



HAL
open science

Modèles précliniques de schwannomes vestibulaires pour l'évaluation d'une stratégie de réduction de dose d'irradiation par combinaison avec des thérapies ciblées

Nicolas-Xavier Bonne

► To cite this version:

Nicolas-Xavier Bonne. Modèles précliniques de schwannomes vestibulaires pour l'évaluation d'une stratégie de réduction de dose d'irradiation par combinaison avec des thérapies ciblées. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS017 . tel-02284634

HAL Id: tel-02284634

<https://theses.hal.science/tel-02284634>

Submitted on 12 Sep 2019

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.

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE
Année : 2018

THESE DE DOCTORAT

En vue de l'obtention du grade de docteur d'Université
Discipline : Sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Oto-Rhino-Laryngologie

**Modèles précliniques de schwannomes vestibulaires pour l'évaluation
d'une stratégie de réduction de dose d'irradiation par combinaison avec
des thérapies ciblées**

Présentée et soutenue publiquement
À Lille, le 31 octobre 2018
Par
Nicolas-Xavier Bonne

JURY

Directeur:

Monsieur le Professeur Christophe Vincent

Rapporteurs:

Monsieur le Professeur Michel Kalamarides

Monsieur le Docteur Thomas Deraedt

Examineurs:

Monsieur le Professeur Marco Giovannini

Madame le Docteur Emilie Le Rhun

AVANT-PROPOS

Ce travail résulte d'une collaboration et d'une réflexion multidisciplinaire impliquant plusieurs unités de recherche et en particulier le département de recherche sur les tumeurs nerveuses, House Research Institute, le Saban Research Institute, Children Hospital Los-Angeles et l'unité de recherche Inserm U1008 dirigée par le Pr J SIEPMANN.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de *Children Tumor Foundation* (CTF) et de House Research Institute.

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury,

Monsieur le Professeur **Michel KALAMARIDES**,

Professeur de Neurochirurgie

Coordinateur du centre constitutif en Neurofibromatose de type 2

Service de Neurochirurgie Hôpital Pitié-Sapétrière à Paris,

Votre connaissance approfondie des mécanismes moléculaires de la Neurofibromatose de type 2 et de sa prise en charge Clinique vous implique comme une évidence dans ce projet,

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail,

Monsieur le Docteur **Thomas DERAEDT**,

Professeur Assistant de Pédiatrie

Université de Pennsylvanie, Pittsburgh, USA

Votre implication dans l'étude du rôle des gènes de la Neurofibromatose vous fait gravir les échelons académiques et vous avez acquis le respect de vos pairs par la force de votre travail,

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail,

Monsieur le Professeur **Marco GIOVANNINI**,

Professeur de Médecine

Université de Californie Los Angeles, CA, USA,

J'ai la chance de vous avoir eu pour m'accompagner tout au long de ce projet jusqu'à votre présence aujourd'hui,

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail,

Madame le Docteur **Emilie LE RHUN**,

Praticien Hospitalier en Neuro-Oncologie,

Service de neurochirurgie CHU Lille, Inserm U1192,

J'ai la chance de pouvoir travailler à tes côtés et de bénéficier de tes conseils avisés,

Merci de me faire l'honneur de juger ce travail,

Monsieur le Professeur **Christophe VINCENT**,

Professeur d'Oto-Rhino-Laryngologie,

Chef de service d'Otologie et Otoneurologie au CHU de Lille,

Merci de m'avoir soutenu et poussé à mener à bien ce travail jusqu'à son échéance, d'avoir contribué à ma formation chirurgicale et scientifique.

Je voudrais aussi remercier:

Le **Professeur Juergen SIEPMANN** directeur de notre laboratoire pour votre confiance et votre soutien.

Le **Professeur David LIM**, dont les travaux ont rendu possible la réalisation de cette thèse. Vous nous avez quitté en laissant les traces visibles de votre travail considérable pour la recherche en Otologie. Veuillez trouver en ces quelques pages le symbole de mon plus profond respect.

Le **Docteur Jérémie VITTE**, tu me fais l'honneur d'être mon amis et tu m'as tout appris du domaine de la recherche. Reçois toute ma reconnaissance pour ces heures passées à tes côtés.

A tous les membres de House Research Institute et plus particulièrement à **Liz Mosely, Fabrice et Bénédicte Chareyre**, au **Docteur Karo Tanaka**.

NOMENCLATURE

AdCre: Adénovirus recombinant exprimant l'enzyme recombinatoire Cre

CFU: unité formatrice de colonie

⁶⁰Co : isotope radioactif du Cobalt

D : Dose d'inactivation moyenne en Gy

DER: Dose Enhancement Ratio, ratio de renforcement de dose

DMEM: Dulbecco's modified Eagle Serum

D0: dose nécessaire pour obtenir une réduction de survie de 37%

Dq: dose à partir de laquelle l'épaule de la courbe de survie apparaît

ERBB2: HER2, human epidermal growth factor receptor 2

GI50: Concentration de drogue nécessaire pour une inhibition de 50% de la croissance

Gy: unité de mesure Gray

HPV: Human Papilloma Virus

mTOR: mammalian target or rapamycin

NF2: Neurofibromatose de type 2

NF2: Gène humain de la Neurofibromatose de type 2

Nf2: Gène murin de la neurofibromatose de type 2

PEA: Potentiel évoqué auditif

PI3K: Phosphatidylinositol trois kinase

SDS: Speech Discrimination Score, score de discrimination de la parole

SF: Surviving fraction, fraction de survie

SF2: fraction de survie à 2 Gy

SV: Schwannome vestibulaire

VEGF: Vascular endothelial growth factor

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS..... 3

REMERCIEMENTS 4

NOMENCLATURE 6

TABLE DES MATIERES..... 7

TABLE DES FIGURES 9

INTRODUCTION 11

Considérations médico-économiques 12

Origine des schwannomes vestibulaires..... 13

Modèles de Neurofibromatose de type 2..... 15

 Inactivation constitutionnelle..... 15

 Inactivation conditionnelle 16

 Modèles de schwannomes 16

Lignées cellulaires de schwannomes et cellules de Schwann humains..... 18

Radiobiologie de la radiochirurgie..... 19

Méthode pour l'étude de la radiosensibilité in-vitro 20

Limites de ces modèles..... 22

OBJECTIFS DU TRAVAIL..... 23

MATERIEL ET METHODES 24

Lignées cellulaires..... 24

Essais clonogéniques..... 25

 Test d'inhibition pharmacologique de la croissance 25

 Epreuve de radiosensibilité..... 25

Modèle animal..... 26

 Procédure chirurgicale 26

 Procédure d'injection..... 27

Protocole d'Imagerie 27

 Imagerie par bioluminescence in-vivo..... 27

 Imagerie par résonance magnétique 28

Mesures de l'audition 28

Histologie et microscopie confocale..... 29

 Histologie conventionnelle 29

 Immunofluorescence cellulaire..... 29

 Immunofluorescence sur cochlées clarifiées 29

RESULTATS..... 32

Radiosensibilité des modèles de schwannomes NF2 in-vitro 32

 Inhibition de la croissance en essai clonogénique 32

 Radorésistance des modèles de schwannome..... 33

 Etude de la potentialisation par une inhibition ciblée de la voie mTOR 35

 Effet de l'inhibition conjuguée de la voie mTOR et de la voie PI3 kinase 38

 Application à des doses pertinentes 40

Modèle murin in vivo	42
Approche microchirurgicale du nerf vestibulo-cochléaire	42
Approche stéréotaxique du nerf cochléo-vestibulaire.	44
Suivi Volumétrique par Imagerie par résonance magnétique	45
Effets sur la fonction auditive.....	46
Histologie cochléaire	49
Histologie de la cochlée de souris	49
Clarification cochléaire de la cochlée de souris	51
Adaptation à d'autres modèles.....	53
DISCUSSION	54
mTOR et résistance à l'irradiation.	54
Blocage mTOR et PI3 kinase et réponse à l'irradiation.	55
Association d'un traitement ciblé à une irradiation stéréotaxique	56
Autres cibles précliniques	57
Modèle Orthotopique	58
Apport de l'histologie cochléaire pour l'étude de la perte d'audition dans les modèles de schwannome	60
ABSTRACT	69
RESUME	71
MOTS-CLES	72

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1: Aspect histologique d'un nerf vestibulaire à hauteur du ganglion de Scarpa chez un patient porteur d'une Neurofibromatose de type 2.....</i>	<i>p11</i>
<i>Figure 2 : développement de schwannomes spontanés dans les routes dorsales de la moelle épinière de souris Nf2 ;P0-SCH-Δ(39-121).....</i>	<i>p17</i>
<i>Figure 3 : croissance des schwannomes rachidiens dans le modèle Nf2 ;P0-SCH-Δ(39-121).....</i>	<i>p18</i>
<i>Figure 4: Détermination de la dose d'inhibition de croissance en essai clonogénique pour la lignée HEI193.....</i>	<i>p32</i>
<i>Figure 5: Détermination de la capacité clonogénique des lignées cellulaires humaines en réponse à une dose croissante d'irradiation gamma.....</i>	<i>p33</i>
<i>Figure 6: Détermination de la capacité clonogénique de la lignée de schwannome murin NF2 P0-SCH-Δ(39-121) en réponse à une dose croissante d'irradiation gamma.....</i>	<i>p34</i>
<i>Figure 7: Immunofluorescence cellulaire par marquage de la protéine Phospho-S6 trente minutes après exposition à une dose unique de 10Gy.....</i>	<i>p35</i>
<i>Figure 8: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à doses croissantes de Rapamicine une heure avant irradiation.....</i>	<i>p36</i>
<i>Figure 9: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI182 par pré-exposition à 5 nM de Rapamicine une heure avant irradiatio.....</i>	<i>p37</i>
<i>Figure 10: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome murin 08031-9 par pré-exposition à 5 nM de Rapamicine une heure avant irradiation.....</i>	<i>p37</i>
<i>Figure 11: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de cellules de Schwann humaines HEI2826 par pré-exposition à 5 nM de Rapamicine une heure avant irradiation.....</i>	<i>p38</i>
<i>Figure 12: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à doses croissantes d'inhibiteur PI3 kinase GDC-0941 une heure avant irradiation... </i>	<i>p39</i>
<i>Figure 13: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à une dose de 5nM de rapamycine en comparaison à 5 nM d'inhibiteur mTOR-PI3 kinase BEZ-235une heure avant irradiation.....</i>	<i>p39</i>
<i>Figure 14: Valeurs pertinentes pour la clinique de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à une dose de 5nM de rapamycine.....</i>	<i>p41</i>
<i>Figure 15 : approche microchirurgicale de l'angle ponto-cérébelleux de la souris.....</i>	<i>p43</i>
<i>Figure 16 : site d'injection stéréotaxique théorique.....</i>	<i>p44</i>
<i>Figure 17: Localisation des schwannomes après injection stéréotaxique.....</i>	<i>p45</i>
<i>Figure 18: évolution du volume tumorale par IRM et étude de la corrélation à la bioluminescence.....</i>	<i>p46</i>
<i>Figure 19 : Etude des potentiels évoqués auditifs.....</i>	<i>p48</i>
<i>Figure 20: microdissection d'une souris présentant un shwannome vestibulaire gauche.....</i>	<i>p48</i>
<i>Figure 21: Coupe histologique de la cochlée par le modiulus.....</i>	<i>p49</i>
<i>Figure 22: Coupe histologique de la cochlée et du ganglion cochléaire passant par le modiulus et le ganglion de Scarpa.....</i>	<i>p50</i>
<i>Figure 23 : Relation entre le nerf facial et le nerf vestibulaire supérieur.....</i>	<i>p50</i>

Figure 24: Aspect histologique d'un schwannome vestibulaire murin.....p51
Figure 25: effet de la clarification cochléaire.....p52
Figure 26: acquisition d'un volume cochléaire complet par microscopie confocale.....p52
Figure 27: vue transapicale du tour de spire moyen d'une cochlée de Gerbille.....p53

INTRODUCTION

Le schwannome est une tumeur de grade 1 selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il s'agit d'une tumeur bénigne de la gaine des nerfs périphériques. Elle se développe à partir de la prolifération clonale d'une cellule de Schwann mature. Au sein du nerf vestibulaire les cellules à l'origine des schwannomes semblent être les cellules de Schwann non-myélinisantes qui ont été décrites dans le ganglion vestibulaire de Scarpa.¹ Ceci expliquerait la plus grande incidence des schwannomes vestibulaires autour de cette zone anatomique latérale à la jonction de gliomyéline de Obersteiner-Reidlich.² Dans les formes génétiques liées à la Neurofibromatose de type 2 (NF2) il pourra être décrit des zones d'origine multiples (Figure 1).³ Les schwannomes sont souvent encapsulés et n'infiltrent pas les tissus mous avoisinants. Sur le plan histologique l'aspect classique est celui de l'association de zones lâches volontiers creusées de pseudo-kystes par dégénérescence du stroma (aspect Antoni B) et de zone compactes (aspect Antoni A) caractérisées par la présence de corps de Verocay (palissades de noyaux de cellules de Schwann séparées d'un espace fibrillaire).

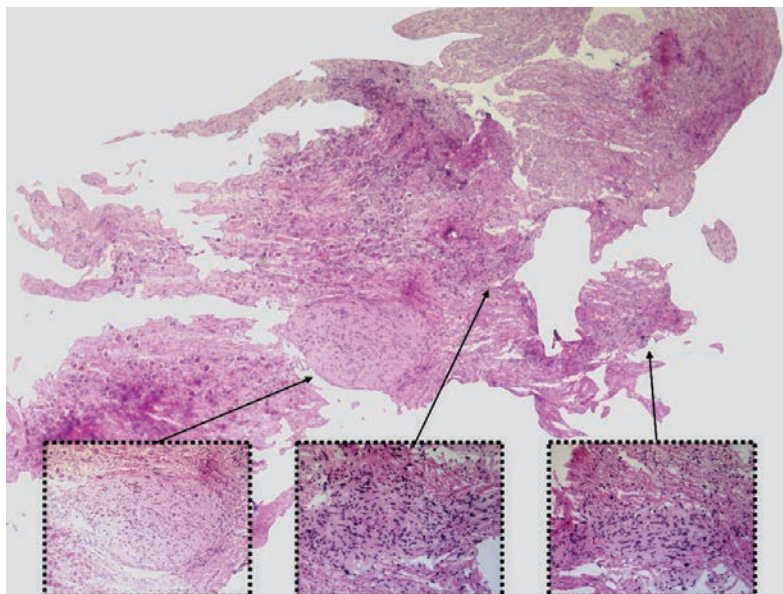


Figure 1: Aspect histologique d'un nerf vestibulaire à hauteur du ganglion de Scarpa chez un patient porteur d'une Neurofibromatose de type 2. On note une multitude d'ilôts tumoraux indépendants espacés de fibres nerveuses normales et de corps de cellules ganglionnaires (courtoisie du Pr C-A Maurage, CHU Lille, Univ.Lille)

Considérations médico-économiques

Le schwannome de localisation vestibulaire affecte entre 2.3 et 5.4 personnes sur 100 000 au cours de la vie, il représente environ 6% de l'ensemble des néoplasmes intra-crâniens. Il existe une forte augmentation de l'incidence observée des schwannomes vestibulaires sur les dernières décades: de 3.2 à 4.2 dans la population de Olmsted Minnesota et de 0.3 à 2.3 de 1978 à 2005 au Danemark.^{4,5} L'influence de l'échantillonnage et de la pyramide des âges est à prendre en compte puisque une franche majoration du risque est à souligner au-delà de la soixante-dixième année de vie ou le risque atteint 18.3 pour 100 000 habitants par an avec une incidence supérieure chez les hommes (23.9 vs 14.1) dans la population étudiée du Minnesota.⁴ L'augmentation de l'incidence des schwannomes vestibulaires se fait en partie par l'identification de tumeurs symptomatiques découvertes de façon fortuite à l'occasion d'un bilan d'imagerie et dites « incidentalomes ». Le potentiel d'évolution de ces chiffres est important puisque les séries autopsiques et radiologiques évoquent des chiffres bien plus élevés avec une prévalence pouvant atteindre jusqu'à 0.07% (MRI) voir de 0,8 à 2.4% (autopsie) de la population générale.⁵ Ces chiffres ont été largement discutés et il est probable que les incidentalomes présentent une incidence de 1 pour 100 000 habitants par an. Même s'il est difficile d'extrapoler ces données du fait des différences d'origine des populations et du faible échantillonnage de ces études, pour la population des Hauts de France évaluée par l'INSEE 2015 à 6 006 156 habitants avec une espérance de vie de 80 ans, cela représenterait de 138 à 324 nouveaux cas annuels dont 60 découvertes fortuites ou encore une prévalence IRM de 4204 cas. Cette incidence remarquable a un coût évalué dans un nombre limité d'études. En effet si en 1978 la prise en charge était quasiment exclusivement chirurgicale, elle ne représente maintenant que 14% des schwannomes vestibulaires laissant la place à une prise en charge conservatrice par surveillance clinique, audiométrique et radiologique associée ou non à un traitement par irradiation. Peu d'études se sont penchées directement sur le coût de cette prise en charge en particulier dans un système d'assurance maladie solidaire, néanmoins on notera le coût élevé de la chirurgie qui peut être significativement réduit par l'accroissement des volumes chirurgicaux, le coût précoce

potentiellement inférieur de la radiochirurgie gamma-knife à 12 mois de la prise en charge, le coût de la répétition des IRM et la nécessité d'adaptation des protocoles de suivi.^{6,7} Il n'y a pas d'études sur l'impact médico-économique du diagnostic ou de la prise en charge des schwannomes vestibulaires. L'un des facteurs sous-évalué est l'impact de la perte d'audition unilatérale. La perte d'audition est présente dans 73% des schwannomes vestibulaires à 4000 Hz au diagnostic et 17% auraient un score de discrimination conservé.⁸ L'audition progresse pour une large majorité de patients dans les dix ans du diagnostic d'un schwannome intra canaliculaire avec une perte associée de score de discrimination de la parole (SDS) de 2,8 à 3,3% par an.⁹ Trent quatre pourcent des patients porteurs d'un schwannome intracanalair ont une audition conservée « fonctionnelle » à 10 ans.⁹ L'ensemble de ces considérations justifie d'une démarche de recherche pour l'amélioration des stratégies de traitement pour la prise en charge des schwannomes vestibulaires et l'étude des mécanismes de la perte d'audition.¹⁰

Origine des schwannomes vestibulaires

Les mécanismes à l'origine de la tumorigénèse font appel à l'inactivation bi-allélique du gène NF2 codant pour la protéine Merline / Schwannomine.¹¹⁻¹³ Une altération de ce gène est retrouvée dans 66% des cas de schwannomes vestibulaires sporadiques.¹⁴ Des mutations peuvent affecter les gènes *ARID1A* et *ARID1B*, deux gènes impliqués dans la formation du complexe de remodelage de la chromatine *SWI-SNF*. Les gènes *TSC1* et *TSC2* peuvent présenter des altérations pour 15% des schwannomes laissant supposer une coopération pour l'activation de la voie mTOR, sensible à la rapamycine, son inhibiteur spécifique, dans ces schwannomes. D'autres altérations ont également été décrites tels que la fusion *SH3PXD2A-HTRA1* qui pourrait être identifiée dans 10% des schwannomes sporadiques et responsable d'une activation de la voie *MEK-ERK* sensible au trametinib.¹⁵ Il est peu probable que les phénomènes épi-génétiques tels que la méthylation soient impliqués.¹¹

Il existe des formes génétiques prédisposant au développement de schwannomes vestibulaires. Tout d'abord la Neurofibromatose de type 2.¹⁶ Il s'agit d'une maladie génétique transmise sur un mode autosomique dominant par mutation du gène suppresseur de tumeur NF2. Sa prévalence est rapportée est de 1/60 000 naissances.¹⁷ Il s'agit d'une nouvelle mutation dans 50% des cas. En cas de nouvelles mutations (forme sporadique), 33% des cas porteurs d'un SV bilatéral et 60% des formes se présentant avec un SV unilatéral seront des formes mosaïques.¹⁸ La Neurofibromatose de type 2 prédispose au développement de tumeurs multiples de la gaine des nerfs (schwannome), des méninges (méningiome) et du canal épendymaire (épendymome). Dans sa forme typique la Neurofibromatose de type 2 se présentera avec des schwannomes vestibulaires bilatéraux. Ce phénotype traduit la relation étroite entre l'expression du gène *NF2* et la morphologie du nerf vestibulaire. La Schwannomatose est une autre maladie génétique responsable de la formation de schwannomes multiples, exceptionnellement vestibulaires. Dans cette maladie le schwannome vestibulaire n'est jamais bilatéral. Les gènes responsables principaux décrits de cette maladie sont les gènes *SMARC-B1* et *LZTR1* avec une fréquence supérieure des schwannomes vestibulaires unilatéraux dans les formes liées à *LZTR1*.¹⁹ Le mécanisme de tumorigénèse fait appel à la perte successive de l'expression des 2 allèles de ces gènes et des deux allèles du gène *NF2* selon un mécanisme en quatre étapes décrit par *Sestini et collègues*.²⁰ Dans cette maladie génétique, les schwannomes vestibulaires sont peu fréquents, jamais bilatéraux et ont été décrits pour la forme liée à une mutation du gène *LZTR1* permettant la proposition de nouveaux critères diagnostics.²¹

Les formes génétiques et sporadiques soulignent l'importance de l'expression du gène *NF2* et/ou de la présence d'une protéine Merline / Schwannomine fonctionnelle nécessaire à l'homéostasie et au maintien de la gaine de Schwann du nerf vestibulaire. L'implication de nouveaux gènes constitutifs du complexe de remodelage de la chromatine SWI-SNF (*ARID1*, *SMARC*) ouvre de nouveaux champs de recherche. Ces éléments soulignent la nécessité d'avoir accès à des systèmes modèles pour étudier l'expression du gène *NF2* et les fonctions de la protéine merline/schwannomine

Modèles de Neurofibromatose de type 2

Différentes approches ont été utilisées pour développer des modèles de tumeur reproduisant les caractéristiques de celles des patients affectés par la Neurofibromatose de type 2 (NF2).²² Initialement les études ont porté sur la génération de modèles murins par mutation dirigée du gène *Nf2*. Les modèles de seconde génération initiés grâce à l'inactivation du gène *Nf2* dans des tissus spécifiques ont permis d'appréhender la fonction de la protéine merline / schwannomine dans des types cellulaires spécifiques et les conséquences de la perte de *Nf2* pour la tumorigénèse. Le développement de modèles murins génétiquement modifiés de NF2 offre une opportunité unique d'appréhender les mécanismes de l'initiation tumorale et de la croissance tumorale ainsi que de développer les outils pronostiques et thérapeutiques.

