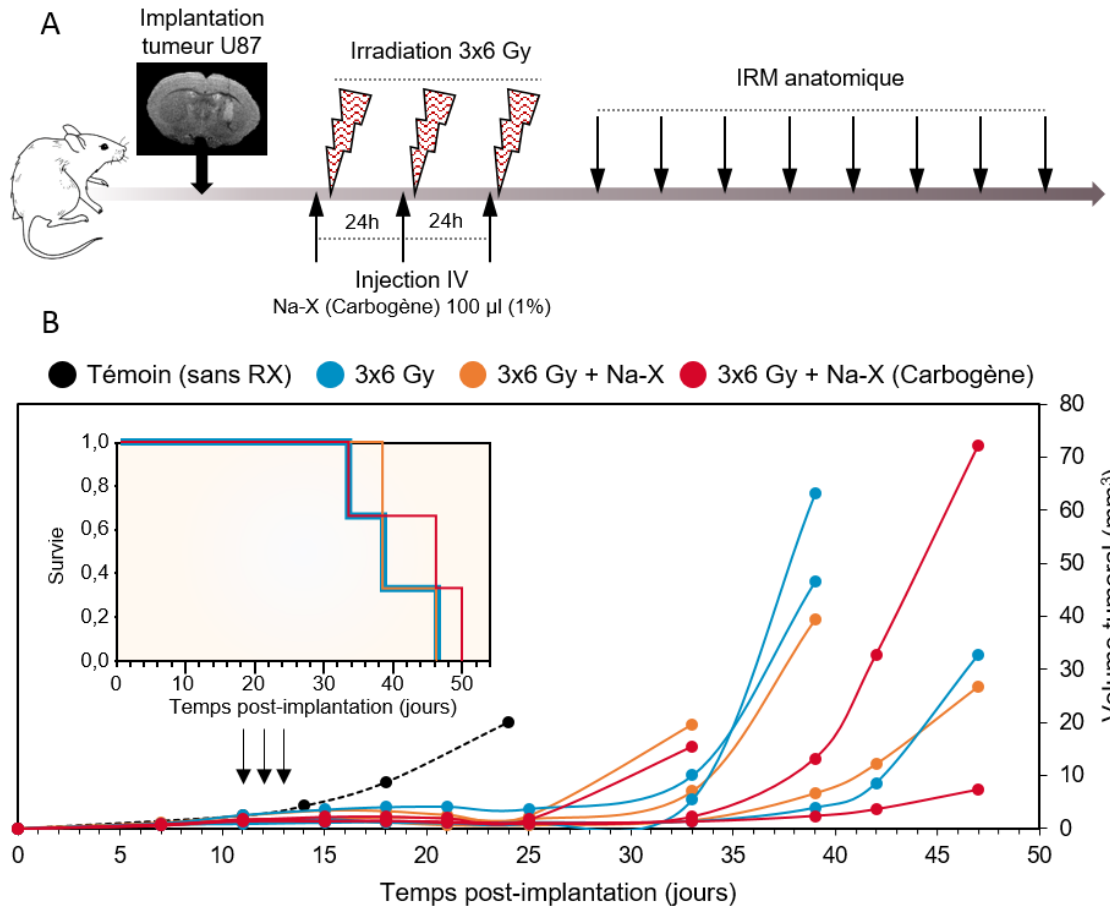


Figure 69 | La vectorisation de carbogène par les zéolithes influence-t-elle l'efficacité de la radiothérapie ? **A.** Schéma représentatif du protocole utilisé. Des cellules U87-MG ont été implantées dans le striatum droit de souris *nude*. Elles ont ensuite été irradiées 3 fois à 6 Gy à 24h d'intervalle. Des zéolithes Na-X chargées en carbogène, des zéolithes NA-X seules ou de l'eau pure en tant que témoin ont été injectées par voies intraveineuse 15 min avant chaque irradiation. N=3 par groupe. **B.** Volume tumoraux mesurés par IRM au cours du temps. Les flèches représentent l'irradiation. *Insert* : Courbe de survie associée.

DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

Malgré les traitements actuellement utilisés, les GB demeurent incurables, la médiane de survie des patients atteints ne dépassant pas les 15 mois (Chinot *et al.* 2014). Une particularité histologique des GB concerne leur vascularisation. Contrairement au tissu cérébral sain qui possède une vascularisation fonctionnelle permettant un apport suffisant en nutriments et en oxygène, celle des GB est chaotique et peu fonctionnelle. Ceci entraîne un déficit de perfusion et une inadéquation entre la consommation en oxygène et son apport. Ainsi, alors que la pO_2 dans le cerveau sain est d'environ 40 mmHg, celle-ci est inférieure à 10 mmHg dans la tumeur et peut même descendre en dessous de 1 mmHg dans certaines régions (Kempf *et al.* 2015). **La présence de cette composante hypoxique est une des caractéristiques majeures des GB.**

Pour se prémunir contre le stress induit par cette hypoxie tissulaire, les cellules tumorales mettent en place un certain nombre de processus, comme l'adaptation de leur métabolisme aux faibles pO_2 , des phénomènes d'angiogenèse et d'invasion, etc. qui participent à la croissance tumorale. L'hypoxie est également à l'origine de résistances aux traitements, notamment à la RT (Pérès *et al.* 2014; Wilson & Hay 2011). **Du fait de la mise en place de ces mécanismes, l'hypoxie est un facteur de mauvais pronostic pour les patients.** Pour améliorer l'efficacité des traitements et augmenter la survie des patients, la problématique est alors de trouver des moyens de diminuer cette hypoxie tissulaire. En d'autres termes, il faut trouver des **stratégies de réoxygénation tissulaire.**

C'est ainsi qu'une stratégie de réoxygénation basée sur l'utilisation de carbogène a été expérimentée dans le cadre d'un essai clinique. **Cependant, le résultat de l'étude a montré que, dans le cadre des GB, ce traitement ne permet pas d'amélioration de la survie des patients** (Kaanders *et al.* 2002). Nous avons montré dans des études précliniques que l'inhalation de carbogène permet en réalité de réoxygéner le tissu sain mais que cette réoxygénation est très limitée dans le tissu tumoral (Chakhoyan *et al.* 2016).

L'administration d'EPO humaine recombinante a également été testée en essai clinique. Le but était à la fois de lutter contre l'anémie consécutive aux traitements mais aussi de lutter contre l'hypoxie en augmentant l'hématocrite et donc les capacités d'apport tissulaire en oxygène du sang. Cependant, les résultats ont montré que cette approche ne permet pas d'augmenter la survie des patients. **Au contraire, des doutes ont même été émis concernant le rôle de l'EPO dans la progression tumorale, rendant cette approche contre-productive** (Shenouda *et al.* 2015).

Les stratégies de réoxygénation non ciblées sont donc peu efficaces et peuvent même s'avérer contre-productives. Cependant, l'hypoxie reste une cible attractive et il est de ce fait intéressant de se pencher sur des **approches spécifiques de réoxygénation des tissus tumoraux** ou de **cibler des facteurs inductibles par l'hypoxie comme l'EPO** (Aguilera & Giaccia 2015).

Afin de développer ces approches, deux caractéristiques des GB peuvent être vues comme des points faibles permettant de les cibler spécifiquement : **le tropisme qu'il exerce sur les macrophages et sa vascularisation perméable**. Le tropisme envers les macrophages permet de les utiliser en tant que « cheval de Troie » pour un **ciblage actif**, basé sur le chimiotactisme (Muthana *et al.* 2013, 2011). La vascularisation perméable permet quant à elle un **ciblage passif** de la tumeur basée sur l'effet EPR en utilisant des vecteurs de thérapies (Maeda *et al.* 2013; Jain & Stylianopoulos 2010). **Dans ces travaux de thèse, nous avons montré que des approches de vectorisation peuvent être envisagées pour cibler spécifiquement les GB.**

I. INHIBITION DES EFFETS DE L'HYPOXIE PAR CIBLAGE ACTIF DE L'EPO PAR LES MACROPHAGES

Dans la première partie de ces résultats de thèse, une stratégie d'inhibition de l'EPO basée sur un ciblage actif, spécifique des GB, a été développée. En effet, des études ont montré le rôle que joue l'EPO dans la progression et la croissance des GB (Hardee *et al.* 2006; Mohyeldin *et al.* 2007). Des travaux ont montré l'efficacité de l'inhibition de la signalisation EPO/EPOR sur la croissance de gliomes, notamment par une approche utilisant un récepteur à l'EPO tronqué. Cette forme du récepteur agit en tant que dominant négatif par rapport à la forme entière pour piéger l'EPO dans le microenvironnement tumoral (Pérès *et al.* 2011).

Dans ces travaux de thèse, une stratégie thérapeutique a été imaginée, dans laquelle ce récepteur tronqué est vectorisé directement sur le site tumoral par l'intermédiaire des macrophages. Cependant, cette stratégie souffre d'un manque de spécificité car elle nécessite une injection de macrophages par voie intraveineuse et il a été montré que des macrophages ainsi administrés se retrouvent, en plus du site tumoral, dans d'autres organes (Valable *et al.* 2007). Les travaux présentés ici visent à augmenter la spécificité de l'inhibition de l'EPO vis-à-vis de la tumeur en utilisant son caractère hypoxique.

Nous avons ainsi développé une approche originale consistant à conditionner l'expression d'un inhibiteur de l'EPO par l'hypoxie. Le plasmide pGL3-HRE-EPORT mis au point est ainsi inductible par l'hypoxie. On observe en effet une augmentation de l'expression du gène de l'EPORT pour des cellules transfectées avec ce plasmide par

rapport aux témoins sans séquences HRE et ce, seulement en condition d'hypoxie. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par Muthana *et al.* et Kim *et al.*, la présence de ces séquences dans les régions régulatrices des gènes permet de rendre leur expression spécifique des conditions d'hypoxie.

La transfection de cellules U87-MG avec ce plasmide inductible et la mesure de la prolifération ont permis d'observer que l'induction de l'expression des gènes par l'hypoxie se traduisait, *in vitro*, par un effet fonctionnel. Les résultats montrent que le fait d'ajouter des séquences HRE dans les séquences régulatrices du gène de l'EPOR permet de réduire la prolifération cellulaire par rapport au témoin sans séquences HRE en condition d'hypoxie. La prolifération est comparable à celle observée en hypoxie pour les cellules transfectées avec les plasmides contenant les promoteurs forts alors qu'en normoxie elle est comparable à celle observée pour les cellules transfectées avec les plasmides contenant les promoteurs faibles. Ces résultats demandent cependant à être confirmés.

Les travaux antérieurs du laboratoire (Pérès *et al.* 2011) ont montré que le fait de piéger l'EPO *in vitro* par ajout d'EPOR soluble réduit la prolifération cellulaire de manière dépendante de la dose en condition de normoxie, démontrant l'intérêt d'une telle stratégie pour réduire la croissance des GB. Il était intéressant de voir si cet effet se retrouvait en condition d'hypoxie. Les résultats montrent que l'ajout de sEPOR réduit effectivement la prolifération des cellules de GB en condition d'hypoxie. Cependant, si l'on compare aux résultats de Pérès *et al.* obtenus en condition de normoxie, on remarque que pour la même dose de sEPOR, la réduction de la prolifération est moins importante en hypoxie. La prolifération atteint 60% du témoin pour les cellules U251-MG et 75% pour les cellules U87-MG en normoxie contre 75% et 85% respectivement en hypoxie. Ces résultats restent à confirmer mais pourraient être expliqués par le fait que ces cellules synthétisent des quantités plus importantes d'EPO en hypoxie.

Concernant la vectorisation par les macrophages, les résultats ont montré que la surexpression de l'EPOR par des macrophages injectés par voie intraveineuse chez des souris porteuses de GB est efficace pour réduire la croissance tumorale d'un modèle de GB lorsque celui-ci est hypoxique. Ces résultats sont extrêmement encourageants mais cependant, dans ces expériences, la surexpression de l'EPOR par les macrophages n'était pas spécifique de la tumeur. Le risque avec cette approche est donc d'inhiber de façon systémique la signalisation EPO/EPOR au risque de créer de graves anémies.

Ces études mettent en perspective les résultats obtenus au cours de cette thèse concernant la co-culture de macrophages THP1 transfectés avec les plasmides permettant une surexpression de l'EPOR en condition d'hypoxie avec les cellules U251-

MG. Ces résultats ont montré *in vitro* que dans ces conditions, la vectorisation de l'EPOR est efficace pour réduire la prolifération des cellules de GB uniquement en condition d'hypoxie. **Ces résultats permettent d'envisager l'application de cette stratégie *in vivo* pour vectoriser de manière active l'EPOR sur le site tumoral avec une spécificité vis-à-vis de la tumeur conférée par une expression inductible par l'hypoxie.**

Cependant, à l'heure actuelle, une limite de l'étude repose sur la manière de modifier génétiquement les macrophages. A ce stade, les constructions inductibles par l'hypoxie ne permettent que des transfections transitoires. De plus, les macrophages sont une population cellulaire particulièrement difficile à transfecter, en particulier les cultures primaires. Pour poursuivre cette étude, il semble donc inévitable de devoir adapter ces constructions pour pouvoir être vectorisées par des lentivirus, qui sont beaucoup plus efficaces sur les macrophages. Ces constructions lentivirales sont donc en cours de mise au point.

Ces limites techniques peuvent cependant poser des difficultés pour une mise en place à l'échelle clinique d'une telle stratégie. **C'est pourquoi, en parallèle, une stratégie de réoxygénation spécifique des GB, basée sur un ciblage passif de la tumeur par des NP a été développée.** Les NP sont depuis longtemps étudiées dans le cadre du cancer pour leur faculté à s'accumuler dans les tissus tumoraux par ce qu'on appelle l'effet EPR.

II. REOXYGENATION TUMORALE PAR VECTORISATION PASSIVE DE GAZ HYPEROXIQUES

Les zéolithes sont une classe de matériaux connus depuis longtemps pour leur capacité de sorption vis-à-vis des gaz, notamment le NO et le CO₂. Jusqu'à récemment, les techniques de synthèse ne permettaient d'obtenir que des zéolithes de taille micrométrique. Une taille nanométrique ne pouvait être obtenue qu'au prix de l'utilisation de molécules organiques toxiques et très coûteuses, barrant ainsi la route à une utilisation biomédicale des nanozéolithes. Cependant, récemment, le Laboratoire Catalyse et Spectrochimie de Caen (CNRS, UNICAEN, ENSICAEN) a mis au point une méthode permettant de synthétiser des nanozéolithes en s'affranchissant de ces molécules organiques (Ng *et al.* 2012; Awala *et al.* 2015), démultipliant ainsi les applications potentielles de ce type de matériau. **Dans ces travaux de thèse, une stratégie de réoxygénation, basée sur un ciblage passif des GB, en utilisant des nanozéolithes vectrices d'O₂ et de CO₂ a été développée.**

Parmi la diversité de types de zéolithes existants, le choix s'est porté sur des zéolithes de type FAU car elles possèdent des capacités de sorption relativement élevées grâce à

la taille importante de leurs pores. De plus, une propriété intéressante des zéolithes est la possibilité d'y incorporer de manière stable des cations. Du fer et du gadolinium ont ainsi été ajoutés dans ces NP pour en faire des agents de contraste en IRM.

Les études de toxicité ont permis de montrer que ces nanozéolithes ne présentent pas d'effets néfastes majeurs sur les cellules eucaryotes. En effet, différents types cellulaires, présentant des caractéristiques propres, ont été utilisés : cellules humaines (U87-MG, HEK 293) ou de rongeurs (bEnd.3, cultures primaires d'astrocytes et neurones murins), cellules proliférantes (U87-MG, HEK 293, bEnd.3) ou quiescentes (cultures primaires d'astrocytes et neurones murins), cellules provenant du SNC (U87-MG, cultures primaires d'astrocytes et neurones murins) ou périphériques (HEK 293, bEnd.3). Le but étant de couvrir un large éventail de cellules provenant de tissus pouvant être potentiellement en contact avec ces nanozéolithes à la suite d'une injection intraveineuse : des cellules endothéliales (bEnd.3), aux cellules cérébrales du parenchyme sain (cultures primaires d'astrocytes et neurones murins) et de GB (U87-MG) en passant par des organes périphériques impliqués dans l'élimination comme le rein (HEK 293). Les résultats ont montré que pour obtenir un effet significatif sur la viabilité des cellules, il faut exposer celles-ci à des doses importantes de zéolithes pendant des temps longs. De plus, ces nanozéolithes n'induisent pas de génotoxicité. De manière intéressante, ces résultats sont obtenus à la fois pour les zéolithes non modifiées (Na-X) mais aussi pour les zéolithes dans lesquelles ont été ajoutés les atomes de fer et de gadolinium.

La caractérisation de la sorption de l'oxygène et du CO₂ montre que les nanozéolithes ont une bonne capacité à adsorber ces gaz et l'ajout de fer augmente cette capacité. Ce dernier résultat est étayé par les expériences menées dans le but de mesurer la libération de l'oxygène par les zéolithes en condition d'hypoxie. Outre le fait que ces expériences aient permis de montrer que le gaz transporté peut effectivement être libéré hors des zéolithes, elles ont également pu mettre en avant le fait que les zéolithes Fe-X sont celles qui permettent la libération de la plus grande quantité d'O₂ en comparaison des zéolithes Na-X et Gd-X. Pour expliquer ce mécanisme de libération de l'O₂, l'hypothèse est que celle-ci intervient en fonction du gradient de pO₂ existant entre la NP et le milieu environnant, au même titre que pour les microparticules développées par Seekell *et al.* (2016). En cas de pO₂ interne supérieure à la pO₂ environnante, l'oxygène est libéré et la cinétique de libération dépendrait de l'amplitude de cette différence (**Figure 70**). Cette hypothèse a été validée en réalisant des expériences similaires en condition de normoxie

et à des niveaux d'oxygène intermédiaires. Elles ont permis de mesurer une libération moindre de l'oxygène à mesure que la pO_2 externe augmente.

