Etude de l'effet radio-sensibilisant de nanotubes de carbone dans le modèle de glioblastome canin spontané, en vue d'un développement chez l'Homme

Benjamin Cartiaux

▶ **To cite this version:**

Benjamin Cartiaux. Etude de l'effet radio-sensibilisant de nanotubes de carbone dans le modèle de glioblastome canin spontané, en vue d'un développement chez l'Homme. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30133 . tel-03141721

HAL Id: tel-03141721
https://theses.hal.science/tel-03141721

Submitted on 15 Feb 2021

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.

Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Benjamin CARTIAUX

Le 17 décembre 2020

Etude de l'effet radio-sensibilisant de nanotubes de carbone dans le modèle de glioblastome canin spontané, en vue d'un développement chez l'Homme.

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :
CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par
Elizabeth MOYAL et Giovanni MOGICATO

Jury

M. Thierry ROGER, Rapporteur
Mme Frédérique PONCE, Rapporteure
M. Jesus RUBERTE, Rapporteur
M. Emmanuel FLAHAUT, Examinateur
M. Marti PUMAROLA, Examinateur
Mme Elizabeth MOYAL, Directrice de thèse
M. Giovanni MOGICATO, Co-directeur de thèse

Remerciements

À Monsieur Martí Pumarola Batlle,
Professeur à l'Université Autonome de Barcelone en anatomie-pathologique,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse.

À Madame Frédérique Ponce,
Professeure à VetAgro Sup en oncologie comparative,

À Monsieur Thierry Roger,
Professeur à VetAgro Sup en anatomie ,

À Monsieur Jesus Ruberte,
Professeur à l'Université Autonome de Barcelone en anatomie ,

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs pour ce travail de thèse universitaire, pour leur relecture et leurs remarques pertinentes.

À Monsieur Emmanuel Flahaut,
Directeur de Recherche CNRS au CIRIMAT
Qui m'accompagné tout au long de cette thèse pour la partie nanotubes de carbone, pour ses précieux conseils, sa gentillesse et sa disponibilité.

À Madame Elizabeth Moyal,
PU-PH en neuro-oncologie, Cheffe du département de radiothérapie à l'IUCT,
Qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être ma directrice de thèse. Merci pour ta bienveillance, et ta capacité à toujours tirer du positif dans chaque chose. Merci pour nos discussions enrichissantes et pour le temps que tu m'as accordé tout au long de ces quatre années.

À Monsieur Giovanni Mogicato,
Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse en Anatomie et Imagerie Médicale
Qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être mon co-directeur de thèse. Merci pour tout le temps que tu m'as accordé à chaque instant, dans les bons et mauvais moments, pour ta prévenance de chaque instant.
À toutes ces années passées ensemble, et celles à venir

Table des matières

Table des matières 5
Liste des abréviations 9
Table des illustrations 13
Figures 13
Tableaux 17
Résumé de thèse français 19
Thesis Summary 20
Introduction 21
I. Étude bibliographique 25
A. Les gliomes diffus 27
1. Définition histopathologique 27
a) Les cellules de la glie 27
b) Classification des gliomes selon l'OMS 28
2. Épidémiologie 33
a) Incidence 33
b) Facteurs de risque 34
3. Diagnostic 36
a) Clinique 36
b) Radiologique 36
(1) Tomodensitométrie (TDM) 36
(2) Modalités anatomiques et fonctionnelles de l'IRM 37
(3) La tomographie à émission de positons (TEP) 41
c) Anatomopathologique 42
d) Biomarqueurs circulants 43
4. Traitement 44
a) Chirurgie 44
b) Radiothérapie 46
c) Chimiothérapie 48
d) Immunothérapie 49
e) Traitements adjuvants 52
f) Résistance aux traitements 54

5. Pronostic 56
B. Le chien comme modèle d'étude en oncologie comparative 61
1. Intérêts du modèle canin 63
a) Arguments en faveur d'une convergence nosologique entre gliomes canins et humains 63
(1) Arguments épidémiologiques 63
(2) Arguments génétiques 64
(3) Arguments étiopathogéniques 65
(4) Arguments morphologiques 67
b) Avantages du modèle canin par rapport au modèle murin 70
2. Les lignées cellulaires de gliomes canins comme modèle d'étude *in vitro* 71
C. Les nanotubes de carbone 75
1. Structure des nanotubes de carbone 75
a) Une nouvelle forme allotropique du carbone 75
b) Classification des nanotubes de carbone 77
2. Synthèse des nanotubes de carbone et purification 79
3. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone 80
a) Purification des nanotubes de carbone 81
b) Fonctionnalisation covalente 82
c) Fonctionnalisation non-covalente 84
4. Caractérisation des nanotubes de carbone 85
a) La spectroscopie Raman 86
b) La microscopie électronique 87
c) La microscopie à sonde locale 87
d) Autres techniques de caractérisation des NTC 88
5. Toxicité des nanotubes de carbone 88
6. Propriétés et différentes applications des NTC 89
7. Intérêts des NTC dans le traitement du gliome 95
Synthèse de la revue bibliographique et objectifs de la thèse 97
II. Étude expérimentale 101
A. Caractérisation de lignées cellulaires de gliomes canins à but translationnel : article en cours de soumission auprès de *Frontiers in Veterinary Sciences* 103
B. Étude de l'effet radiosensibilisant des NTC sur les lignées de gliomes canins 137
1. Matériel et méthode 139

a) Préparation des NTC 139
(1) Synthèse des NTC 139
(2) Extraction et rinçage des NTC 141
(3) Fonctionnalisation endoédrique des NTC par du chlorure de gadolinium 141
(4) Dispersion des NTC 142
b) Évaluation de la pénétration des NTC dans les cellules de gliomes canins 142
(1) Microscopie biphotonique 142
(2) Spectroscopie Raman 144
c) Évaluation de la cytoxicité des NTC 144
(1) Évaluation au bleu de trypan 144
(2) Évaluation au WST-1 145
d) Étude du cycle cellulaire 145
e) Étude de l'effet radiosensibilisant des NTC 146
(1) Test de survie SF2 146
(2) Test de clonogénicité 146
2. Résultats 147
a) Évaluation de la pénétration des NTC dans les cellules de gliome canin 147
(1) Microscopie biphotonique 147
(2) Spectroscopie Raman 151
b) Évaluation de la cytotoxicité des NTC 152
(1) Évaluation de la cytotoxicité au bleu de trypan 152
(2) Évaluation au WST1 153
c) Évaluation de l'effet de NTC sur le cycle cellulaire 154
d) Étude de la radiosensibilisation de la lignée cellulaire de gliome canin J3T par les NTC 155
(1) Calcul des valeurs SF2 155
(2) MID 156
3. Discussion 157
4. Perspectives futures 160
Conclusion générale 165
Publications scientifiques 167
Bibliographie 171