Les premiers modèles murins génétiquement modifiés ne présentèrent pas le phénotype tumoral typique de la NF2. Ils ont été utilisés pour étudier la pathogénie de la maladie. Depuis l'identification du gène *NF2* responsable de la NF2, les recherches ont été conduites pour déterminer le rôle de la protéine merline / schwannomine dans les cellules pour identifier les conséquences d'une protéine anormale ou absente. La première génération de souris mutantes a été porteuse de mutations du gène *Nf2* ressemblant aux mutations humaines. Comme pour les patients NF2, les souris knockout hétérozygotes pour *Nf2* sont prédisposées au développement de tumeurs. Cependant le spectre de tumeurs est différent. C'est pour cette raison que de nouveaux modèles ont dû être générés. Dans ces nouveaux modèles, seuls une population définie de cellules est porteuse de la mutation du gène *Nf2*.

Inactivation constitutionnelle

Deux équipes ont publié une approche par knockout germlinal de *Nf2*. Les résultats obtenus de ces deux équipes diffèrent de par l'importance du degré de délétion du gène *Nf2* endogène.²³⁻²⁵ Trois approches différentes visant à reproduire une mutation similaire à la condition humaine ont échoué aboutissant à une condition non viable. L'inactivation constitutionnelle de *Nf2* est responsable

d'une mort précoce par défaut de gastrulation secondaire au défaut d'organisation extra-embryonnaire de l'ectoderme.²⁵ De plus, une étude récente a démontré que la perte d'expression de *Nf2* dans le système nerveux entraîne un défaut de fusion du tube neural.²⁶

Un détachement anormal et une apoptose sont retrouvés le long du neuro-épithélium. Ce phénotype est lié à l'incapacité de former les complexes fonctionnels apicaux secondairement à la fonction de la Merline de contrôler la formation et la stabilisation des jonctions adhérentes.^{27,28}

L'hétérozygotie constitutionnelle pour trois allèles mutants provoque une incidence élevée de tumeurs osseuses ou d'autres tissus tels que des tumeurs hépatiques ou des sarcomes indifférenciés avec perte de l'allèle naturel de *Nf2*.^{23,24} Cependant ces types de souris hémizygotiques n'ont pas reproduit de phénotype compatible avec la forme humaine de NF2.

Inactivation conditionnelle

Des souris ont été générées au sein desquelles le gène *Nf2* est inactivé de façon conditionnelle grâce à un système Cre-*LoxP*. L'exon 2 du gène *Nf2* est flanqué d'une séquence de recombinaison *LoxP* introduite dans la séquence non-codante intronique. Les souris *Nf2*^{fllox2/fllox2} sont similaires aux souches sauvages puisque l'insertion de la séquence *LoxP* n'interfère pas sur l'expression du gène *Nf2*. La mutation du gène *Nf2* interviendra en présence de l'enzyme de recombinaison Cre, soit présentée *in vitro* aux cellules isolées et mises en cultures, soit exprimée *in vivo* sous contrôle d'un promoteur spécifique ou par injection directe d'un adénovirus recombinant dans les tissus cibles (AdCre). Ainsi plusieurs modèles de souris porteuses d'une inactivation conditionnelle de *Nf2* ont été générés, en particulier sous contrôle de promoteurs spécifiques des cellules de Schwann.²⁹

Modèles de schwannomes

L'inactivation conditionnelle de *Nf2* sous contrôle du promoteur P0 spécifique des cellules de Schwann est viable. Les souris de génotype P0Cre;*Nf2*^{fllox2/fllox2} récapitulent certains des phénotypes spécifiques de la forme humaine de NF2 et en particulier des tumeurs issues des cellules de

Schwann, une hyperplasie des cellules de Schwann, une cataracte et des calcifications. Ces manifestations n'ont été observées que lorsque les deux copies du gène *Nf2* sont inactivées au sein des cellules de Schwann et un groupe de cellules issues des crêtes neurales.²³ Les premières lésions histologiques associées à cette tumorigénèse chez la souris sont représentées par une hyperplasie des cellules de Schwann. Ces lésions sont retrouvées très précocement avec une importante fréquence chez les souris $P0Cre;Nf2^{fllox2/fllox2}$ mais pas chez les souris hétérozygotes $Nf2^{+/-}$. Les tumeurs dérivées des cellules de Schwann apparaissent plus tard à raison d'une tumeur par souris sans que toutes les souris mutantes développent constamment de telles tumeurs. Les schwannomes murins (grade 1) sont composés de cellules de Schwann mature caractérisées par une immunohistochimie positive pour la protéine S100 et l'analyse ultra structurale.³⁰ En histologie, les schwannomes NF2 de souris mutantes présentent un aspect dense (type Antoni A) alors que les corps de Verocay sont rares. Par contraste avec les formes humaines, ces schwannomes ne sont pas encapsulés et infiltrent les tissus mous avoisinants. Au contraire de la NF2 humaine, les souris mutante *Nf2* développent spontanément des schwannomes plus agressifs (grade 2 GEM) caractérisés par un polymorphisme nucléaire, une cellularité plus importante, des mitoses.³⁰ Un spectre tumoral identique a pu être décrit pour les souris transgéniques exprimant un transgène NF2 humain dont l'expression de la protéine berline se traduit par une protéine manquant les acides aminés 39-121, isoforme SCH- Δ (39-121), et qui présente une activité dominant négatif.³¹ Ce modèle P0-SCH- Δ (39-121) a largement été caractérisé et utilisé à des fins précliniques.³²

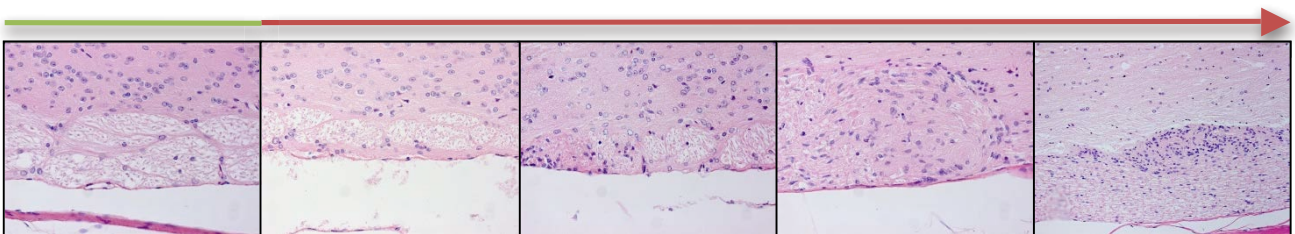


Figure 2 : développement de schwannomes spontanés dans les routes dorsales de la moelle épinière de souris $Nf2;P0-SCH-\Delta(39-121)$. L'évolution se fait depuis une hyperplasie des cellules de Schwann qui s'organise progressivement en tumorlet puis en schwannome.

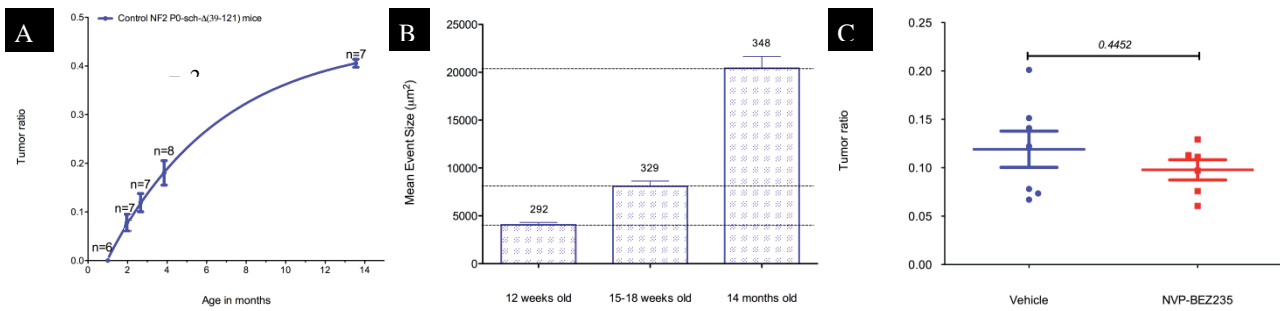


Figure 3 : croissance des schwannomes rachidiens dans le modèle *Nf2 ;P0-SCH-Δ(39-121)* . A, croissance au cours du temps, B, surface occupée par champ de microscope, C, exemple de réponse tumorale par ciblage de la voie PI3kinase/mTOR.

Lignées cellulaires de schwannomes et cellules de Schwann humains.

Les lignées cellulaires humaines établies par l'équipe de *David Lim* à l'institut House de Los Angeles, et publiées par *Hung et collaborateurs*. Ces lignées constituent une ressource unique de lignées humaines immortalisées. Les lignées cellulaires ont été établies à partir de patients porteurs de Neurofibromatose de type 2 ou de nerfs vestibulaires sectionnés au cours d'une neurectomie. Dans un rapport initial, *Hung et al.* ont décrit la mise en culture de 25 schwannomes de patients.³³ Les cellules de schwannome exprimaient de façon homogène les marqueurs de cellule de Schwann preuve que les cellules mises en cultures conservaient des caractéristiques similaires à *in vivo*. Ce protocole ne permettait pas le maintien en culture et l'établissement de lignées car la prolifération cessait autour du quatrième passage avec un taux de croissance variable. Devant ce résultat sub-optimal *Hung et al.* a développé un protocole d'immortalisation par transduction avec un retrovirus pLXSN contenant les gènes des protéines E6-E7 du virus du papillome humain type 16 (HPV: Human Papilloma Virus).³⁴ La caractérisation précise de la lignée HEI193 a ainsi été publiée en 2002. Cette lignée cellulaire est porteuse d'une mutation du site accepteur d'épissage de l'exon 15 (c1575.1 G>A). Cette lignée a conservé les caractéristiques de lignage de Schwann comme confirmé par l'immunomarquage spécifique S100. Cette lignée n'a pas de capacité tumorigène chez

les souris SCID ou nude. *Tanaka et collègues* ont utilisé les propriétés clonogéniques de ces lignées cellulaires pour la caractérisation de la réponse aux inhibiteurs HSP 90 avec succès.³⁵ Ces résultats ouvrent le champ à l'étude de la radiosensibilité de ces modèles dans l'objectif de développer une stratégie de sensibilisation.

Radiobiologie de la radiochirurgie

La dose marginale utilisée dans le traitement des SV a suivi une réduction significative tout d'abord à 14 Gy prescrit à l'isodose marginale il y a une vingtaine d'année³⁶ jusqu' à un plateau établi de 11 à 14 Gy pour la plupart des équipes et comme recommandé par la société Internationale de radio chirurgie stéréotaxique (*International Stereotactic Radiosurgery Society, ISRS*).³⁷ Le taux de réponse rapporté selon ces protocoles avoisine 94 % pour les SV de moins de 0,5 cc à 80,7% pour les volumes supérieurs à 6 cc selon les résultats rapportés par *klijn et collègues*.³⁸ Des protocoles d'optimisation de dose ont pu être proposé utilisant des doses marginales aussi basses que 11 Gy ou une réduction de la dose délivrée au fond de conduit auditif interne. Pourtant, malgré l'amélioration de la dosimétrie, un certain nombre de schwannomes progresseront. Si les lésions histologiques ont pu être décrites avec association de nécrose et dommages vasculaires,³⁹ *Jacob et collègues* ont pu identifier la persistance de capacités prolifératives au sein d'un schwannome vestibulaire 3 ans après avoir été traité avec une dose marginale 13 Gy.⁴⁰ Dans cette observation, la partie solide du SV présentait une prolifération confirmée par un marquage Ki-67 positif pour 4.5% des noyaux ainsi que par la capacité à produire une culture primaire *in vitro*. Certains échecs peuvent être attribués à des événements moléculaires acquis secondairement à la radiothérapie tel que la mutation ponctuelle décrite par *Shin et al* du gène *P53*.⁴¹

Avec l'utilisation des modalités récentes de dosimétries, c'est à dire une dose marginale de 12 à 14 Gy, le taux de préservation d'audition rapporté à 5 ans est de l'ordre de 41 à 79% selon la revue récente menée par *ISRS*.³⁷ *Massager et collègues* ont été les premiers à retenir un lien entre la dose délivrée à la cochlée et le taux de préservation auditive.⁴² Selon les études la mesure peut être

assurée soit assurée par pointage au modiolus ou mesure de la dose moyenne calculée par segmentation cochléaire avec une reproductibilité supérieure des mesures réalisées sur le volume cochléaire et utilisant une imagerie scannographique.⁴³ Malgré les caractéristiques de chute de dose en utilisant l'isodose 50% comme isodose de prescription, le traitement entraîne de facto une exposition significative de la cochlée en particulier pour les tumeurs présentant une extension latérale importante dans le conduit auditif interne. Dans une récente revue de la littérature *Kondziolka et collègues* définissent à 4 Gy la dose limite au-delà de laquelle le risque de progression auditive secondaire sera augmenté.⁴⁴ Cependant les valeurs rapportées dans la littérature se répartissent de 3 Gy à 5,2 Gy.⁴³ Des facteurs individuels tels que le volume cochléaire total sont à prendre en considération.⁴⁵ Les lésions histologiques cochléaires affectent volontiers la strie vasculaire de l'oreille interne, les cellules ciliées externes.

Pourtant la relation entre la dose délivrée à la cochlée et la perte d'audition n'est pas unique et de nombreux autres paramètres vont intervenir. Cette variabilité justifie pour certains auteurs de progresser avec prudence vers des protocoles de réduction supplémentaire de dose afin de garantir un taux de réponse satisfaisant.⁴³ Ces éléments justifient de l'intérêt à développer des systèmes modèles adaptés à l'étude de la radiobiologie des schwannomes dans le but d'identifier des méthodes d'accroissement de la sensibilité avec une réduction de dose significative tout en garantissant le minimum de capacité proliférative au sein du résidu tumoral.

Méthode pour l'étude de la radiosensibilité in-vitro

Une méthode d'évaluation objective de la radiosensibilité des différents types cellulaires a été proposée dès 1956 par *Puck et Marcus*.⁴⁶ Dans cette publication princeps, *Puck et Marcus* décrivent la première caractérisation de la radiosensibilité des cellules HeLa en réponse à l'exposition à des radiations ionisantes. Leur objectif est d'obtenir une description quantitative des effets de rayons ionisants à haute énergie sur la capacité de reproduction de cellules uniques. Pour ce faire, la méthode se veut indépendante des interactions complexes de larges populations dont les résultats

peuvent être difficiles à traduire en termes de devenir de cellule individuelle. Cette technique relève de la capacité des cellules utilisées à former des clones de façon persistante au-delà de 17 jours afin de pouvoir identifier les cellules survivantes des cellules tuées. La proportion de cellules survivantes dépend de la dose et la vitesse de croissance peut être affectée par l'irradiation. Même les colonies dont la vitesse de croissance est la plus réduite devront atteindre une taille de 3 à 4 mm, au contraire des cellules abortives qui n'atteindront jamais 50 clones au sein de la colonie. Le critère retenu pour une colonie est donc un nombre de clones supérieur à 50 à la fin de la période d'incubation. Toutefois à des doses supérieures à 600 Roentgen (5.2 Gy) les cellules exposées ne se divisent pas une fois. Pour la détermination des courbes de survie *Puck et Marcus* proposent la réalisation des expériences menées en triplicat. Les limitations techniques à attendre selon cette technique sont liées à l'ensemencement nécessaire en comparaison à la dose d'exposition pour garantir un nombre suffisant de colonies survivantes.

Plus récemment, en 2006, *Franken et collègues* ont remis à jour cette technique en proposant un protocole complet et qui permette de l'associer à l'évaluation d'agents de chimiothérapie afin de déterminer les différences de réponse entre le tissu normal et tissu tumoral dans différentes conditions et modes d'application.⁴⁷ Lorsque les expériences impliquent l'utilisation d'un traitement, le protocole doit tenir compte de l'effet du traitement sur le taux de prolifération. Ces expériences permettent de déterminer le ratio d'accroissement de sensibilité (DER, « Dose Enhancement Ratio »).

Pourtant, aucune étude n'a permis de déterminer la radiosensibilité des schwannomes. Ceci est en particulier lié à l'incapacité des cellules tumorales de produire des clones lorsque cultivées en essai clonogénique. Les études publiées ayant recours à des cultures en 2 dimensions recueillent des résultats déroutants avec des réponses observées à des doses très élevées de l'ordre de 20 à 40 Gy.^{48,49}

Limites de ces modèles

Les modèles ainsi décrits ont permis l'étude des mécanismes moléculaires responsables de l'initiation et de la croissance tumorale. Grâce aux lignées cellulaires dérivées de ces modèles une meilleure compréhension des interactions entre la protéine Merline / Schwannomine et le cytosquelette ainsi qu'avec les récepteurs aux facteurs de croissance de la famille ERB ont pu être appréhendés.^{50,51} Néanmoins, le coût de la génération et de l'entretien d'un volume suffisant de souris transgéniques, le délai et la fréquence modérée de développement de tumeurs individualisables rend ces modèles difficiles d'utilisation pour l'étude de la réponse à des thérapies ciblées avec un turn-over suffisant. De même, probablement du fait de la faible longueur du nerf vestibulaire il n'y a pas de modèle suffisamment robuste pour reproduire les symptômes liés au développement d'un schwannome vestibulaire et en particulier pour l'étude des mécanismes de perte d'audition que celle-ci soit liée à l'évolution tumorale ou à un éventuel traitement en particulier par radiothérapie.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif de ce travail a donc été d'établir un ensemble de modèles et d'outils *in vitro* et *in vivo* permettant l'étude de la réponse des schwannomes NF2 à un traitement par radiothérapie délivré en dose unique.

A cette fin a été mis en place un système cellulaire d'essai clonogénique permettant l'étude de la radiosensibilisation des modèles de schwannomes puis il a été établi un modèle de schwannome vestibulaire orthotopique reproduisant la symptomatologie clinique. Enfin, une mise au point technique est proposée afin de permettre l'acquisition d'images tridimensionnelles de la cochlée et du nerf cochléaire en limitant les artefacts de microdissection par l'utilisation d'un procédé de transparençation cochléaire.

MATERIEL ET METHODES

Lignées cellulaires

Des cellules de Schwann de souris adultes $Nf2^{\text{flox2/flox2}}$ ont été précédemment isolées. Après induction in-vitro de la perte homozygote de $Nf2$ par un adenovirus portant le gène de la recombinase Cre (adCre), les cellules ont été triées et sélectionnées au niveau clonale par cytométrie en flux. Nous avons utilisé la lignée cellulaire SC4 clone 9 exprimant la luciférase de façon stable par transfection pour nos expériences de xénogreffes. Ce clone présente les meilleures caractéristiques de croissance in vivo et intensité de luminescence. Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM et récoltées 72 heures après avoir étéensemencées à une densité de 6000 cellules/cm² pour les expériences de xénogreffe. Après avoir été comptées sur hematocytomètre, 850 000 à 20×10^5 cellules ont été resuspendues dans 20 µl de DMEM selon les expériences.

La lignée cellulaire tumorale 08031-9 a été établie à partir d'un schwannome spontané d'une branche cutanée du plexus brachial d'une souris transgénique NF2 P0-Sch-Δ(39–121)-27 de fond FVB/N âgée de 11.3 mois. Cette lignée cellulaire exprime la protéine humaine à activité dominant négatif Sch-Δ(39–121). Cette lignée est maintenue en culture dans un milieu de prolifération (PM: DMEM with 10% FCS (Invitrogen), 1% supplément N2, 10ng/mL NRG1 et 2µM forskolin, 50µg/mL gentamycine, and 1% fungizone).

Les lignées humaines HEI193, HEI182, HEI286 ont été offertes par Dr. Lim (House Research Institute, Los Angeles, CA). Ces lignées cellulaires de la famille HEI ont été établies depuis des tissus de nerf vestibulaire humains et immortalisés par les oncoprotéines liées à HPV. HEI182 et HEI193 sont des lignées de schwannomes vestibulaires humains établies et publiées par Hung et al. HEI286 est une lignée de cellules de Schwann dérivé de nerfs vestibulaires et immortalisée selon les mêmes modalités. Concernant HEI193 la mutation caractéristique de la lignée

confirmée par séquençage est c1575.1 G>A affectant le site accepteur d'épissage de l'exon 15.

Les cellules ont été cultivées en milieu DMEM supplément en 10% FCS, 50U/mL pénicilline, et 50µg/mL streptomycine.

Essais clonogéniques

Les essais clonogéniques de lignées cellulaires HEI et 08031-9 ont été adaptés de la technique décrite par *Tanaka et al.* En bref, depuis une suspension cellulaire ($2.5\sim 5 \times 10^3$ cells/60mm dish) dans 4ml de milieu RPMI enrichie d'Agarose 0.35% low-melting température (supplémenté en 10% FCS et NRG1/folskolin si nécessaire), les cellules ont étéensemencées sur une base de 2mL, ensuite recouvertes par une couche de 2mL. Ces deux couches sont constituées de 0.7% agarose (Seaplaque Agarose, Fisher). Après 24 hrs, le traitement est apporté dans 4ml supplémentaire de milieu de culture. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C, 7.5% CO₂ pendant environ 21 jours jusqu'à ce que les colonies soient visibles et non confluentes. Le milieu liquide est changé tous les 3~4 jours.