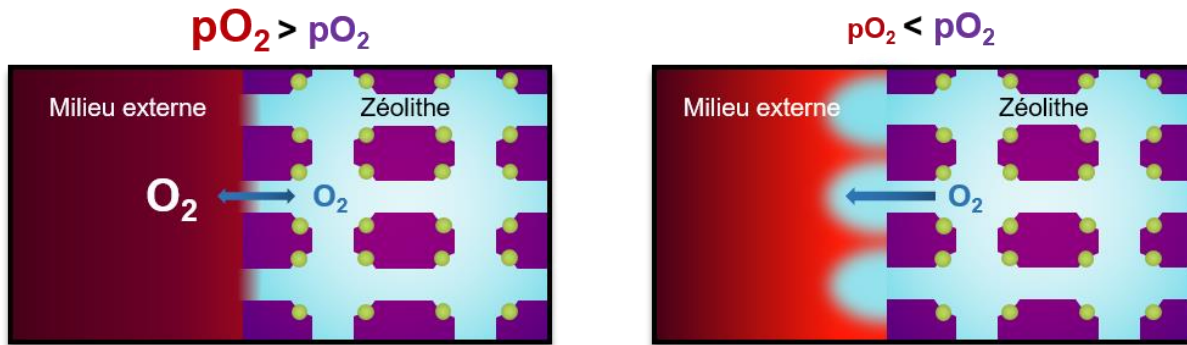


Figure 70 | Proposition de mécanisme pour la libération de l'oxygène. Schéma représentant le mécanisme proposé pour la libération de l'oxygène hors des zéolithes. Lorsque la pO_2 du milieu environnant est supérieure à la pO_2 des zéolithes, l' O_2 reste confiné dans la zéolithe. Lorsque la zéolithe pénètre dans un environnement où la pO_2 est plus faible que sa propre pO_2 , l'oxygène est libéré. Il faut noter que sur le schéma présenté ci-dessus, seule la fraction physisorbée de l'oxygène est représentée. En effet, la fraction d'oxygène chimisorbée semble plus difficilement mobilisable compte tenu des énergies de liaison mises en jeu. Les cations, qui influencent la quantité d'oxygène adsorbée, sont représentés en vert.

Ce mécanisme rend d'autant plus intéressant l'utilisation des zéolithes pour réoxygéner les tissus hypoxiques comme les GB. **En effet, cela signifierait qu'après injection par voie intraveineuse, elles garderaient leur charge en oxygène tant qu'elles n'atteindraient pas le tissu hypoxique.** Ce n'est qu'une fois dans cet environnement pauvre en oxygène qu'elles libéreraient alors leur contenu en oxygène. Il est intéressant de noter la grande différence de quantité d'oxygène libérée à 5% et 1% d' O_2 ($0,46 \pm 0,07$ et $2,67 \pm 0,11$ fois la ligne de base respectivement). En effet, nous avons vu que la pO_2 dans un tissu comme le cerveau est de 40 mmHg, ce qui correspond à 5,3% d' O_2 (**Tableau 2**). Dans un organe non hypoxique, les nanozéolithes garderaient de ce fait une grande partie de leur charge en oxygène pour ne réoxygéner que les tissus hypoxiques.

Dans les études *in vivo*, les zéolithes Fe-X n'ont pas été utilisées malgré leur plus grande capacité de transport de gaz en raison de la méthode utilisée pour mesurer les modifications de volume sanguin et d'oxygénation tissulaire. En effet, ces deux paramètres ont été mesurés par IRM, ce qui nécessite l'injection d'un agent de contraste à base de fer, rendant incompatible cette technique avec l'utilisation des zéolithes Fe-X. Les effets observés avec les zéolithes Gd-X et Na-X pourraient ainsi être potentiellement plus importants en utilisant ces Fe-X.

Dans un premier temps, les études de toxicité chronique n'ont pas mis en évidence d'effets néfastes importants sur des souris. Après injection intraveineuse chez des rats, la demi-vie sanguine des nanozéolithes est d'environ 12 min. De plus, de manière attendue,

les zéolithes s'accumulent dans des organes périphériques impliqués dans le drainage du sang tels que le foie et la rate. Les résultats montrent également que lorsqu'elles sont chargées en CO₂, elles libèrent rapidement une partie de leur contenu dans la circulation sanguine, ce qui se traduit par une élévation de la pCO₂ sanguine, une légère baisse du pH et une vasodilatation des artères révélée par une augmentation du signal BOLD en IRM.

Les résultats obtenus avec les zéolithes Gd-X montrent qu'elles peuvent se comporter comme un agent de contraste. Les études par IRM montrent une meilleure relaxivité R1 pour les Gd-X que pour le Dotarem®, un agent de contraste classiquement utilisé en clinique. A concentration de gadolinium égale, le signal est ainsi plus intense avec les zéolithes Gd-X. Cela permet de les envisager en tant qu'agent de contraste. En effet, après injection intraveineuse chez des rats porteurs de GB, un hypersignal en imagerie pondérée T1 est observé dans la tumeur et non dans le tissu sain environnant. Ce résultat démontre deux choses. Premièrement, il confirme *in vivo* ce qui a été vu avec les études de relaxivité : les zéolithes Gd-X peuvent servir d'agent de contraste. Deuxièmement, il démontre que les nanozéolithes sont capables de s'accumuler passivement et spécifiquement dans la tumeur. Une vectorisation passive des GB par les zéolithes, ciblant spécifiquement le tissu tumoral et non le tissu sain environnant est donc possible.

Enfin, lorsque les nanozéolithes chargées en CO₂ sont injectées par voie intraveineuse, une vasodilatation du tissu tumoral plus importante par rapport au tissu sain est observée. Il semble donc que, malgré la diffusion d'une partie de leur contenu en gaz dans la circulation sanguine, une quantité importante de zéolithe pénètre le tissu tumoral et libère du CO₂ en quantité suffisante pour induire une vasodilatation supérieure à celle du tissu sain.

La vectorisation de carbogène montre quant à elle un effet plus limité au niveau de la vasodilatation par rapport au CO₂ pur. Le fait que le carbogène ne contienne que 5% de CO₂ pourrait éventuellement expliquer cet effet. En revanche, la présence d'oxygène ne permet pas de réoxygéner significativement le tissu tumoral. Il semble donc que la quantité d'oxygène apportée ne soit pas suffisante. Les études réalisées *in vitro* ont montré que l'ajout de fer permet d'augmenter la quantité d'oxygène vectorisée dans les zéolithes. Compte-tenu de l'impossibilité de mesurer la réoxygénation tissulaire par IRM en utilisant les zéolithes Fe-X, il pourrait être intéressant d'utiliser d'autres méthodes de mesure de l'oxygénation tissulaire *in vivo* comme la TEP [¹⁸F]-FMISO. Cette technique permettrait d'évaluer quantitativement et de comparer l'apport d'oxygène par les différents types de zéolithes. De même, pour affiner les études de biodistribution il pourrait être également intéressant de se tourner vers la TEP, en incorporant des cations radioactifs, comme le

^{64}Cu , dans les zéolithes. Cela permettrait de réaliser des études quantitatives de biodistribution et d'élimination sur des animaux vivants.

Les zéolithes Gd-X peuvent ainsi servir d'agent de contraste IRM et véhiculer des thérapies gazeuses. La cinétique de libération des gaz semble compatible avec une utilisation en tant que radiosensibilisant. Celle-ci intervient dans les minutes qui suivent l'injection de zéolithe. Il peut ainsi être imaginé une injection quelques minutes avant la RT pour sensibiliser spécifiquement la tumeur aux rayonnements ionisants par augmentation de l'effet oxygène. De plus, plusieurs études, dont celle de Kotb *et al.* (2016) présentée dans l'introduction, ont montré le pouvoir radiosensibilisant de NP contenant des atomes de gadolinium par émission d'électron Auger. Il sera donc intéressant d'étudier par la suite si la présence de gadolinium dans les zéolithes permet de potentialiser la RT par les mêmes mécanismes. Si tel était le cas, nous aurions donc une NP à usage théranostique, agissant à trois niveaux. Elle jouerait le rôle d'agent de contraste en IRM et elle améliorerait l'efficacité de la RT en augmentant l'effet oxygène mais également par émission d'électron Auger.

Pour conclure, la vectorisation ciblée de gaz thérapeutique est plus efficace que l'inhalation de ces mêmes gaz pour atteindre la tumeur. La comparaison avec les résultats des précédentes études du laboratoire réalisées avec inhalation de carbogène (Chakhoyan *et al.* 2016) révèle la différence entre les deux approches. A titre d'exemple, en prenant en compte les variations de volume sanguin cérébral, la vasodilatation est plus importante dans le tissu sain par rapport à la tumeur après inhalation de gaz tandis que

lorsque ce gaz est vectorisé par des NP, le résultat contraire est obtenu, la vasodilatation est plus importante dans la tumeur par rapport au tissu sain (**Figure 71**).

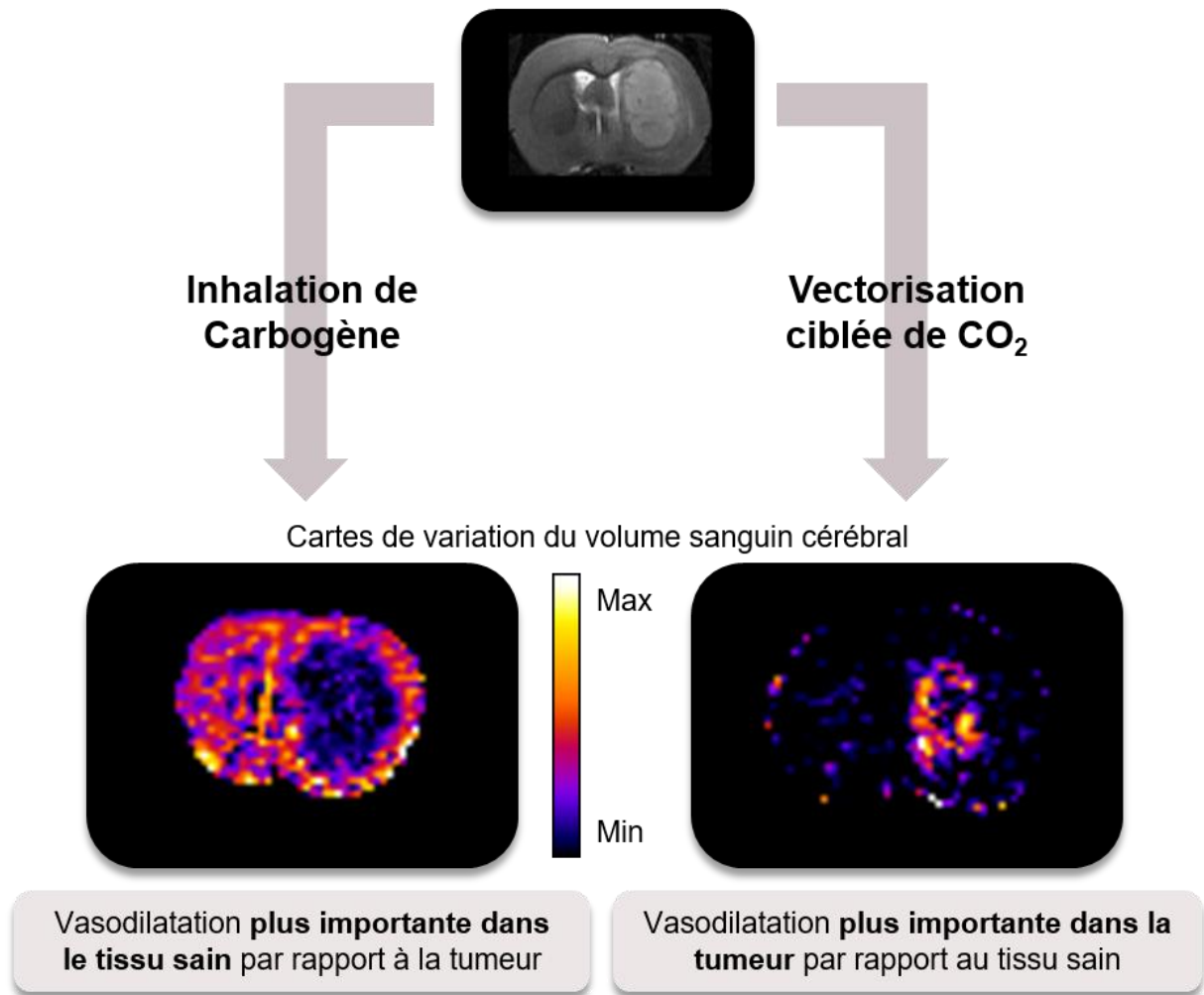


Figure 71 | La vectorisation ciblée de CO₂ permet d'augmenter le volume sanguin dans la tumeur de manière plus importante par rapport à l'inhalation de carbogène. Adapté de Chakhoyan *et al.* 2016 pour l'image de gauche avec le carbogène et de ces travaux de thèse pour l'image de droite.

III. CONCLUSION GENERALE

Devant l'échec des thérapies actuellement utilisées contre le GB, il est nécessaire de trouver de nouvelles voies de lutte contre cette pathologie. L'hypoxie reste une cible thérapeutique attractive, malgré la faible efficacité des stratégies utilisées jusqu'à présent pour la corriger. Afin de surmonter cette résistance, le développement de la vectorisation ciblée de thérapie semble être une piste prometteuse. Ainsi, les deux approches développées au cours de cette thèse permettent d'envisager de lutter spécifiquement contre l'hypoxie, au sein des GB, pour réoxygéner le tissu tumoral ou bien contrecarrer les effets bénéfiques de l'EPO.

La stratégie de vectorisation d'un récepteur tronqué sur le site tumoral par le biais de macrophages, avec un caractère spécifique, est utilisée ici contre l'EPO. Il pourrait également être envisagé d'utiliser cette stratégie en la dirigeant contre d'autres facteurs inductibles par l'hypoxie et participant à la croissance des GB comme les facteurs angiogéniques, d'autres cytokines ou bien d'utiliser un cocktail de récepteurs tronqués, ciblant plusieurs facteurs à la fois. Enfin cette stratégie pourrait être envisagée pour d'autres cancers que les GB, les macrophages étant retrouvés en grand nombre dans de nombreuses tumeurs solides comme dans les cancers du sein (Franklin *et al.* 2014). Une application clinique d'une telle stratégie nécessiterait encore de nombreux travaux à l'échelle préclinique avant de pouvoir être envisagée. Néanmoins, la faisabilité de ce type de stratégie consistant en une réinjection autologue de cellules modifiées génétiquement a été démontrée par les nombreux essais cliniques réalisés dans le cadre des stratégies d'immunothérapie, et notamment dans les GB (Huang *et al.* 2017).

La vectorisation passive de NP, mettant à profit l'effet EPR, pour réoxygéner le tissu tumoral ne semble pas, elle non plus, cantonnée aux seuls GB. Cependant, pour cette stratégie, c'est pour ce type de tumeur que la spécificité pourrait être la plus élevée, en raison de la présence de la BHE dans le tissu sain. Les zéolithes ne se déposant pas dans le tissu sain, l'effet radiosensibilisant serait ainsi spécifique du tissu tumoral. Si la faible toxicité des zéolithes *in vivo* est confirmée, l'accumulation dans d'autres organes n'est alors plus un problème, la seule molécule thérapeutique vectorisée étant de l'oxygène.

En conclusion, bien que les GB soient incurables à l'heure actuelle, le développement de la médecine ciblée, l'essor des moyens techniques, notamment d'imagerie médicale, et la maîtrise de la synthèse de composés aux propriétés prédéterminées nous permettent d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques originales et prometteuses. Dans ce cadre, ces travaux de thèse démontrent que lorsqu'ils parviennent à trouver un langage commun, la coopération entre chercheurs venus d'horizons différents : biologistes, chimistes, physiciens, etc. ouvre des perspectives d'une richesse infinie et décuple les capacités de l'imagination. Ces projets multidisciplinaires ont déjà démontré par le passé leur grande capacité d'innovation et c'est sans doute sur eux que repose l'espoir de guérir les patients.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N. Joan, Lars Rönnbäck, et Elisabeth Hansson. 2006. « Astrocyte–endothelial Interactions at the Blood–brain Barrier ». *Nature Reviews Neuroscience* 7 (1): 41-53.
- Agnihotri, Sameer, et Gelareh Zadeh. 2016. « Metabolic reprogramming in glioblastoma: the influence of cancer metabolism on epigenetics and unanswered questions ». *Neuro-Oncology* 18 (2): 160-72.
- Aguilera, Todd A., et Amato J. Giaccia. 2015. « The End of the Hypoxic EPOch ». *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 91 (5): 895-97.
- Alifieris, Constantinos, et Dimitrios T. Trafalis. 2015. « Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment ». *Pharmacology & Therapeutics* 152 (août): 63-82.
- Altaner, Cestmir, Veronika Altanerova, Marina Cihova, Katarina Ondicova, Boris Rychly, Ladislav Baciak, et Boris Mravec. 2014. « Complete Regression of Glioblastoma by Mesenchymal Stem Cells Mediated Prodrug Gene Therapy Simulating Clinical Therapeutic Scenario ». *International Journal of Cancer* 134 (6): 1458-65.
- Amorim, Ricardo, Natália Vilaça, Olga Martinho, Rui M. Reis, Mariana Sardo, João Rocha, António M. Fonseca, Fátima Baltazar, et Isabel C. Neves. 2012. « Zeolite Structures Loading with an Anticancer Compound As Drug Delivery Systems ». *The Journal of Physical Chemistry C* 116 (48): 25642-50.
- Arcasoy, Murat O, Xiaohong Jiang, et Zishan A Haroon. 2003. « Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307 (4): 999-1007.
- Arvizo, Rochelle R., Sanjib Bhattacharyya, Rachel A. Kudgus, Karuna Giri, Resham Bhattacharya, et Priyabrata Mukherjee. 2012. « Intrinsic Therapeutic Applications of Noble Metal Nanoparticles: Past, Present and Future ». *Chemical Society Reviews* 41 (7): 2943-70.
- Asharani, Pv, Swaminathan Sethu, Hui Kheng Lim, Ganapathy Balaji, Suresh Valiyaveetil, et M. Prakash Hande. 2012. « Differential Regulation of Intracellular Factors Mediating Cell Cycle, DNA Repair and Inflammation Following Exposure to Silver Nanoparticles in Human Cells ». *Genome Integrity* 3 (1): 2.
- Awala, Hussein, Jean-Pierre Gilson, Richard Retoux, Philippe Boullay, Jean-Michel Goupil, Valentin Valtchev, et Svetlana Mintova. 2015. « Template-Free Nanosized Faujasite-Type Zeolites ». *Nature Materials* 14 (4): 447-51.
- Banerjee, Deboshri, et Shiladitya Sengupta. 2011. « Chapter 12 - Nanoparticles in Cancer Chemotherapy ». *Prog Mol Biol Transl Sci* 104: 489-507.
- Bekaert, Lien, Samuel Valable, Emmanuèle Lechapt-Zalcman, Keven Ponte, Solène Collet, Jean-Marc Constans, Guénaëlle Levallet, et al. 2017. « [18F]-FMISO PET Study of Hypoxia in Gliomas before Surgery: Correlation with Molecular Markers of Hypoxia and Angiogenesis ». *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 44(8): 1383-1392.
- Belin, T., C. Mve Mfoumou, S. Mignard, et Y. Pouilloux. 2013. « Study of physisorbed carbon dioxide on zeolites modified by addition of oxides or acetate impregnation ». *Microporous and Mesoporous Materials* 182: 109-16.
- Bent, Martin van den, Olivier-Louis Chinot, et J. Gregory Cairncross. 2003. « Recent developments in the molecular characterization and treatment of oligodendroglial tumors ». *Neuro-Oncology* 5 (2): 128-38.