Liste des abréviations

AFA :	Alcool-Formol-Acide
ADSC :	*Adipocyte Derived Stem Cell*
5-ALA :	*5-Aminolevulinic Acid*
^{6}O-meG :	^{6}O-méthyl-guanine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ARNm :	Acide Ribonucléique messager
ATRX :	*ATP-dependant X-linked helicase*
AVC :	Accident Vasculo-Cérébral
bFGF :	*basic Fibroblast Growth Factor*
BHM :	Barrière Hémato-Méningée
BOLD :	*Blood Oxygen Level Dependant*
Cho :	Choline
CCVD :	Dépôt Chimique Catalytique en phase Vapeur
CED :	*Convection-Enhanced Delivery*
CMF :	Cytométrie en Flux
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Cr :	Créatinine
CSC :	Cellules Souches Cancéreuses
DAMP :	*Damage-Associated Molecular Pattern*
DCx :	*Doublecortin*
ddPCR :	*Droplet Digital Polymerase Chain Reaction*
DMEM :	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DTI :	*Diffusion Tensor Imaging*
DWNT :	*Double-Walled carbon NanoTubes*
EGFR :	Récepteur du Facteur de Croissance Epidermique
EOR :	Etendue de Résection
GBM :	Glioblastome
Gd :	Gadolinium
GFAP :	*Glial Fibrillary Acidic Protein*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HIF : *Hypoxia-Inducible Factor*

HGMB1 : *High Mobility Group protein B1*

HRE : *Hypoxia Responsive Element*

HSP : *Heat Shock Protein*

IARC : Agence International de la Recherche sur le Cancer

ICD : *Immunogenic Cell Death*

ICD-O : *International Classification of Diseases for Oncology*

IDH : Isocitrate Déshydrogénase

IL-6 : Inter-leukine 6

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire-1

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

IRMf : Imagerie par Résonnance Magnétique fonctionnelle

ISRM : Imagerie Spectroscopie par Résonnance Magnétique

KPS : Indice de Karnofsky

LCS : Liquide Cérébro Spinal

MDR : *Multi Drug Resistance*

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

MET : Microscopie Électronique à Transmission

MGMT : ^{6}O-methylguanine-DNA methyltransferase

miARN : Micro Acide RiboNucléïque

MMP : Métallo-Protéase Matricielle

MRP1 : *Multidrug resistance-related protein 1*

MRS : *Magnetic Resonance Spectroscopy*

mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*

MWNT : *Multi-Walled carbon NanoTubes*

NAA : N-Acétylaspartate

NeuN : *Neuronal Nuclei*

NK : *Natural Killer*

NTC : Nanotube de Carbone

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : *Open Reading Frame*

PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PEG : PolyÉthylène Glycol

Pgp : P-glycoprotéine

PHDs *specific prolyl hydroxylase-domain*

PpIX : Protoporphyrine IX

PS : Pénicilline-Streptomycine

RBM : *Radial Breathing Mode*

RGD : Arginine-Glycine-Acide Aspartique

RI : Rayons Ionisants

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROI : *Region of Interest*

RT : Radiothérapie

RT-PCR : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

SAMD9 : *Sterile Alpha Motif Domain containing 9 protein*

SI : Système Immunitaire

SNC : Système Nerveux Central

SPARC : *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SWNT : *Single-Walled carbon NanoTubes*

TAAs : *Tumour-Associated Antigens*

TEP : Tomographie à Emission de Positons

TDM : Tomodensimétrie

TGFβ : *Transforming Growth Factor-β*

TIR : *Terminal Inverted Repeated Region*

TMZ : Témozolomide

TP53 Protéine tumorale 53

Treg : Lymphocyte T Régulateur

UAB : Université Autonome de Barcelone

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Schéma de l'organisation des cellules gliales (d'après Jansen 2014)..... 28
Figure 2 : Classification simplifiée des gliomes diffus, d'après la classification OMS 2016. 32
Figure 3 : Tumeurs du SNC a) ensemble des tumeurs primitives b) tumeurs malignes du SNC (d'après (Ostrom et al. 2019). Les gliomes représentent à elles seules approximativement 75% des tumeurs du SNC. 34
Figure 4 : Examen tomodensitométrique sans produit de contraste, d'un patient atteint de GBM. 37
Figure 5 : Images IRM obtenues chez un patient atteint de GBM. 38
Figure 6 : Représentation d'un cadre stéréotaxique et mise en évidence de la trajectoire de la biopsie. Présentation de 3 coupes du crâne : sagittale(en haut à droite), axiale (en bas à gauche) et coronale (en bas à droite) et de la trajectoire (en vert) de la biopsie. (Young et al., 2015) 38
Figure 7 : Imagerie du tenseur de diffusion réalisée chez un patient souffrant d'un astrocytome. La masse tumorale (indiquée par la pointe de flèche) modifie le trajet des fibres de substance blanche (Wolbers et al., 2014). 39
Figure 8 : Imagerie de Spectroscopie par Résonance Magnétique réalisée chez un patient atteint de GBM. On observe un rapport Cho/Cr >2, un pic NAA diminué et un pic en lactate dans la région d'intérêt (Young et al., 2015) 40
Figure 9 : TEP et IRM associées, de deux patients atteints de GBM au début de leur traitement (Basal) et 3 semaines plus tard (+ 3 sem). 41
Figure 10 : Corrélation entre un ratio Cho/NAA élevé et la surexpression de SOX-2. (A-C) Image pondérée en T1, image FLAIR et imagerie de spectroscopie par résonance magnétique d'un patient atteint d'un astrocytome anaplasique. (D-E) Immunohistochimie du tissu prélevé dans la région d'intérêt (i.e. carré vert présent sur les images précédentes) montrant une surexpression de la protéine SOX2 (d'après Cordova et al., 2016) 42

Figure 11 : Photographies d'aires corticales motrices (cercle blanc) en présence de 5-ALA, (A) sous lumière blanche et (B) sous ultraviolet (UV). 46
Figure 12 : Plans dosimétriques comparant la protonthérapie (A) à la radiothérapie conventionnelle (B), d'après (Shih et al., 2015) 47
Figure 13 **:** Exemple de résultats immunohistochimiques obtenus pour un GBM canin (A : Marquage nestin, B : Marquage CD133, C : Marquage Olig2, D : Marquage DCx, E : marquage Ki67)(Fernandez et al., 2016) 66
Figure 14 : Coupes coronales issues d'une séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium chez un patient humain (A) et un patient canin (B) atteints de GBM temporal gauche. 67
Figure 15 : Arbre de décision pour la classification des gliomes canins. (A = morphologie astrocytaire ; O = morphologie oligodendrogliale ; U =morphologie non définie : N = sans infiltration ; F : infiltration focale ; D : infiltration diffuse 68
Figure 16 : Représentation moléculaire des différentes allotropiques du carbone (d'après Negri et al. 2020) 76
Figure 17 : Image au microscope électronique à transmission d'un MWNT en vue longitudinale, montrant l'embriquement des feuillets de graphène 77
Figure 18 : Classification des nanotubes de carbone (a) selon le nombre de parois où on peut distinguer les SWNT des DWNT/MWNT (b) selon le type d'enroulement des feuillets de graphène airmchair, zig-zag ou chiral (d'après Negri et al. 2020) 78
Figure 19 : Images obtenues au microscope électronique à transmission de SWNT avant et après purification. (a) Échantillon de SWNT avec un grand nombre d'impuretés. (b) SWNT après traitement de purification (HNO_3 et H_2SO_4) où la plupart des impuretés ont disparu (d'après Monthioux et al. 2001) 81
Figure 20 : Résumé des différentes techniques de fonctionnalisation covalente des NTC (d'après Singh et al. 2009) 83
Figure 21 : Structure des molécules fluorescentes utilisées dans la fonctionnalisation non-covalente des NTC (d'après Koh et al., 2012) 84
Figure 22 : Fonctionnalisation de NTC par du phospholipide-PEG (d'après Liu et al., 2009) 85
Figure 23 : Spectre Raman de NTC montrant les bandes caractéristiques associées (d'après Belin et al, 2005) 86