Test d'inhibition pharmacologique de la croissance

Pour évaluer la dose optimale d'inhibiteur, un test clonogénique en gel d'agarose a été utilisé afin de déterminer la viabilité cellulaire (nombre de CFU: unité de formation de colonies) à 72 heures et 21 jours après administration de traitement. L'effet du traitement est exprimé en % de nombre de CFU par comparaison au contrôle. La concentration de traitement nécessaire à l'inhibition de 50% du taux de CFU a été déterminée par Prism 5.0 (GraphPad Software).

Epreuve de radiosensibilité

Les cellules ont étéensemencées selon les modalités de l'essai clonogénique au sein d'un milieu de culture adapté dans des plaques à douze puits. Les drogues ont été ajoutées au milieu après une incubation de 16 heures soit 1 heure avant irradiation. Les plaques ont ensuite été exposées à une

source de radiation gamma par ^{60}Co à une dose rate de 1 Gy/min puis transférées 30 minutes en incubateur. Le milieu de culture a été changé 30 minutes après irradiation puis tous les 3 jours pour favoriser le sevrage en traitement. Des photos ont été prises grâce à un stéréomicroscope ZEISS après 21 jours de culture permettant le décompte du nombre d'unité de formation de colonies.

Modèle animal

Procédure chirurgicale

Les souris athymiques femelles (nu/nu, 6 semaines, Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, Mass, USA) ont été hébergées par groupes de cinq dans des cages spécifiquement autoclavées dans une salle BSL2 dédiée. Ces expériences ont fait l'objet d'amendements spécifiques au près du Comité Institutionnel de Soins et d'Utilisation des Animaux (IACUC) du HEI 11-75-08-03, de CHLA315-12 et du DHUR de l'Université Lille 2 selon les expérimentations.

Les anesthésies générales ont été réalisées par injection intra péritonéale d'un mélange de Ketamine 100 mg/kg et Xylazine 10 mg/kg. La profondeur de l'anesthésie était surveillée par réflexe de flexion par stimulation à la plante de la patte arrière avant toute incision. La tolérance à l'anesthésie était contrôlée par observation des mouvements respiratoires, de la couleur des muqueuses et par contrôle de l'oxymétrie transcutanée.

Les interventions ont été réalisées dans une salle dédiée dans des conditions stériles sous microscope opératoire (Zeiss OPMI) avec tapis chauffant. En cas de perte sanguine ou de déshydratation, une correction de la volémie a été réalisée au cas par cas par administration sous cutanée de 0.1 à 1mL de Ringer Lactate (pertes sanguines) ou sérum salé isotonique préalablement chauffé à 37°. Après chirurgie, les souris ont été transférées dans une cage propre et stérile sur tapis chauffant le temps du réveil, et observées toutes les quinze minutes jusqu'à récupération complète. L'analgésie était assurée par administration sous cutanée de Buprénorphine 0.05 mg/kg avant chirurgie et renouvelée six heures après chirurgie. Une co-

analgésie a été associée de principe par Ibuprofen 7.5 mg/kg PO pendant 48 heures. Les souris ont été suivies par la suite afin d'identifier les signes de souffrances (signes de garde, morsures, cannibalisme, modifications du comportement exploratoire). Devant ces signes ou devant une perte de poids supérieur à 20% du poids initial les souris ont été sacrifiées par inhalation de CO₂ suivi de dislocation cervicale et une nécropsie complète a été réalisée.

Procédure d'injection

La suspension cellulaire a été injectée progressivement à l'aide d'une aiguille fine (34G, titanium, biseautée) adaptée à un micromanipulateur relié à une seringue 10 µL (NanoFil™ Sub-Microliter Injection System, Intra-ocular injection kit, World Precision Instruments, Sarasota, FL) montée sur un injecteur contrôlé par le microprocesseur UMP-III (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Après plusieurs essais, le volume d'injection a été réduit à 120 nL, infusés pendant deux minutes (1 nL/ sec, mode microstepping).

Protocole d'Imagerie

Imagerie par bioluminescence in-vivo

Un suivi au minimum hebdomadaire par imagerie par bioluminescence a été réalisé en utilisant le système Xenogen IVIS 200 (Xenogen, Alameda, CA). Après injection intrapéritonéale de 5 mL/kg de solution de Luciferin (D-Luciferin Firefly, Biosynth), préparée à une concentration de 30 mg/mL dans un milieu Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X avec calcium chloride et magnésium chloride puis conservée à -20°C), Les souris ont été anesthésiées simultanément par groupe de 5 par mélange oxygène/Isofluorane 2.5% (Abbott Laboratories Ltd., Kent, United Kingdom). Les images ont été acquises 12 minutes après injection. L'analyse de la luminescence a été réalisée grâce au logiciel Living Image 3.2. Des régions d'intérêts incluant le signal et de surface égale ont été délimitées et le nombre total de photons par secondes par stéradian et par centimètre carré ont été colligés par animal et par date.

Imagerie par résonance magnétique

Une anesthésie est induite et maintenue par Isoflurane pour l'ensemble de la procédure. Les souris sont installées en décubitus ventral au sein de l'IRM adaptée (PharmaScan 300, Bruker BioSpin Division, Billerica, MA, USA) 7 Tesla, avec 19-mm inner diameter transmit receive coil. L'acquisition a été paramétrée grâce au logiciel ParaVision 4.0 (BRUKER BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Germany) pour programmer des séquences RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) et spin écho pour une acquisition rapide en séquences pondérées T2 (temps d'écho=50, temps de répétition =3000, RARE Factor 8) au sein d'une matrice de 256x256 et d'un champ de vision de 2.56 cm. Si nécessaire après l'acquisition les souris sont réchauffées sur un matelas régulé avant de retourner dans leur cage. Les images acquises ont été reconstruites en résolution native. Pour chaque souris cela a permis l'acquisition de 22 images axiales de 0.4mm d'épaisseur espacées de 0.02 mm. La résolution produite est donc de $0.1 \times 0.1 \text{ mm}^2$ par pixel dans le plan avec une épaisseur effective de coupe de 0.42 mm. Les images reconstruites ont été transférées en format DICOM grâce à eFilm Workstation 1.8.1 (eFilm Medical Inc., Toronto, Canada). Les analyses ont ensuite été réalisées grâce à OsiriX v3.7 pour Mac Os 10.5.

Mesures de l'audition

La mesure de l'audition a été assurée par recueil des potentiels évoqués auditifs (PEA) avec recherche de seuil. Une électrode aiguille est positionnée sur le vertex, une autre sous l'oreille mesurée et une électrode de masse sur le corps de la souris anesthésiée, puis les impédances sont contrôlées $< 5 \text{ k}\Omega$. Afin d'obtenir des mesures spécifiques de fréquence le stimulus utilisé était des Tone-pips échelonnés de 4 à 32 kHz. Les mesures étaient répétées et moyennes sur 300 acquisitions. Le signal enregistré est filtré avec un pass band de 300Hz à 3000Hz et amplifié grâce à un amplificateur différentiel ($105 \mu\text{V}$). Les PEA ainsi acquis ont été interprétés grâce au logiciel BioSig (Tucker Davis Technologies).

Histologie et microscopie confocale

Histologie conventionnelle

Après dissection les tissus ossifiés ont été fixés en milieu EAF pendant 24 heures, les têtes complètes ont été décalcifiées par immersion 24 heures (RapidCal-Immuno™, BBC biochemical corporation). Après décalcification, les têtes ont été orientées sectionnées suivant l'axe cochléaire et incluses en paraffine. Des sections consécutives de 3,5 µm d'épaisseur ont ensuite été réalisées puis colorées par Hématoxyline et Éosine. Les sections ont été analysées sous microscope à lumière blanche. Les images ont été acquises et retravaillées en utilisant le logiciel Axiovision (Zeiss).

Immunofluorescence cellulaire

Les cultures cellulaires de cellule HEI ont été soumises à une exposition d'une heure au traitement pour établir l'inhibition de la cible. Après rinçage les cellules ont été fixées et marquées par DAPI et anticorps spécifique anti phospho-S6.

Immunofluorescence sur cochlées clarifiées

Pour l'étude de l'organe de Corti, les os temporaux fraîchement séparés du crâne ont été immergés en PBS (PBS 10X, Sigma Aldrich). Sous grossissement par loupes binoculaires (Zeiss microscope), la capsule otique a été délicatement séparée au contact de l'endoste cochléaire et de la strie vasculaire. Après section à la jonction de la lame spirale osseuse, les organes de Corti ont été préservés pour fixation. Les organes de Corti fraîchement disséqués ont été fixés par immersion en Paraformaldéhyde (PFA) pour une durée de 30 minutes puis rincés par PBS. Pour l'étude de cochlées complètes, après ablation de l'étrier et ouverture de la membrane de la fenêtre ronde, un trépan a été réalisé à l'apex cochléaire en regard de l'hélicotréma permettant de perfuser les cochlées par 4% PFA dilué dans une solution

tampon de 0,1 M phosphate de sodium-potassium à PH 7,4. Les cochlées ainsi préparées ont ensuite été fixées par immersion 4% PFA pendant 24 heures à 4°C en agitation douce. Les capsules otiques ont ensuite été décalcifiées par immersion complète en 10% EDTA en PBS PH 7,4 pour une durée de 4 jours, puis rincées en Ethanol 70%. Ainsi fixés, les spécimens ont été préservés à +4°C jusqu'à utilisation ultérieure. Les cochlées décalcifiées ont été incubées pour une durée de 30 min au sein d'une solution Image-iT fx (Molecular Probes, Eugene, OR). Les membranes cytoplasmiques ont été perméabilisées par immersion à trois reprises dans une solution de PBS contenant 0,1% de solution Triton (Triton™ X-100, Sigma Aldrich) pour une durée de 30 minutes chacune. Le blocage des réactions non spécifiques a ensuite été assuré par incubation à température ambiante sous agitation douce (2 heures) dans une solution dite « tampon de blocage » (contenant 0,1% Triton™ X-100, 10% sérum fœtal bovin (FBS) dans le PBS). et DAPI (0,25 µg/ml en PBS).

Un Immuno-marquage indirect par anticorps primaire (Lapin polyclonale anti-Neurofilament 200kd, Sigma Aldrich, 1 :80) dilué dans la solution de blocage a été réalisé par incubation à +4°C en agitation douce sur trois jours puis les spécimens ont été rincés par trois bains successifs de PBS. Cette étape a été suivie par l'incubation avec un anticorps secondaire spécifique (Chèvre-anti-lapin Atto 633) pour une durée de 12 heures à +4°C avant rinçage en PBS. Afin de les rendre transparentes, les cochlées complètes ont été déshydratées par bains successifs d'éthanol (70%, 95% puis absolu) de deux heures chacun. Une solution de MSBB reconstituée par mélange de méthyle salicylate avec 3 parts de benzoate de benzyle. La clarification des cochlées marquées a été assurée par immersion dans une solution de MSBB diluée 1:1 dans de l'alcool absolu pour 4 heures suivi par trois changements en MSBB pour 2 heures, 4 heures et sur la nuit respectivement. Toutes ces étapes ont été réalisées protégées de la lumière, à température ambiante et sous agitation douce. Les spécimens ainsi préparés ont été montés à l'aide d'un milieu spécifique enrichi en DAPI (Fluoroshield DAPI, Sigma Aldrich) autorisant le marquage immunofluorescent des noyaux cellulaires. Après montage,

les spécimens ont été conservés à une température de +4°C dans l'obscurité totale. Les images d'immunofluorescence ont été obtenues par microscopie confocale (Zeiss microscope confocal inversé LSM 710, plateforme d'imagerie cellulaire de l'Université Lille2). Les filtres d'exposition et d'émission ont été choisis en suivant les recommandations des fabricants (résumés en Table 1). Le choix des miroirs dichroïques a été guidé par les fluorochromes utilisés. Les images ont ensuite été importées pour étude par Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2006). Les figures finales ont été créées sous GIMP pour Mac OS 10.4.

RESULTATS

Radiosensibilité des modèles de schwannomes NF2 in-vitro

Inhibition de la croissance en essai clonogénique

Les concentrations nécessaires d'inhibiteurs des voies mTOR (Rapamycine), PI3 kinase (GDC0941) et inhibiteur double mTOR et PI3 kinase (NVPBEZ235) ont été étudiées en essai clonogénique afin de déterminer les doses inhibitrices seuils (GI50 : « growth inhibition 50% ») selon le protocole proposé par *Tanaka et collègues*. Ainsi la dose inhibitrice seuil pour la lignée de référence HEI193 déterminée selon cette méthode était de 0.36 nM pour la Rapamycine, 76,57nM pour GDC0941, de 24,09 nM pour BEZ235. Ces résultats suggèrent une sensibilité de la lignée HEI193 à ces trois inhibiteurs à de très faibles concentrations. L'effet cytostatique de la rapamycine est bien identifié par la persistance d'une capacité de croissance résiduelle même à de très fortes concentrations (1µM) au-dessus du GI50%.

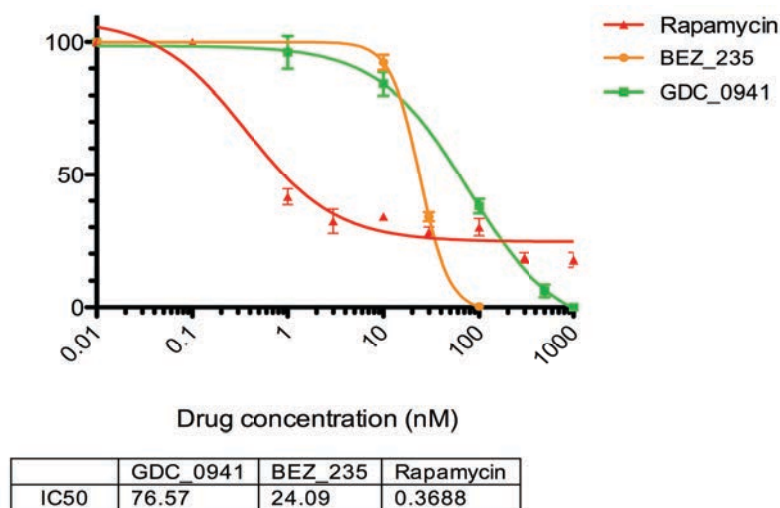


Figure 4 : Détermination de la dose d'inhibition de croissance en essai clonogénique pour la lignée HEI193 en réponse à un inhibiteur de la voie mTOR (Rapamycin), à un inhibiteur de la voie mTOR et PI3kinase (BEZ_235) et à un inhibiteur spécifique de PI3kinase (GDC_0941)

Radiorésistance des modèles de schwannome

Dans cette étude nous avons déterminé l'effet des radiations ionisantes sur des lignées humaines de schwannomes (HEI193, HEI182), sur une lignée contrôle de cellules de Schwann immortalisées selon le même procédé et sur une lignée murine de schwannome NF2 spontané (08031-9). La capacité à former des clones a été étudiée en réponse à une exposition croissante de rayonnements gamma issus d'une source de cobalt (^{60}Co) à 1 Gy/min. Il a été possible de déterminer la dose d'inactivation moyenne grâce au décompte du nombre de colonies obtenues 3 semaines après exposition à une dose unique de gamma-radiation. La dose d'inactivation moyenne a été déterminée par des mesures en triplicat sur les trois lignées humaines immortalisées et la lignée murine de schwannome spontané.

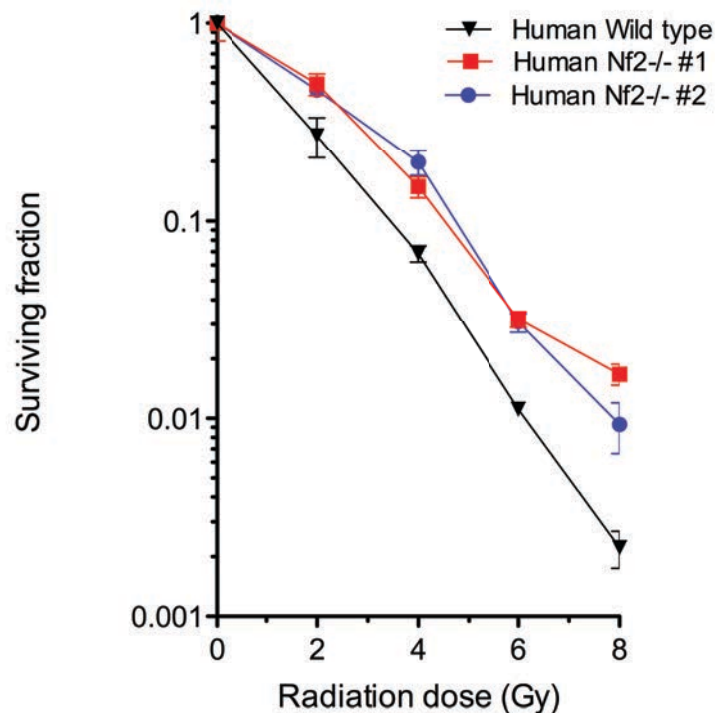


Figure 5 : Détermination de la capacité clonogénique des lignées cellulaires humaines en réponse à une dose croissante d'irradiation gamma. On note une nette résistance des lignées de schwannome NF2 par comparaison à la lignée contrôle de cellules de Schwann vestibulaires

La dose d'inactivation moyenne retrouvée a été de 2,436 Gy pour la lignée HEI193, de 2,367 Gy pour la lignée HEI182. La dose d'inactivation moyenne pour la lignée contrôle a été retrouvée bien inférieure à 1,704 Gy suggérant une radiorésistance relative des lignées de schwannomes humains mutés NF2 en comparaison au contrôle. La dose d'inactivation moyenne pour la lignée murine a été retrouvée très nettement supérieure, à une dose de 4,976 Gy suggérant une réponse différente à l'irradiation en dose unique de cette lignée.

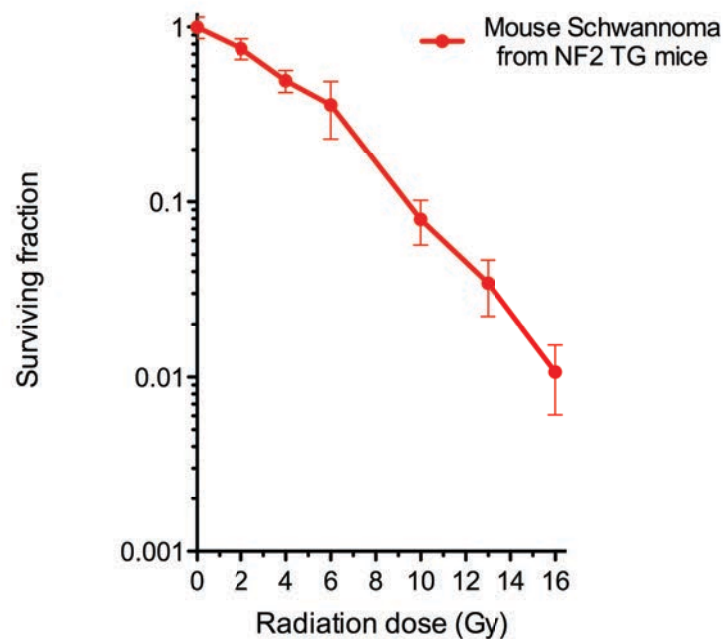


Figure 6 : Détermination de la capacité clonogénique de la lignée de schwannome murin NF2 P0-SCH-Δ(39-121) en réponse à une dose croissante d'irradiation gamma. On note une nette résistance par comparaison aux lignées humaine testées.

Etude de la potentialisation par une inhibition ciblée de la voie mTOR

La première voie ciblée a été celle de la voie mTOR par l'utilisation de rapamycine puisque l'activation de cette voie a été rapportée comme impliquée dans la tumorigénèse par perte de fonction de NF2. L'inactivation de la phosphorylation de la protéine S6 a été confirmée par immunofluorescence 30 minutes après exposition à une dose de 10 Gy devant l'attente d'une activation précoce de cette voie immédiatement après irradiation. La pré-exposition 1 heure avant irradiation était efficace pour bloquer la phosphorylation de S6 confirmant l'effet de la rapamycine au moment de l'irradiation.

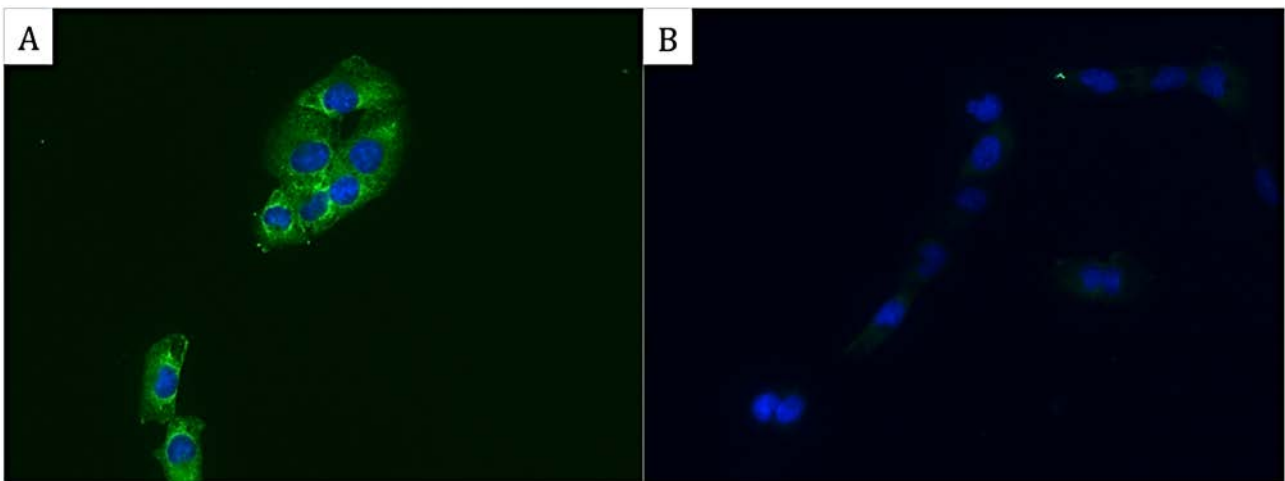


Figure 7 : Immunofluorescence cellulaire par marquage de la protéine Phospho-S6 trente minutes après exposition à une dose unique de 10Gy. [A] Phosphorylation S6 spontanée, [B] perte du niveau de phospho-S6 avec un pré-exposition à la rapamycine 1 heure avant irradiation.