- Berbeco, Ross I., Wilfred Ngwa, et G. Mike Makrigiorgos. 2011. « Localized Dose Enhancement to Tumor Blood Vessel Endothelial Cells via Megavoltage X-rays and Targeted Gold Nanoparticles: New Potential for External Beam Radiotherapy ». *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 81 (1): 270-76.
- Bergers, Gabriele, et Laura E. Benjamin. 2003. « Tumorigenesis and the Angiogenic Switch ». *Nature Reviews Cancer* 3 (6): 401-10.
- Bernaudin, M., A. Bellail, H. H. Marti, A. Yvon, D. Vivien, I. Duchatelle, E. T. Mackenzie, et E. Petit. 2000. « Neurons and Astrocytes Express EPO mRNA: Oxygen-Sensing Mechanisms That Involve the Redox-State of the Brain ». *Glia* 30 (3): 271-78.
- Blecic, Serge, Michal Rynkowski, Olivier De Witte, et Florence Lefranc. 2013. « Glutamate and malignant gliomas, from epilepsy to biological aggressiveness: therapeutic implications ». *Bulletin Du Cancer* 100 (9): 829-35.
- Bohr, Stefan, Suraj J. Patel, Radovan Vasko, Keyue Shen, Arvin Iracheta-Vellve, Jungwoo Lee, Shyam Sundhar Bale, et al. 2014. « Modulation of Cellular Stress Response via the Erythropoietin/CD131 Heteroreceptor Complex in Mouse Mesenchymal-Derived Cells ». *Journal of Molecular Medicine* 93 (2): 199-2100.
- Brat, Daniel J., Amilcar A. Castellano-Sanchez, Stephen B. Hunter, Marcia Pecot, Cynthia Cohen, Elizabeth H. Hammond, Sarojini N. Devi, Balveen Kaur, et Erwin G. Van Meir. 2004. « Pseudopalisades in Glioblastoma Are Hypoxic, Express Extracellular Matrix Proteases, and Are Formed by an Actively Migrating Cell Population ». *Cancer Research* 64 (3): 920-27.
- Bulnes, Susana, Harkaitz Bengoetxea, Naiara Ortuzar, Argandoña, Enrike G. A., García-Blanco, Ivaro, Irantzu Rico-Barrio, José Lafuente, et V. 2012. « Angiogenic Signalling Pathways Altered in Gliomas: Selection Mechanisms for More Aggressive Neoplastic Subpopulations with Invasive Phenotype ». *J Signal Transduct* 2012: 597915.
- Cao, Wei-Dong, Nobuyuki Kawai, Keisuke Miyake, Xiang Zhang, Zhou Fei, et Takashi Tamiya. 2013. « Relationship of 14-3-3zeta (Z), HIF-1 α , and VEGF Expression in Human Brain Gliomas ». *Brain Tumor Pathology* 31 (1): 1-10.
- Cao, Yiting, Justin D. Lathia, Christine E. Eyler, Qiulian Wu, Zhizhong Li, Hui Wang, Roger E. McLendon, Anita B. Hjelmeland, et Jeremy N. Rich. 2010. « Erythropoietin Receptor Signaling through STAT3 Is Required for Glioma Stem Cell Maintenance ». *Genes & Cancer* 1 (1): 50-61.
- Chakhoyan, Ararat, Aurélien Corroyer-Dulmont, Marine M. Leblond, Aurélie Gérault, Jérôme Toutain, Laurent Chazaviel, Didier Divoux, et al. 2016. « Carbogen-Induced Increases in Tumor Oxygenation Depend on the Vascular Status of the Tumor: A Multiparametric MRI Study in Two Rat Glioblastoma Models ». *J Cereb Blood Flow Metab* 37(6): 2270-2282.
- Chan, Ka Kui, Kyle B. Matchett, Jonathan A. Coulter, Hiu-Fung Yuen, Cian M. McCrudden, Shu-Dong Zhang, Gareth W. Irwin, et al. 2017. « Erythropoietin Drives Breast Cancer Progression by Activation of Its Receptor EPOR ». *Oncotarget* 13; 8 (24):38251-38263
- Chen, Guojun, Liwei Wang, Travis Cordie, Corinne Vokoun, Kevin W. Eliceiri, et Shaoqin Gong. 2015. « Multi-Functional Self-Fluorescent Unimolecular Micelles for Tumor-Targeted Drug Delivery and Bioimaging ». *Biomaterials* 47: 41-50
- Chen, Jian, Renée M. McKay, et Luis F. Parada. 2012. « Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells ». *Cell* 149 (1): 36-47.

- Chen, Qian, Liangzhu Feng, Jingjing Liu, Wenwen Zhu, Ziliang Dong, Yifan Wu, et Zhuang Liu. 2016. « Intelligent Albumin–MnO₂ Nanoparticles as pH-/H₂O₂-Responsive Dissociable Nanocarriers to Modulate Tumor Hypoxia for Effective Combination Therapy ». *Adv Mater* 28 (33): 7129-36.
- Chiang, Chi-Shiun, Sheng Yung Fu, Shu-Chi Wang, Ching-Fang Yu, Fang-Hsin Chen, Chi-Min Lin, et Ji-Hong Hong. 2012. « Irradiation Promotes an M2 Macrophage Phenotype in Tumor Hypoxia ». *Front Oncol.* 6 (2): 89.
- Chiarelli, Peter A., Forrest M. Kievit, Miqin Zhang, et Richard G. Ellenbogen. 2015. « Bionanotechnology and the Future of Glioma ». *Surgical Neurology International* 6 (Suppl 1): S45-58.
- Chinot, Olivier L., Wolfgang Wick, Warren Mason, Roger Henriksson, Frank Saran, Ryo Nishikawa, Antoine F. Carpentier, et al. 2014. « Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma ». *New England Journal of Medicine* 370 (8): 709-22.
- Christen, Thomas, Pierre Bouzat, Nicolas Pannetier, Nicolas Coquery, Anaïck Moisan, Benjamin Lemasson, Sébastien Thomas, et al. 2014. « Tissue Oxygen Saturation Mapping with Magnetic Resonance Imaging ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 34 (9): 1550-57.
- Christen, Thomas, Benjamin Lemasson, Nicolas Pannetier, Régine Farion, Christoph Segebarth, Chantal Rémy, et Emmanuel L. Barbier. 2011. « Evaluation of a Quantitative Blood Oxygenation Level-Dependent (qBOLD) Approach to Map Local Blood Oxygen Saturation ». *NMR in Biomedicine* 24 (4): 393-403.
- Christensen, Karina, Henrik D. Schrøder, et Bjarne W. Kristensen. 2008. « CD133 Identifies Perivascular Niches in Grade II–IV Astrocytomas ». *Journal of Neuro-Oncology* 90 (2): 157.
- Clara, Carlos Afonso, Suely K. N. Marie, José Reynaldo Walther de Almeida, Alda Wakamatsu, Sueli Mieko Oba-Shinjo, Miyuki Uno, Munro Neville, et Sérgio Rosemberg. 2014. « Angiogenesis and Expression of PDGF-C, VEGF, CD105 and HIF-1 α in Human Glioblastoma ». *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 34 (4): 343-52.
- Clarke, Jennifer L., Annette M. Molinaro, Juan R. Cabrera, Ashley A. DeSilva, Jane E. Rabbitt, Joshua Prey, Daryl C. Drummond, et al. 2017. « A Phase 1 Trial of Intravenous Liposomal Irinotecan in Patients with Recurrent High-Grade Glioma ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 79 (3): 603-10.
- Clavreul, Anne, Catherine Guette, Rogatien Faguer, Clément Tétaud, Alice Boissard, Laurent Lemaire, Audrey Rousseau, et al. 2014. « Glioblastoma-Associated Stromal Cells (GASCs) from Histologically Normal Surgical Margins Have a Myofibroblast Phenotype and Angiogenic Properties ». *The Journal of Pathology* 233 (1): 74-88.
- Coman, Daniel, Yuegao Huang, Jyotsna U. Rao, Henk M. De Feyter, Douglas L. Rothman, Christoph Juchem, et Fahmeed Hyder. 2016. « Imaging the Intratumoral-Peritumoral Extracellular pH Gradient of Gliomas ». *NMR in Biomedicine* 29 (3): 309-19.
- Cooper, Robert J., et Nadja Spitzer. 2015. « Silver nanoparticles at sublethal concentrations disrupt cytoskeleton and neurite dynamics in cultured adult neural stem cells ». *NeuroToxicology* 48 (mai): 231-38.
- Corroyer-Dulmont, Aurélien, Ararat Chakhoyan, Solène Collet, Lucile Durand, Eric T. MacKenzie, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, Omar Touzani, et Samuel Valable.

2015. « Imaging modalities to assess oxygen status in glioblastoma ». *Nuclear Medicine*, 57.
- Corroyer-Dulmont, Aurélien, Elodie A. Pérès, Edwige Petit, Lucile Durand, Léna Marteau, Jérôme Toutain, Didier Divoux, et al. 2013. « Noninvasive assessment of hypoxia with 3-[¹⁸F]-fluoro-1-(2-nitro-1-imidazolyl)-2-propanol ([¹⁸F]-FMISO): a PET study in two experimental models of human glioma ». *Biological Chemistry* 394 (4).
- Csajbók, Eva, István Bányai, Luce Vander Elst, Robert N. Muller, Wuzong Zhou, et Joop A. Peters. 2005. « Gadolinium(III)-Loaded Nanoparticulate Zeolites as Potential High-Field MRI Contrast Agents: Relationship between Structure and Relaxivity ». *Chemistry* 11 (16): 4799-807.
- Cuddapah, Vishnu Anand, Stefanie Robel, Stacey Watkins, et Harald Sontheimer. 2014. « A Neurocentric Perspective on Glioma Invasion ». *Nature Reviews Neuroscience* 15 (7): 455-65.
- Datt, Ashish, Eric A. Burns, Nikhil A. Dhuna, et Sarah C. Larsen. 2013. « Loading and release of 5-fluorouracil from HY zeolites with varying SiO₂/Al₂O₃ ratios ». *Microporous and Mesoporous Materials* 167: 182-87.
- Debeljak, Nataša, Peter Solár, et Arthur J. Sytkowski. 2014. « Erythropoietin and Cancer: The Unintended Consequences of Anemia Correction ». *Front Immunol* 11 (5): 563.
- Decuzzi, P., S. Lee, B. Bhushan, et M. Ferrari. 2005. « A Theoretical Model for the Margination of Particles within Blood Vessels ». *Annals of Biomedical Engineering* 33 (2): 179-90.
- Decuzzi, Paolo, Renata Pasqualini, Wadih Arap, et Mauro Ferrari. 2009. « Intravascular Delivery of Particulate Systems: Does Geometry Really Matter? ». *Pharmaceutical Research* 26 (1): 235.
- Demirci, Selami, Zeynep Ustaoglu, Gonca Altin Yilmazer, Fikrettin Sahin, et Nurcan Baç. 2014. « Antimicrobial Properties of Zeolite-X and Zeolite-A Ion-Exchanged with Silver, Copper, and Zinc Against a Broad Range of Microorganisms ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172 (3): 1652-62.
- Dische, S., P. J. Anderson, R. Sealy, et E. R. Watson. 1983. « Carcinoma of the cervix—anaemia, radiotherapy and hyperbaric oxygen ». *The British Journal of Radiology* 56 (664): 251-55.
- Dong, B., S. Belkhair, M. Zaarour, L. Fisher, J. Verran, L. Tosheva, R. Retoux, J.-P. Gilson, et S. Mintova. 2014. « Silver Confined within Zeolite EMT Nanoparticles: Preparation and Antibacterial Properties ». *Nanoscale* 6 (18): 10859-64.
- Dreaden, Erik C., Stephen W. Morton, Kevin E. Shopsowitz, Jae-Hyeok Choi, Zhou J. Deng, Nam-Joon Cho, et Paula T. Hammond. 2014. « Bimodal Tumor-Targeting from Microenvironment Responsive Hyaluronan Layer-by-Layer (LbL) Nanoparticles ». *ACS Nano* 8 (8): 8374-82.
- Eales, K L, K E R Hollinshead, et D A Tennant. 2016. « Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells ». *Oncogenesis* 5 (1).
- Elhag, Rashid, Elizabeth A. Mazzi, et Karam F.A. Soliman. 2015. « The Effect of Silibinin in Enhancing Toxicity of Temozolomide and Etoposide in p53 and PTEN-mutated Resistant Glioma Cell Lines ». *Anticancer research* 35 (3): 1263-69.
- Evans, Sydney M, Kevin W Jenkins, H Isaac Chen, W Timothy Jenkins, Kevin D Judy, Wei-Ting Hwang, Robert A Lustig, et al. 2010. « The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study ». *Translational Oncology* 3 (3): 160-69.

- Farokhzad, Omid C., et Robert Langer. 2009. « Impact of Nanotechnology on Drug Delivery ». *ACS Nano* 3 (1): 16-20.
- Ferrari, Mauro. 2005. « Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges ». *Nature Reviews. Cancer* 5 (3): 161-71.
- Ferreira, Liliana, António M. Fonseca, Gabriela Botelho, Cristina Almeida- Aguiar, et Isabel C. Neves. 2012. « Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver ». *Microporous and Mesoporous Materials* 160: 126-32.
- Franklin, Ruth A., Will Liao, Abira Sarkar, Myoungjoo V. Kim, Michael R. Bivona, Kang Liu, Eric G. Pamer, et Ming O. Li. 2014. « The Cellular and Molecular Origin of Tumor-Associated Macrophages ». *Science* 344 (6186): 921-25.
- Frising, T., et P. Leflaive. 2008. « Extraframework cation distributions in X and Y faujasite zeolites: A review ». *Microporous and Mesoporous Materials* 114 (1–3): 27-63.
- Gaffet, Eric. 2011. « Nanomaterials : a review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development ». <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00598817>.
- Ge, Liangpeng, Qingtao Li, Meng Wang, Jun Ouyang, Xiojian Li, et Malcolm MQ Xing. 2014. « Nanosilver Particles in Medical Applications: Synthesis, Performance, and Toxicity ». *Int J Nanomedicine* 16 (9): 2399-407.
- Georgieva, Veselina, Clément Anfray, Richard Retoux, Valentin Valtchev, Samuel Valable, et Svetlana Mintova. 2016. « Iron loaded EMT nanosized zeolite with high affinity towards CO₂ and NO ». *Microporous and Mesoporous Materials* 232: 256-63.
- Gerlinger, Marco, Andrew J. Rowan, Stuart Horswell, James Larkin, David Endesfelder, Eva Gronroos, Pierre Martinez, et al. 2012. « Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing ». *New England Journal of Medicine* 366 (10): 883-92.
- Gerlowski, L. E., et R. K. Jain. 1986. « Microvascular Permeability of Normal and Neoplastic Tissues ». *Microvascular Research* 31 (3): 288-305.
- Ghobril, Cynthia, Giuseppe Lamanna, Marie Kueny-Stotz, Antonio Garofalo, Claire Billotey, et Delphine Felder-Flesch. 2012. « Dendrimers in Nuclear Medical Imaging ». *New Journal of Chemistry* 36 (2): 310-23.
- Gibson, J. A. Arran, Enzo Mangano, Elenica Shiko, Alex G. Greenaway, Andrei V. Gromov, Magdalena M. Lozinska, Daniel Friedrich, Eleanor E. B. Campbell, Paul A. Wright, et Stefano Brandani. 2016. « Adsorption Materials and Processes for Carbon Capture from Gas-Fired Power Plants: AMPGas ». *Industrial & Engineering Chemistry Research* 55 (13): 3840-51.
- Glaser, Talita, Inbo Han, Liquan Wu, et Xiang Zeng. 2017. « Targeted Nanotechnology in Glioblastoma Multiforme ». *Frontiers in Pharmacology* 8.
- Glass, Rainer, et Michael Synowitz. 2014. « CNS Macrophages and Peripheral Myeloid Cells in Brain Tumours ». *Acta Neuropathologica* 128 (3): 347-62.
- Goda, Nobuhito, Heather E. Ryan, Bahram Khadivi, Wayne McNulty, Robert C. Rickert, et Randall S. Johnson. 2003. « Hypoxia-Inducible Factor 1 α Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (1): 359-69.
- Goodman, Thomas T., Peggy L. Olive, et Suzie H. Pun. 2007. « Increased Nanoparticle Penetration in Collagenase-Treated Multicellular Spheroids ». *International Journal of Nanomedicine* 2 (2): 265-74.