Figure 24 **:** Images de NTC obtenues par microscopie électronique (a) images obtenues au MEB (b) images obtenues au MET (c) images haute-résolution de MWNT lié à une nanoparticule de Cobalt (Co) au MET, où on peut dénombrer le nombre de parois (d'après Rodriguez-Manzo et al. 2009; Herrero-Latorre et al. 2014) 87
Figure 25 : Image confocale de cellules WiDr incubées avec des SWNT-fluorescéine (émission mesurée à 500-530nm) (d'après Bartelmess et al., 2015) 91
Figure 26 : Suivi de la distribution de SWNT-PEG par fluorescence infrarouge au cours du temps. La flèche verte indique la tumeur primaire et la flèche blanche, le nœud lymphatique (d'après Liang et al. 2014) 92
Figure 27 : Double-fonctionnalisation d'un NTC associant un anticorps et un groupe portant un radio-nucléotide 92
Figure 28 : Évaluation de l'efficacité thérapeutique de SWNT conjugué (a), par évaluation IRM du volume tumoral (b) et bioluminescence tumorale (c). Le volume tumorale a été évalué deux fois par semaine par IRM et est reporté dans le tableau (d) (i. pré-injection; ii: souris non-traité; iii. Salinomycine (SAL); iv. Paclitaxel (PTX); v. combinaison SAL+PTX; vi. SAL conjugué au SWCNT (SWNT-SAL); vii. PTX conjugué au SWCNT (SWNT-PTX); viii. Combinaison SWCNT-SAL + SWCNT-PTX (d'après Al Faraj, et al. 2016)..... 94
Figure 29 : Schéma du montage expérimental utilisé pour la synthèse de NTC par CCVD à partir de CH4. Les débits de gaz sont régulés à l'aide de débitmètres massiques (MFM). Une bouteille de lavage est placée à la sortie pour surveiller le débit de gaz et une autre pour éviter le reflux dans le réacteur tubulaire (d'après Line, 2019) 140
Figure 30 : Image en microscopie biphotonique d'une cellule J3T cultivée avec des NTC à 20µg/ml, et marquage nucléaire au DAPI. On distingue le noyau marqué en bleu, ainsi qu'un amas de NTC (flèche orange). La flèche blanche montre le bruit diffus dans le cytoplasme 148
Figure 31 : Images obtenues par microscopie biphotonique de différentes lignées de gliomes avec des concentrations de NTC a) J3T-Bg avec 50µg/ml de NTC b) Raffray avec 20µg/ml de NTC c) agrandissement de coupe orthogonale YZ vue sur l'image (b) permet de bien visualiser la position des NTC en position intracellulaire. 149
Figure 32 : Images de cellules J3T vivantes observées au microscope inversé, exposée à une concentration de NTC de 20µg/ml. Les cellules sont marquées à l'IP

(rouge), les NTC sont en verts. Les flèches blanches indiquent les vacuoles qui apparaissent lors de l'induction de la mort cellulaire. 150
Figure 33 : a) et b) Résultats Raman des J3T, non exposées aux NTC c) et d) Résultats Raman des J3T exposées à 20 µg/ml de gadoNTC. Flèche bleue : Pic Raman d'origine inconnue ; Flèche Rouge : Pic Raman spécifique de la bande G des NTC 151
Figure 34 : Courbes de survie des 5 lignées cellulaires de gliome canin avec le bleu de trypan (barre erreur : écart-type) 152
Figure 35 : Courbes de survie des lignées J3T et J3T-Bg au test colorimétrique WST1 à différentes concentrations de NTC, pendant 24, 48 et 72 heures d'exposition (barre erreur : écart-type) 153
Figure 36 : Courbes de survie des lignées SDT3 et G06A au test colorimétrique WST1 à différentes concentrations de NTC, pendant 24, 48 et 72 heures d'exposition (barre erreur : écart-type) 153
Figure 37 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux de la lignée J3T sans exposition aux NTC 154
Figure 38 : Distribution des phases du cycle cellulaire de la lignée J3T, exposée à des concentrations croissantes de NTC (0, 1, 10 et 50µg/ml de NTC) 154
Figure 39 : Courbe de survie de la lignée J3T exposée à la dose de 50µg/ml de NTC 155
Figure 40 : Courbe de radiosensibilité des cellules J3T en fonction des doses d'irradiation, selon leur exposition aux NTC 156
Figure 41 : Images IRM 3T en pondération T1 (à gauche) et T2 (à droite) réalisées à la plateforme INSERM (Pavillon Baudot, CHU Purpan) d'un chien Beagle anesthésié. 161
Figure 42 : Données métaboliques ISRM d'un Beagle de laboratoire sain anesthésié 163
Figure 43 : Poster présenté lors du Congrès du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire à Bologne en Septembre 2016 168
Figure 44 : Poster présenté lors des 12èmes journées CGSO en Novembre 2016 .. 169
Figure 45 : Poster présenté lors des journées de l'École Doctorale BSB en Avril 2018 170

Tableaux

Tableau 1 : Classification des différents types tumoraux (d'après la classification OMS 2007)..... 29
Tableau 2 : Nouvelle classification des gliomes, d'après la classification OMS 2016 (Louis et al., 2016)..... 31
Tableau 3 : Indice de Karnofsky (d'après social-sante.gouv.fr)..... 58
Tableau 4 : Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires..... 72
Tableau 5 : Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique et des résultats obtenus concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires (rouge : résultats obtenus ; bleu : expérimentation à réaliser)..... 133
Tableau 6 : Représentation schématique de la répartition des cellules et des NTC/gadoNTC par puits d'une lame LAB-TEK..... 144
Tableau 7 : Valeurs SF2 pour la lignée J3T, exposée à différentes doses de NTC 155
Tableau 8 : MID de la lignée J3T exposée ou non à une dose de 50µg/ml de NTC 156
Tableau 9 : MID de la lignée J3T exposée ou non à 1 et 5µg/ml de NTC 157

Résumé de thèse français

Mots clés : nanotube, glioblastome, modèle canin, radiothérapie

Les gliomes représentent les tumeurs primaires les plus fréquentes du système nerveux central avec le pronostic le plus mauvais, malgré une prise en charge précoce associée à un traitement agressif et multimodal. De nouvelles thérapies sont donc à l'étude afin d'améliorer la médiane de survie des patients. Parmi ces pistes de recherche, l'optimisation de la radiothérapie (RT) du glioblastome (GBM) est un enjeu majeur. Dans ce contexte, l'utilisation de nanotubes de carbone (NTC) est prometteuse : en plus d'être potentiellement radio-sensibilisants, les NTC contenant du gadolinium (Gd) peuvent aider à mieux délimiter le volume cible tumoral en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Contrairement au modèle d'étude actuel qu'est la souris avec un certain nombre de limites, le chien est un modèle particulièrement adapté car il peut spontanément développer un GBM d'une taille suffisante pour utiliser le même matériel de RT et d'imagerie qu'en médecine humaine, facilitant ainsi la transposition directe des méthodes.

Cette étude vise donc à valider la pertinence de modèles cellulaires de GBM canins en radio-oncologie comparée en caractérisant 5 lignées cellulaires de gliome canin et à évaluer la capacité des NTC à radio-sensibiliser des lignées de GBM canins.