Tout d'abord la lignée HEI193 a été exposée à des doses croissantes d'irradiation sans (contrôle) puis après une heure de pré-exposition à la rapamycine à doses croissantes nano-molaires (5 nM, 50 nM et 500 nM). L'association d'une irradiation en dose unique à une pré-exposition à la rapamycine a permis une potentialisation des effets avec une réduction franche des capacités des clones à former des colonies et ce en suivant une relation liée à la dose. Dès une exposition de 5

nM, la dose d'inactivation moyenne pour la lignée de schwannome HEI193 ($D=1,992$ Gy) rejoignait la dose contrôle de la lignée HEI286 ($D=1,704$ Gy).

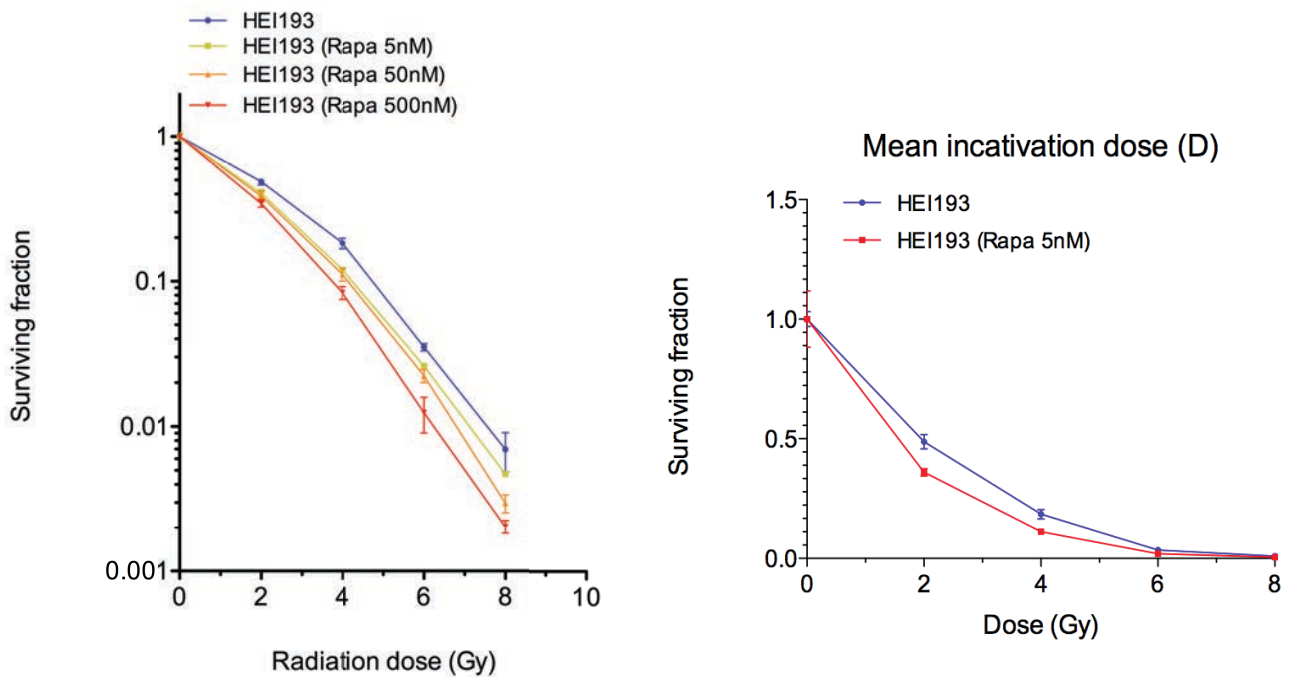


Figure 8: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à doses croissantes de Rapamicine une heure avant irradiation. [A] l'étude des courbes de survie montre un effet significatif de l'exposition à la rapamycine dès une dose d'irradiation de 2 Gy et s'accroissant avec l'augmentation des concentrations de rapamycine et de dose d'irradiation. [B] La mesure de la dose d'inactivation (2,4 Gy) montre une restitution d'une dose similaire au contrôle humain de cellule de Schwann (1,9 Gy).

Afin de confirmer cet effet dès 5 nM, la lignée HEI182 a été soumise aux mêmes conditions de pré-exposition suivie d'irradiation. L'effet observé a été similaire avec une réduction de la dose d'inactivation moyenne à $D=1,883$ Gy.

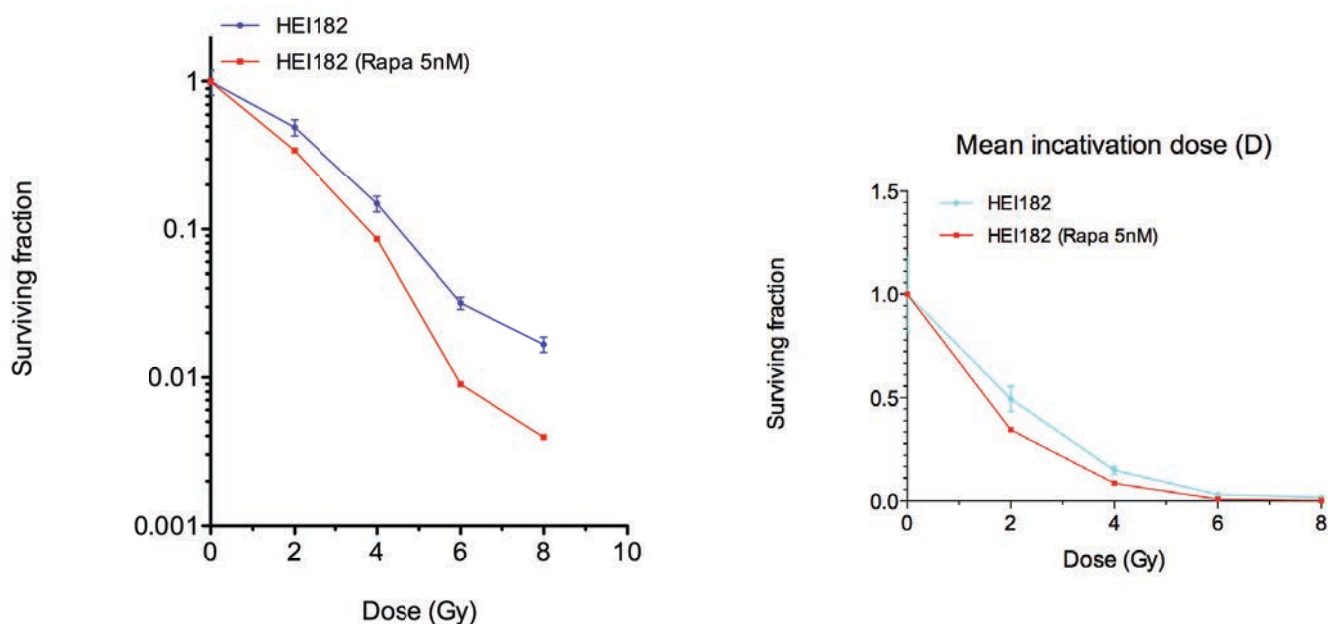


Figure 9: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI182 par pré-exposition à 5 nM de Rapamicine une heure avant irradiation confirme des résultats similaires à la lignée de schwannome HEI193. [A] l'étude des courbes de survie montre un effet significatif de l'exposition à la rapamycine dès une dose d'irradiation de 2 Gy et s'accroît avec l'augmentation de la dose d'irradiation. [B] La mesure de la dose d'inactivation (2,36 Gy) montre une restitution d'une dose similaire au contrôle humain de cellule de Schwann (1,8 Gy).

Par comparaison, l'effet d'une pré-exposition a été testé sur la lignée murine 08031-9 issue du modèle murin le plus couramment utilisé. Un effet radiosensibilisant très maximum a été retrouvé dès une exposition à une concentration de 5 nM (réduction de la dose d'inactivation moyenne de (4,976 Gy à 2.604 Gy) sans effet supplémentaire retrouvé à 500 nM d'exposition.

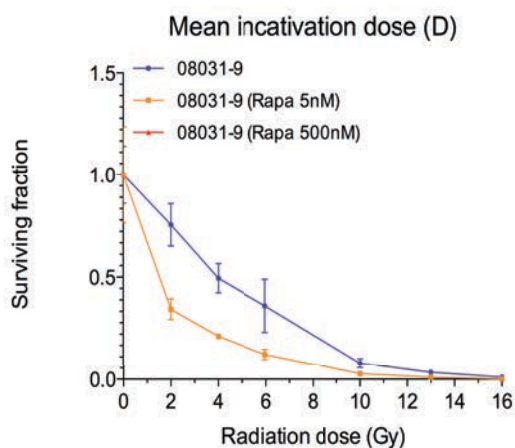


Figure 10: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome murin 08031-9 par pré-exposition à 5 nM de Rapamicine une heure avant irradiation confirme des résultats similaires aux lignées humaines de schwannome. La mesure de la dose d'inactivation (4,96 Gy) montre une restitution d'une dose similaire au contrôle humain de cellule de Schwann (2,6 Gy).

Afin de déterminer si cet effet pouvait être sélectif, la lignée contrôle de cellules de Schwann humaines HEI286 a été de même exposée à doses croissantes d'irradiation après pré-exposition à 5nM de Rapamycine. A cette dose, il n'a pas été observé d'effet significatif de réduction de colonies contrairement aux lignées de schwannomes NF2.

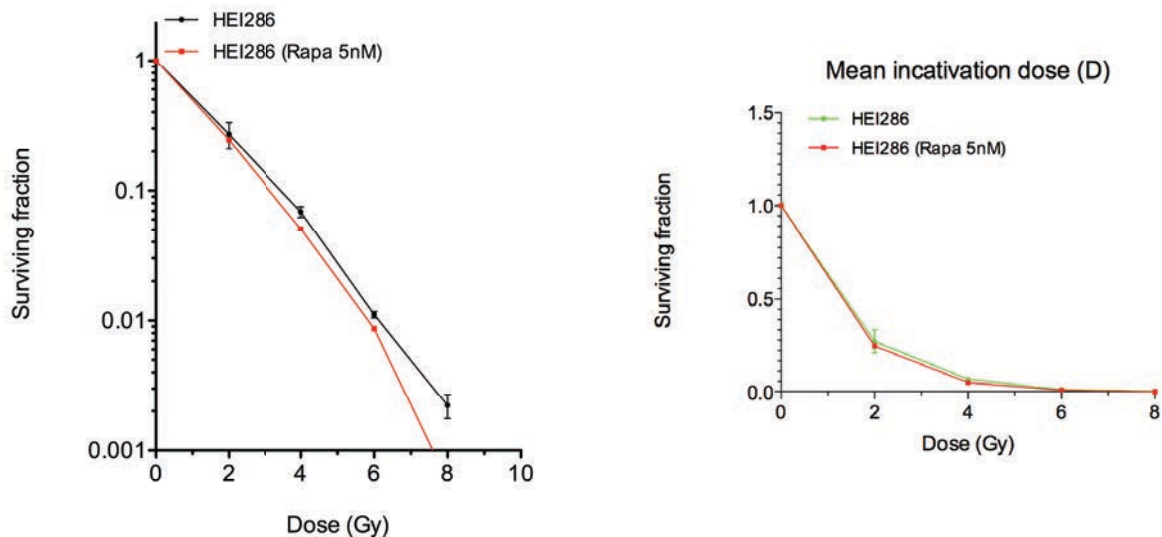


Figure 11: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de cellules de Schwann humaines HEI286 par pré-exposition à 5 nM de Rapamycine une heure avant irradiation. [A] l'étude des courbes de survie montre un effet très restreint de l'exposition à la rapamycine sans effet lié à la dose d'irradiation [B] La mesure de la dose d'inactivation (1,7 Gy) montre une dose stable après exposition (1,6 Gy) par comparaison à l'effet observé sur les lignées de schwannomes humains et murins.

Grâce à cette approche, nous démontrons que l'inhibition de mTOR radiosensibilise sélectivement les lignées de schwannomes vestibulaires NF2 avec une relation dépendante de la dose.

Effet de l'inhibition conjuguée de la voie mTOR et de la voie PI3 kinase

Afin d'étudier l'intérêt de l'effet d'une inhibition complémentaire de la voie PI3 kinase, une autre voie d'intérêt, la lignée HEI193 a été exposée à doses croissantes d'irradiation après pré-traitement par un inhibiteur spécifique (GDC0941). L'effet observé n'a pas été significatif malgré des doses de 5 nM, 75 nM et 1000 nM, bien supérieures au GI 50% déterminé pour cette même lignée dans des

conditions similaires. Toutefois un effet notable a été observé pour la dose maximale d'exposition (8 Gy) pouvant laisser espérer un effet supra-additif d'une inhibition PI3 kinase associée à une inhibition mTOR.

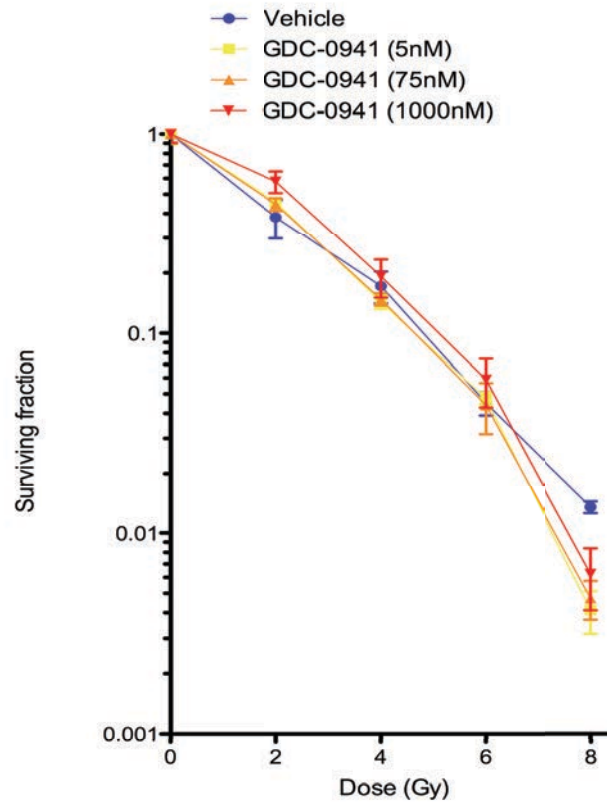


Figure 12: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à doses croissantes d'inhibiteur PI3 kinase GDC-0941 une heure avant irradiation. L'étude des courbes de survie montre l'absence d'effet significatif de l'exposition à GDC même pour des concentrations supérieures au GI50%

La lignée HEI193 a donc été utilisée pour comparer les courbes de survie sans pré-exposition, avec pré-exposition à 5 nM de Rapamycine puis à 5 nM de BEZ235. A ces doses il n'y a pas d'avantage observé de l'inhibition de la voie PI3 kinase en plus de la voie mTOR jusqu'à 6 Gy. Par contre à la dose maximale de 8 Gy était observé un effet supplémentaire comparable à l'effet observé avec GDC0941.

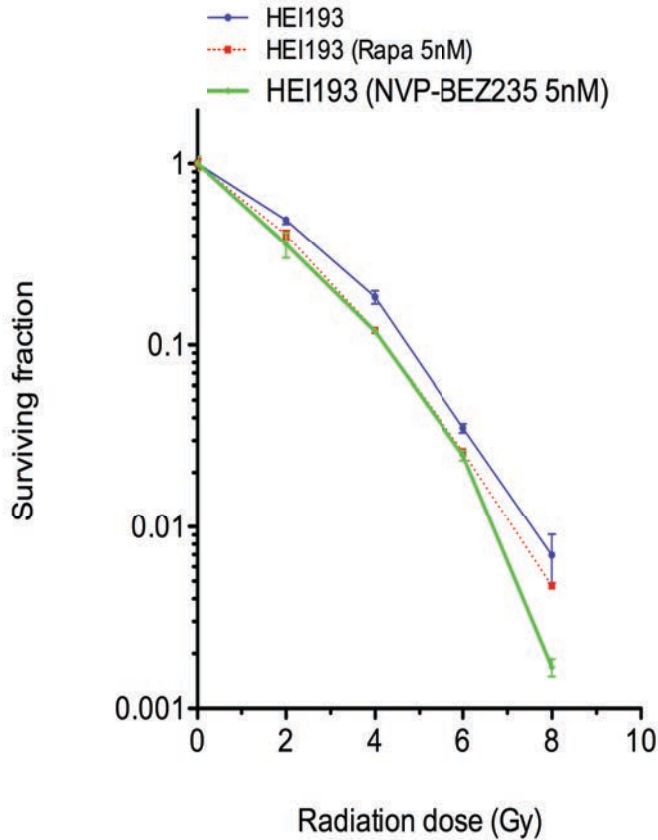


Figure 13: Etude de la radiosensibilisation de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à une dose de 5nM de rapamycine en comparaison à 5 nM d'inhibiteur mTOR-PI3 kinase BEZ-235 une heure avant irradiation. L'étude des courbes de survie montre l'absence d'effet supplémentaire de l'exposition à BEZ235 avant la dose de 8 Gy

L'inhibition de la voie PI3 kinase en plus de l'inhibition de la voie mTOR procure un avantage à l'efficacité de la radiothérapie délivrée en dose unique à une dose proche de l'utilisation clinique même à des concentrations d'exposition inférieures celles requises pour induire une inhibition de croissance.

Application à des doses pertinentes

Afin de caractériser la réponse des cellules de schwannome HEI193 le modèle quadratique linéaire a été appliqué aux doses les plus faibles. HEI193 est une lignée qui démontre une radio résistance

spontanée puisque la SF_2 est de 0.66, supérieure à la limite habituellement retenue de 0,4. La dose D_0 calculée est de 1 Gy, la D_q est de 1,5 Gy comme représenté dans la figure ci-dessous. Néanmoins ces valeurs ne sont pas informatives pour l'irradiation en dose unique ni en hypofractionnement puisque la réponse varie du modèle quadratique habituel. Etonnement, HEI193 décrit un plateau débutant au-delà de 8 Gy. Ce plateau reste présent jusqu'à la dose maximum testée de 16 Gy. Pourtant l'association d'une pré-exposition permet d'obtenir une réduction significative des cellules formatrices de colonies avec un effet très significatif dès 10 Gy. Sur cette expérience, une exposition à 13 Gy en dose unique est équivalente à une irradiation de 8 Gy lorsque les cellules sont pré-exposées à la rapamycine suggérant la possibilité d'une réduction très significative de la dose nécessaire.

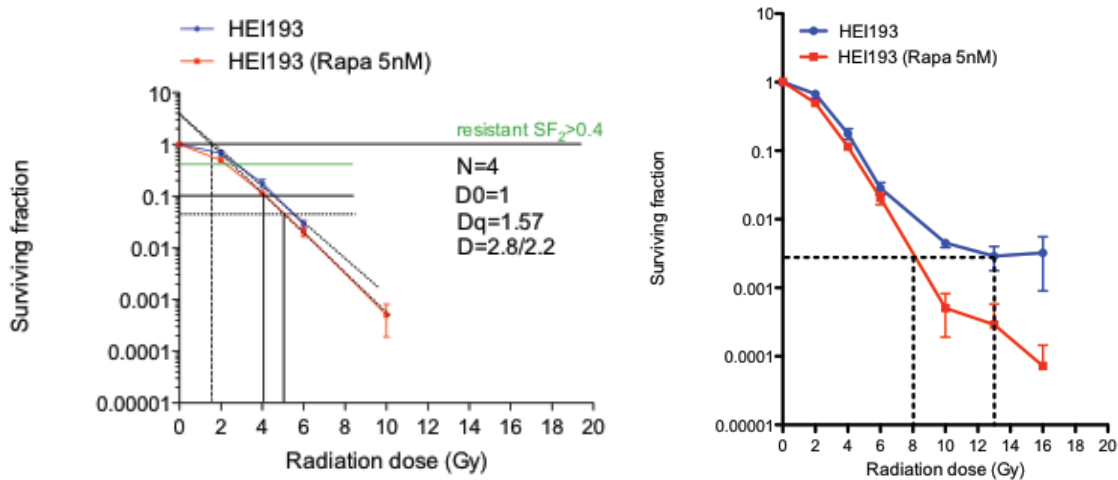


Figure 14: Valeurs pertinentes pour la clinique de la lignée de schwannome humain HEI193 par pré-exposition à une dose de 5nM de rapamycine. L'étude des courbes de survie montre l'apparition d'un plateau de survie à partir de 10 Gy. Le ratio de renforcement de dose est maximal pour les doses équivalentes ou supérieures à 10 Gy.

Modèle murin in vivo

Approche microchirurgicale du nerf vestibulo-cochléaire

Plusieurs sites d'injection ont été évalué pour accéder au nerf vestibulo-cochléaire de la souris. Le modèle retenu et qui sera décrit est celui d'une approche de l'angle cérébello-pontin par retraction du lobe flocculaire du cervelet qui se présente chez la souris comme une protrusion entre les arches des canaux semi-circulaires.