- Greene-Schloesser, Dana, Mike E. Robbins, Ann M. Peiffer, Edward G. Shaw, Kenneth T. Wheeler, et Michael D. Chan. 2012. « Radiation-induced brain injury: A review ». *Frontiers in Oncology* 2 (juillet).
- Haase, Andrea, Stephanie Rott, Alexandre Manton, Philipp Graf, Johanna Plendl, Andreas F. Thünemann, Wolfgang P. Meier, Andreas Taubert, Andreas Luch, et Georg Reiser. 2012. « Effects of Silver Nanoparticles on Primary Mixed Neural Cell Cultures: Uptake, Oxidative Stress and Acute Calcium Responses ». *Toxicological Sciences* 126 (2): 457-68.
- Hambardzumyan, Dolores, David H Gutmann, et Helmut Kettenmann. 2016. « The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression ». *Nature neuroscience* 19 (1): 20-27.
- Hardee, Matthew E., Murat O. Arcasoy, Kimberly L. Blackwell, John P. Kirkpatrick, et Mark W. Dewhirst. 2006. « Erythropoietin Biology in Cancer ». *Clinical Cancer Research* 12 (2): 332-39.
- Hegi, Monika E., Annie-Claire Diserens, Thierry Gorlia, Marie-France Hamou, Nicolas de Tribolet, Michael Weller, Johan M. Kros, et al. 2005. « MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma ». *New England Journal of Medicine* 352 (10): 997-1003.
- Henaine, A. M., N. Paubel, F. Ducray, G. Diebold, D. Frappaz, J. Guyotat, S. Cartalat-Carel, et al. 2016. « Current Trends in the Management of Glioblastoma in a French University Hospital and Associated Direct Costs ». *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 41 (1): 47-53.
- Hossain, Anwar, Joy Gumin, Feng Gao, Javier Figueroa, Naoki Shinojima, Tatsuya Takezaki, Waldemar Priebe, et al. 2015. « Mesenchymal Stem Cells Isolated From Human Gliomas Increase Proliferation and Maintain Stemness of Glioma Stem Cells Through the IL-6/gp130/STAT3 Pathway ». *STEM CELLS* 33 (8): 2400-2415.
- Hou, Huagang, Ruhong Dong, Hongbin Li, Benjamin Williams, Jean P. Lariviere, S.K. Hekmatyar, Risto A. Kauppinen, Nadeem Khan, et Harold Swartz. 2012. « Dynamic changes in oxygenation of intracranial tumor and contralateral brain during tumor growth and carbogen breathing: A multisite EPR oximetry with implantable resonators ». *Journal of magnetic resonance* 214 (1): 22-28.
- Hu, Che-Ming J., Li Zhang, Santosh Aryal, Connie Cheung, Ronnie H. Fang, et Liangfang Zhang. 2011. « Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (27): 10980-85.
- Huang, Boyuan, Hongbo Zhang, Lijuan Gu, Bainxin Ye, Zhihong Jian, Creed Stary, et Xiaoxing Xiong. 2017. « Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme ». *J Immunol Res* 2017: 3597613.
- Huang, Wen-Chia, Wen-Hsuan Chiang, Ya-Hui Cheng, Wan-Chi Lin, Ching-Fang Yu, Chia-Yi Yen, Chih-Kuang Yeh, Chorng-Shyan Chern, Chi-Shiun Chiang, et Hsin-Cheng Chiu. 2015. « Tumortropic monocyte-mediated delivery of echogenic polymer bubbles and therapeutic vesicles for chemotherapy of tumor hypoxia ». *Biomaterials* 71: 71-83.
- Huhndorf, Monika, Amir Moussavi, Nadine Kramann, Olga Will, Kirsten Hattermann, Christine Stadelmann, Olav Jansen, et Susann Boretius. 2016. « Alterations of the Blood-Brain Barrier and Regional Perfusion in Tumor Development: MRI Insights from a Rat C6 Glioma Model ». *PLoS ONE* 11 (12).
- Hussain, S. Farzana, David Yang, Dima Suki, Kenneth Aldape, Elizabeth Grimm, et Amy B. Heimberger. 2006. « The role of human glioma-infiltrating

- microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses ». *Neuro-Oncology* 8 (3): 261-79.
- Huynh, Ngoc Trinh, Marie Morille, Jerome Bejaud, Pierre Legras, Anne Vessieres, Gerard Jaouen, Jean-Pierre Benoit, et Catherine Passirani. 2011. « Treatment of 9L Gliosarcoma in Rats by Ferrociphenol-Loaded Lipid Nanocapsules Based on a Passive Targeting Strategy via the EPR Effect ». *Pharmaceutical Research* 28 (12): 3189-98.
- Jain, Rakesh K. 2005. « Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy ». *Science* 307 (5706): 58-62.
- Jain, Rakesh K., et Triantafyllos Stylianopoulos. 2010. « Delivering nanomedicine to solid tumors ». *Nature reviews. Clinical oncology* 7 (11): 653-64.
- Jelkmann, W. 1992. « Erythropoietin : Structure, Control of Production, and Function ». *Physiological Reviews* 72 (2): 449-89.
- Jiang, Xiue, Julia Dausend, Margit Hafner, Anna Musyanovych, Carlheinz Röcker, Katharina Landfester, Volker Mailänder, et G. Ulrich Nienhaus. 2010. « Specific Effects of Surface Amines on Polystyrene Nanoparticles in their Interactions with Mesenchymal Stem Cells ». *Biomacromolecules* 11 (3): 748-53.
- Jiang, Xiue, Carlheinz Röcker, Margit Hafner, Stefan Brandholt, René M. Dörlich, et G. Ulrich Nienhaus. 2010. « Endo- and Exocytosis of Zwitterionic Quantum Dot Nanoparticles by Live HeLa Cells ». *ACS Nano* 4 (11): 6787-97.
- Julius, Annabelle, Anjali Desai, et Raymond L. Yung. 2017. « Recombinant Human Erythropoietin Stimulates Melanoma Tumor Growth through Activation of Initiation Factor eIF4E ». *Oncotarget*
- Kaanders, Johannes HAM, Johan Bussink, et Albert J van der Kogel. 2002. « ARCON: a novel biology-based approach in radiotherapy ». *The Lancet Oncology* 3 (12): 728-37.
- Kapitsinou, Pinelopi P., Qingdu Liu, Travis L. Unger, Jennifer Rha, Olena Davidoff, Brian Keith, Jonathan A. Epstein, Sheri L. Moores, Connie L. Erickson-Miller, et Volker H. Haase. 2010. « Hepatic HIF-2 Regulates Erythropoietic Responses to Hypoxia in Renal Anemia ». *Blood* 116 (16): 3039-48.
- Karageorgis, Anastassia, Sandrine Dufort, Lucie Sancey, Maxime Henry, Samuli Hirsjärvi, Catherine Passirani, Jean-Pierre Benoit, et al. 2016. « An MRI-Based Classification Scheme to Predict Passive Access of 5 to 50-Nm Large Nanoparticles to Tumors ». *Sci Rep* 19 (6): 21417.
- Karpel-Massler, Georg, Mike-Andrew Westhoff, Richard E. Kast, Annika Dwucet, Lisa Nonnenmacher, C. Rainer Wirtz, Klaus-Michael Debatin, et Marc-Eric Halatsch. 2014. « Artesunate Enhances the Antiproliferative Effect of Temozolomide on U87MG and A172 Glioblastoma Cell Lines ». *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 14 (2): 313-18.
- Kawai, Nobuyuki, Wei Lin, Wei-Dong Cao, Daisuke Ogawa, Keisuke Miyake, Reiji Haba, Yukito Maeda, Yuka Yamamoto, Yoshihiro Nishiyama, et Takashi Tamiya. 2014. « Correlation between 18F-Fluoromisonidazole PET and Expression of HIF-1 α and VEGF in Newly Diagnosed and Recurrent Malignant Gliomas ». *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 41 (10): 1870-78.
- Keith, Brian, Randall S. Johnson, et M. Celeste Simon. 2011. « HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression ». *Nature reviews. Cancer* 12 (1): 9-22.

- Kempf, Harald, Marcus Bleicher, et Michael Meyer-Hermann. 2015. « Spatio-Temporal Dynamics of Hypoxia during Radiotherapy ». *PLOS ONE* 10 (8).
- Kheir, John N., et Brian D. Polizzotti. 2016. « Reply to Span et Al.: Rational Design of Oxygen Microparticles for Radiation Therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (50).
- Kievit, Forrest M., Kui Wang, Tatsuya Ozawa, Aria W. Tarudji, John R. Silber, Eric C. Holland, Richard G. Ellenbogen, et Miqin Zhang. 2017. « Nanoparticle-Mediated Knockdown of DNA Repair Sensitizes Cells to Radiotherapy and Extends Survival in a Genetic Mouse Model of Glioblastoma ». *Nanomedicine* 11 (17): 30110-7.
- Kim, Hyun Ah, Jin Hyeong Park, Na Yi, et Minhyung Lee. 2014. « Delivery of Hypoxia and Glioma Dual-Specific Suicide Gene Using Dexamethasone Conjugated Polyethylenimine for Glioblastoma-Specific Gene Therapy ». *Molecular Pharmaceutics* 11 (3): 938-50.
- Kirpotin, Dmitri B., Daryl C. Drummond, Yi Shao, M. Refaat Shalaby, Keelung Hong, Ulrik B. Nielsen, James D. Marks, Christopher C. Benz, et John W. Park. 2006. « Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models ». *Cancer Research* 66 (13): 6732-40.
- Koh, Mei Yee, et Garth Powis. 2012. « Passing the baton: The HIF switch ». *Trends in biochemical sciences* 37 (9): 364-72.
- Kotb, Shady, Alexandre Detappe, François Lux, Florence Appaix, Emmanuel L. Barbier, Vu-Long Tran, Marie Plissonneau, et al. 2016. « Gadolinium-Based Nanoparticles and Radiation Therapy for Multiple Brain Melanoma Metastases: Proof of Concept before Phase I Trial ». *Theranostics* 6 (3): 418-27.
- Kunz-Schughart, Leoni A., Anna Dubrovskaja, Claudia Peitzsch, Alexander Ewe, Achim Aigner, Samuel Schellenburg, Michael H. Mudders, et al. 2017. « Nanoparticles for radiooncology: Mission, vision, challenges ». *Biomaterials* 120: 155-84.
- Kwakye-Awuah, Bright, C. Williams, M.a. Kenward, et I. Radecka. 2008. « Antimicrobial Action and Efficiency of Silver-Loaded Zeolite X ». *Journal of Applied Microbiology* 104 (5): 1516-24.
- Laurent, S., E.-P. Ng, C. Thirifays, L. Lakiss, G.-M. Goupil, S. Mintova, C. Burtea, et al. 2013. « Corona Protein Composition and Cytotoxicity Evaluation of Ultra-Small Zeolites Synthesized from Template Free Precursor Suspensions ». *Toxicology Research* 2 (4): 270-79.
- Le Gall, Tony, Valérie Polard, Morgane Rousselot, Auréline Lotte, Mouna Raouane, Pierre Lehn, Paule Opolon, et al. 2014. « In vivo biodistribution and oxygenation potential of a new generation of oxygen carrier ». *Journal of Biotechnology* 187: 1-9.
- Leblond, Marine M., Aurélie N. Gérault, Aurélien Corroyer-Dulmont, Eric T. MacKenzie, Edwige Petit, Myriam Bernaudin, et Samuel Valable. 2016. « Hypoxia induces macrophage polarization and re-education toward an M2 phenotype in U87 and U251 glioblastoma models ». *Oncotarget* 5 (1).
- Li, Zhizhong, Shideng Bao, Qiulian Wu, Hui Wang, Christine Eyler, Sith Sathornsumetee, Qing Shi, et al. 2009. « Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells ». *Cancer Cell* 15 (6): 501-13.
- Lievens, Jan L., Johannes P. Verduijn, Anton-Jan Bons, et Wilfried J. Motier. 1992. « Cation site energies in dehydrated hexagonal faujasite (EMT) ». *Zeolites* 12 (6): 698-705.

- Liu, Hongmei, Hong Chang, Jia Lv, Cong Jiang, Zhenxi Li, Fei Wang, Hui Wang, et al. 2016. « Screening of efficient siRNA carriers in a library of surface-engineered dendrimers ». *Scientific Reports* 6 (avril).
- Ljungkvist, Anna S. E, Johan Bussink, Paulus F. J. W Rijken, James A Raleigh, Juliana Denekamp, et Albert J Van Der Kogel. 2000. « Changes in tumor hypoxia measured with a double hypoxic marker technique ». *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics* 48 (5): 1529-38.
- Louis, David N., Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling, Dominique Figarella-Branger, Webster K. Cavenee, Hiroko Ohgaki, Otmar D. Wiestler, Paul Kleihues, et David W. Ellison. 2016. « The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary ». *Acta Neuropathologica* 131 (6): 803-20.
- Lozinska, Magdalena M., Enzo Mangano, John P. S. Mowat, Ashley M. Shepherd, Russell F. Howe, Stephen P. Thompson, Julia E. Parker, Stefano Brandani, et Paul A. Wright. 2012. « Understanding Carbon Dioxide Adsorption on Univalent Cation Forms of the Flexible Zeolite Rho at Conditions Relevant to Carbon Capture from Flue Gases ». *Journal of the American Chemical Society* 134 (42): 17628-42.
- Lu-Emerson, Christine, Matija Snuderl, Nathaniel D. Kirkpatrick, Jermaine Goveia, Christian Davidson, Yuhui Huang, Lars Riedemann, et al. 2013. « Increase in Tumor-Associated Macrophages after Antiangiogenic Therapy Is Associated with Poor Survival among Patients with Recurrent Glioblastoma ». *Neuro-Oncology* 15 (8): 1079-87.
- Lynch, Iseult, Anna Salvati, et Kenneth A. Dawson. 2009. « Protein-Nanoparticle Interactions: What Does the Cell See? ». *Nature Nanotechnology* 4 (9): 546-47.
- Madar, Shalom, Ido Goldstein, et Varda Rotter. 2013. « 'Cancer associated fibroblasts' – more than meets the eye ». *Trends in Molecular Medicine* 19 (8): 447-53.
- Maeda, Hiroshi, Hideaki Nakamura, et Jun Fang. 2013. « The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 (1): 71-79.
- Mahajan, Supriya D., Ravikumar Aalinkeel, Wing-Cheung Law, Jessica L. Reynolds, Bindukumar B. Nair, Donald E. Sykes, Ken-Tye Yong, Indrajit Roy, Paras N. Prasad, et Stanley A. Schwartz. 2012. « Anti-HIV-1 Nanotherapeutics: Promises and Challenges for the Future ». *Int J Nanomedicine* 7: 5301-14.
- Malpartida, I., E. Ivanova, M. Mihaylov, K. Hadjiivanov, V. Blasin-Aubé, O. Marie, et M. Daturi. 2010. « CO and NO adsorption for the IR characterization of Fe²⁺ cations in ferrierite: An efficient catalyst for NO_x SCR with NH₃ as studied by operando IR spectroscopy ». *Catalysis Today* 149 (3–4): 295-303.
- Mamot, Christoph, Daryl C. Drummond, Charles O. Noble, Verena Kallab, Zexiong Guo, Keelung Hong, Dmitri B. Kirpotin, et John W. Park. 2005. « Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Immunoliposomes Significantly Enhance the Efficacy of Multiple Anticancer Drugs In Vivo ». *Cancer Research* 65 (24): 11631-38.
- Marega, Riccardo, Eko Adi Prasetyanto, Carine Michiels, Luisa De Cola, et Davide Bonifazi. 2016. « Fast Targeting and Cancer Cell Uptake of Luminescent Antibody-Nanozeolite Bioconjugates ». *Small* 12 (39): 5431-41.
- Masoud, Georgina N., et Wei Li. 2015. « HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy ». *Acta Pharmaceutica Sinica B* 5 (5): 378-89.

- Matsumura, Yasuhiro, et Hiroshi Maeda. 1986. « A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs ». *Cancer Research* 46 (12 Part 1): 6387-92.
- McGirt, Matthew J., Kaisorn L. Chaichana, Frank J. Attenello, Jon D. Weingart, Khoi Than, Peter C. Burger, Alessandro Olivi, Henry Brem, et Alfredo Quiñones-Hinojosa. 2008. « Extent of Surgical Resection is Independently Associated with Survival in Patients with Hemispheric Infiltrating Low-grade Gliomas ». *Neurosurgery* 63 (4): 700-708.
- Mehta, Minesh P., Patrick Rodrigus, C.h.j. Terhaard, Aroor Rao, John Suh, Wilson Roa, Luis Souhami, et al. 2003. « Survival and Neurologic Outcomes in a Randomized Trial of Motexafin Gadolinium and Whole-Brain Radiation Therapy in Brain Metastases ». *Journal of Clinical Oncology* 21 (13): 2529-36.
- Mintova, Svetlana, Julien Grand, et Valentin Valtchev. 2016. « Nanosized zeolites: Quo Vadis? ». *Comptes Rendus Chimie*, 19 (1–2): 183-91.
- Miralbell, Raymond, Françoise Mornex, Richard Greiner, Michel Bolla, Guy Storme, Maarten Hulshof, Jacques Bernier, et al. 1999. « Accelerated Radiotherapy, Carbogen, and Nicotinamide in Glioblastoma Multiforme: Report of European Organization for Research and Treatment of Cancer Trial 22933 ». *Journal of Clinical Oncology* 17 (10): 3143-49.
- Miranda-Gonçalves, Vera, Mrinalini Honavar, Céline Pinheiro, Olga Martinho, Manuel M. Pires, Célia Pinheiro, Michelle Cordeiro, et al. 2013. « Monocarboxylate Transporters (MCTs) in Gliomas: Expression and Exploitation as Therapeutic Targets ». *Neuro-Oncology* 15 (2): 172-88.
- Miyake, T., C. K. Kung, et E. Goldwasser. 1977. « Purification of Human Erythropoietin. ». *Journal of Biological Chemistry* 252 (15): 5558-64.
- Mohyeldin, Ahmed, Clifton L. Dalgard, Huasheng Lu, Thomas Mcfate, A. Sasha Tait, Viral C. Patel, Kondi Wong, et al. 2007. « Survival and invasiveness of astrocytomas promoted by erythropoietin ». *Journal of Neurosurgery* 106 (2): 338-50.
- Mooney, Rachael, Yiming Weng, Elizabeth Garcia, Sukhada Bhojane, Leslie Smith-Powell, Seung U. Kim, Alexander J. Annala, Karen S. Aboody, et Jacob M. Berlin. 2014. « Conjugation of pH-responsive nanoparticles to neural stem cells improves intratumoral therapy ». *Journal of Controlled Release*, Eleventh International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium, 191: 82-89.
- Mori, Hiroyuki, Yao Yao, Brian S. Learman, Kazuhiko Kurozumi, Joji Ishida, Sadeesh K. Ramakrishnan, Katherine A. Overmyer, et al. 2016. « Induction of WNT11 by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Regulates Cell Proliferation, Migration and Invasion ». *Scientific Reports* 6: 21520.
- Mouro-Chanteloup, Isabelle, Sylvie Cochet, Mohamed Chami, Sandrine Genetet, Nedjma Zidi-Yahiaoui, Andreas Engel, Yves Colin, Olivier Bertrand, et Pierre Ripoché. 2010. « Functional Reconstitution into Liposomes of Purified Human RhCG Ammonia Channel ». *PLoS ONE* 5 (1).
- Muthana, Munitta, Athina Giannoudis, Simon D. Scott, Hsin-Yu Fang, Seth B. Coffelt, Fiona J. Morrow, Craig Murdoch, et al. 2011. « Use of Macrophages to Target Therapeutic Adenovirus to Human Prostate Tumors ». *Cancer Research* 71 (5): 1805-15.
- Muthana, Munitta, Samuel Rodrigues, Yung-Yi Chen, Abigail Welford, Russell Hughes, Simon Tazzyman, Magnus Essand, Fiona Morrow, et Claire E. Lewis. 2013.