L'étude de ces 5 lignées cellulaires canines a montré de nombreuses analogies entre le chien et l'homme. La morphologie des cellules est identique, de même que le temps de doublement, le test de clonalité et le caryotype. L'étude immunohistochimique des protéines de surface, sur les lignées cellulaires et après injection stéréotaxique sur des souris révèle aussi une similarité étroite. Les cellules gliales canines et humaines ont un profil de radiosensibilité similaire. La pénétration des NTC au sein des cellules tumorales a pu être mis en évidence à l'aide de la microscopie bi-photonique. Des études complémentaires sont nécessaires pour démontrer un effet radiosensibilisant des NTC. L'excitation laser des NTC lors de l'observation au microscope bi-photonique a montré un effet photothermique intéressant qui pourrait être approfondies au cours d'études ultérieures.

Le modèle canin et les nanotubes de carbone ont fourni des résultats intéressants, qui en font des éléments d'intérêt dans l'étude des gliomes.

Thesis Summary

Keywords: nanotube, glioblastoma, canine model, radiation therapy

Despite several aggressive and multimodal treatments, gliomas represent the most frequent brain tumor with the worst prognostic associated. In order to enhance median survival, researchers are looking for optimization of radiotherapy (RT) for glioblastoma (GBM). In this context, the use of carbon nanotubes (CNTs) is promising: in addition to being potentially radio-sensitizing, CNTs containing gadolinium (Gd) can help to better define the tumor target volume in Magnetic Resonance Imaging (MRI). Unlike the current study model of the mouse with its number of limitations, dog is a particularly suitable model because it can spontaneously develop a GBM of sufficient size to use the same RT and imaging equipment as in human medicine, facilitating thus the direct transposition of methods.

This study therefore aims to validate the relevance of cell models of canine GBM in comparative radiation oncology by characterizing 5 cell lines of canine glioma and to assess the capacity of CNTs to radio-sensitize canine GBM lines.

Study of these 5 canine cell lines shows numerous analogies between dogs and humans. Cell morphology is identical, such as doubling time, clonality test and karyotype. Immunohistochemical study of surface proteins, directly on cell lines and after stereotaxic injection in mice also reveals close similarity. Radiosensitivity profile of glial cells between human and dog is alike. CNT penetration into tumor cells is demonstrated using two-photon microscopy. Therefore, further studies are needed to demonstrate a radiosensitizing effect of CNTs. Laser excitation of CNTs with bi-photon microscope showed an interesting photothermal effect which could be further explored in further studies.

The canine model and carbon nanotubes have provided interesting results which are elements of interest in the study of gliomas.

Introduction

Parmi les principales causes de décès en France, le cancer est la première chez l'homme et la seconde chez la femme sur la période de 2005 à 2009. Il correspond à un développement anarchique d'un certain type de cellules, échappant aux différents mécanismes de régulation, moléculaires et cellulaires, dont les conséquences mettent la vie du patient en danger. Malgré les recherches actuelles permettant une meilleure compréhension de la tumorigenèse ainsi que des mécanismes de développement, le cancer reste le mal premier du XXI^{ème} siècle. En effet, la France a compté plus de 382 000 nouveaux cas au cours de l'année 2018 (*Les cancers en France - Edition 2015 - Institut National Du Cancer* 2016), un chiffre qui peut s'expliquer par le vieillissement de la population ainsi que par l'amélioration des outils diagnostiques et des politiques préventives mises en place en France et à travers le monde. Certains cancers présentent une forte prévalence et pourtant leur taux de guérison est élevé, c'est le cas notamment des cancers du poumon, du sein et du côlon. A l'inverse, certains présentent des taux de mortalité bien plus élevés malgré une plus faible prévalence.

Parmi ces derniers, les tumeurs issues des cellules gliales - les gliomes – sont associées à un pronostic sombre. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) permet de distinguer les gliomes selon le type de cellules initiatrices (astrocyte, oligodendrocyte, épendymocyte) et de grader chaque gliome selon son degré de malignité. Cette classification a récemment été mise à jour afin de prendre en considération des données moléculaires apportant des informations pronostiques et permettant d'orienter la décision thérapeutique. C'est notamment le cas du sous-groupe des gliomes diffus qui rassemble des astrocytomes et des oligodendrogliomes particulièrement invasifs (Louis et al. 2016). La prise en charge thérapeutique des gliomes diffus repose sur une exérèse chirurgicale lorsqu'elle est possible, suivie d'une radiothérapie (RT) associée à du témozolomide (TMZ) pour les hauts-grades (grades III et IV), ou l'une de ces modalités thérapeutiques pour les grades II. Malgré une approche multimodale dans le traitement des gliomes diffus, les récidives sont nombreuses et la médiane de survie est faible : pour le glioblastome (GBM), astrocytome de grade IV, elle varie de 12 à 21 mois selon les études (Alifieris, Trafalis

2015; Gilbert et al. 2014; Weller et al. 2017). Une des explications à cet échec repose sur l'apparition d'une chimiorésistance et d'une radiorésistance précoce des cellules cancéreuses (Dean, Fojo, Bates 2005). Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la résistance aux radiations ionisantes (RI) et aux agents chimiothérapeutiques est donc un prérequis indispensable à la proposition de traitements plus efficaces aux patients souffrant de gliomes diffus.

L'étude des mécanismes de résistance cellulaire aux traitements repose sur des travaux réalisés *in vitro* sur lignées cellulaires tumorales et *in vivo* sur modèle animal reproduisant la pathologie humaine. Actuellement, le modèle murin est le modèle le plus utilisé (Stylli et al. 2015), alors qu'il présente de nombreux inconvénients. En effet, les tumeurs chez la souris sont induites et des injections stéréotaxiques sont nécessaires afin d'étudier le développement tumoral intracérébral. De plus, les souris utilisées pour la recherche sont des souris immunodéficientes ; l'interaction entre le système immunitaire et le développement tumoral ne peut donc pas être pris en compte dans les études actuelles. Enfin, le modèle murin ne permet pas d'utiliser certains outils diagnostiques et thérapeutiques utilisés chez l'Homme tels que l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou la chirurgie stéréotaxique. A l'inverse, le chien apparait comme un modèle animal plus intéressant pour l'étude des gliomes diffus car il peut spontanément développer ces tumeurs avec une prévalence similaire à celle rapportée chez l'Homme (R.B. Song et al. 2013). Outre les avantages inhérents au modèle spontané (immunocompétence, diversité clonale, similarité des mécanismes oncogéniques avec la pathologie humaine), le chien présente un avantage anatomique majeur par rapport au modèle murin : la grande taille de son encéphale permet d'utiliser les mêmes outils d'imagerie et de RT que ceux utilisés pour le patient humain. Le modèle canin semble donc être plus pertinent que le modèle murin pour l'étude des gliomes diffus de l'Homme (Candolfi et al. 2007). Cependant, avant de pouvoir l'utiliser comme modèle d'étude dans un contexte de recherche en radio-oncologie comparative, il est indispensable de démontrer la similarité de réponse à la RT entre gliomes canins et humains. Cette caractérisation de la réponse tumorale radio-induite devra se faire dans un premier temps sur différentes lignées cellulaires de gliomes canins préalablement caractérisées.