Après avoir réalisé une incision semi-circulaire s'étendant du vertex à la région cervicale, un lambeau auriculaire à charnière antérieure est levé pour permettre l'accès à la partie latérale de la base du crâne comprenant l'os temporal et l'occipute. Les muscles nucaux sont séparés de leurs insertions le long de la face latérale de l'os pétreux. Le nerf facial est identifié à son émergence du massif pétreux. Afin d'éviter les saignements excessifs l'os exposé est cautérisé. L'identification des canaux semi-circulaires latéraux et postérieurs et de la racine du zygoma en avant permettent d'identifier la zone de fraisage. Le fraisage a été réalisé sous irrigation à l'aide d'une micro-fraise diamantée de 0.6 mm pour exposer la dure-mère qui recouvre le flocculus. L'exposition maximale est obtenue par exposition de la ligne bleue du canal semi-circulaire latéral et postérieur et par l'identification du sinus veineux. Ainsi exposé, la dure mère est ouverte puis le flocculus délicatement rétracté alors qu'un dissecteur mousse sépare sa face antéro-inférieure de ses adhérences pour accéder aux citernes de liquide cérébro-spinal de l'angle ponto-cérébelleux. Un petit crochet coupant permet l'ouverture de la membrane arachnoïdienne cloisonnant l'accès. Après évacuation du liquide cérébro-spinal, le site d'injection est repéré. L'ampoule du canal semi-circulaire latéral qui est située directement au contact du nerf permet d'orienter l'injection. Après injection le site opératoire est comblé de façon étanche avec de la cire de Horsley.

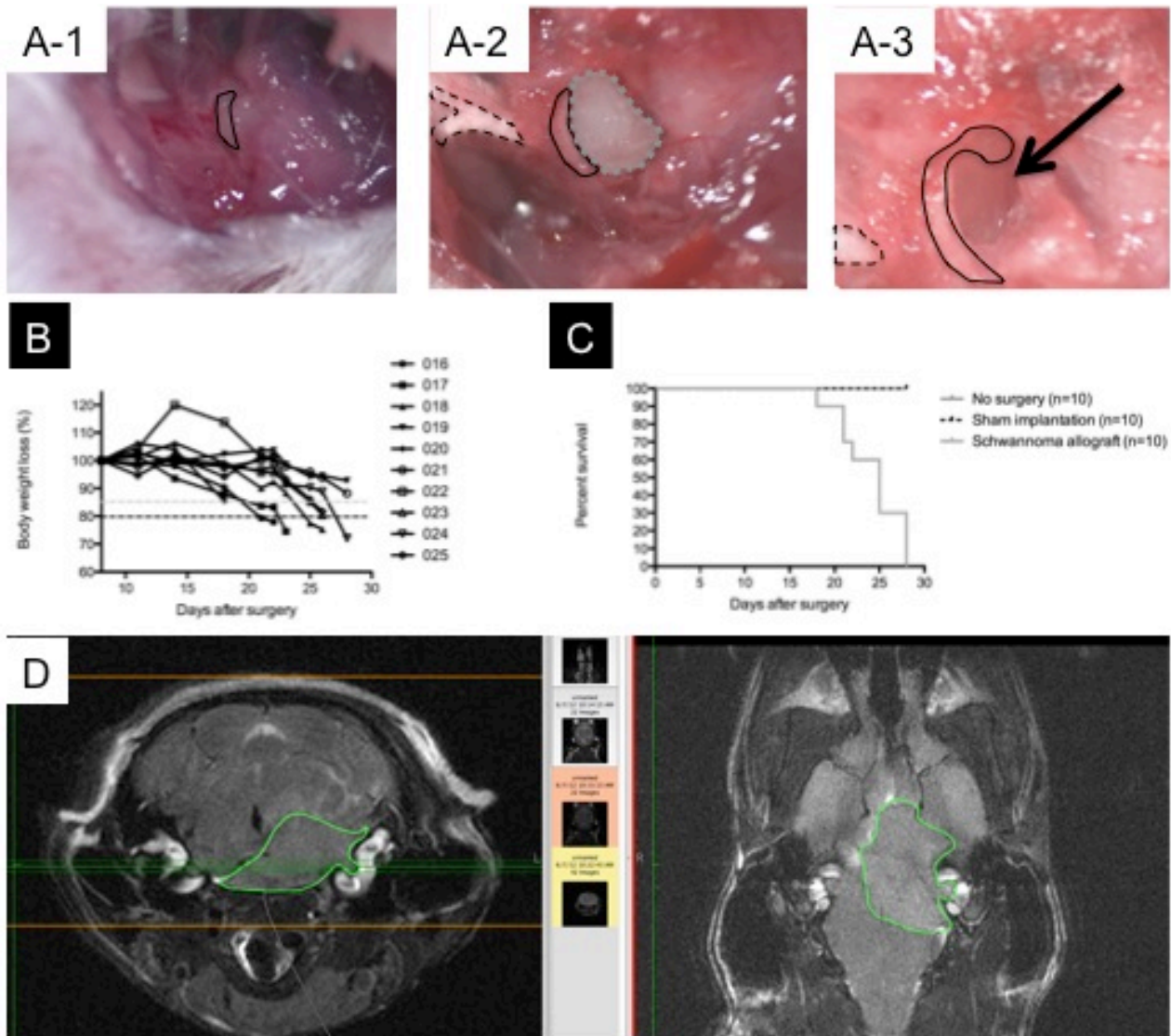


Figure 15: approche microchirurgicale de l'angle ponto-cérébelleux de la souris. [A1] ligne bleue du canal semi-circulaire latéral, [A2] émergence du nerf facial et projection de l'aire de craniotomie, [A3] après craniotomie et rétraction du flocculus, l'arachnoïde du porus acoustique interne est visualisée. [B] courbes de poids des souris opérées témoignant de la bonne tolérance de l'intervention et de l'effet délétère de la croissance tumorale, entraînant [C] le décès des souris implantées par tumeur sans effet sur les contrôles. [D] Aspect IRM des schwannomes générés par cette technique se développant dans l'angle ponto cérébelleux et longeant la base du crâne.

Approche stéréotaxique du nerf cochléo-vestibulaire.

Une approche stéréotaxique a ensuite été développée pour proposer une approche alternative à la microchirurgie et permettre d'accélérer les procédures tout en garantissant une reproductibilité inter-opérateur. En l'absence de références stéréotaxiques connues pour le nerf cochléo-vestibulaire, les coordonnées ont été déterminées par injection d'encre puis confirmées sur les spécimens en paraffine. Une fois validées, ces coordonnées ont été utilisées dans des expériences de greffe. Les coordonnées retenues pour la calibration du cadre stéréotaxique sont:

4.91 mm cranio-caudal depuis le bregma, 2.1 mm latéral de la ligne médiane 5.6 mm de profondeur depuis la surface du crâne.

Dix souris ont ainsi pu être injectées de façon consécutive grâce à cette technique. La surveillance de la croissance tumorale a été réalisée deux fois par semaine par IRM dédiée.

Aucun décès n'a été noté après injection.

Huit des dix souris ont développé une tumeur du nerf cochléo-vestibulaire s'étendant depuis le conduit auditif interne vers l'angle ponto-cérébelleux, reproduisant ainsi l'évolution de croissance d'un schwannome vestibulaire humaine. Toutes les souris ont dû être euthanasiées en accord avec la charte éthique et les recommandations IACUC de l'établissement. Dans l'ensemble des cas, le décès semblait lié à l'extension dans la capsule otique responsable d'un syndrome vestibulaire sévère plutôt qu'en conséquence de l'extension au trou cérébral ou de l'effet de masse.

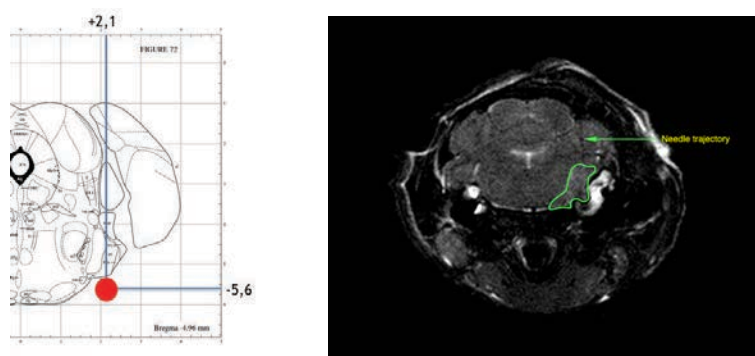


Figure 16: site d'injection théorique dédié depuis l'atlas Paxinos et confirmé par IRM (flèche verte : trajectoire de l'aiguille d'injection stéréotaxique)

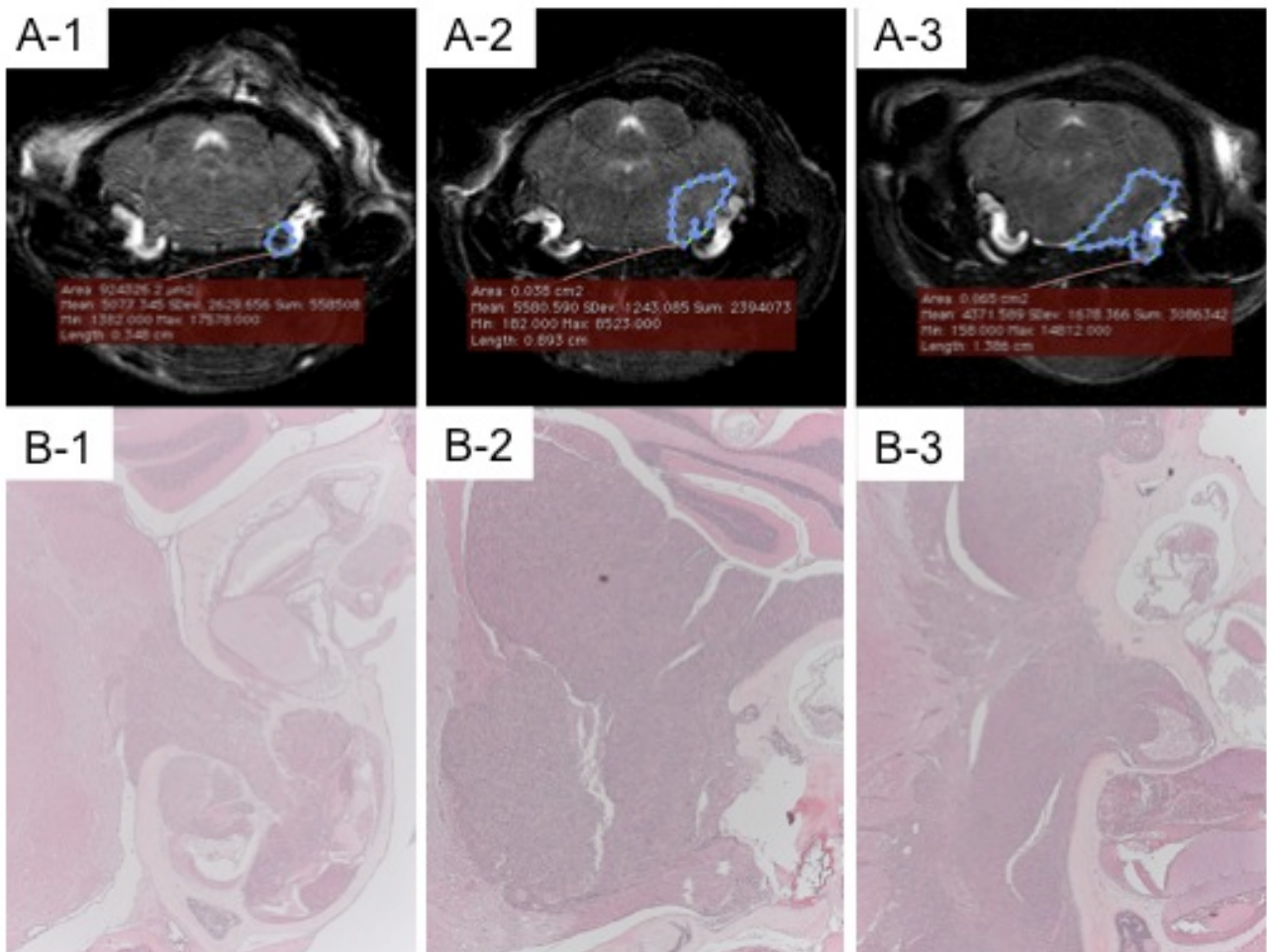


Figure 17: Localisation des schwannomes après injection stéréotaxique de cellules SC4-9 : aspect IRM [A] et correspondance histopathologique [B]. Le schwannome vestibulaire s'établit dans le nerf vestibulocochléaire dans le conduit interne puis s'étend à l'angle ponto-cérébelleux et aux rampes cochléaires tympanique mimant les localisations humaines.

Suivi Volumétrique par Imagerie par résonance magnétique

Afin de décrire la vitesse de croissance tumorale les souris greffées ont été suivies par imagerie par bioluminescence in vivo et par imagerie par résonance magnétique. Tout d'abord dix souris ont été suivies pour étudier la corrélation entre la radiance émise et le volume tumoral. La

radiance était corrélée au volume tumoral pour les schwannomes orthotopiques les plus volumineux ($r^2 = 0.88$ avec inclusion de valeurs extrêmes de 120 mm^3). Par contre, l'imagerie par bioluminescence n'était pas capable de détecter les tumeurs les plus petites. La détection précoce des schwannomes est un point essentiel pour l'établissement d'une stratégie d'évaluation thérapeutique *in vivo*. Par la suite seule l'imagerie par résonance magnétique a donc été utilisée afin de réduire le nombre d'anesthésies nécessaires par animal. Pour dix souris, l'apparition d'un schwannome a pu être détectée dès le onzième jour et la croissance suivie jusqu'au 21ème jour après injection stéréotaxique. Le volume du schwannome au 11ème jour était de $0.32 \pm 0.08 \text{ mm}^3$ [0.11-0.64], ($n=6/8$). Les schwannomes évoluèrent jusqu'à atteindre un volume $2.7 \pm 0.9 \text{ mm}^3$ au 21ème jour. La croissance tumorale moyenne sur la période depuis J11 à J21 était de 0.28 mm^3 par jour.

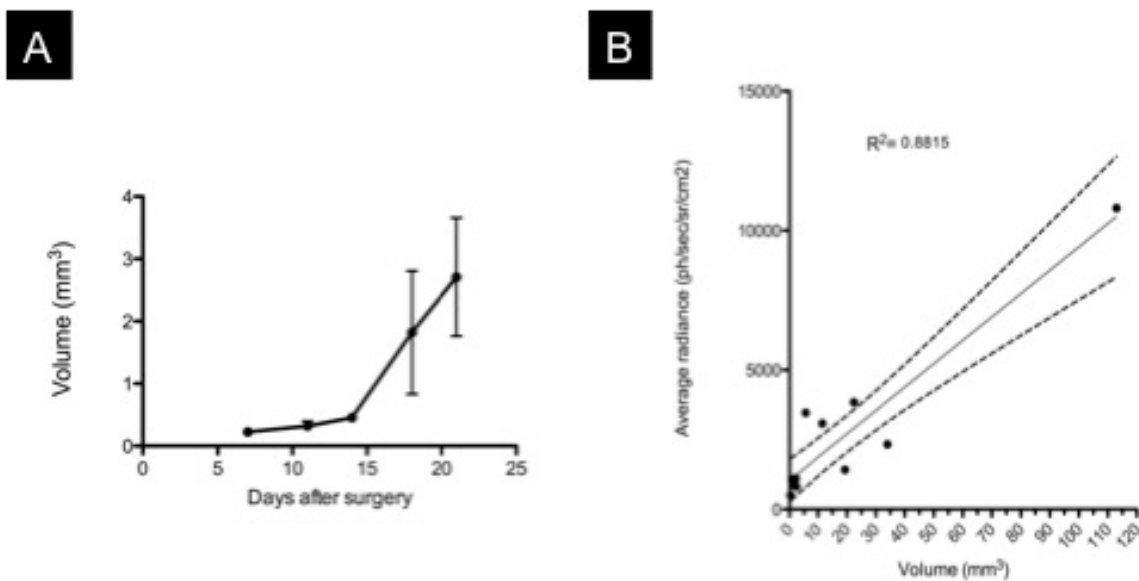


Figure 18: évolution du volume tumorale par IRM et étude de la corrélation à la bioluminescence

Effets sur la fonction auditive

A notre connaissance, il n'y a pas de données connues sur le suivi par potentiels évoqués auditifs des souris nude dans la littérature. C'est pourquoi dans un premier temps il a été nécessaire de

caractériser le niveau auditif de dix souris contrôle NU-Foxn1^{nu}. Puis chaque groupe de 10 souris a été testé avant chaque procédure pour confirmer le niveau auditif (n=60 oreilles testées). Il n'a pas été mis en évidence de différence significative. Dans les semaines qui ont suivi (semaines 8-11), les souris contrôle NU-Foxn1^{nu} ont développé une surdité progressive sur les fréquences testées les plus aiguës (24 and 32 KHz).

Une fois cette caractérisation effectuée, deux groupes de 10 souris NU-Foxn1^{nu} chacun ont été constitués et ont subi la même intervention micro chirurgicale. Un groupe a reçu une injection de cellules SC4 suspendues en DMEM alors que l'autre groupe a reçu une injection contrôle de DMEM seul. Dès le deuxième jour après chirurgie il a été observé une baisse d'audition dans ces deux groupes du côté de la procédure (total de 20 oreilles). Cette perte d'audition était caractérisée par une augmentation des seuils dominant sur les basses fréquences (4 and 8 kHz). Une récupération d'audition était observées chez les souris injectées par DMEM seul jusqu'au quatorzième jour suivant la chirurgie retrouvant alors un niveau auditif comparable aux contrôles non injectés. Cependant dans le groupe injecté avec une suspension de cellules SC4, la perte d'audition sur les fréquences graves n'a pas récupéré au niveau des contrôles et l'audition s'est progressivement dégradée sur la fréquence 16 kHz. Cette différence était statistiquement significative à J 21 (t-test, $p < 0.05$, n=10 par groupe).

Il est intéressant d'observer que l'audition des oreilles controlatérales était également affectée par l'élévation des seuils sur les fréquences graves de façon comparable aux oreilles traitées. Ceci suggère un mécanisme lié à la déplétion de liquide cerebrospinal.

Dans ce modèle de schwannome orthotopique NU-Foxn1^{nu}, La fréquence 16 kHz est la mesure la plus fiable et présente une élévation constante et progressive depuis le J2 jusqu'au 21ème jour sans être affecté ni par l'âge au moins jusqu'à 11 semaines de vie, ni par la chirurgie.

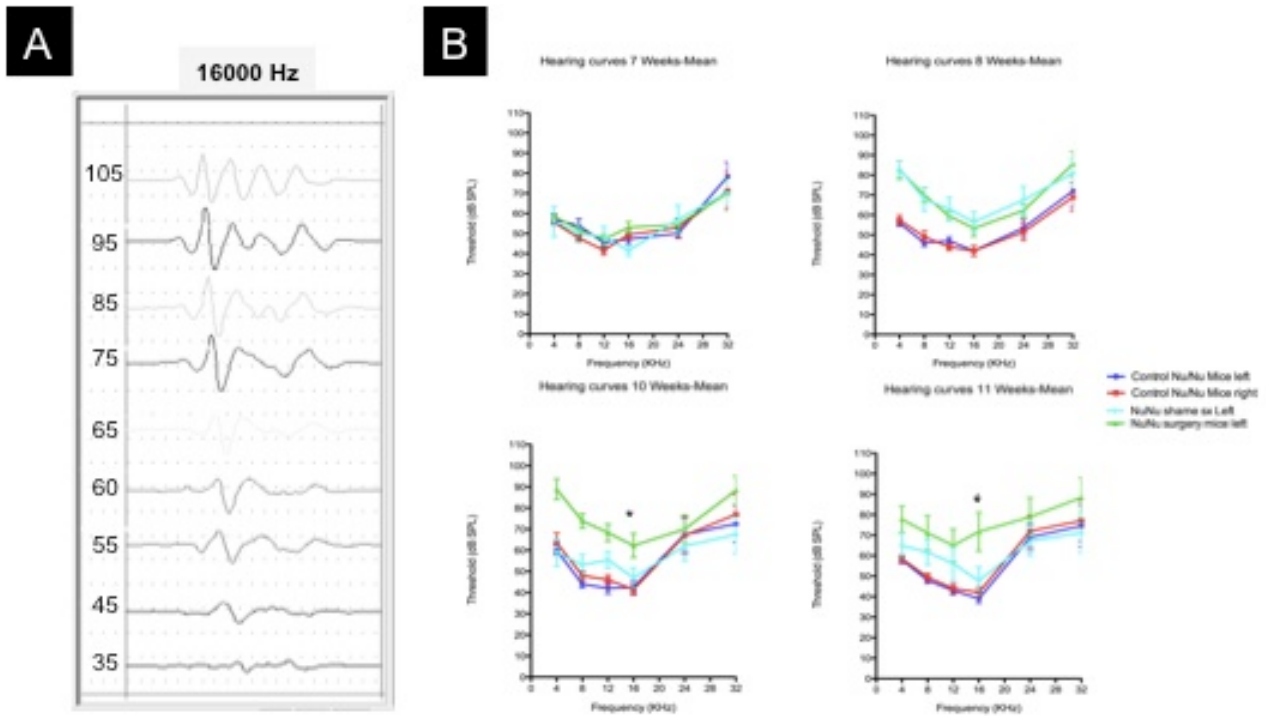


Figure 19: Etude des potentiels évoqués auditifs. [A] analyse des ondes auditives pour la détermination du seuil objectif par la reconnaissance d'au moins deux pics reproductible. [B] évolution auditive secondaire à la croissance des schwannomes développés secondairement aux greffes de cellules SC4#9