- « Macrophage Delivery of an Oncolytic Virus Abolishes Tumor Regrowth and Metastasis after Chemotherapy or Irradiation ». *Cancer Research* 73 (2): 490-95.
- Ng, Eng-Poh, Daniel Chateigner, Thomas Bein, Valentin Valtchev, et Svetlana Mintova. 2012. « Capturing Ultrasmall EMT Zeolite from Template-Free Systems ». *Science* 335 (6064): 70-73.
- Ostrom, Quinn T., Haley Gittleman, Jordonna Fulop, Max Liu, Rachel Blanda, Courtney Kromer, Yingli Wolinsky, Carol Kruchko, et Jill S. Barnholtz-Sloan. 2015. « CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012 ». *Neuro-Oncology* 17 (Suppl 4): iv1-iv62.
- Pan, Xiaoqing, Norio Suzuki, Ikuo Hirano, Shun Yamazaki, Naoko Minegishi, et Masayuki Yamamoto. 2011. « Isolation and Characterization of Renal Erythropoietin-Producing Cells from Genetically Produced Anemia Mice ». *PLOS ONE* 6 (10).
- Peer, Dan, Jeffrey M. Karp, Seungpyo Hong, Omid C. Farokhzad, Rimona Margalit, et Robert Langer. 2007. « Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy ». *Nature Nanotechnology* 2 (12): 751-60.
- Pérès, Elodie A., Aurélie N. Gérault, Samuel Valable, Simon Roussel, Jérôme Toutain, Didier Divoux, Jean-Sébastien Guillamo, Marc Sanson, Myriam Bernaudin, et Edwige Petit. 2014. « Silencing erythropoietin receptor on glioma cells reinforces efficacy of temozolomide and X-rays through senescence and mitotic catastrophe ». *Oncotarget* 6 (4): 2101-19.
- Pérès, Elodie A., Samuel Valable, Jean-Sébastien Guillamo, Léna Marteau, Jean-François Bernaudin, Simon Roussel, Emmanuèle Lechapt-Zalcman, Myriam Bernaudin, et Edwige Petit. 2011. « Targeting the erythropoietin receptor on glioma cells reduces tumour growth ». *Experimental Cell Research* 317 (16): 2321-32.
- Pérez-Ramírez, Javier. 2012. « Zeolite Nanosystems: Imagination Has No Limits ». *Nature Chemistry* 4 (4): 250-51.
- Peters, Joop A., et Kristina Djanashvili. 2012. « Lanthanide Loaded Zeolites, Clays, and Mesoporous Silica Materials as MRI Probes ». *European Journal of Inorganic Chemistry* 2012 (12): 1961-74.
- Pinel, Sophie, Muriel Barberi-Heyob, Elizabeth Cohen-Jonathan, Jean-Louis Merlin, Caroline Delmas, François Plenat, et Pascal Chastagner. 2004. « Erythropoietin-Induced Reduction of Hypoxia before and during Fractionated Irradiation Contributes to Improvement of Radioresponse in Human Glioma Xenografts ». *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 59 (1): 250-59.
- Pirollo, Kathleen F., et Esther H. Chang. 2008. « Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake? ». *Trends in Biotechnology* 26 (10): 552-58.
- Pradeep, Sunila, Jie Huang, Edna M. Mora, Alpa M. Nick, Min Soon Cho, Sherry Y. Wu, Kyunghee Noh, et al. 2015. « Erythropoietin Stimulates Tumor Growth via EphB4 ». *Cancer Cell* 28 (5): 610-22.
- Prasetyanti, Pramudita R., et Jan Paul Medema. 2017. « Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective ». *Mol Cancer* 16 (1): 41.
- Rai, Mahendra, Alka Yadav, et Aniket Gade. 2009. « Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials ». *Biotechnology Advances* 27 (1): 76-83.
- Ramis, G., G. Busca, et V. Lorenzelli. 1991. « Low-temperature CO₂ adsorption on metal oxides: spectroscopic characterization of some weakly adsorbed species ».

- Materials Chemistry and Physics*, Workshop on Clusters and Surfaces, 29 (1): 425-35.
- Reissmann, Kurt R. 1950. « Studies on the Mechanism of Erythropoietic Stimulation in Parabolic Rats During Hypoxia ». *Blood* 5 (4): 372-80.
- Ribot, Emeline J., Sylvain Miraux, Jan P. Konsman, Véronique Bouchaud, Line Pourtau, Marie-Hélène Delville, Jean-Michel Franconi, Eric Thiaudière, et Pierre J. Voisin. 2011. « In Vivo MR Tracking of Therapeutic Microglia to a Human Glioma Model ». *NMR in Biomedicine* 24 (10): 1361-68.
- Richards, Rosalie, Michael D. Jenkinson, Brian J. Haylock, et Violaine See. 2016. « Cell Cycle Progression in Glioblastoma Cells Is Unaffected by Pathophysiological Levels of Hypoxia ». *PeerJ* 3 (4): e1755.
- Rivallan, Mickaël, Gabriele Ricchiardi, Silvia Bordiga, et Adriano Zecchina. 2009. « Adsorption and reactivity of nitrogen oxides (NO₂, NO, N₂O) on Fe-zeolites ». *Journal of Catalysis* 264 (2): 104-16.
- Sakanaka, M., T. C. Wen, S. Matsuda, S. Masuda, E. Morishita, M. Nagao, et R. Sasaki. 1998. « In Vivo Evidence That Erythropoietin Protects Neurons from Ischemic Damage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (8): 4635-40.
- Sakulkhu, Usawadee, Morteza Mahmoudi, Lionel Maurizi, Jatuporn Salaklang, et Heinrich Hofmann. 2014. « Protein Corona Composition of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Various Physico-Chemical Properties and Coatings ». *Sci Rep* 21 (4): 5020.
- Santarosa, Corrado, Antonella Castellano, Gian Marco Conte, Marcello Cadioli, Antonella Iadanza, Maria Rosa Terreni, Alberto Franzin, et al. 2016. « Dynamic contrast-enhanced and dynamic susceptibility contrast perfusion MR imaging for glioma grading: Preliminary comparison of vessel compartment and permeability parameters using hotspot and histogram analysis ». *European Journal of Radiology* 85 (6): 1147-56.
- Schrand, Amanda M., Mohammad F. Rahman, Saber M. Hussain, John J. Schlager, David A. Smith, et Ali F. Syed. 2010. « Metal-Based Nanoparticles and Their Toxicity Assessment ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2 (5): 544-68.
- Schütz, Catherine A., Lucienne Juillerat-Jeanneret, Heinz Mueller, Iseult Lynch, Michael Riediker, et NanoImpactNet Consortium. 2013. « Therapeutic Nanoparticles in Clinics and under Clinical Evaluation ». *Nanomedicine* 8 (3): 449-67.
- Schwartzbaum, Judith A., James L. Fisher, Kenneth D. Aldape, et Margaret Wrensch. 2006. « Epidemiology and Molecular Pathology of Glioma ». *Nature Clinical Practice Neurology* 2 (9): 494-503.
- Scigliano, Sonia, Sophie Pinel, Sylvain Poussier, Fanny Fouyssac, Francois Plenat, Gilles Karcher, et Pascal Chastagner. 2008. « Measurement of Hypoxia Using Invasive Oxygen-Sensitive Electrode, Pimonidazole Binding and 18F-FDG Uptake in Anaemic or Erythropoietin-Treated Mice Bearing Human Glioma Xenografts ». *International Journal of Oncology* 32 (1): 69-77.
- Seekell, Raymond P., Andrew T. Lock, Yifeng Peng, Alexis R. Cole, Dorothy A. Perry, John N. Kheir, et Brian D. Polizzotti. 2016. « Oxygen Delivery Using Engineered Microparticles ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (44): 12380-85.

- Seifu, Dawit G., Tayirjan T. Isimjan, et Kibret Mequanint. 2011. « Tissue engineering scaffolds containing embedded fluorinated-zeolite oxygen vectors ». *Acta Biomaterialia* 7 (10): 3670-78.
- Shang, Li, Karin Nienhaus, et Gerd Ulrich Nienhaus. 2014. « Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters ». *Journal of Nanobiotechnology* 12 (février): 5.
- Shenouda, George, Qiang Zhang, K. Kian Ang, Mitchell Machtay, Matthew B. Parliament, Diane Hershock, Mohan Suntharalingam, et al. 2015. « Long-Term Results of Radiation Therapy Oncology Group 9903: A Randomized Phase 3 Trial to Assess the Effect of Erythropoietin on Local-Regional Control in Anemic Patients Treated With Radiation Therapy for Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck ». *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 91 (5): 907-15.
- Sicard-Roselli, Cécile, Emilie Brun, Manon Gilles, Gérard Baldacchino, Colin Kelsey, Harold McQuaid, Chris Polin, Nathan Wardlow, et Frederick Currell. 2014. « A New Mechanism for Hydroxyl Radical Production in Irradiated Nanoparticle Solutions ». *Small* 10 (16): 3338-46.
- Simon, M. Celeste. 2016. « The Hypoxia Response Pathways — Hats Off! ». *New England Journal of Medicine* 375 (17): 1687-89.
- Sinclair, Angus M., Marque D. Todd, Kevin Forsythe, Susan J. Knox, Steve Elliott, et C. Glenn Begley. 2007. « Expression and Function of Erythropoietin Receptors in Tumors ». *Cancer* 110 (3): 477-88.
- Singh, Sheila K., Ian D. Clarke, Mizuhiko Terasaki, Victoria E. Bonn, Cynthia Hawkins, Jeremy Squire, et Peter B. Dirks. 2003. « Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors ». *Cancer Research* 63 (18): 5821-28.
- Singh, Sheila K., Cynthia Hawkins, Ian D. Clarke, Jeremy A. Squire, Jane Bayani, Takuichiro Hide, R. Mark Henkelman, Michael D. Cusimano, et Peter B. Dirks. 2004. « Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells ». *Nature* 432 (7015): 396-401.
- Siu, Alan, Joshua J. Wind, J. Bryan Iorgulescu, Timothy A. Chan, Yoshiya Yamada, et Jonathan H. Sherman. 2012. « Radiation Necrosis Following Treatment of High Grade Glioma—a Review of the Literature and Current Understanding ». *Acta Neurochirurgica* 154 (2): 191-201.
- Span, Paul N., Johan Bussink, et Johannes H. A. M. Kaanders. 2016. « Engineered Microparticles Delivering Oxygen to Enhance Radiotherapy Efficacy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (50).
- Spence, Alexander M., Mark Muzi, Kristin R. Swanson, Finbarr O'Sullivan, Jason K. Rockhill, Joseph G. Rajendran, Tom C.H. Adamsen, et al. 2008. « Regional Hypoxia in Glioblastoma Multiforme Quantified with [18F] Fluoromisonidazole Positron Emission Tomography before Radiotherapy: Correlation with Time to Progression and Survival ». *Clinical cancer research* 14 (9): 2623-30.
- Stupp, Roger, Monika E Hegi, Warren P Mason, Martin J van den Bent, Martin JB Taphoorn, Robert C Janzer, Samuel K Ludwin, et al. 2009. « Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial ». *The Lancet Oncology* 10 (5): 459-66.
- Sun, Lova, Daniel Y. Joh, Ajlan Al-Zaki, Melissa Stangl, Surya Murty, James J. Davis, Brian C. Baumann, et al. 2016. « Theranostic Application of Mixed Gold and Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Micelles in Glioblastoma Multiforme ». *Journal of biomedical nanotechnology* 12 (2): 347-56.

- Sun, Tianmeng, Yu Shrike Zhang, Bo Pang, Dong Choon Hyun, Miaoxin Yang, et Younan Xia. 2014. « Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 53 (46): 12320-64.
- Tang, Xiang-Jun, Jun-Ti Lu, Han-Jun Tu, Kuan-Ming Huang, Rui Fu, Gang Cao, Min Huang, Long-Hai Cheng, Long-Jun Dai, et Li Zhang. 2014. « TRAIL-Engineered Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: TRAIL Expression and Cytotoxic Effects on C6 Glioma Cells ». *Anticancer Research* 34 (2): 729-34.
- Tellier, Céline, Déborah Desmet, Laurene Petit, Laure Finet, Carlos Graux, Martine Raes, Olivier Feron, et Carine Michiels. 2015. « Cycling Hypoxia Induces a Specific Amplified Inflammatory Phenotype in Endothelial Cells and Enhances Tumor-Promoting Inflammation In Vivo ». *Neoplasia* 17 (1): 66-78.
- Todaro, Matilde, Alice Turdo, Monica Bartucci, Flora Iovino, Rosanna Dattilo, Marco Biffoni, Giorgio Stassi, Giulia Federici, Ruggero De Maria, et Ann Zeuner. 2013. « Erythropoietin Activates Cell Survival Pathways in Breast Cancer Stem-like Cells to Protect Them from Chemotherapy ». *Cancer Research* 73 (21): 6393-6400.
- Valable, Samuel, Emmanuel L. Barbier, Myriam Bernaudin, Simon Roussel, Christoph Segebarth, Edwige Petit, et Chantal Rémy. 2007. « In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma ». *NeuroImage* 37, Supplement 1: S47-58.
- Valable, Samuel, Aurélien Corroyer-Dulmont, Ararat Chakhoyan, Lucile Durand, Jérôme Toutain, Didier Divoux, Louisa Barré, et al. 2016. « Imaging of Brain Oxygenation with Magnetic Resonance Imaging: A Validation with Positron Emission Tomography in the Healthy and Tumoural Brain ». *J Cereb Blood Flow Metab* 37 (7): 2584-2597.
- Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley, et Craig B. Thompson. 2009. « Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation ». *Science* 324 (5930): 1029-33.
- Vartanian, Alenoush, Sanjay K. Singh, Sameer Agnihotri, Shahrzad Jalali, Kelly Burrell, Kenneth D. Aldape, et Gelareh Zadeh. 2014. « GBM's Multifaceted Landscape: Highlighting Regional and Microenvironmental Heterogeneity ». *Neuro-Oncology* 16 (9): 1167-75.
- Venkatesh, Humsa S., Tessa B. Johung, Viola Caretti, Alyssa Noll, Yujie Tang, Surya Nagaraja, Erin M. Gibson, et al. 2015. « Neuronal Activity Promotes Glioma Growth through Neuroligin-3 Secretion ». *Cell* 161 (4): 803-16.
- Vilaça, Natália, Ricardo Amorim, Ana F. Machado, Pier Parpot, Manuel F. R. Pereira, Mariana Sardo, João Rocha, António M. Fonseca, Isabel C. Neves, et Fátima Baltazar. 2013. « Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for in vitro models of colorectal carcinoma ». *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 112: 237-44.
- Wagloehner, Steffen, Julian N. Baer, et Sven Kureti. 2014. « Structure–activity relation of iron oxide catalysts in soot oxidation ». *Applied Catalysis B: Environmental* 147 (avril): 1000-1008.
- Weller, Michael, Jörg Felsberg, Christian Hartmann, Hilmar Berger, Joachim P. Steinbach, Johannes Schramm, Manfred Westphal, et al. 2009. « Molecular Predictors of Progression-Free and Overall Survival in Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma: A Prospective Translational Study of the German Glioma Network ». *Journal of Clinical Oncology* 27 (34): 5743-50.
- Wheatley, Paul S., Anthony R. Butler, Michael S. Crane, Sarah Fox, Bo Xiao, Adriano G Rossi, Ian L. Megson, et Russell E. Morris. 2006. « NO-Releasing Zeolites and

- Their Antithrombotic Properties ». *Journal of the American Chemical Society* 128 (2): 502-9.
- Wilson, William R., et Michael P. Hay. 2011. « Targeting Hypoxia in Cancer Therapy ». *Nature Reviews Cancer* 11 (6): 393-410.
- Wong, Cliff, Triantafyllos Stylianopoulos, Jian Cui, John Martin, Vikash P. Chauhan, Wen Jiang, Zoran Popović, Rakesh K. Jain, Mounji G. Bawendi, et Dai Fukumura. 2011. « Multistage Nanoparticle Delivery System for Deep Penetration into Tumor Tissue ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (6): 2426-31.
- Yang, Ning, Tao Yan, Huaiyang Zhu, Xiao Liang, Lina Leiss, Per Øystein Sakariassen, Kai Ove Skafnesmo, et al. 2014. « A co-culture model with brain tumor-specific bioluminescence demonstrates astrocyte-induced drug resistance in glioblastoma ». *Journal of Translational Medicine* 12: 278.
- Yoon, Seon-Jin, Jin-Kyoung Shim, Jong Hee Chang, Ju Hyung Moon, Tae-Hoon Roh, Kyoung Su Sung, Ji-Hyun Lee, et al. 2016. « Tumor Mesenchymal Stem-Like Cell as a Prognostic Marker in Primary Glioblastoma ». *Stem Cells In* 2016: 6756983.
- Yoshimura, Michio, Satoshi Itasaka, Hiroshi Harada, et Masahiro Hiraoka. 2012. « Microenvironment and Radiation Therapy ». *Biomed Res Int* 2013:685308.
- Yuan, Xiangpeng, James Curtin, Yizhi Xiong, Gentao Liu, Sebastian Waschsmann-Hogiu, Daniel L. Farkas, Keith L. Black, et John S. Yu. 2004. « Isolation of Cancer Stem Cells from Adult Glioblastoma Multiforme ». *Oncogene* 23 (58): 9392-9400.
- Zaarour, Moussa, Biao Dong, Izabela Naydenova, Richard Retoux, et Svetlana Mintova. 2014. « Progress in zeolite synthesis promotes advanced applications ». *Microporous and Mesoporous Materials*, 17th International Zeolite Conference, Moscow, Russia, July 7-12, 2013:Plenary-, Keynote- and Selected Papers dedicated to Dr. Michael Stocker on the occasion of his retirement as Editor-in-Chief of Microporous and Mesoporous Materials, 189: 11-21.
- Zazo, Hinojal, Clara I. Colino, et José M. Lanao. 2016. « Current applications of nanoparticles in infectious diseases ». *Journal of Controlled Release* 224: 86-102.