Face aux limites actuelles dans la détection des gliomes diffus et leur traitement, de nouvelles stratégies sont actuellement étudiées pour optimiser l'efficacité des RI. Dans ce contexte, l'essor des nanoparticules représente une option diagnostique et thérapeutique particulièrement intéressante. En effet, l'approche nanotechnologique a été théorisée dès 1950 par Richard P. Feynman et l'emploi des nanoparticules trouve des applications dans de nombreuses branches de la médecine en tant que biocapteurs à des fins diagnostiques ou en tant que médicaments, vaccins et véhicules géniques dans le traitement du cancer (Krukemeyer 2015). Parmi ces nanoparticules, les nanotubes de carbone (NTC) font l'objet d'une attention particulière dans de nombreuses équipes de recherche. Découverts, par Iijima, en 1991 lors de la synthèse de fullerènes, les NTC sont des structures tubulaires de taille nanométrique, constituées d'une ou plusieurs couches de graphène, enroulées sous forme de cylindre (Iijima 1991). Ces différents NTC ont des propriétés intrinsèques, utiles dans de nombreuses applications médicales. La taille de ces nanotubes, ainsi que leur caractère hydrophobe leur permettent de traverser la membrane plasmique, par transcytose ou par endocytose (Jin, Heller, Strano 2008). Ils vont ainsi être internalisés par la cellule et peuvent interagir avec les différents constituants cellulaires. Outre ces propriétés intrinsèques, les nanotubes de carbone peuvent être fonctionnalisés : des groupes de molécules très variés peuvent ainsi être ajoutés à leur surface afin de leur apporter des propriétés supplémentaires ou de modifier leurs propriétés intrisèques telles que leur solubilité, leur ciblage cellulaire ou leur capacité à être détectées en imagerie médicale. Ces liaisons avec le NTC peuvent être covalentes, à savoir durable et forte, ou elle peut être non-covalente, et le groupe fonctionnel pourra se détacher du nanotube à la faveur d'une variation de pH, de température ou d'une coupure enzymatique. Ainsi, cette réversibilité de la fonctionnalisation non-covalente est une voie intéressante pour la délivrance de médicaments au sein des cellules cibles. Enfin, les nanotubes de carbone (NTC) sont particulièrement intéressants car ils pénètrent très facilement dans les cellules tumorales (Neves et al. 2012), entraînent une augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire et la modulation de l'autophagie (Fiorito et al. 2014)**.** Ces derniers arguments, qui s'ajoutent à la mise en évidence de la production de radicaux oxygénés par les cellules au contact des NTC (Meunier et al. 2012)**,** laissent supposer que ceux-ci peuvent radiosensibiliser les cellules tumorales.

Dans un contexte de recherche translationnelle, le chien atteint de gliomes diffus représente un modèle d'étude pertinent qui pourrait être utilisé dans un futur proche pour des études précliniques visant à évaluer l'efficacité de stratégies thérapeutiques innovantes telles que l'association des NTC à la RT. La mise en place de telles études précliniques chez le chien nécessite dans un premier temps d'évaluer *in vitro,* sur lignées cellulaires de gliome canin préalablement caractérisées, l'efficacité anti-tumorale de la RT, et la capacité des NTC à les radiosensibiliser.

Ainsi ce projet de thèse universitaire a pour buts de :

(i) Réaliser la caractérisation phénotypique et génotypique de différentes lignées cellulaires de gliome canin de haut-grade de malignité,

(ii) Caractériser la réponse radio-induite de ces lignées cellulaires,

(iii) Évaluer l'efficacité des NTC à radiosensibiliser ces différentes lignées de gliome canins

Dans une première partie, une revue de la littérature visant à détailler les différents éléments nécessaires à la compréhension du sujet sera réalisée. Une approche générale du gliome chez l'Homme, mais aussi chez le chien sera faite afin de mieux comprendre cette entité pathologique. Puis nous présenterons l'intérêt des NTC dans le traitement du cancer, en abordant leur structure, leur synthèse, leur fonctionnalisation, ainsi que les outils permettant de les caractériser, et de les détecter *in vivo*.

Dans une deuxième partie, nous présenterons dans un premier temps, les résultats concernant la caractérisation complète de lignées de gliome canin de haut-grade, puis nous aborderons les résultats sur la capacité des nanotubes de carbone à radiosensibiliser ces gliomes canins.

I. Étude bibliographique

A. Les gliomes diffus

1. Définition histopathologique

a) Les cellules de la glie

Les gliomes correspondent aux tumeurs du Système Nerveux Central (SNC) issues des cellules gliales. Ce type cellulaire a longtemps été considéré comme un simple support du tissu nerveux en permettant le maintien de son architecture et de sa stabilité (Louis et al. 2007). La découverte des différents types de cellules gliales a montré que ce tissu joue un rôle bien plus important au sein du SNC. Ainsi, on distingue deux grands types cellulaires (Dimou, Gotz 2014) (figure 1):

- La microglie dont les cellules forment le système immunitaire inné du SNC et sont capables de phagocytose. Elle est au contact des neurones et peut supprimer les synapses défaillantes. On parle de *synaptic stripping* (Kettenmann 2013).
- La macroglie se compose de différents sous-types cellulaires :
    - Les astrocytes permettent le maintien de l'homéostasie métabolique et ionique au sein du cerveau. Par ailleurs, ceux-ci interviennent dans la communication neuronale au niveau de la synapse, mais aussi dans la cicatrisation lors d'atteinte du SNC.
    - Les oligodendrocytes sont les cellules gliales myélinisantes du SNC.
    - Les épendymocytes sont à l'interface entre le SNC et le Liquide Cérébro-Spinal (LCS).
    - Les cellules gliales NG2 ont été découvertes à l'aide d'anticorps NG2, spécifiques du protéoglycane chondroïtine sulfate de type 4. Elles forment un réseau péri-neuronal, permettent de stabiliser la synapse et sont distribuées dans l'ensemble du cerveau adulte. Elles interviennent dans la cicatrisation du tissu nerveux et peuvent se différencier en d'autres types cellulaires, tels que des oligodendrocytes.

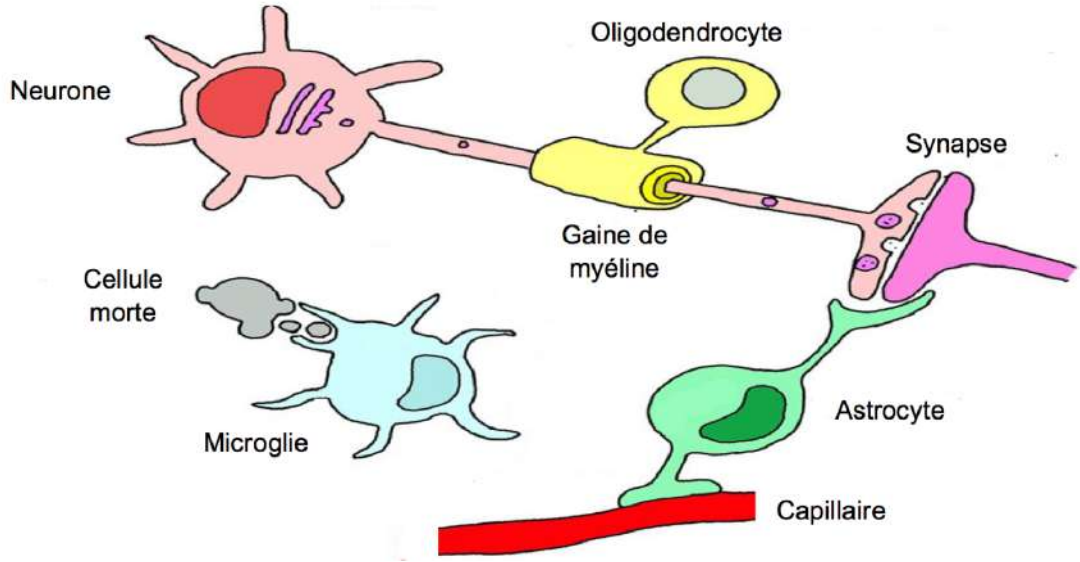


Figure 1 : *Schéma de l'organisation des cellules gliales (d'après Jansen 2014).*
Les astrocytes soutiennent le réseau neuronal et interviennent dans la nutrition des neurones et la communication synaptique. Les oligodendrocytes forment des gaines de myéline autour des axones dans le SNC. La microglie participe à la défense du SNC et possède la capacité de phagocyter les débris cellulaires.