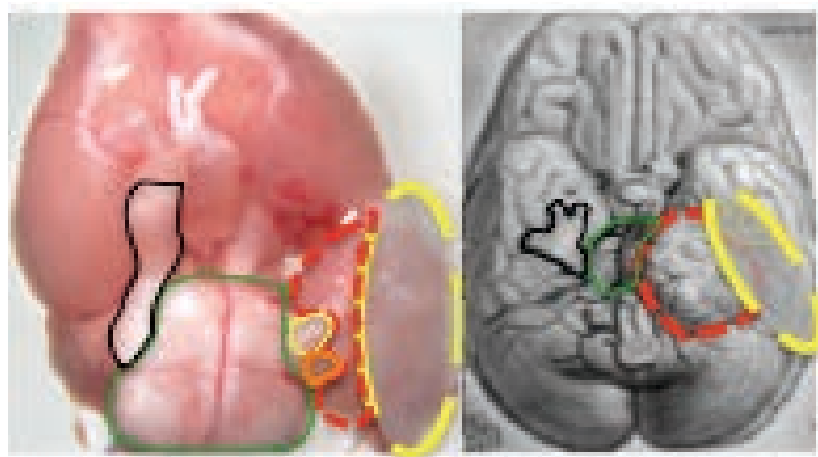


Figure 20: microdissection d'une souris présentant un schwannome vestibulaire gauche. On note la similarité avec la forme humaine (vert : tronc cérébral, rouge : schwannome vestibulaire, jaune : massif pétreux et nerf cochléaire)

Histologie cochléaire

Histologie de la cochlée de souris

Puisque l'irradiation de la cochlée joue un rôle dans la perte d'audition secondaire à irradiation⁴³ et que les mécanismes de perte d'audition dans la NF2 font appel à une ototoxicité spécifique des vésicules excrétées par les schwannomes,⁵² il est nécessaire de procéder à une analyse histologique de cochlée et des tissus nerveux. Il n'y a pas de description de lésion cochléaire connue dans les modèles murins de schwannome. L'objet est ici de proposer des éléments d'anatomie pour déterminer les zones d'intérêt à analyser dans de futurs modèles.⁵³

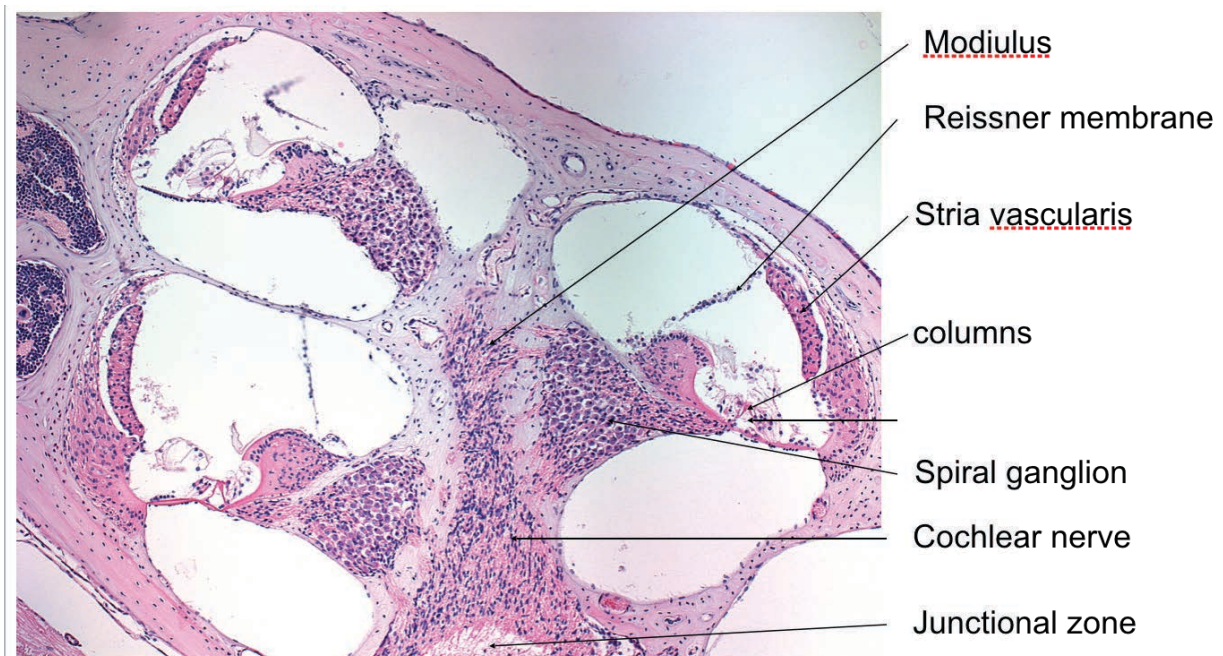


Figure 21: Coupe de la cochlée par le modiolus. La zone jonctionnelle est visualisable avec l'apparition du nerf cochléaire directement dans la fossette cochléaire. A ce niveau le nerf décrit un accroissement de cellularité.

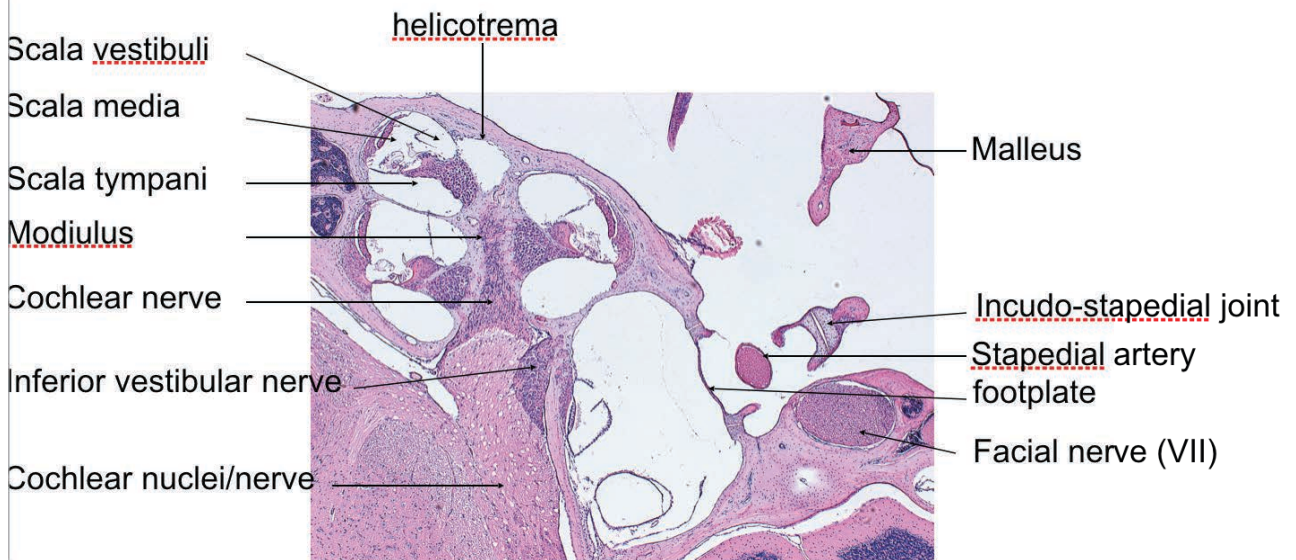


Figure 22: Coupe de la cochlée et du ganglion cochléaire passant par le modiulus et le ganglion de Scarpa. On peut noter ici la très faible longueur du nerf sacculaire myélinisé. (« inferior vestibular nerve »)

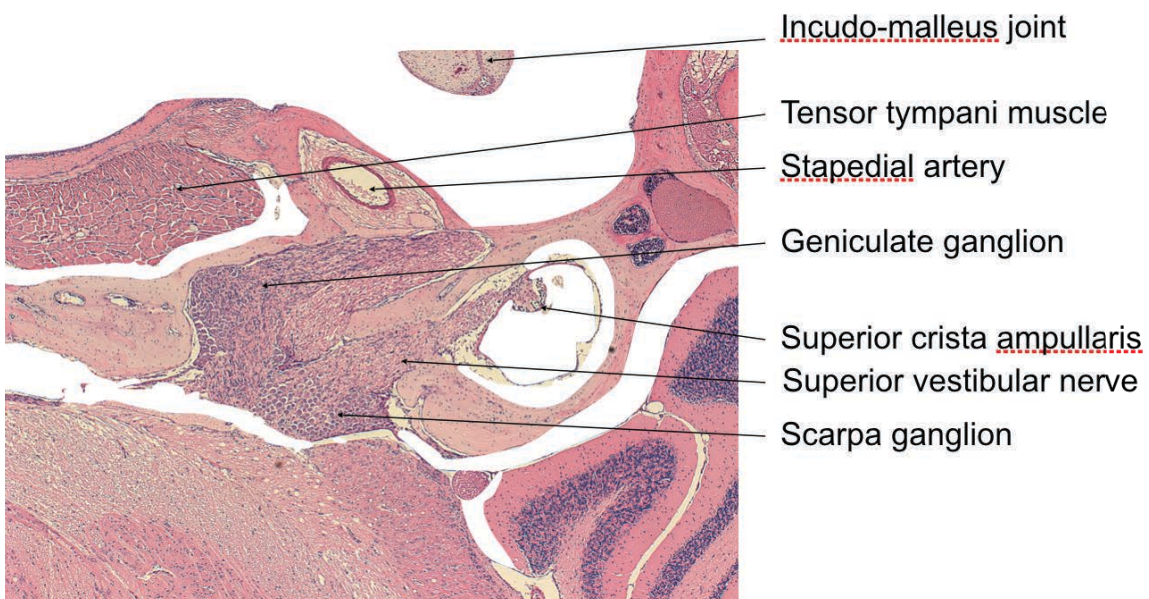


Figure 23: Relation entre le nerf facial et le nerf vestibulaire supérieur. Sur cette coupe, le ganglion géniculé est identifié en avant du ganglion vestibulaire de Scarpa.

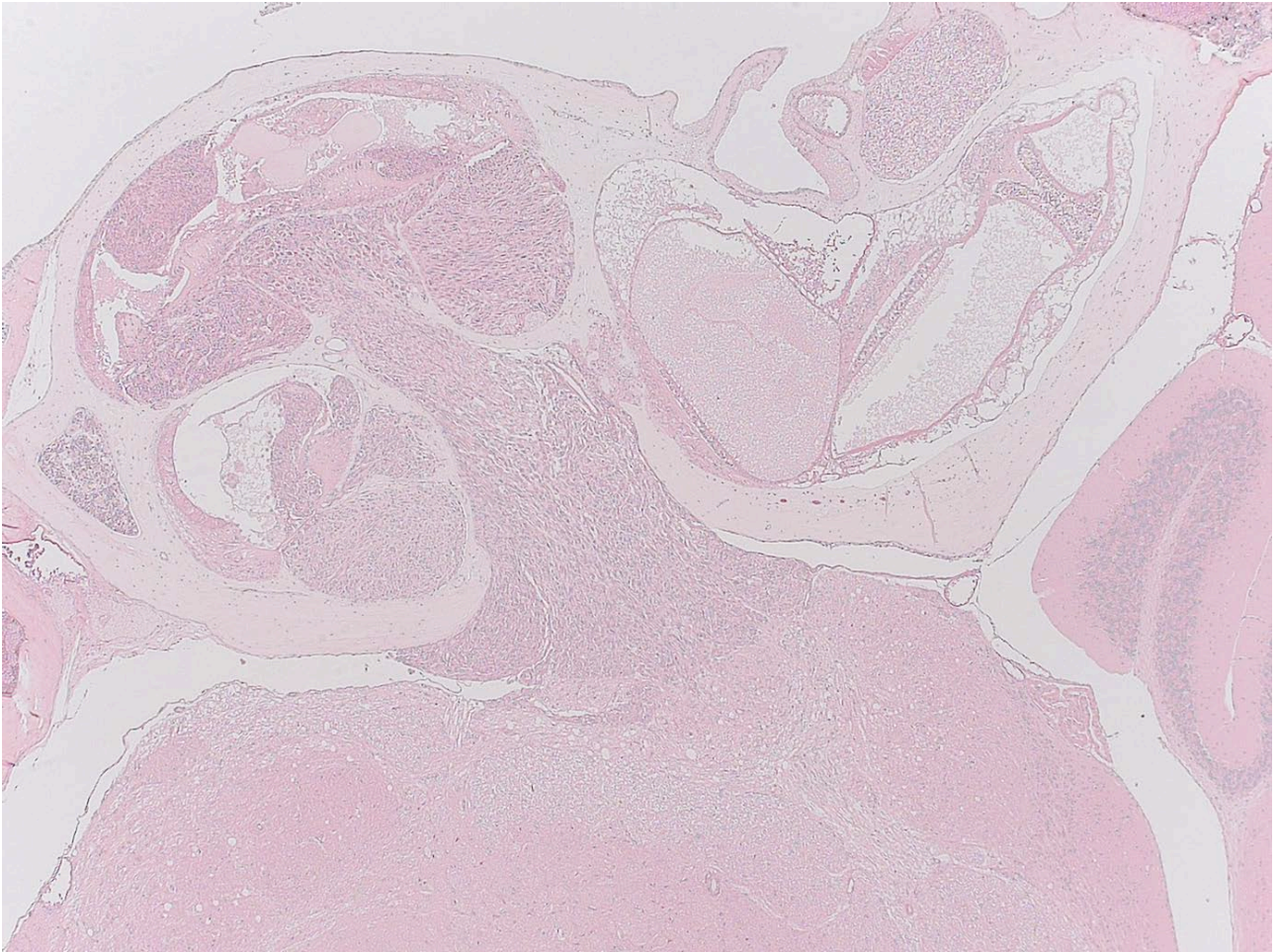


Figure 24: Aspect histologique d'un schwannome vestibulaire murin. On pourra noter les extensions à la rampe tympanique et de part et d'autre de la zone de jonction glie-Schwann.

Clarification cochléaire de la cochlée de souris

Afin de préserver les structures de l'oreille interne nous avons adapté le protocole de clarification cochléaire pour permettre l'analyse de cochlées complètes non micro disséquées et du nerf cochléaire adjacent.⁵⁴

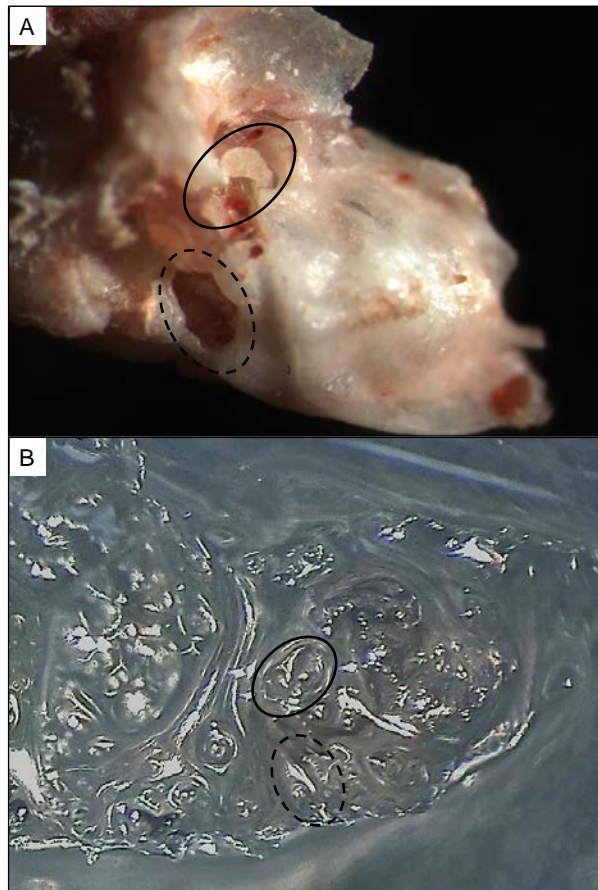


Figure 25: effet de la clarification cochléaire. A, os temporal microdisséqué, B, même os temporal après décalcification clarification par MSBB

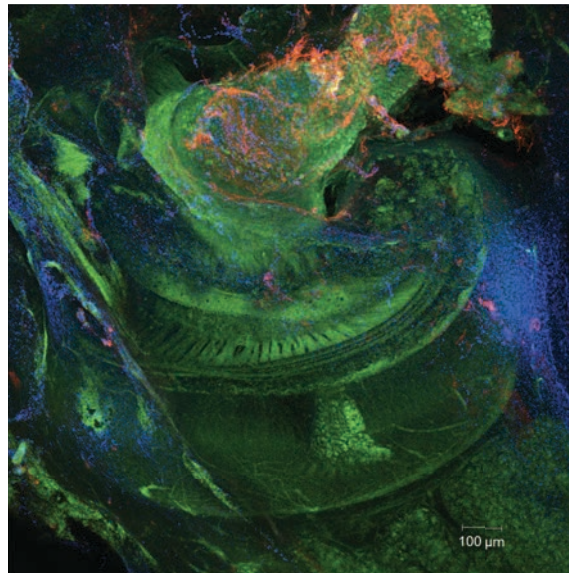


Figure 26: acquisition d'un volume cochléaire complet par microscopie confocale. Vert Phalloidine-TRITC, bleu DAPI, rouge neurofilament.

Adaptation à d'autres modèles

Cette technique de clarification cochléaire est transposable à d'autres espèces.⁵⁵

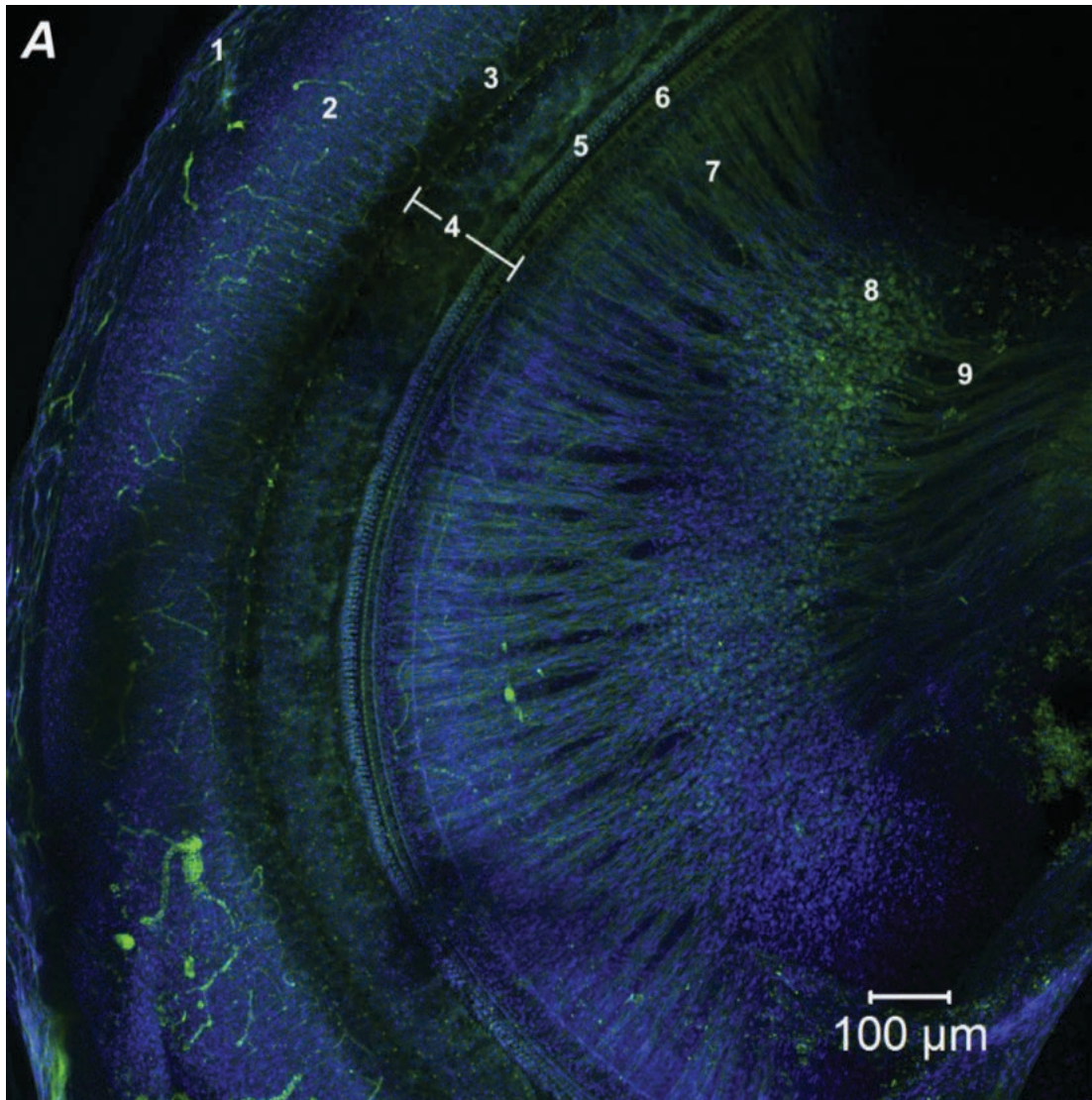


Figure 27: vue transapicale du tour de spire moyen d'une cochlée de Gerbille (bleu DAPI, Vert Phalloïdine-TRITC)

DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons mis en place un système complet permettant l'étude la radiosensibilité de modèles de schwannomes humains *in-vitro* et murins *in-vivo*.⁵⁶ Afin d'améliorer la qualité de l'analyse histologique cochléaire, nous avons adapté un protocole de transparençation cochléaire et démontré sa transposition à d'autres modèles animaux de surdité.⁵⁵

Afin d'étudier la radiosensibilité des schwannomes, nous avons mis au point un système basé sur la capacité des lignées de type HEI à former des clones en Agarose. Cette capacité diffère des caractéristiques spontanées des cultures primaires de schwannomes. Afin de contourner ces difficultés, des tests de radiosensibilité ont été réalisés en culture bi dimensionnelles.^{48,49} C'est une des raisons pour laquelle l'étude de la radiosensibilité des schwannomes est rendue si difficile. Le protocole que nous avons pu établir reprend les règles établies par *Puck et al* en 1956.⁴⁶ Afin d'utiliser un référentiel reproductible, nous avons suivi les recommandations actualisées et publiées dans Nature Protocols.⁴⁷ Grâce aux travaux précédents il a été possible d'adapter un système compatible avec la constitution de courbes de survie en réponse à l'exposition de dose de radiation gamma.³⁵

mTOR et résistance à l'irradiation.