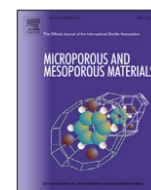
ANNEXE 1

“Synthesis and encapsulation of fluorescein in zeolite Y”

Małgorzata Łukarska, Aldona Jankowska, Jacek Gapinski, Samuel Valable, Clément Anfray, Benjamin Ménard, Svetlana Mintova and Stanisław Kowalak

Microporous and Mesoporous Materials

2016



Synthesis and encapsulation of fluorescein in zeolite Y



Małgorzata Łukarska^a, Aldona Jankowska^a, Jacek Gapiński^{b, c}, Samuel Valable^d,
Clement Anfray^d, Benjamin Ménard^d, Svetlana Mintova^e, Stanisław Kowalak^{a, *}

^a Faculty of Chemistry, A. Mickiewicz University, Poznań, Poland

^b Faculty of Physics, A. Mickiewicz University, Poznań, Poland

^c NanoBioMedical Center, A. Mickiewicz University, Poznań, Poland

^d CERVOxy Group, CNRS, University of Caen, CEA, 14050 Caen, France

^e LCS, CNRS, ENSICAEN, University of Caen, 14050 Caen, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2015

Received in revised form

19 February 2016

Accepted 21 February 2016

Available online 24 February 2016

Keywords:

Fluorescein

Synthesis

Zeolite Y

Encapsulation

Fluorescence

ABSTRACT

Fluorescein was entrapped inside FAU type zeolite (Y) by generating it from resorcinol and phthalic anhydride. Prior to the formation of fluorescein, zeolite Y was modified with various cations (H, Zn, Ce, Na, K). The modified zeolite acted as catalysts for the fluorescein Friedel–Crafts reaction synthesis, while at the same time it played a role of matrix for the stabilization and homogeneous dispersion of the guest molecules. The nature of the different cations influenced the content of fluorescein generated in the zeolite, and favoured the formation of some dye isomers (i.e. anion, dianion, cation or transition metal complex). The contribution of different fluorescein derivatives in the products was reflected in their absorption and fluorescence properties. The H-, Ce-, and Zn-containing Y zeolites revealed the highest content of fluorescein due to their distinct acid active sites. The composites with H- and ZnY zeolites indicated much higher fluorescence than that of the pristine fluorescein. Moreover, fluorescein in zeolite Y matrices did not show any photobleaching under continuous illumination ($\lambda = 730$ nm, in a two-photon experiment for 180 s), which suggests that these materials could be used for biomedical applications.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Zeolites and related materials (molecular sieves) have gained enormous importance in many industrial applications, particularly in selective adsorption, catalysis and ion exchange processes. The uniform pore system in a given type of zeolite makes them very suitable matrices for embedding different organic or inorganic guest molecules [1]. Such guest–host systems provide a perfect dispersion of the incorporated molecules, which often evokes their novel properties and increased stability [2]. The resulting composites can be used as sensors, optical and microelectronic devices, fast pigments, and medical agents for both diagnostic and therapeutic (theranostic) purposes. The guest molecules can be chemically bonded to the zeolite surface (e.g. by means of ion-exchange of cationic moieties like methylene blue), or they can be confined within the zeolite matrix without any significantly strong chemical interaction (*ship in a bottle encapsulation*) [3].

Fluorescein (F) is a synthetic xanthene dye with distinct fluorescent properties. The size of the fluorescein molecule is

$\sim 1.05 \times 0.8 \times 0.7$ nm [4]. The dimension of the fluorescein molecule is bigger than the size of the pore opening of zeolites (e.g. LTA, FAU, MFI, LTL), which suggests that its introduction by post synthesis treatment within zeolites will be difficult. However, there is a paper that has reported on the introduction of some fluorescein into zeolite X by means of solution impregnation [4]. Fluorescein was synthesized for the first time by von Baeyer in 1871 by means of the Friedel–Crafts reaction of resorcinol and phthalic anhydride catalysed by ZnCl_2 . The Brønsted acids appeared even more efficient catalysts of this reaction than ZnCl_2 (Lewis acid). Therefore, the above reaction could be applied for encapsulation of fluorescein into relatively narrow pore zeolites such as FAU, LTL, MFI, and MOR structures. The initial substrate compounds (resorcinol and phthalic anhydride) with relatively small molecules could be easily introduced into zeolite voids after which it would be possible for the bulkier fluorescein molecules to form there upon catalytic reaction. The required catalytic active acid sites (Brønsted or Lewis type) can be easily generated in zeolites by means of modification with respective cations.

The formation of fluorescein in zeolites has been already reported [5–7]. Scaiano et al. used zeolite Y modified with several different cations (H^+ , Na^+ , Cs^+), although oligovalent cations were not used.

* Corresponding author.

They noticed lower fluorescence of the fluorescein encapsulated in samples NaY and CsY than that obtained with zeolite HY. Results on using nanosized zeolite Y were reported by Wada et al. [7]. They found that the fluorescein engaged inside the cavities of zeolite was protected against fluorescence quenching (with C₆₀), which was in contrast to the dye molecules adsorbed on outer surface of the zeolite. Some photochemists are reluctant to use zeolite matrices as a dispersing phase for fluorescent compounds because of doubts concerning their definite localization within the pore system and the homogeneity of these positions [6]. The reliability of transient absorbance spectra obtained by diffuse reflectance is also disputable. The interaction between host and guest is an important issue and the distinction of molecules inside the pores and those adsorbed on outer surface is not easy to determine [7].

The following study is focused on the encapsulation of fluorescein inside zeolite Y by means of generation of the dye from initial substrates mixed with the zeolite modified with various cations and heated at 150 °C. Some of the results (e.g. on samples with Cu, Fe, Co modified zeolite Y) require further characterization and they are not included in this paper. The products based on matrices with (zeolite Y modified with cations such as H⁺, Zn²⁺, Ce³⁺, Na⁺, K⁺) are presented here. The catalytic properties of zeolite depend on the nature of extra-framework cations and therefore, the initial zeolite NaY was subjected to ion exchange. The H-form of zeolite provides strong protonic acid sites. Acid sites (Lewis or Brønsted type) are also generated in zeolites modified with oligovalent metal cations. Some noticeable acidity is attributed even to zeolites with alkaline metal cations. The nature of the cations in zeolite affects the efficiency and selectivity of the substrate reaction. It can also influence the interaction of generated fluorescein with the zeolite matrix. Some cations (particularly transition metal cations) can form coordination bonds with fluorescein species. We have chosen the Zn modification of zeolite in reminiscence of von Bayer's classic synthesis of fluorescein with ZnCl₂ catalyst. The nature and strength of these interactions affect the properties of the resulting composite and the nature of the fluorescein derivative form (Fig. S1, supplementary information) anion, dianion, cation, zwitterion, lactone, etc. The resulting composites based on fluorescein introduced in zeolite Y modified with various cations and the results of this process were subjected to Soxhlet extraction with ethanol in order to remove non-reacted substrates and compounds located on the outer zeolite surface. The prepared products were characterized thoroughly by UV–Vis, IR, XRD, SEM, NMR, thermogravimetric analysis (TG), elemental analysis, fluorescence, and confocal microscopy. It was very interesting to assess the influence of the chosen extra framework zeolite cations on the properties of the resulting fluorescein composites. The fluorescein encapsulated in zeolites will be considered for new applications as optical and fluorescent devices or theranostic agents.

2. Experimental

Zeolites NaY (powder) supplied by Aldrich, Poland were used as starting material. The proton (H) form of zeolite Y was prepared by threefold ion exchange with NH₄Cl aqueous solution (0.1 M) and further thermal treatment at 350 °C, overnight. The modifications of the parent NaY zeolite with different cations (H, Na, K, Zn, Ce) were obtained by the ion-exchange procedure with solutions of chlorides of the respective cations. Only selected samples are presented in this paper (Table 1).

The zeolite samples were thermally activated (230 °C for 2 h) in order to remove water, and then mixed and ground with stoichiometric amounts of resorcinol (2 R) and phthalic anhydride (1 Ph). Some excess of the reagents was applied, depending on the amount of zeolite (usually 220 mg of R, 150 mg of Ph and 500 mg of

zeolite). The mixtures were heated in glass vials inserted in a steel autoclave at 150 °C for 16 h.

The products showed beige colouration, which turned yellow after Soxhlet extraction with ethanol. The extraction was continued until a colourless extract was attained and its UV–Vis spectra showed no evidence of fluorescein.

The samples were characterized by means of X-ray diffraction (XRD) using a Bruker D8 Advance X-ray diffractometer with filtered Cu-K α radiation ($\lambda = 0.154056$ nm), (Ni filter) in 2 θ angle range of 6–60°. The microphotographs of samples were obtained with a scanning electron microscope (SEM) using a TESCAN Mira. Thermogravimetric (TG) analyses of samples were conducted using a SETARAM, SETSYS 1200 (10–15 mg samples heated in air from 25 to 800 °C with a rate of 5 °C/min). The N₂ sorption isotherms for the samples were recorded by Quantachrome NOVA 1000e. The elemental analysis (carbon content) was performed with an Elementar Vario EL III instrument.

FTIR spectra (KBr) in the range 400–4000 cm⁻¹ were recorded with a Bruker Tensor 27 FT-IR spectrometer. Diffuse reflectance UV–Vis spectra of solids and suspensions (water or ethanol) were recorded by a Jasco V-670 spectrophotometer. ¹³C CP/MAS nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were measured with a Bruker Advance 400 spectrometer while the fluorescence spectra of the samples were measured by means of an LS 55 Fluorescence Perkin Elmer Spectrometer. Additionally, the selected samples were measured using a confocal microscope equipped with an LSM 780 Zeiss. A Leica two-photon microscope DM6000 coupled to a femtosecond pulsed infrared laser (680–1080 nm, power 3 W) attached to the Zeiss LSM 780 confocal microscope was used to estimate fluorescence efficiency. Photobleaching experiments were performed for 180 s (1 s resolution) by means of the Leica two-photon microscope DM6000 at an excitation wavelength of 730 nm (highest fluorescence efficiency). For spectroscopic measurements, pristine fluorescein (Aldrich, USA) was used without any purification as a standard (reference) sample. TPLSM image analysis was carried out with an in-house macros based on ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/gate1.inist.fr/ij/>, 1997–2009). Fluorescence lifetime measurements were performed by means of a Picoquant add-on setup combined with an Olympus FV1000 laser-scanning microscope. A picosecond diode laser with 485 nm wavelength was used for sample excitation.

3. Results and discussion

A series of samples was obtained by mixing and then heating the cation modified zeolites Y and stoichiometric mixtures of resorcinol and phthalic anhydride. The product samples were ground and washed with ethanol in the Soxhlet apparatus in order to remove the excess of non-entrapped fluorescein as well as the unconverted initial reagents. Some of the products were analysed by UV–Vis absorption before washing. The UV–Vis spectra of the extract collected after Soxhlet treatment show the same shape as that of fluorescein there by confirming the formation of this dye (Fig. 1).

Table 1
Symbols of presented samples and carbon content in the washed composites.

Sample		
As prepared	After washing	C [% wt.]
CeY_F	CeY_F_W	14.63
HY_F	HY_F_W	12.44
KY_F	KY_F_W	3.2
NaY_F	NaY_F_W	5.29
ZnY_F	ZnY_F_W	9.52

The ^{13}C CP/MAS NMR results verify the generation of F inside zeolite Y (Fig. 2). It can be seen that all the peaks recorded for pure fluorescein are also present in the spectrum of the HY_F_W sample. An additional peak is noticeable at 109.7 ppm, which might be due to unreacted resorcinol [8]. This is confirmed by the NMR spectrum of the mechanical mixture of zeolite Y and the substrates (Fig. S2). The broadening of the signal at ppm ~ 170 in spectrum of HY_F_W provides evidence of F encapsulation inside zeolite Y. The molecules inside zeolite Y are rigidly packed with retarded mobility which causes a broadening of the signal in the spectrum [9,10]. The spectra also suggest that a fraction of dye molecules is only partly confined by the zeolite pore system and another part of the molecule remains outside the crystallites. It is likely that the central part of the dye molecules, i.e. the carboxylic group ($2'\text{-CO}$) is entrapped inside zeolite Y. The part of molecule located outside the zeolite may associate (e.g. hydrogen bonds) with other dye molecules and so form aggregates. This result can explain the relatively high dye content in the prepared samples.

The results of the elemental analysis indicate the considerable influence of the cations in zeolite Y on the content of the encapsulated fluorescein (Table 2). The highest fluorescein content was found for samples prepared with CeY and HY (i.e. 14.6 and 12.4% of C, respectively). This may be due to the high acidity of these zeolites. Composites with alkaline cation modified zeolite matrices (KY_F_W, NaY_F_W) contain a relatively low dye concentration, i.e. 3.2% and 5.3%, respectively.

These results reveal a substantial content of carbon in the samples, although this cannot be explicitly attributed to the fluorescein generated in the zeolites. It is possible that some portion of the initial (unconverted) substances remain inside the zeolites despite the extensive solvent extraction treatment. Moreover, the relatively bulky fluorescein generated inside the zeolite may block the pores and impede the removal of smaller molecules (initial substances) upon washing.

The thermogravimetric (TG) analyses of selected samples confirm the aforementioned results (elemental composition). The weight loss followed by TG proceeds in two main stages (Fig. 3). The first with a maximum at ~ 100 °C results from the desorption of alcohol remaining after extraction and some water. The next step with a maximum above 500 °C results from the combustion of dye and desorption of the oxidation products. The weight lost and the respective temperatures are summarized in Table S1.

The F introduced into zeolite Y was also studied by IR spectroscopy. The IR spectra of as prepared composites show distinct bands similar to that of pristine F, but after careful washing the

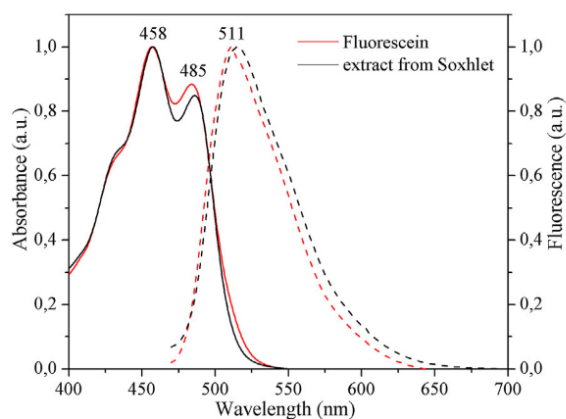


Fig. 1. UV–Vis absorption (solid) and emission (dashed) spectra of pristine fluorescein (in EtOH) and extract from EtOH washed (Soxhlet) composite.

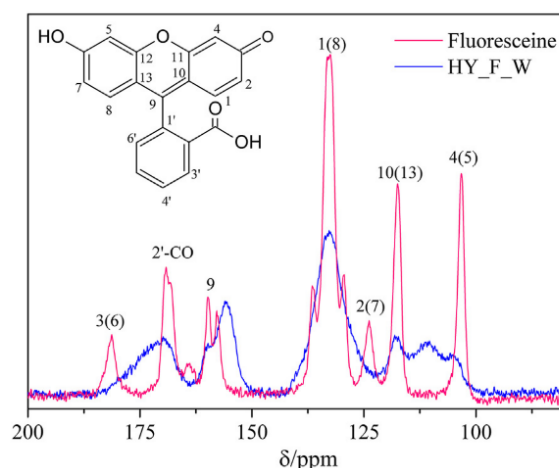


Fig. 2. ^{13}C NMR spectra of HY_F_W and pristine fluorescein.

peaks attributed to F diminish in intensity dramatically (Fig. S3). The crystallinity of the samples after introduction of fluorescein at elevated temperature was confirmed by recording the X-ray diffraction. As shown in Fig. S4, the encapsulation of fluorescein does not affect the crystallinity of zeolite Y. All the Bragg reflections characteristic of FAU type zeolite appear in the XRD patterns, although their small shifting is observed. This is most likely a result of the presence of fluorescein inside the pore system, that alters the unit cell parameters (Table S2).

The accommodation of F inside Y supercages is reflected in changed porous properties. As expected, adsorption ability is drastically reduced after the inner voids are filled with F molecules (Table 2). The porosity of the samples containing F decreases dramatically.