b) Classification des gliomes selon l'OMS

La classification des tumeurs cérébrales, éditée par l'OMS, n'a cessé d'être enrichie avec de nouvelles données, consécutives à l'avancée des recherches scientifiques. La première classification, qui date de 1979, différenciait les tumeurs selon leur type histologique. Ainsi, la principale dichotomie se fait entre les cellules astrocytaires, épendymaires et oligodendrogliales. La seconde classification de 1993 apporte des informations supplémentaires *via* l'analyse immunohistochimique des différents types cellulaires (Kleihues, Burger, Scheithauer 1993). La troisième classification fournit les profils génétiques des cellules afin d'affiner la description des tumeurs cérébrales. Par ailleurs, cette nomenclature fait référence pour la première fois à l'épidémiologie, les symptômes ainsi que le pronostic pour chaque entité clinique (Kleihues et al. 2002). La classification de 2007 s'appuie sur les travaux précédents et fournit de nouvelles informations pronostiques sur les tumeurs. Les différents types histologiques de gliomes et le grade OMS associé sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau 1 : *Classification des différents types tumoraux (d'après la classification OMS 2007)*

Type	Sous-type	Grade			
		I	II	III	IV
Astrocytomes	Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes	x			
	Astrocytome pilocytique	x			
	Astrocytome pilomyxoïde		x		
	Astrocytome diffus		x		
	Xanthoastrocytome pléomorphique		x		
	Astrocytome anaplasique			x	
	Glioblastome				x
	Glioblastome à cellules géantes				x
	Gliosarcome				x
Oligodendrogliomes	Oligodendrogliome		x		
	Oligodendrogliome anaplasique			x	
Oligoastrocytomes	Oligoastrocytome		x		
	Oligoastrocytome anaplasique			x	
Ependymomes	Subependymome	x			
	Ependymome myxopapillaire	x			
	Ependymome		x		
	Ependymome anaplasique			x	

Parmi les tumeurs présentées dans le tableau 1, certaines sont particulièrement infiltrantes, difficiles à réséquer et posent des problèmes de récidive locale : elles sont alors désignées de manière usuelle sous le terme de « gliomes diffus ». Elles correspondent aux astrocytomes diffus, anaplasiques et de grade IV ainsi que les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade II et III.

La cinquième classification OMS de Juillet 2016 apporte une modification considérable à celle de 2007. En effet, les paramètres génétiques sont pris en compte dans l'établissement du diagnostic, mais aussi du pronostic des tumeurs. Ainsi, la classification repose sur le diagnostic histologique en premier lieu, qui est ensuite complété par le diagnostic génétique lorsque celui-ci est possible. L'apport des données génétiques est responsable d'une restructuration de certains types tumoraux (Tableau 2). L'un des exemples les plus marquants de cette restructuration concerne le groupe des gliomes diffus qui devient alors une entité à part entière, pour laquelle

certains marqueurs moléculaires ont une valeur pronostique (mutations des gènes - *IDH1* et *IDH2)* et d'autres ont une valeur diagnostique telles que la mutation du gène *ATRX* fortement associée aux astrocytomes et la codélétion 1p/19q associée aux oligodendrogliomes. Le gène *IDH* code l'enzyme de même nom (Isocrate déshydrogénase) qui est responsable de la transformation de l'isocitrate en a-kétoglutarate lors du cycle des acides tricarboxyliques. Sa mutation entraîne la production d'une nouvelle molécule, le D-2-HG (D-2-Hydroxyglutarate), dont la concentration importante entraîne des modifications épigénétiques et une hyperméthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les patients atteints de gliomes avec une mutation IDH présente une médiane de survie plus élevée par rapport à ceux avec un profil IDH « sauvage » (Dunn, Andronesi, Cahill 2013). La codélétion 1p/19q est un marqueur fortement associé au diagnostic d'oligodendrogliome et représente aussi un facteur pronostic favorable (Nikiforova, Hamilton 2011). Ainsi, la classification des gliomes diffus repose dans un premier temps sur une différenciation histologique, puis dans un second temps sur la caractérisation de différents marqueurs pronostiques dont le statut IDH (Figure 2).

La grande majorité des GBM (90%) se développent rapidement *de novo* chez les patients âgés, sans évidence clinique ou histologique d'une lésion précurseur moins maligne : ce sont les GBM primaire. Les GBM secondaires évoluent à partir d'un astrocytome diffus de bas grade ou d'un astrocytome anaplasique. Ils se manifestent chez les patients plus jeunes, présentent un moindre degré de nécrose, sont préférentiellement situés dans le lobe frontal et portent un pronostic nettement meilleur. D'un point de vue histologique, les GBM primaires et secondaires sont indiscernables. Cependant, leurs profils génétiques et épigénétiques permettent de les différencier. En effet, les GBM secondaires présentent une mutation du gène *IDH1* chez la majorité des patients, avec une profil génétique hyperméthylé, tandis que chez les patients atteints de GBM primaire, le gène IDH1 est non muté (Ohgaki, Kleihues 2012)

Tableau 2 : *Nouvelle classification des gliomes, d'après la classification OMS 2016 (Louis et al., 2016)*

Type	Sous-type	Grade			
		I	II	III	IV
Tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales diffuses	Astrocytome diffus, IDH-mutant		x		
	Astrocytome diffus, IDH-sauvage		x		
	Astrocytome diffus, NOS		x		
	Astrocytome anaplasique, IDH-mutant			x	
	Astrocytome anaplasique, IDH-sauvage			x	
	Astrocytome anaplasique, NOS			x	
	Glioblastome, IDH-mutant				x
	Glioblastome, IDH-sauvage				x
	Glioblastome, NOS				x
	Gliome diffus de la ligne médiane, H3K27M-mutant				x
	Oligodendrogliome, IDH-mutant et 1p/19q codélété		x		
	Oligodendrogliome, NOS		x		
	Oligodendrogliome anaplasique, IDH-mutant et 1p/19q codélété			x	
	Oligodendrogliome anaplasique, NOS			x	
	Oligoastrocytome, NOS		x		
	Oligoastrocytome anaplasique, NOS			x	
Autres tumeurs astrocytaires	Astrocytome pilocytique	x			
	Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes	x			
	Xanthoastrocytome pléomorphique		x		
	Xanthoastrocytome pléomorphique anaplasique			x	
Ependymomes	Subépendymome	x			
	Ependymome myxopapillaire	x			
	Ependymome		x		
	Ependymome, *RELA fusion-positive*		x	x	
	Ependymome anaplasique			x	
Autres gliomes	Gliome angiocentrique	x			
	Gliome choroïde du 3ème ventricule		x		