La voie de signalisation Akt mTOR est activée dans les minutes suivant une irradiation et participe aux mécanismes de survie cellulaire.⁵⁷ Certains auteurs ont donc proposé d'exploiter cette réponse biologique comme cible de sensibilisation.⁵⁸ Dans ce but, le modèle choisi par *Eke et al* est un modèle de cancer de prostate puisque le « cancer génome Atlas » permet d'identification d'une sur-expression de mTOR dans ce type de cancer. De même il a été démontré que la voie mTOR est activée par perte de fonction de la protéine Merline et joue un rôle important pour réguler la croissance des schwannomes.^{32,59-62} L'expression d'une forme activée de mTOR a été rapportée dans différents types de cancers et parfois associée à une valeur pronostic (adénocarcinome des

voies biliaires, le glioblastome, le cancer de prostate, le cancer du sein ou encore le cancer cervicale avancé). Le rôle de la voie mTOR dans la réponse aux traitements par radiothérapie est étudié dans des essais cliniques de phase I et II.⁶³⁻⁶⁶ Plus récemment l'activation de la voie mTOR a été associée à un certain degré de résistance aux radiations par *Min-Kyu Kim et collègues* dans une étude cas contrôle de 119 cancers du col.⁶⁷ *Eun Ju Kim et collègues* ont étudié le mécanisme de radio résistance secondaire à l'inactivation de PTEN dans un modèle de cancer du poumon non à petites cellules.⁶⁴ Dans ce modèle, la perte d'expression de PTEN induit une activation de la voie mTOR et une résistance à l'irradiation améliorée par le traitement par Rapamycine. Le mécanisme proposé par cette équipe est celui de la normalisation de l'induction d'autophagie. Dans notre travail, nous retrouvons une sensibilité marquée des modèles cellulaires de schwannomes HEI à un pré-traitement par rapamycine. Il faut noter que dans un article récent de *Paldor et collègues* étudiant la radiosensibilisation d'un modèle schwannome *in vivo* le dosage en inhibiteur mTOR à raison d'un dose par semaine n'a pas permis de reproduire la réponse décrite dans l'article de *Giovannini et collègues*.^{32,68} De fait les auteurs n'ont pas testé l'association de l'irradiation avec une thérapie ciblant mTOR dans ce modèle de greffe de lignée murine SC4. Ces données seront donc à produire grâce au modèle orthotopique proposé ici et avec un dosage de rapamycine plus proche de celui ayant démontré son efficacité.

Blocage mTOR et PI3 kinase et réponse à l'irradiation.

Dans notre étude la mortalité cellulaire semble atteindre un plateau à des doses supérieures à 8 Gy même en cas de sensibilisation par Rapamycine. Cette courbe diffère du modèle quadratique linéaire habituellement décrit mais est concordante avec l'observation de la poursuite d'une capacité proliférative après mise en culture de schwannomes préalablement traités.⁴⁰ Le traitement par inhibiteur de PI3 kinase procure un avantage à ces hautes doses restituant une courbe de survie plus proche du modèle attendu d'accélération de la mortalité cellulaire avec l'accroissement des doses en condition d'hypofractionnement (modèle linéaire-quadratique-linéaire).⁶⁹ L'inhibition combinée de

mTOR et de la voie PI3 kinase a également été étudiée pour lutter contre la radio-résistance dans d'autres modèles. Le mécanisme proposé est celui d'une activation de l'autophagie et d'un effet synergistique d'apoptose.⁷⁰⁻⁷² D'autres mécanismes ont pu être décrits tels que l'inhibition de la réparation des fractures des brins d'ADN.⁷³ La radiosensibilisation obtenue par traitement par BEZ235 dépend du moment entre l'administration du traitement et de la radiothérapie, l'effet d'accroissement de dose étant observé uniquement en cas de traitement concomitant.⁷⁴ Il est important de noter que dans un modèle d'inhibition de ATR, l'utilisation de la molécule BEZ_235 s'est révélée particulièrement toxique en association avec la radiothérapie.⁷⁵ Cette observation montre les limites de l'utilisation de ce traitement en pratique clinique.

Association d'un traitement ciblé à une irradiation stéréotaxique

L'association concomitante d'une thérapie ciblée a été rapportée dans la littérature.⁷⁶ L'objectif comme observé dans notre modèle est d'obtenir un effet de potentialisation (encore appelé supra-additivité) grâce à la modulation de la réponse obtenue par l'agent chimique. Cette modulation doit être la plus sélective possible afin de limiter les effets sur les tissus sains qui exposeraient à un risque de toxicité. Les effets observés sont de deux ordres: (1) aigus, (2) tardifs (3) les réactions de rappel (*recall effect*) qui sont des effets aigus mais survenant plusieurs mois à plusieurs semaines après l'irradiation.⁷⁷ Cet effet rappel a en particulier été rapporté avec les anti-angiogéniques.

La prescription de l'agent doit donc être déterminée sur des données précises prenant en compte le temps de demi-vie plasmatique, la diffusion et la clairance tissulaire, la pharmacodynamie. Les données disponibles en association avec la radiothérapie stéréotaxique sont encore exceptionnelles, pourtant elles sont nécessaires à l'évaluation de la balance bénéfice-risque. A l'heure de l'écriture de cette thèse il n'existe pas d'argument clinique suffisant pour supporter l'utilisation d'un agent de la classe des inhibiteurs mTOR en association avec une radiothérapie stéréotaxique en l'absence d'éléments de toxicité potentielle. Pourtant des données biologiques supportent l'activation de la voie Akt-mTOR après irradiation. Le bénéfice de l'association à un inhibiteur mTOR est en cours

d'évaluation avec des traitements par radiothérapie conventionnelle suggérant le caractère recevable de la proposition d'une association Gamma knife / Rapamycine.^{57,58} Une étude de phase 1 précoce est en cours étudiant l'utilisation de l'everolimus (NCT01880749, Investigator: Matthias A Karajannis MD , Sponsor and Collaborator: New York University School of Medicine) après une durée d'imprégnation de 10 jours à une dose quotidienne de 10 mg. Ces données sont nécessaires à la promotion d'un protocole clinique plus avancé.

Autres cibles précliniques

La thématique de radiosensibilisation des schwannomes est débutante. Actuellement quatre cibles moléculaires ont été associées à des possibilités de radiosensibilisation. La première voie fait appel à l'inhibition de la voie des facteurs de croissance liée à ERBB2. Le lapatinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase spécifique de cette voie a été rapporté comme sensibilisant dans deux modèles. Le premier article rapporte un modèle *in vitro* de culture primaire de schwannomes en deux dimensions dans lequel les doses d'irradiation s'évaluaient de 20 à 40 Gy bien supérieures aux doses couramment utilisées.⁴⁸ Le second rapporte l'évaluation *in vivo* à partir d'un modèle murin de greffe sous-cutanée de cellules de Schwann inactivées pour *Nf2* (SC4#9).⁶⁸ Dans ce modèle, l'irradiation est réalisée à 3 Gy compte tenu d'une réponse complète obtenue dès une exposition de 5 Gy *in vivo*. Cette observation est discordante des résultats obtenus *in vitro* dans le même article où la dose inhibitrice 50% est de 6.6 Gy. L'évaluation de la survie est réalisée par un test en 2D ce qui peut expliquer en partie cette différence. La seconde voie explorée est celle de l'utilisation d'un anti-angiogénique.^{78,79} Cette voie est justifiée par l'utilisation clinique du bévacizumab pour le traitement des schwannomes vestibulaires sur oreille unique dans la NF2.⁸⁰ Le bénéfice est significatif et testé *in vivo* en association à des doses d'irradiation de 5 Gy dans un modèle de greffe intra-neurale de cellules de Schwann inactivées pour *Nf2* (SC4#9).⁸¹ L'efficacité dans ce modèle semble liée aux effets sur l'environnement vasculaire et le timing de prescription de la radiothérapie doit être optimisé au cours de la période de normalisation vasculaire pour un effet maximum. Dans

ce modèle les auteurs décrivent un bénéfice fonctionnel. Plus récemment la même équipe a étudié précisément l'inhibition de la voie cMET en association avec la radiothérapie dans un modèle d'injection intra-crânienne plus proche du modèle animal proposé ici.⁸² De même un bénéfice significatif a été démontré. La dernière voie explorée est la voie cJUN.⁴⁹ Dans un article récent l'inhibition de cette voie contemporaine de l'irradiation gamma présente également un bénéfice dans un modèle *in vitro* en 2D de culture primaire.

Devant la multitude des voies explorées, une rationalisation des cibles doit être menée. L'axe principal reste l'inhibition de l'axe des récepteurs de croissance lié à ERBB2 et médié par mTOR. La toxicité décrite des inhibiteurs doubles mTOR/PI3kinase rend peu probable l'intérêt clinique de cette molécule à l'heure actuelle alors que l'association d'un inhibiteur ERBB2-3 à un inhibiteur mTOR n'a pas encore été évaluée.

Modèle Orthotopique

Le développement d'un modèle orthotopique vient de la nécessité d'étudier la réponse cellulaire au sein du même micro-environnement que celui de la tumeur native afin de ne pas dénaturer les caractéristiques de réponse. L'importance de l'utilisation de tels modèles a bien été soulignée dans la littérature.^{83,84} La génération de ces modèles requiert l'établissement d'une souche tumorale (biospie, culture primaire, modèle cellulaire) « seed » et l'identification d'une technique propice à sa greffe dans le tissu d'origine spécifique « soil ». L'importance du micro-environnement pour le développement des schwannomes a pu être établi grâce à un modèle de traumatisme nerveux dans des souris de fond génétique modifié P0-Cre ;Nf2^{flox/flox} et P0-Cre ;Nefh-Cre ;Nf2^{flox/+}.⁸⁵

Dans ce travail nous avons utilisé *in vitro* les lignées humaines établies par *Hung et collègues* dont la caractérisation initiale indiquait l'absence de capacité tumorigène en greffes sous-cutanées chez des souris SCID et nude. De même il n'a pas été possible de générer de modèle intra-neural sciatique à partir de la lignée HEI193 (données personnelles) contrairement à d'autres équipes.⁷⁸

Par conséquent nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'une lignée murine. Deux modèles ont été utilisés dans ce travail. Tout d'abord *in vitro* le modèle choisi a été la lignée 08031-9 établie à partir d'un schwannome spontané d'une souris P0-SCH- Δ (39-121).^{30,31} Ce choix a été orienté vers la possibilité d'utiliser dans le future le modèle murin P0-SCH- Δ (39-121) finement caractérisé et dont la sensibilité à l'inhibition de mTOR a été démontrée.³¹ Toutefois ce modèle a été sélectionné et purifié pour ses caractéristiques de Schwann mais n'a pas été trié au niveau clonale ce qui peut expliquer une partie de la variabilité de la réponse observée. Dans la mesure où un modèle robuste et caractérisé est disponible nous nous sommes orienté vers l'utilisation d'un autre modèle génétiquement plus proche de l'événement humain d'inactivation double allèle.^{23,86} Le modèle choisi a été la lignée SC4 clone 9 exprimant la luciférase puisque cette lignée avait l'avantage d'un taux de prise de greffe élevé et de la possibilité de suivi par bio-luminescence *in vivo*. De plus ce modèle a été utilisé dans de nombreuses publications confirmant que ce modèle résume de nombreuses signatures de signalisation intra-cellulaire communes aux schwannomes humains et murins, justifiant de son intérêt pour la constitution du modèle orthotopique.

La détermination du site d'implantation a nécessité de nombreux tests et approches pour garantir une toxicité minimale pour les souris, une grande reproductibilité et un site concordant avec l'origine des schwannomes vestibulaires.^{2,87,88} La zone de transition schwannienne étant située chez la souris dans le conduit auditif interne il nous a fallu déterminer les voies d'accès chirurgicales puis les coordonnées stéréotaxiques. Si les coordonnées des noyaux du tronc cérébral sont bien établies dans l'atlas de *Paxinos*, les nerfs crâniens n'y sont pas figurés.⁸⁹ Il a été possible de déterminer la localisation d'injection préférentielle dans le nerf cochléo-vestibulaire et de reproduire la croissance d'un schwannome vestibulaire partageant des similarités histologiques avec les schwannomes humains NF2.⁸⁸ De plus ces modèles reproduisent une perte progressive d'audition dont les mécanismes précis devront être élucidés. Les limitations de ces modèles sont liées au coût d'utilisation et à la durée d'acquisition des IRM.⁹⁰ Cependant nous avons démontré la capacité à acquérir une imagerie In-Vivo par bioluminescence mais dont les limites sont

probablement liées au faible volume tumoral. D'autres équipes ont cherché depuis notre publication à modifier ce modèle pour l'adapter à des conditions d'irradiation et de suivi par imagerie non invasive.⁸² Si les modèles proposés reprennent les grandes lignes du modèle proposé dans ce travail, les coordonnées correspondent plus volonté à une injection sub-arachnoïdienne à distance du conduit auditif interne. On peut alors s'interroger sur la possibilité d'utiliser de la technique de fenêtre crânienne pour la visualisation d'une tumeur idéalement située dans l'angle ponto-cérébelleux et étendue au conduit auditif interne. Le modèle proposé dans ce travail a été adapté à d'autres rongeurs témoignant de l'intérêt de la communauté pour ce type d'approche.⁹¹

L'alternative à la génération d'un modèle orthotopique est la génération d'un modèle génétiquement modifié reproductible reproduisant les caractéristiques tumorales et fonctionnelles. *Gehlhausen et collègues* ont proposé le modèle *Postn-Cre; Nf2^{flox/flox}*.⁹² Les caractéristiques histologiques montrent des formes plutôt limitées à un stade de tumorlets difficile d'exploitation préclinique. D'ailleurs, l'évaluation de l'effet chémopréventif du celecoxib dans ce modèle n'a pas utilisé cette localisation de schwannome comme évaluation de la réponse.⁹³ D'autre part, les caractéristiques auditives évoquées dans la première publication ne se retrouvent que partiellement dans cette seconde publication nécessitant l'utilisation de modèles mathématiques de statistiques univariés d'identification de valeurs aberrantes « outliers » plutôt que d'un classique test ANOVA avec analyse posthoc de comparaison multiples adapté.

Apport de l'histologie cochléaire pour l'étude de la perte d'audition dans les modèles de schwannome

Il a paru important de rapporter ici des éléments d'histologie cochléaire et du nerf vestibulaire devant l'intérêt grandissant porté sur ces régions anatomiques. En effet dans le modèle *Postn-Cre; Nf2^{flox/flox}* des modifications de l'aspect des nerfs facial et vestibulaire sont décrites.⁹² Ces modifications sont décrites à la zone de jonction glie-schwann ou à proximité des cellules ganglionnaires. Il nous semblait important de proposer des sections contrôles pour familiariser le

lecteur avec cette région. Une coupe histologique de schwannome intraméatique à extension intralabyrinthique est proposée pour permettre la reconnaissance des similarités avec les rapports histologiques observés chez l'humain.^{87,88} Enfin, une technique de transparisation cochléaire a été validée pour permettre l'étude de ces régions anatomiques sans en altérer la microstructure et pour ne pas limiter l'étude à quelques sections limitées.

BIBLIOGRAPHIE

1. Sterkers JM, Perre J, Viala P, Foncin JF. The origin of acoustic neuromas. *Acta Otolaryngol (Stockh)*. 1987;103(5-6):427-431.
2. Xenellis JE, Linthicum FH. On the myth of the glial/schwann junction (Obersteiner-Redlich zone): origin of vestibular nerve schwannomas. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol*. 2003;24(1):1.
3. Stivaros SM, Stemmer-Rachamimov AO, Alston R, et al. Multiple synchronous sites of origin of vestibular schwannomas in neurofibromatosis Type 2. *J Med Genet*. 2015;52(8):557-562. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103050
4. Marinelli JP, Lohse CM, Carlson ML. Incidence of Vestibular Schwannoma over the Past Half-Century: A Population-Based Study of Olmsted County, Minnesota. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. April 2018:194599818770629. doi:10.1177/0194599818770629
5. Stangerup S-E, Tos M, Thomsen J, Caye-Thomasen P. True incidence of vestibular schwannoma? *Neurosurgery*. 2010;67(5):1335-1340; discussion 1340. doi:10.1227/NEU.0b013e3181f22660
6. Slattery WH, Schwartz MS, Fisher LM, Oppenheimer M. Acoustic neuroma surgical cost and outcome by hospital volume in California. *Otolaryngol--Head Neck Surg Off J Am Acad Otolaryngol-Head Neck Surg*. 2004;130(6):726-735. doi:10.1016/j.otohns.2004.02.008
7. Caruso JP, Moosa S, Fezeu F, Ramesh A, Sheehan JP. A cost comparative study of Gamma Knife radiosurgery versus open surgery for intracranial pathology. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas*. 2015;22(1):184-188. doi:10.1016/j.jocn.2014.08.012
8. Stangerup S-E, Tos M, Thomsen J, Caye-Thomasen P. Hearing outcomes of vestibular schwannoma patients managed with “wait and scan”: predictive value of hearing level at diagnosis. *J Laryngol Otol*. 2010;124(5):490-494. doi:10.1017/S0022215109992611
9. Kirchmann M, Karnov K, Hansen S, Dethloff T, Stangerup S-E, Caye-Thomasen P. Ten-Year Follow-up on Tumor Growth and Hearing in Patients Observed With an Intracanalicular Vestibular Schwannoma. *Neurosurgery*. 2017;80(1):49-56. doi:10.1227/NEU.0000000000001414
10. Soares VYR, Atai NA, Fujita T, et al. Extracellular vesicles derived from human vestibular schwannomas associated with poor hearing damage cochlear cells. *Neuro-Oncol*. 2016;18(11):1498-1507. doi:10.1093/neuonc/now099
11. Lee JD, Kwon TJ, Kim U-K, Lee W-S. Genetic and epigenetic alterations of the NF2 gene in sporadic vestibular schwannomas. *PloS One*. 2012;7(1):e30418. doi:10.1371/journal.pone.0030418
12. Zhang Z, Wang Z, Sun L, et al. Mutation spectrum and differential gene expression in cystic and solid vestibular schwannoma. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. September 2013. doi:10.1038/gim.2013.114
13. Lassaletta L, Torres-Martín M, Peña-Granero C, et al. NF2 genetic alterations in sporadic vestibular schwannomas: clinical implications. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol*. 2013;34(7):1355-1361. doi:10.1097/MAO.0b013e318298ac79
14. Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology*. 1997;49(1):267-270.
15. Agnihotri S, Jalali S, Wilson MR, et al. The genomic landscape of schwannoma. *Nat Genet*.