Important information on the nature of the fluorescein molecules in zeolite Y is provided by the diffuse reflectance UV–Vis results. The UV–Vis spectra (Fig. 4) indicate a substantial difference between the spectrum of pristine fluorescein and the zeolite composites containing fluorescein. The bands at ~ 390 and ~ 490 nm are predominant in the spectrum of pristine fluorescein which might reflect the contribution of crystalline F aggregates [11]. In the spectra of fluorescein bearing zeolite samples before washing, the most intense band is at ~ 440 nm and two bands with lower intensity at ~ 360 and ~ 490 nm are also observed. After careful purification (washing) of zeolite samples with ethanol, their spectra contained only one band at ~ 435 nm that suggests the removal of F from the external surface of the crystals.

An additional preparation experiment was performed with 10 times lower loading (15 mg Ph, 22 mg R) of initial substrates (Ph + R) for formation of fluorescein within zeolite HY (500 mg of zeolite) (Fig. S5). The aim of this experiment was to assess if the fluorescein located on the outer zeolite surface is also formed when the amount of substrates is substantially reduced. As indicated in Fig. S5, the UV–Vis spectra contain only one band at 434 nm, and the purification of the samples with ethanol does not change the

Table 2
BET surface area and micropore volume of parent zeolite NaY and of exemplary composites.

Sample	Specific surface area m^2/g	Micropore volume [cm^3/g]
NaY	511.6	0.344
HY_F_W	1.0	0.00276
CeY_F_W	5.9	0.0188

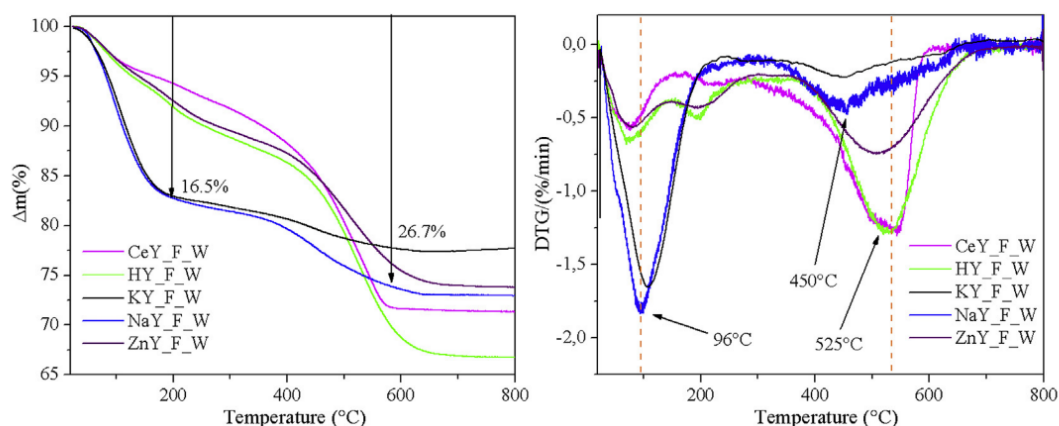


Fig. 3. TG (left) and DTG (right) curves of zeolite samples containing fluorescein (ZnY_F_W, CeY_F_W, HY_F_W, KY_F_W and NaY_F_W).

intensity or position of the band. The fluorescence emission spectrum (Fig. S6) indicates a much higher emission intensity of the sample prepared with a reduced content of substrates than for the sample prepared according to the conventional procedure (see Experimental section). Based on the carbon content analysis (C, wt.%), the amount of fluorescein corresponded to ~7.8 wt.% of C, whereas in the sample with higher loading of substrates (Ph + R), the F content was 12.44 wt.% C.

The diffuse reflectance spectra do not show any substantial differences in the samples prepared with various cations introduced in zeolite Y (Fig. 4). The spectra recorded for the samples suspended in ethanol (Fig. 5) or water (Fig. S7) demonstrate the influence of the type of cations in the zeolite much more distinctly. The positions of the absorption (λ_{\max}) band observed for all samples after washing are summarized in Table S3.

The spectra of the as prepared samples suspended in ethanol resemble that recorded for the solid samples. They consist of bands from dispersed product and from fluorescein dissolved in the ethanol from the surface of the zeolites. There are two paramount absorption bands at ~480 and 460 nm, and a smaller one at ~420 nm. A dramatic difference in UV–Vis spectra is seen in samples purified with ethanol. The NaY, KY, and ZnY samples exhibit similar spectra with an absorption maximum at ~470 nm, while the spectra of HY, CeY samples show the bands at ~420 nm. The spectra

of the first group of samples might reflect the contribution of anion or dianion in the embedded fluorescein [12,13], due to the contribution of alkaline cations. However, the behaviour of ZnY in this group is unexpected and difficult to explain. On the other hand, HY and CeY with strong acid sites favour a generation of a cationic derivative of F. The spectra recorded in water suspension are very much alike for all the samples under study, regardless of the type of cations introduced to the zeolites (Fig. S7). The maxima of the absorption (λ_{\max}) band observed for all the samples after washing are summarized in Table S3.

The fluorescence properties of the resulted composites are presented in Fig. S8. The suspension of as prepared samples in ethanol after excitation by a laser beam of wavelength $\lambda = 400$ nm shows a band with a maximum at 514 nm in the emission spectra, regardless of the kind of zeolite cations. The emission spectra of the above samples suspended in water are even more uniform. The maxima of all the emission bands are at 514 nm in ethanol, which is typical of emission spectra for pristine fluorescein in this solvent. Only the sample KY_F displays an additional emission band at 535 nm. The change of solvent for a more polar one (water) results in a more uniform course of the recorded spectra with the exception of sample HY_F, which is much broader and shows a shoulder at 537 nm. The similarity of the above spectra probably results from the remarkable contribution of extra-cage located F, which suppresses the influence of zeolite cations.

The washed samples (Fig. 6), on the other hand, exhibit considerable differences in their fluorescence intensity and wavelength of emission bands measured in ethanol in the range 512–553 nm. The fluorescence recorded in water is again very similar for these samples and shows a maximum at 512 nm. Only the spectrum of sample NaY_F_W is red shifted from 536 to 569 nm, while for the samples KY_F_W and HY_F_W a small red shift with a maximum at 520 nm and 536 nm, respectively, is observed.

In photobleaching experiments with pristine fluorescein a mono-exponential decay was observed, as expected. The results of the photobleaching experiment performed on zeolite Y containing F are very far from exponential decays, as can be seen in Fig. 7. The photobleaching effect can be described as a dynamic process in which fluorescent molecules undergo photo-induced chemical destruction leading to the loss of their fluorescence ability due to exposure to excitation light. The dye molecule (F) interacts with the zeolite Y containing different cations, which means that the environment is very complex and not easy to control, in contrast to pure solvent. The pristine fluorescein behaves according to the mechanism D-O described in the literature [14,15], where oxygen plays

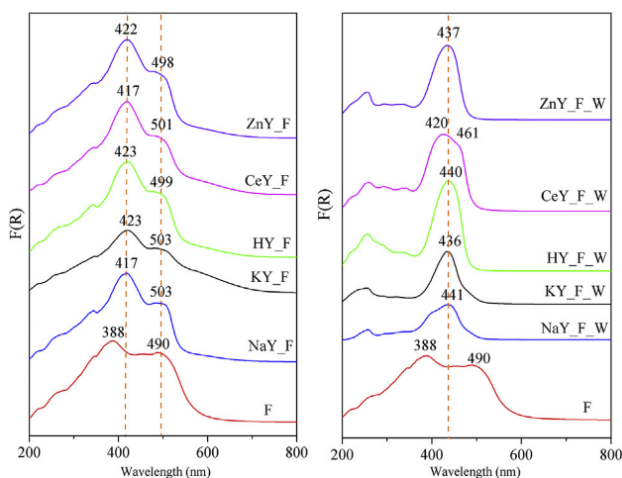


Fig. 4. Diffuse reflectance UV–Vis spectra of composite samples before (left) and after washing with ethanol (right).

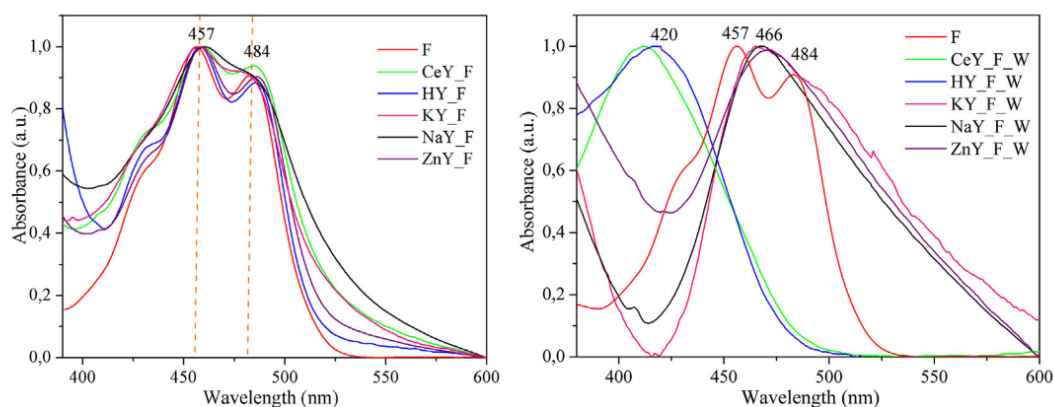


Fig. 5. UV-Vis spectra of as-prepared (ZnY_F, CeY_F, HY_F, KY_F, NaY_F, and F) (left) and washed samples (right) suspended in ethanol.

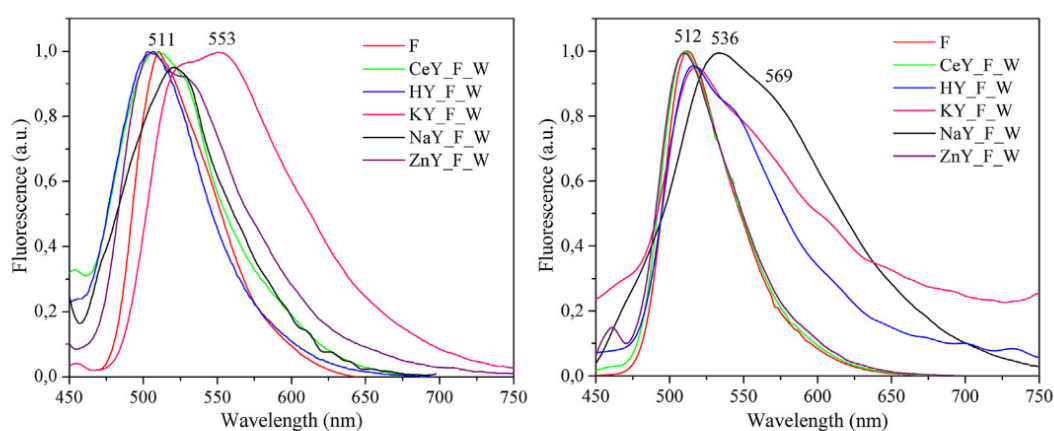


Fig. 6. Emission spectra of the indicated samples and fluorescein suspended in ethanol (left) and in water (right).

the role of a “quencher” of the triplet state of fluorescein. This situation is possible because pristine fluorescein in solid state due to continuous contact with the oxygen can undergo a photobleaching [16]. In the case of F encapsulated in the zeolite Y, the concentration and access of oxygen reacting with F decreases markedly. It is possible that one dye molecule inside the zeolite void could contact with another, but we assume that a higher dispersion is guaranteed

in the zeolite than in conventional solvent (ethanol) where fluorescein could freely move and diffuse. On the other hand, the zeolite also acts as a solvent.

More interestingly, the zeolite Y samples with fluorescein show much higher intensity in fluorescence emission in comparison to pure fluorescein (Fig. 8). The fluorescence intensity of the sample with ZnY_F_W is the most predominant among the samples under study. The fluorescence intensity of the other samples is substantially lower and can be ranked in the following order KY_F_W >> CeY_F_W > NaY_F_W > HY_F_W > F. It is also conspicuous that the emission maximum of the samples HY_F_W and CeY_F_W is the same as for pristine F (i.e. 511 nm), whereas in the case of samples ZnY_F_W and particularly KY_F_W it is markedly red shifted to 520 nm and 560 nm, respectively. The direction of the shift seems to correlate with the acidity of the zeolite matrix. There is no shift in the spectra maxima for samples HY_F_W and CeY_F_W, with strongly acidic zeolites. The high fluorescence of the sample KY_F_W may result from a contribution of the dianionic form of generated fluorescein, but the predominant position of the ZnY_F_W sample is not completely clear.

The lifetime of the samples was measured by fluorescence lifetime imaging (FLIM). As shown in Fig. 9, a variety of fluorescence lifetimes were observed for the samples in the following declining order:

ZnY_F_W > CeY_F_W > HY_F_W > KY_F_W > NaY_F_W > and F. The following lifetime (τ) order for fluorescein isomers has been reported in the literature: $\tau_{\text{dianion}} > \tau_{\text{anion}} > \tau_{\text{quinoid}}$ [17]. The extended fluorescence lifetime of the zeolite samples with

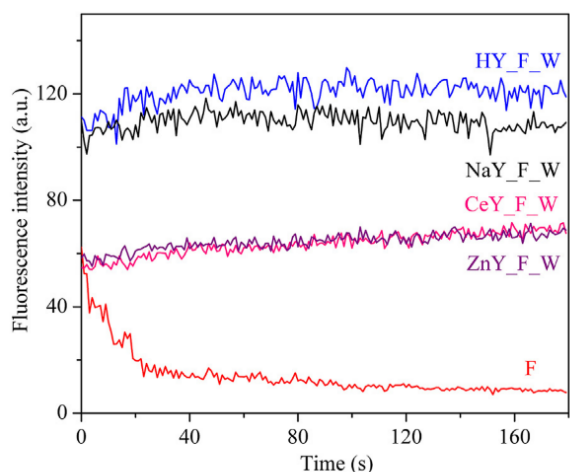


Fig. 7. Photobleaching of the indicated samples and pristine fluorescein (F).

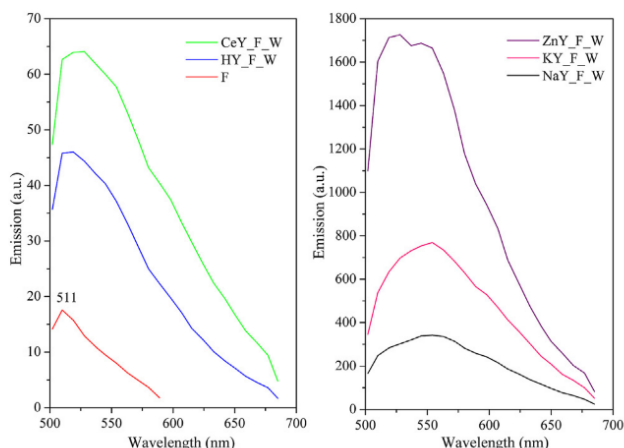


Fig. 8. Emission spectra for CeY_F_W, HY_F_W, fluorescein (left) and ZnY_F_W, KY_F_W, NaY_F_W (right).

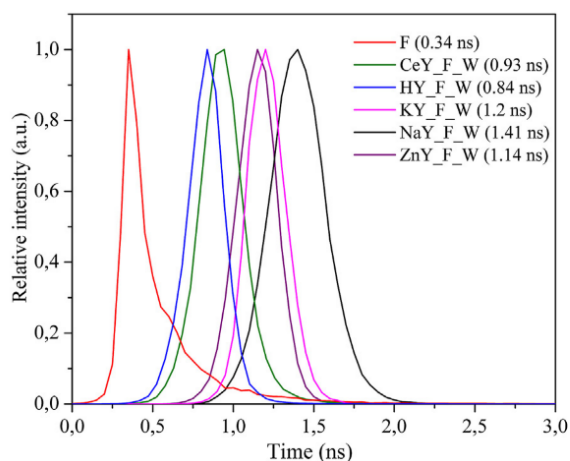


Fig. 9. Fluorescence lifetime of the indicated samples and fluorescein (F) (distributions were normalized with respect to their maximum values).

fluorescein as shown in Fig. 9 may result from its very high dispersion in the Y zeolite. This effect was also observed after encapsulation of fluorescein in mesoporous materials SBA-15 [18]. The high dispersion of fluorescein even at a monomolecular level prevents the collision between the dye and dye-solvent molecules and thus they are greatly reduced. This is reflected in energy loss and consequently in prolonging the fluorescence lifetime of the fluorescein. Moreover, different zeolite cations favour the generation of various forms of fluorescein. The spectra of samples CeY_F_W, HY_F_W and ZnY_F_W, where strong acidic sites are present, are reminiscent of those of pure dye, and suggest a prevailing contribution of a cationic or quinoid form of the fluorescein. The extended fluorescence lifetime of these samples results from a very high dispersion of F molecules in the zeolite matrix.

4. Conclusions

Fluorescein was introduced into zeolite Y by its solvent-free synthesis and subsequent encapsulation. The amount of encapsulated fluorescein was found to depend on the nature of the zeolite cations. The zeolite samples with strong acidic sites (HY, CeY, ZnY) contain the highest content of fluorescein. The fluorescein molecules

are formed not only exclusively inside the cavities but also on the outer surface of zeolites. Moreover, it is very likely that some molecules are only partially attached on the entrance of the zeolite pore system and a part of molecule remains outside. An excess of fluorescein from the zeolite outer surface can be removed by ethanol extraction.

The cations introduced in zeolite Y by ion exchange not only affect the amount of fluorescein formed and encapsulated, but also influence the form of the generated dye derivative. The electronic spectra (particularly those recorded in solvent suspensions) illustrate significant differences in the positions of the absorption bands. Acidic zeolites (e.g. HY, CeY) show bands typical of the cationic form of fluorescein. Samples with alkaline cations (K, Na) present absorption spectra resembling the anion and dianion forms of fluorescein. Cations also affect the intensity of fluorescence as well as the bands' maximum in the emission spectra. All zeolite samples containing fluorescein species show higher fluorescence in comparison to pristine F because of its high dispersion. Although the anion and dianion forms of fluorescein are considered more efficient, the samples obtained in acidic zeolite (i.e. containing H and oligovalent metal cations) indicate a higher emission due to a greater concentration of formed fluorescein. ZnY seems to be a particularly suitable matrix and it causes the highest fluorescence efficiency of the confined fluorescein. An extended fluorescence lifetime of the zeolite samples with fluorescein in comparison to pristine fluorescein is attained, which can be explained by the low rate of collision between the bare molecules and low energy loss.