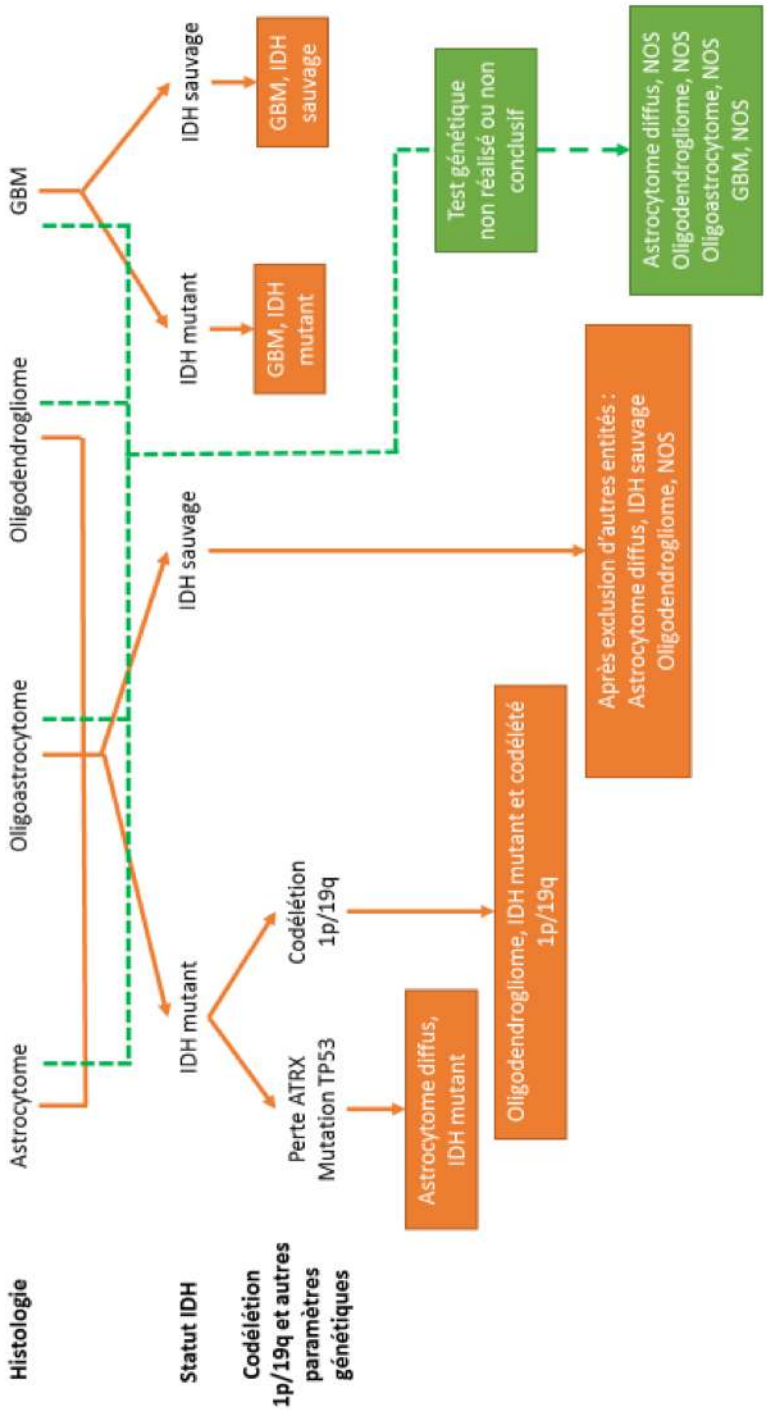


Figure 2 : *Classification simplifiée des gliomes diffus, d'après la classification OMS 2016.*
Le terme NOS (Not Otherwise Specified) ne représente pas un groupe tumoral spécifique : il désigne les tumeurs dont les tests génétiques n'ont pas été réalisés, n'ont pas été faits intégralement ou n'ont pas montré d'altérations génétiques diagnostiques. Une classification NOS regroupe ainsi des types tumoraux dont les critères pathologiques, cliniques et génétiques sont incomplets et nécessitent des études complémentaires (Louis et al., 2016

2. Épidémiologie

a) Incidence

Les gliomes représentent 75% des tumeurs malignes du SNC (Figure 3). Leur taux d'incidence, tous confondus, varie de 4.67 à 5.73 pour 100 000 personnes. Le GBM est le gliome ayant le taux d'incidence le plus élevé puisqu'il varie entre 0.59 et 3.69 pour 100 000 personnes selon différentes études. Celui-ci est également associé aux taux de survie à 5 ans les plus faibles. L'incidence pour les astrocytomes anaplasiques et le GBM augmente avec l'âge, et le groupe des 75-84 ans est le plus atteint. Ainsi, chez les personnes de plus de 40 ans, le taux d'incidence annuel ajusté à l'âge est de 6,8/100 000 (Leece et al. 2017). De manière générale, l'incidence des tumeurs astrocytaires est 40 à 50% plus élevée chez l'homme par rapport à la femme, tout âge confondu (Ostrom et al. 2019). À l'échelle mondiale, on peut noter des différences significatives d'incidence entre des différentes populations Ainsi, l'incidence des gliomes est quatre fois plus élevée dans les pays d'Europe du Nord ou d'Amérique du Nord (8,5/100 000) par rapport aux pays d'Asie de l'Est (1,9/100 000). Des différences d'ordre génétique, ethnique, culturel, environnemental sont à l'étude afin d'expliquer ces différences significatives (Molinaro et al. 2019). Cette variation d'incidence s'observe au sein même de pays comme les États-Unis, où de nombreux groupes raciaux sont représentés : l'incidence de gliome diffus chez l'adulte est la plus élevée chez les individus blancs non-hispaniques par rapport aux autres populations (hispaniques, noires, amérindiennes, …) (Bauchet, Ostrom 2019).

Bien que les gliomes puissent se développer dans l'ensemble de l'encéphale, on les retrouve préférentiellement dans le lobe frontal (26,5%), le lobe temporal (20,3%) et le lobe pariétal (11,6%). (Ostrom et al. 2019).