2016;48(11):1339-1348. doi:10.1038/ng.3688

16. Evans DGR. Neurofibromatosis type 2 (NF2): a clinical and molecular review. *Orphanet J Rare Dis.* 2009;4:16. doi:10.1186/1750-1172-4-16
17. Evans DG, Howard E, Giblin C, et al. Birth incidence and prevalence of tumor-prone syndromes: estimates from a UK family genetic register service. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(2):327-332. doi:10.1002/ajmg.a.33139
18. Evans DGR, Ramsden RT, Shenton A, et al. Mosaicism in neurofibromatosis type 2: an update of risk based on uni/bilaterality of vestibular schwannoma at presentation and sensitive mutation analysis including multiple ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2007;44(7):424-428. doi:10.1136/jmg.2006.047753
19. Kehrer-Sawatzki H, Farschtschi S, Mautner V-F, Cooper DN. The molecular pathogenesis of schwannomatosis, a paradigm for the co-involvement of multiple tumour suppressor genes in tumorigenesis. *Hum Genet.* 2017;136(2):129-148. doi:10.1007/s00439-016-1753-8
20. Sestini R, Bacci C, Provenzano A, Genuardi M, Papi L. Evidence of a four-hit mechanism involving SMARCB1 and NF2 in schwannomatosis-associated schwannomas. *Hum Mutat.* 2008;29(2):227-231. doi:10.1002/humu.20679
21. Smith MJ, Bowers NL, Bulman M, et al. Revisiting neurofibromatosis type 2 diagnostic criteria to exclude LZTR1-related schwannomatosis. *Neurology.* 2017;88(1):87-92. doi:10.1212/WNL.0000000000003418
22. Giovannini M, Peyre M, Kalamarides M, Bonne N-X. Mouse models of Neurofibromatosis type 2. In: *Advances in Neurofibromatosis Research.* K.S.G Cunha and M. Geller, pp.; 2011.
23. Giovannini M, Robanus-Maandag E, van der Valk M, et al. Conditional biallelic Nf2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2. *Genes Dev.* 2000;14(13):1617-1630.
24. McClatchey AI, Saotome I, Mercer K, et al. Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev.* 1998;12(8):1121-1133.
25. McClatchey AI, Saotome I, Ramesh V, Gusella JF, Jacks T. The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes Dev.* 1997;11(10):1253-1265.
26. McLaughlin ME, Kruger GM, Slocum KL, et al. The Nf2 tumor suppressor regulates cell-cell adhesion during tissue fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3261-3266. doi:10.1073/pnas.0700044104
27. Gladden AB, Hebert AM, Schneeberger EE, McClatchey AI. The NF2 tumor suppressor, Merlin, regulates epidermal development through the establishment of a junctional polarity complex. *Dev Cell.* 2010;19(5):727-739. doi:10.1016/j.devcel.2010.10.008
28. Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI. NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev.* 2003;17(9):1090-1100. doi:10.1101/gad.1054603
29. Giovannini M. [Spatio-temporal control of oncogenesis]. *Pathol Biol (Paris).* 1998;46(2):120-121.
30. Stemmer-Rachamimov AO, Louis DN, Nielsen GP, et al. Comparative pathology of nerve sheath tumors in mouse models and humans. *Cancer Res.* 2004;64(10):3718-3724. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-4079
31. Giovannini M, Robanus-Maandag E, Niwa-Kawakita M, et al. Schwann cell hyperplasia and

- tumors in transgenic mice expressing a naturally occurring mutant NF2 protein. *Genes Dev.* 1999;13(8):978-986.
32. Giovannini M, Bonne N-X, Vitte J, et al. mTORC1 inhibition delays growth of neurofibromatosis type 2 schwannoma. *Neuro-Oncol.* January 2014. doi:10.1093/neuonc/not242
33. Hung G, Faudoa R, Li X, et al. Establishment of primary vestibular schwannoma cultures from neurofibromatosis type-2 patients. *Int J Oncol.* 1999;14(3):409-415.
34. Hung G, Li X, Faudoa R, et al. Establishment and characterization of a schwannoma cell line from a patient with neurofibromatosis 2. *Int J Oncol.* 2002;20(3):475-482.
35. Tanaka K, Eskin A, Chareyre F, et al. Therapeutic potential of HSP90 inhibition for neurofibromatosis type 2. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2013;19(14):3856-3870. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3167
36. Niranjana A, Lunsford LD, Flickinger JC, Maitz A, Kondziolka D. Dose reduction improves hearing preservation rates after intracanalicular acoustic tumor radiosurgery. *Neurosurgery.* 1999;45(4):753-762; discussion 762-765.
37. Tsao MN, Sahgal A, Xu W, et al. Stereotactic radiosurgery for vestibular schwannoma: International Stereotactic Radiosurgery Society (ISRS) Practice Guideline. *J Radiosurgery SBRT.* 2017;5(1):5-24.
38. Klijn S, Verheul JB, Beute GN, et al. Gamma Knife radiosurgery for vestibular schwannomas: evaluation of tumor control and its predictors in a large patient cohort in The Netherlands. *J Neurosurg.* 2016;124(6):1619-1626. doi:10.3171/2015.4.JNS142415
39. Szeifert GT, Figarella-Branger D, Roche P-H, Régis J. Histopathological observations on vestibular schwannomas after Gamma Knife radiosurgery: the Marseille experience. *Neurochirurgie.* 2004;50(2-3 Pt 2):327-337.
40. Jacob A, Igarashi S, Platto T, Khan R, Jain R. The Solid Component of Radiographically Non-Growing, Post-Radiated Vestibular Schwannoma Retains Proliferative Capacity: Implications for Patient Counseling. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2015;124(10):834-840. doi:10.1177/0003489415588128
41. Shin M, Ueki K, Kurita H, Kirino T. Malignant transformation of a vestibular schwannoma after gamma knife radiosurgery. *Lancet.* 2002;360(9329):309-310. doi:10.1016/S0140-6736(02)09521-1
42. Massager N, Nissim O, Delbrouck C, et al. Irradiation of cochlear structures during vestibular schwannoma radiosurgery and associated hearing outcome. *J Neurosurg.* 2007;107(4):733-739. doi:10.3171/JNS-07/10/0733
43. Jacob JT, Carlson ML, Schiefer TK, Pollock BE, Driscoll CL, Link MJ. Significance of cochlear dose in the radiosurgical treatment of vestibular schwannoma: controversies and unanswered questions. *Neurosurgery.* 2014;74(5):466-474; discussion 474. doi:10.1227/NEU.0000000000000299
44. Kondziolka D, Shin SM, Brunswick A, Kim I, Silverman JS. The biology of radiosurgery and its clinical applications for brain tumors. *Neuro-Oncol.* 2015;17(1):29-44. doi:10.1093/neuonc/nou284
45. Hayden Gephart MG, Hansasuta A, Balise RR, et al. Cochlea radiation dose correlates with hearing loss after stereotactic radiosurgery of vestibular schwannoma. *World Neurosurg.* 2013;80(3-4):359-363. doi:10.1016/j.wneu.2012.04.001
46. Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956;103(5):653-666.

47. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Bree C van. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315-2319. doi:10.1038/nprot.2006.339
48. Hansen MR, Clark JJ, Gantz BJ, Goswami PC. Effects of ErbB2 signaling on the response of vestibular schwannoma cells to gamma-irradiation. *The Laryngoscope.* 2008;118(6):1023-1030. doi:10.1097/MLG.0b013e318163f920
49. Yue WY, Clark JJ, Telisak M, Hansen MR. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity enhances vestibular schwannoma cell sensitivity to gamma irradiation. *Neurosurgery.* 2013;73(3):506-516. doi:10.1227/01.neu.0000431483.10031.89
50. Gautreau A, Manent J, Fievet B, Louvard D, Giovannini M, Arpin M. Mutant products of the NF2 tumor suppressor gene are degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(35):31279-31282. doi:10.1074/jbc.C200125200
51. Lallemand D, Manent J, Couvelard A, et al. Merlin regulates transmembrane receptor accumulation and signaling at the plasma membrane in primary mouse Schwann cells and in human schwannomas. *Oncogene.* 2009;28(6):854-865. doi:10.1038/onc.2008.427
52. Stankovic KM, Mrugala MM, Martuza RL, et al. Genetic determinants of hearing loss associated with vestibular schwannomas. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol.* 2009;30(5):661-667. doi:10.1097/MAO.0b013e3181a66ece
53. Bohne BA, Harding GW. Processing and analyzing the mouse temporal bone to identify gross, cellular and subcellular pathology. *Hear Res.* 1997;109(1-2):34-45.
54. Bonne N-X. Etude tridimensionnelle de l'organe de Corti par microscopie confocale à balayage laser. 2013.
55. Risoud M, Sircoglou J, Dedieu G, Tardivel M, Vincent C, Bonne N-X. Imaging and cell count in cleared intact cochlea in the Mongolian gerbil using laser scanning confocal microscopy. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2017;134(4):221-224. doi:10.1016/j.anorl.2017.01.001
56. Bonne N-X, Vitte J, Chareyre F, et al. An allograft mouse model for the study of hearing loss secondary to vestibular schwannoma growth. *J Neurooncol.* 2016;129(1):47-56. doi:10.1007/s11060-016-2150-9
57. Contessa JN, Hampton J, Lammering G, et al. Ionizing radiation activates Erb-B receptor dependent Akt and p70 S6 kinase signaling in carcinoma cells. *Oncogene.* 2002;21(25):4032-4041. doi:10.1038/sj.onc.1205500
58. Eke I, Makinde AY, Aryankalayil MJ, et al. Exploiting radiation-induced signaling to increase the susceptibility of resistant cancer cells to targeted drugs: AKT and mTOR inhibitors as an example. *Mol Cancer Ther.* August 2017. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0262
59. James MF, Han S, Polizzano C, et al. NF2/merlin is a novel negative regulator of mTOR complex 1, and activation of mTORC1 is associated with meningioma and schwannoma growth. *Mol Cell Biol.* 2009;29(15):4250-4261. doi:10.1128/MCB.01581-08
60. James MF, Stivison E, Beauchamp R, et al. Regulation of mTOR complex 2 signaling in neurofibromatosis 2-deficient target cell types. *Mol Cancer Res MCR.* 2012;10(5):649-659. doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0425-T
61. Goutagny S, Raymond E, Esposito-Farese M, et al. Phase II study of mTORC1 inhibition by everolimus in neurofibromatosis type 2 patients with growing vestibular schwannomas. *J Neurooncol.* 2015;122(2):313-320. doi:10.1007/s11060-014-1710-0
62. Goutagny S, Giovannini M, Kalamarides M. A 4-year phase II study of everolimus in NF2 patients with growing vestibular schwannomas. *J Neurooncol.* April 2017. doi:10.1007/s11060-017-2447-3

63. Ma DJ, Galanis E, Anderson SK, et al. A phase II trial of everolimus, temozolomide, and radiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma: NCCTG N057K. *Neuro-Oncol.* December 2014. doi:10.1093/neuonc/nou328
64. Kim EJ, Jeong J-H, Bae S, Kang S, Kim CH, Lim Y-B. mTOR inhibitors radiosensitize PTEN-deficient non-small-cell lung cancer cells harboring an EGFR activating mutation by inducing autophagy. *J Cell Biochem.* 2013;114(6):1248-1256. doi:10.1002/jcb.24465
65. Deutsch E, Le Péchoux C, Faivre L, et al. Phase I trial of everolimus in combination with thoracic radiotherapy in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015;26(6):1223-1229. doi:10.1093/annonc/mdv105
66. Narayan V, Vapiwala N, Mick R, et al. Phase 1 Trial of Everolimus and Radiation Therapy for Salvage Treatment of Biochemical Recurrence in Prostate Cancer Patients Following Prostatectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017;97(2):355-361. doi:10.1016/j.ijrobp.2016.10.013
67. Kim M-K, Kim T-J, Sung CO, et al. High expression of mTOR is associated with radiation resistance in cervical cancer. *J Gynecol Oncol.* 2010;21(3):181-185. doi:10.3802/jgo.2010.21.3.181
68. Paldor I, Abadi S, Bonne N, et al. The efficacy of lapatinib and nilotinib in combination with radiation therapy in a model of NF2 associated peripheral schwannoma. *J Neurooncol.* 2017;135(1):47-56. doi:10.1007/s11060-017-2567-9
69. Astrahan M. Some implications of linear-quadratic-linear radiation dose-response with regard to hypofractionation. *Med Phys.* 2008;35(9):4161-4172. doi:10.1118/1.2969065
70. Cerniglia GJ, Karar J, Tyagi S, et al. Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol Pharmacol.* 2012;82(6):1230-1240. doi:10.1124/mol.112.080408
71. Chang L, Graham PH, Hao J, et al. PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. *Cell Death Dis.* 2014;5:e1437. doi:10.1038/cddis.2014.415
72. Chang L, Graham PH, Ni J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015;96(3):507-517. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.07.005
73. Gil del Alcazar CR, Hardebeck MC, Mukherjee B, et al. Inhibition of DNA double-strand break repair by the dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 as a strategy for radiosensitization of glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014;20(5):1235-1248. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1607
74. Kuger S, Graus D, Brendtke R, et al. Radiosensitization of Glioblastoma Cell Lines by the Dual PI3K and mTOR Inhibitor NVP-BEZ235 Depends on Drug-Irradiation Schedule. *Transl Oncol.* 2013;6(2):169-179.
75. Frøsina G, Profumo A, Marubbi D, Marcello D, Ravetti JL, Daga A. ATR kinase inhibitors NVP-BEZ235 and AZD6738 effectively penetrate the brain after systemic administration. *Radiat Oncol Lond Engl.* 2018;13(1):76. doi:10.1186/s13014-018-1020-3
76. Thariat J, Kirova Y, Milano G, Mornex F. [Combination of stereotactic irradiation and chemotherapy or targeted therapies: state of the art and preliminary recommendations]. *Cancer Radiothérapie J Société Fr Radiothérapie Oncol.* 2014;18(4):270-279. doi:10.1016/j.canrad.2014.05.007
77. Kroeze SGC, Fritz C, Hoyer M, et al. Toxicity of concurrent stereotactic radiotherapy and targeted therapy or immunotherapy: A systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:25-37. doi:10.1016/j.ctrv.2016.11.013

78. Wong HK, Lahdenranta J, Kamoun WS, et al. Anti-vascular endothelial growth factor therapies as a novel therapeutic approach to treating neurofibromatosis-related tumors. *Cancer Res.* 2010;70(9):3483-3493. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3107
79. Koutsimpelas D, Bjelopavlovic M, Yetis R, et al. The VEGF/VEGF-R axis in sporadic vestibular schwannomas correlates with irradiation and disease recurrence. *ORL J Oto-Rhino-Laryngol Its Relat Spec.* 2012;74(6):330-338. doi:10.1159/000346238
80. Plotkin SR, Stemmer-Rachamimov AO, Barker FG, et al. Hearing improvement after bevacizumab in patients with neurofibromatosis type 2. *N Engl J Med.* 2009;361(4):358-367. doi:10.1056/NEJMoa0902579
81. Gao X, Zhao Y, Stemmer-Rachamimov AO, et al. Anti-VEGF treatment improves neurological function and augments radiation response in NF2 schwannoma model. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(47):14676-14681. doi:10.1073/pnas.1512570112
82. Zhao Y, Liu P, Zhang N, et al. Targeting the cMET pathway augments radiation response without adverse effect on hearing in NF2 schwannoma models. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;115(9):E2077-E2084. doi:10.1073/pnas.1719966115
83. Killion JJ, Radinsky R, Fidler IJ. Orthotopic models are necessary to predict therapy of transplantable tumors in mice. *Cancer Metastasis Rev.* 1998;17(3):279-284.
84. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2004;40(6):852-857. doi:10.1016/j.ejca.2003.11.021
85. Schulz A, Büttner R, Hagel C, et al. The importance of nerve microenvironment for schwannoma development. *Acta Neuropathol (Berl).* 2016;132(2):289-307. doi:10.1007/s00401-016-1583-8
86. Manent J, Oguievetskaia K, Bayer J, Ratner N, Giovannini M. Magnetic cell sorting for enriching Schwann cells from adult mouse peripheral nerves. *J Neurosci Methods.* 2003;123(2):167-173.
87. Doherty J, Go JL, Linthicum FH. Neurofibromatosis 2 invasion of the internal auditory canal wall: clinical significance. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol.* 2014;35(9):1662-1668. doi:10.1097/MAO.0000000000000494
88. Nam S-I, Linthicum FH, Merchant SN. Temporal bone histopathology in neurofibromatosis type 2. *The Laryngoscope.* 2011;121(7):1548-1554. doi:10.1002/lary.21822
89. Paxinos G, Franklin K. *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* 4th Edition.
90. Messerli SM, Tang Y, Giovannini M, Bronson R, Weissleder R, Breakefield XO. Detection of spontaneous schwannomas by MRI in a transgenic murine model of neurofibromatosis type 2. *Neoplasia N Y N.* 2002;4(6):501-509. doi:10.1038/sj.neo.7900265
91. Dinh CT, Bracho O, Mei C, et al. A Xenograft Model of Vestibular Schwannoma and Hearing Loss. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol.* 2018;39(5):e362-e369. doi:10.1097/MAO.0000000000001766
92. Gehlhausen JR, Park S-J, Hickox AE, et al. A murine model of neurofibromatosis type 2 that accurately phenocopies human schwannoma formation. *Hum Mol Genet.* 2015;24(1):1-8. doi:10.1093/hmg/ddu414
93. Wahle BM, Hawley ET, He Y, et al. Chemopreventative celecoxib fails to prevent schwannoma formation or sensorineural hearing loss in genetically engineered murine model of neurofibromatosis type 2. *Oncotarget.* 2018;9(1):718-725. doi:10.18632/oncotarget.22002

ABSTRACT

Title: Preclinical models of vestibular schwannomas for the evaluation of radiation dose reduction in combination with targeted therapies.

Context: Vestibular schwannomas (VS) are benign neoplasm arising from the Schwann cells of the vestibular nerve. Most of sporadic VS carry a bi-allelic inactivation of the tumor suppressor gene NF2. Congenital inactivation of the NF2 gene is linked to the onset of Neurofibromatosis type 2 (NF2), a genetic condition predisposing to the development of multiple benign tumor of the central nervous system with bilateral VS as a hallmark. Treatment of VS is either surgical or by use of radiation therapy delivered in stereotactic condition. A significant dose reduction has led to improving the hearing outcomes while maintaining good tumor control. Meanwhile a significant number of treated patients will develop a progressive sensorineural hearing loss (SNHL). Laboratory models that faithfully recapitulate NF2 gene inactivation and SNHL are needed to pursue the reduction of the dose delivered

Aim: We aimed at developing new models in-vitro and in-vivo for the study of vestibular schwannoma radio sensitivity in combination with selected compounds that selectively target the pathways activated secondary to NF2 loss of function.

Methodes: Human vestibular schwannoma cell lines (HEI193, HEI182) and control human Schwann cell line (HEI286) were used in clonogenic assay to determine the number of colony forming unit (CFU) spontaneously and at increasing dosing of mTOR inhibitor (Rapamycin), PI3 kinase inhibitor (GDC_0941), PI3K-mTOR dual inhibitor (BEZ_235) to determine the 50% growth inhibitory threshold (GI50%) then in combination with increasing radiation regimen of gamma radiation emitted by a source of Co60. The mouse cell line inactivated for nf2 (SC4#9) was used to generate orthotropic syngrafts. The growth of the tumor was monitored using MRI and bioluminescence imaging and hearing was tested by recording auditory brainstem responses. Pathology of the cochlea were obtained from paraffin embedded sections and then using fluorescence confocal microscopy of whole mounted transparent cochleae

Results: Soft agar clonogenic assays were used and identified a resistance to radiation therapy in human cell lines of VS inactivated for NF2 when compared to the non-mutated control. This radiation resistance could be overcome by pre-exposure to the mTOR inhibitor Rapamycin allowing a return to the radiosensitivity of non-mutated control. There was a tendency toward a beneficial effect when using a dual inhibition of the mTOR and PI3 kinase at a maximum dose of exposure to radiation. A mouse model of VS has been developed by stereotactic seeding of *nf2* deficient cell line SC4#9*luc* targeting the cochleo-vestibular nerve complex. It recapitulates the growth in the suitable micro-environment and secondary SNHL. The growth has been characterized using MRI and in-vivo bioluminescence imaging. Hearing loss was confirmed using sequential ABR. Last a protocol for the clarification of whole mounted cochleae has been adapted to species of rodents suitable for the pathological study of ototoxic change secondary to VS and/or its treatment.

Conclusion: The models presented in this thesis may be used for the preclinical evaluation of combined therapeutic approaches with single dose gamma radiation. A better understanding of the mechanisms involved in ototoxicity secondary to VS and of its treatment would improve the molecular targeting in order to warrant better auditory outcomes.

RESUME

Contexte : Le schwannome vestibulaire (SV) est une tumeur bénigne de la gaine du nerf vestibulaire. La plupart des SV présentent une inactivation somatique bi-allélique du gène suppresseur de tumeur NF2. L'inactivation congénitale du gène NF2 est impliquée dans le développement de la Neurofibromatose de type 2, une maladie génétique autosomique dominante prédisposant au développement de tumeurs multiples du système nerveux central et en particulier de schwannomes vestibulaires bilatéraux. Le traitement des schwannomes vestibulaires repose sur la chirurgie ou la radiothérapie délivrée en conditions stéréotaxiques. La réduction de la dose d'irradiation des schwannomes vestibulaires a permis d'améliorer le pronostic fonctionnel auditif tout en garantissant un taux de réponse satisfaisant. Pourtant de nombreux patients présenteront une surdité neurosensorielle progressive. Afin de poursuivre cette réduction de dose d'irradiation, des modèles biologiques fidèles récapitulant le statut d'inactivation du gène NF2 et la surdité neurosensorielle sont nécessaires à l'élaboration d'une approche préclinique.

Problématique : Nous avons proposé de développer des systèmes modèles in-vitro et in-vivo compatibles avec l'étude de la radiosensibilité des schwannomes vestibulaires en combinaison avec des thérapies ciblant les voies de signalisation spécifiquement activées par la perte de fonction NF2.

Méthodes : Les lignées cellulaires humaines de schwannomes vestibulaires NF2 (HEI193, HEI182), et de cellules de Schwann vestibulaire contrôles (HEI286) ont été cultivées en essai clonogénique afin de déterminer le nombre d'unité formatrices de colonies à doses croissantes d'inhibiteur mTOR (Rapamycine), PI3K (GDC_0941), mTOR et PI3K (BEZ_235) pour déterminer le 50% d'inhibition de croissance (GI50%) puis en combinaison à doses croissantes de radiation gamma (Co60). La lignée cellulaire murine inactivée pour nf2 (SC4#9) a été utilisée pour réaliser des greffes syngéniques orthotopiques. La croissance des tumeurs a été suivie par IRM et bioluminescence et l'audition déterminée par potentiels évoqués auditifs. L'analyse histologique des cochlées a été

réalisée par coloration en hématoxyline et éosine puis par fluorescence après clarification cochléaire. Des volumes complets ont été obtenus par microscopie confocale à balayage laser.

Résultats : Les essais clonogéniques réalisés en Agarose ont identifié une radiorésistance relative des lignées humaines de schwannomes mutées pour NF2 par comparaison au contrôle humain non muté. Cette résistance identifiée en réponse à l'exposition à une dose unique d'irradiation gamma peut être contournée par l'inhibition de la voie mTOR au moment de l'irradiation restituant une sensibilité comparable au contrôle humain non muté. Une tendance à un bénéfice de l'association d'une inhibition mTOR à un inhibiteur PI3 kinase a été retrouvée à une dose maximum d'irradiation. Un modèle murin de schwannome vestibulaire qui récapitule la croissance dans l'angle ponto-cérébelleux et la perte d'audition a été développé par injection stéréotaxique dans le paquet acoustico faciale. Le suivi de croissance de ce schwannome a été caractérisé par IRM et bio-luminescence in-vivo. Enfin un protocole de clarification cochléaire a été adapté aux mammifères murins pour permettre l'étude histologique de cochlées intactes compatible avec l'étude de l'otoxicité des schwannomes et/ou de leur traitement

Conclusion : Les modèles décrits dans cette thèse permettent l'évaluation pré-clinique de stratégies thérapeutiques combinant thérapie ciblée et irradiation gamma en dose unique. L'amélioration des connaissances des mécanismes participant à l'ototoxicité des schwannomes et de leur traitement permettra d'améliorer le ciblage moléculaire afin de réduire les effets auditifs secondaires de la radiochirurgie.

MOTS-CLES

Schwannome vestibulaire, Neurofibromatose de type 2, radiochirurgie, mTOR, radiosensibilisation