Acknowledgement

Financial support from the National Centre for Research and Development under research grant "Nanomaterials and their application to biomedicine", contract number PBS1/A9/13/2012, is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.02.043>.

References

- [1] J.C. Scaiano, H. García, *Acc. Chem. Res.* 32 (1999) 783–793.
- [2] N. Herron, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* 21 (1995) 283–298.
- [3] N. Herron, *Inorg. Chem.* 25 (1986) 4714–4717.
- [4] K.A. Fisher, K.D. Huddersman, M.J. Taylor, *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 5873–5878.
- [5] M.N. Chretien, B. Shen, H. Garcia, A.M. English, J.C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.* 80 (2004) 434–437.
- [6] L.R. Aramburo, J. Ruiz-Martínez, J.P. Hofmann, B. Weckhuysen, *Catal. Sci. Technol.* 3 (2013) 1208–1214.
- [7] T. Kataoka, A.J. Mozer, Y. Tsukahara, T. Yamauchi, Y. Wada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 80 (2007) 2303–2312.
- [8] U. Anthoni, C. Christophersen, P.H. Nielsen, A. Püschl, K. Schaumburg, *Struct. Chem.* 6 (1995) 161–165.
- [9] F. Babonneau, L. Yeung, N. Steunou, C. Gervais, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 31 (2004) 219–223.
- [10] T. Azais, C. Tourné-Péteilh, F. Aussenac, N. Baccile, C. Coelho, J.M. Devoisselle, F. Babonneau, *Chem. Mater.* 18 (2006) 6382–6390.
- [11] S. Das, A.P. Chattopadhyay, S. De, *J. Photochem. Photobiol. A* 197 (2008) 402–414.
- [12] R. Sjöback, J. Nygren, M. Kubista, *Spectrochim. Acta Part A* 51 (1995) L7–L721.
- [13] A. Song, J. Zhang, M. Zhang, T. Shen, J. Tang, *Physicochem. Eng. Aspects* 167 (2000) 253–262.
- [14] V. Kasche, L. Lindqvist, *React. Triplet State Fluorescein Oxyg.* 68 (1964) 817–823.
- [15] G.O. Schenck, *Naturwiss* 35 (1948) 28–29.
- [16] L. Song, E.J. Hennink, I.T. Young, H.J. Tanke, *Biophys. J.* 68 (1995) 2588–2600.
- [17] M. Martin, J. Landqvist, *J. Lum* 10 (1976) 381–391.
- [18] L. Wang, Y. Shao, J. Zhang, M. Anpo, *Opt. Mater.* 28 (2006) 1232–1234.

ANNEXE 2

CURRICULUM VITAE

Clément Anfray

Informations personnelles

Date de naissance: 1991.03.28

Adresse:

159 rue Caponière

14000 Caen, France

E-mail: anfray@cyceron.fr

Téléphone: +33 6 17 07 14 79



Formation

2014-présent	Thèse de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Caen Normandie, France
2015	Diplôme d'expérimentation animale, Université de Caen Normandie, France
2012-2014	Master en Neurosciences, Université de Caen Normandie, France
2009-2012	Licence de Biologie, Université de Caen Normandie, France

Expériences professionnelles

Janvier 2014-Juin 2014	ISTCT- UMR 6301, équipe CERVOxy, France Développement de constructions inductibles par l'hypoxie pour l'inhibition de l'érythropoïétine dans les glioblastomes.
Avril 2013-Mai 2013	ISTCT- UMR 6301, équipe CERVOxy, France Effet du 2-méthoxyestradiol sur l'expression de protéines induites par HIF-1 α : intérêt pour les glioblastomes ?
Juin 2011-Juillet 2011	BioMEA - FRE3484 CNRS INEE Etude de l'impact du lieu de pontes sur la croissance de juvéniles de seiche <i>sepia officinalis</i> .

Compétences scientifiques

Biologie moléculaire

- ✓ RT-qPCR, western-blot, électrophorèse
- ✓ Design, clonage et amplification de plasmides, production de vecteurs lentiviraux

Biologie cellulaire

- ✓ Culture primaire d'astrocytes et de neurones murins, culture de lignées cellulaires (U87-MG, U251-MG, C6, 9L, HEK 293, BEnd.3), culture en hypoxie (chambre à hypoxie)
- ✓ Transfection et infection cellulaires
- ✓ Irradiation X (irradiateur X-rad 225-Cx)
- ✓ Tests de survie et de clonogénicité, cytométrie en flux (analyse du cycle cellulaire)

Expérimentation animale

- ✓ Manipulation d'animaux (souris, rats), injection intrapéritonéale, perfusion cardiaque, irradiation X (irradiateur X-rad 225-Cx), euthanasie

Imagerie

- ✓ IRM (7T Pharmascan, Bruker avec le logiciel Paravision 6.0) : BOLD, Mesure de volume sanguin et cartes de saturation en oxygène
- ✓ Immunocytochimie
- ✓ Microscopie à fluorescence, vidéomicroscopie

Autres

- ✓ Informatique : Analyse d'images (ImageJ, développement de macros), Microsoft Office, Serial Cloner, Chromas, JMP Pro, Metamorph software
- ✓ Logistique : Gestion de stocks
- ✓ Langues : Français, Anglais

Compétences d'enseignement

Cours magistraux et travaux dirigés

- ✓ License de Neurosciences et de Psychologie, Université de Caen Normandie, France (49 heures)

Travaux pratiques

- ✓ Licence de Neurosciences, Université de Caen, France (15 heures)

Encadrement d'étudiants

- ✓ Deux étudiants de Licence 3
- ✓ Deux étudiants de master 2

Publications

C. Anfray, B. Dong, S. Komaty, S. Mintova and S. Valable (2017). Acute toxicity of silver free and encapsulated in nanosized zeolite for eukaryotic cell. *ACS Applied Materials & Interfaces*. *In press*.

V. Georgieva, **C. Anfray**, R. Retoux, V. Valtchev, S. Valable and S. Mintova (2016). Iron loaded EMT nanosized zeolite with high affinity towards CO₂ and NO. *Microporous and Mesoporous Materials*.

M. Łukarska, A. Jankowska, J. Gapiński, S. Valable, **C. Anfray**, B. Ménard, S. Mintova and S. Kowalak (2016). Synthesis and encapsulation of fluorescein in zeolite Y. *Microporous and Mesoporous Materials*.

C. Anfray, S. Komaty, M. Zaarour, K. Goldyn, A. Corroyer-Dulmont, C. Allieux, J. Toutain, K. Bordji, M. Bernaudin, O. Touzani, S. Mintova and S. Valable. Metal containing nanosized zeolites applied to alleviate hypoxia in aggressive brain tumors. *Nature Group (to be submitted)*

M. Leblond, E. Pérès, A. Gérault, C. Helaine, **C. Anfray**, D. Divoux, E. Petit, M. Bernaudin, and S. Valable. M2 macrophages appear more resistant than M0 and M1 macrophages following radiation therapy in the context of glioblastoma. *Oncotarget (In revision)*

S. Komaty, M. Zaarour, B. Rigaud, **C. Anfray**, S. Valable and S. Mintova. Perfluorinated FAU type zeolite nanocrystals as oxygen carrier. *(to be submitted)*

Brevet

S. Valable, **C. Anfray**, V. Valtchev, M. Bernaudin, O. Touzani, S. Mintova. Processing of nanosized materials for biomedical applications in cancer therapy and hypoxia-related diseases. *Under Evaluation*.

Conférences

Communications orales

Congrès internationaux

C. Anfray, K. Goldyn, S. Komaty, C. Allieux, M. Zaarour, K. Bordji, J. Toutain, M. Bernaudin, S. Mintova and S. Valable (2017). Biomedical use of nanosized zeolites for aggressive brain tumors. 7th FEZA conference, Sofia, Bulgaria.

C. Anfray, S. Komaty, C. Allieux, J. Toutain, O. Touzani, E. Petit, M. Bernaudin, K. Bordji, S. Mintova and S. Valable (2016). Zeolites: a new theranostic tool for glioblastoma. New chemical and biological tools for targeting in cancer imaging and therapy. Cancéropôle Grand-Ouest international workshop, Le Bono, France.

C. Anfray, S. Komaty, C. Allieux, J. Toutain, O. Touzani, E. Petit, M. Bernaudin, K. Bordji, S. Mintova and S. Valable (2016). Zeolites as hyperoxic gases carrier for glioblastoma. LCS Workshop, “5th LCS Workshop “Zeolites: Prospects & Challenges”. Ouireham, France.

C. Anfray, A.N. Gérault, E.A. Pérès, E. Petit, M. Bernaudin, K. Bordji and S. Valable (2015). Hypoxia-inducible inhibition of erythropoietin pathway on glioblastoma. 19th Annual meeting of LARC-Neurosciences network, Amiens, France.

C. Anfray, V. Georgiva, S. Komaty, E. Petit, M. Bernaudin, V. Valtchev, S. Mintova and S. Valable (2015). A new strategy for treatment of glioblastoma via reoxygenation using zeolites nanocrystals. International symposium on advanced micro and mesoporous materials, Burgas, Bulgaria.

Congrès nationaux

C. Anfray, K. Goldyn, S. Komaty, C. Allieux, K. Bordji, E. Petit, M. Bernaudin, S. Mintova and S. Valable (2017). Nanosized zeolites do not induce adverse effect on eukaryotic cells. 33^{ me} réunion annuelle du Groupe Français des Zéolithes, Marne la Vallée, France.

C. Anfray, K. Goldyn, S. Komaty, C. Allieux, K. Bordji, E. Petit, M. Bernaudin, S. Mintova and S. Valable (2017). Nanosized zeolites do not induce adverse effect on eukaryotic cells. Journées de l’ cole doctorale normande de biologie intégrative, santé et environnement, Le Havre, France

C. Anfray, K. Bordji, A.N. Gérault, E.A. Pérès, M. Bernaudin, E. Petit and S. Valable (2015). Développement de constructions inductibles par l’hypoxie : application à l’inhibition de l’ rythropo tine dans les glioblastomes. Congrès de la société française du cancer, Paris, France.

C. Anfray, K. Bordji, A.N. Gérault, E.A. Pérès, M. Bernaudin, E. Petit and S. Valable (2015). Développement de constructions inductibles par l'hypoxie pour l'inhibition de l' rythropo tine dans les glioblastomes. 8 mes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France.

C. Anfray, K. Bordji, A.N. Gérault, E.A. Pérès, M. Bernaudin, E. Petit and S. Valable (2015). Development of hypoxia inducible constructs for the inhibition of erythropoietin on glioblastoma cells. Congrès de la SCMC, Paris, France.

Communications affich es

Congrès internationaux

C. Anfray, S. Komaty, K. Goldyn, C. Allieux, M. Zaarour, K. Bordji, J. Toutain, M. Bernaudin, S. Mintova and S. Valable (2017). Biomedical use of nanosized zeolites for aggressive brain tumors. 6th LCS Workshop "Zeolites: Prospects & Challenges". Ouistreham, France.

C. Anfray, B. Dong, S. Komaty, S. Mintova and S. Valable (2017). Acute toxicity of silver free and encapsulated in nanosized zeolite for eukaryotic cell. 6th LCS Workshop "Zeolites: Prospects & Challenges". Ouistreham, France.

K. Goldyn, S. Komaty, **C. Anfray**, M. Zaarour, R. Retoux, V. Valtchev, S. Valable and S. Mintova (2016). Nanosized zeolite as O₂ and CO₂ carrier. LCS Workshop, 5th LCS Workshop "Zeolites: Prospects & Challenges". Ouistreham, France.

S. Komaty, **C. Anfray**, M. Zaarour, H. Awala, R. Retoux, A. Vincent, S. Valable and S. Mintova (2015). Fluorinated Zeolites as Gas-Carriers for O₂ and CO₂. International symposium on advanced micro and mesoporous materials, Burgas, Bulgaria.

S. Mintova, S. Valable, **C. Anfray**, J. Gapi nski, **M.  lukarska**, A. Jankowska and S. Kowalak (2015). Encapsulation of fluorescein inside zeolite Y modified with different cations. International symposium on advanced micro and mesoporous materials, Burgas, Bulgaria.

C. Anfray, K. Bordji, A.N. Gérault, E.A. Pérès, M. Bernaudin, E. Petit and S. Valable (2015). Development of hypoxia inducible constructs for the inhibition of erythropoietin on glioblastoma cells. Hypoxia: from basic mechanisms to therapeutics, Dublin, Ireland

Congrès nationaux

M.M. Leblond, E.A. Pérès, A.N. Gérault, C. Helaine, **C. Anfray**, D. Divoux, E. Petit, M. Bernaudin and **S. Valable** (2017). L'irradiation par rayons X favorise le phénotype M2 des macrophages dans les glioblastomes. 10 mes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France.

K. Goldyn, S. Komaty, **C. Anfray**, S. Valable, R. Retoux, V. Valtchev and S. Mintova (2017). FAU zeolite nanocrystals with increased CO₂ sorption capacity. 33^{ème} réunion annuelle du Groupe Français des Zéolithes, Marne la Vallée, France.

C. Anfray, A. Chakhoyan, S. Komaty, E. Petit, L. Chazalviel, J. Toutain, D. Divoux, C. Allioux, E.T. MacKenzie, M. Bernaudin, O. Touzani, K. Bordji, S. Mintova and S. Valable (2016). Utilisation de nanovecteurs de thérapies gazeuses pour réoxygéner les glioblastomes et augmenter l'efficacité de la radiothérapie. Congrès de la section 28 du CNRS, Bordeaux, France.

C. Anfray, A. Chakhoyan, S. Komaty, E. Petit, L. Chazalviel, J. Toutain, D. Divoux, C. Allioux, E.T. MacKenzie, M. Bernaudin, O. Touzani, K. Bordji, S. Mintova and S. Valable (2016). Utilisation de nanovecteurs de thérapies gazeuses pour réoxygéner les glioblastomes et augmenter l'efficacité de la radiothérapie. 9^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France.

C. Anfray, K. Bordji, A.N. Gérault, E.A. Pérès, M. Bernaudin, E. Petit and S. Valable (2015). Hypoxia-inducible inhibition of erythropoietin effect in brain cancer. Journées de l'école doctorale normande de biologie, Rouen, France.

Financements et récompenses

2017	Subvention FEZA 7 th FEZA conference, Sofia, Bulgaria.
2015	Prix de communication orale International LARC meeting, Amiens, France
2014	Financement de thèse Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
2012-2013	Bourse au mérite Université de Caen Normandie, France

DEVELOPPEMENT DE STRATEGIES DE VECTORISATION POUR REDUIRE LES EFFETS DE L'HYPOXIE DANS LES GLIOBLASTOMES.

L'hypoxie est l'une des principales causes de résistance aux traitements dans les glioblastomes. Des stratégies permettant de lever l'hypoxie ou de limiter ses effets sont de ce fait nécessaires. Ces travaux de thèse s'intéressent à deux stratégies de vectorisation ciblée agissant contre l'hypoxie. La première stratégie vise à lutter contre les effets de l'hypoxie par une approche combinée de vectorisation cellulaire et moléculaire ciblant une protéine à action pro-tumorale : l'érythropoïétine. Des macrophages ont ainsi été modifiés génétiquement pour leur permettre de surexprimer une forme tronquée de récepteur à l'érythropoïétine conduisant à un ralentissement de la croissance d'un modèle de glioblastome. Les constructions moléculaires ont ensuite été modifiées pour rendre la surexpression inductible par l'hypoxie. La deuxième stratégie vise à réoxygéner spécifiquement la tumeur en se basant sur des nanozéolithes vectrices de gaz hyperoxiques. Les résultats montrent que ces nanoparticules microporeuses ne présentent pas d'effets toxiques majeurs *in vitro* et *in vivo*. L'incorporation de fer dans les zéolithes augmente significativement la capacité de transport d'O₂ et le gadolinium permet leur utilisation comme agent de contraste en imagerie par résonance magnétique. D'autre part, les nanozéolithes vectrices de CO₂/O₂ s'accumulent spécifiquement dans le tissu tumoral et augmentent localement le volume sanguin et la quantité d'oxygène. Ainsi, les deux approches développées au cours de cette thèse démontrent le potentiel des stratégies ciblées dirigées contre l'hypoxie dans les glioblastomes.

DEVELOPMENT OF VECTORIZATION STRATEGIES TO ALLEVIATE HYPOXIA AND ITS EFFECTS IN GLIOBLASTOMA.

Hypoxia is one of the main causes of resistance to treatments in glioblastoma, the worst primary brain tumor in term of survival. Two targeted vectorization strategies directed against hypoxia are presented in this thesis work. The first strategy was designed to inhibit hypoxia-induced erythropoietin through the use of macrophages. Macrophages were genetically engineered to overexpress a truncated form of the erythropoietin receptor resulting in a decrease in the tumor volume in a hypoxic model of glioblastoma *in vivo*. Hypoxia-inducible constructs were then developed. The second strategy aimed to use nanozeolites carrying hyperoxic gases as a tool to specifically reoxygenate the tumor. Results show that these microporous nanoparticles have no adverse effects *in vitro* and *in vivo*. The incorporation of iron in the zeolites significantly increases their oxygen transport capacity and the gadolinium allows their use as a contrast agent for magnetic resonance imaging. In addition, nanozeolites carrying CO₂/O₂ accumulate specifically in the tumor tissue and locally increase the blood volume/oxygenation. Thus, the two strategies developed during this thesis demonstrate the potential to fight against hypoxia specifically in glioblastoma.

Mots-clés : glioblastome, hypoxie, nanozéolithe, érythropoïétine, vectorisation ciblée.

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Adresse du laboratoire : ISTCT – FRE 2001, Equipe CERVOxy
GIP Cyceron
Boulevard Henri Becquerel
14074 Caen, France