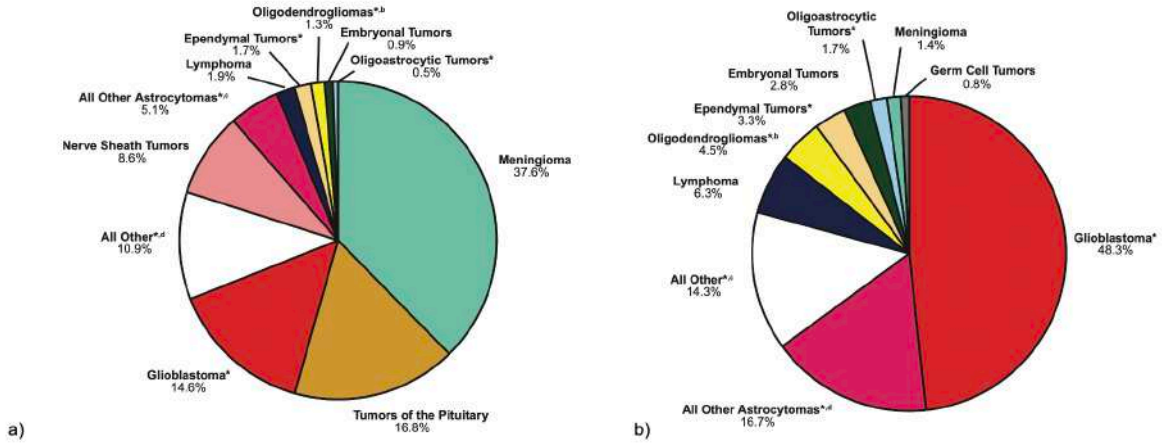


Figure 3 : *Tumeurs du SNC a) ensemble des tumeurs primitives b) tumeurs malignes du SNC (d'après (Ostrom et al. 2019).* Les gliomes représentent à elles seules approximativement 75% des tumeurs du SNC.

b) Facteurs de risque

À l'heure actuelle, un seul facteur a été identifié comme facteur de risque de développer un gliome diffus : l'exposition aux RI. Ceux-ci entraînent des lésions de l'ADN qui peuvent conduire à l'oncogenèse. Les conséquences de cette exposition sont dose-dépendantes et apparaissent des années après l'exposition. Ce facteur de risque a été largement étudié chez les survivants à la bombe atomique qui ont subi des expositions élevées aux RI. De même, les patients pédiatriques exposés aux RI pour des tumeurs primaires, ont un risque plus élevé de développer une tumeur du SNC secondaire au cours de leur vie (Braganza et al. 2012).

L'utilisation des téléphones mobiles est un sujet sensible quant aux risques que leur usage au quotidien représente pour notre cerveau. En effet, l'émission d'ondes radiofréquences (RF) par un mobile pourrait sur le long-terme avoir des effets néfastes sur le tissu nerveux. En 2011, l'agence du CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) a classé les ondes RF émises par les téléphones portables comme « peut-être cancérogènes pour l'Homme » (groupe 2B). De nombreuses études s'intéressent à ce sujet, bien qu'aucune n'apporte de réponses claires et précises. D'une part, certaines ne montrent pas d'augmentation de risque, sauf sur une période supérieure à 10 ans, lors d'utilisation du côté ipsilatéral (Hardell et al. 2007; Little et al. 2012). D'autre part, une étude française de 2015 fait référence à une augmentation du

risque de développer des méningiomes ou des gliomes, lors d'une utilisation chronique de portable. Une étude récente, en se basant sur les connaissances actuelles de la science sur ce sujet recommande à l'agence du CIRC de réévaluer la nocivité des ondes RF (Miller et al. 2019). Des études complémentaires de plus grande ampleur et sur le long terme sont nécessaires afin de clarifier l'impact des ondes RF émises par les téléphones portables sur le risque de développer des gliomes. D'autant plus que l'utilisation des téléphones portables est en constante évolution et l'exposition aux ondes RF touche de plus en plus les jeunes.

De nombreuses études épidémiologiques ont d'autre part montré que les patients qui ont un terrain allergique (allergie alimentaire, asthme, eczéma…) se verraient protéger face à de nombreux cancers dont les tumeurs du SNC : ainsi les patients allergiques auraient 30% en moins de risque de développer un gliome (Amirian et al. 2016). Les patients atteints de gliome ont des taux d'immunoglobuline E (IgE), marqueurs de l'allergie, inférieurs à la moyenne. L'expression du marqueur CD133, marqueur d'agressivité du GBM, est négativement corrélée à l'expression des gènes en lien avec l'allergie et l'inflammation (Schwartzbaum et al. 2010). L'une des hypothèses avancées de l'effet protecteur d'un état allergique pourrait s'expliquer par un système immunitaire inné plus réactif face à des antigènes. Les antigènes tumoraux seraient ainsi reconnus plus précocement et les cellules tumorales seraient ciblées par le système immunitaire.

Bien que la majorité des gliomes apparaissent de manière sporadique, sans lien avec les autres membres de la famille, il existe de rares syndromes héréditaires fortement associés au développement de gliomes. Ces syndromes sont responsables de moins de 5% de l'ensemble des gliomes. Il s'agit :

- Du syndrome Li-Fraumeni associé à une mutation du gène p53, qui prédispose au développement de nombreux cancers dont le GBM,
- De la neurofibromatose 1, liée à une mutation du gène NF1, qui entraine le développement de tumeurs cutanées mais aussi cérébrales.

Concernant le régime alimentaire, la consommation d'alcool ou de tabac, ou l'exposition à des pesticides, aucun n'a été reconnu comme facteur de risque dans le développement de tumeur du SNC.

3. Diagnostic

a) Clinique

Les signes cliniques sont les premiers éléments à orienter le diagnostic vers des troubles nerveux ; cependant, ces signes dépendent de la taille et de la vitesse de croissance de la tumeur, mais aussi de sa localisation (Young et al. 2015). L'œdème péri-tumoral peut comprimer le tissu cérébral et entrainer par la même occasion des signes cliniques très variables. Les patients atteints pourront présenter des migraines, des troubles de la vision, une anisocorie ou des nausées. Certains signes cliniques comme des troubles cognitifs, des changements de personnalité, une perte de conscience ou des troubles convulsifs viendront impacter la vie du patient. Les crises convulsives sont d'ailleurs le signe clinique le plus fréquent chez les personnes atteintes de gliome de haut ou de bas grade (Ruda et al. 2012).

Les commémoratifs, la vitesse d'apparition des symptômes, les facteurs de risques sont des éléments à prendre en considération dans l'évaluation clinique. Malheureusement, ces troubles peuvent s'observer avec d'autres entités cliniques que les gliomes; une hémorragie sub-arachnoïdienne ou un accident vasculaire cérébral ischémique sont à inclure dans le diagnostic différentiel (Singla et al. 2016). C'est pourquoi l'imagerie joue un rôle primordial dans le diagnostic des tumeurs cérébrales.

b) Radiologique

(1) Tomodensitométrie (TDM)

L'examen d'imagerie à réaliser en premier lieu est un examen de tomodensitométrie (TDM) du crâne. En effet, cet examen va permettre d'évaluer l'intégrité du parenchyme cérébral et de faire rapidement le différentiel entre une masse cérébrale et des lésions vasculaires. Il sera aussi recommandé chez les patients possédant des implants intégrés ou des dispositifs métalliques et pour lesquels un examen d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ne peut pas être réalisé. (Allen Perkins, Liu 2016). Le glioblastome apparaît comme une masse

hypodense, avec un centre nécrotique (Figure 4). Néanmoins, le TDM présente des limites de définition et l'IRM, une fois le diagnostic de masse tumorale établi, est l'outil d'imagerie de choix pour affiner le diagnostic.

Figure 4 : *Examen tomodensitométrique sans produit de contraste, d'un patient atteint de GBM. Présence d'une masse hypodense, créant un effet masse et comprimant le ventricule latéral (d'après Young et al, 2015*

(2) Modalités anatomiques et fonctionnelles de l'IRM

L'IRM, technique d'imagerie qui repose sur le principe de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), est l'outil d'imagerie de choix pour évaluer les anomalies affectant le corps humain, et particulièrement le cerveau. Au cours d'un examen IRM, différentes séquences sont réalisées (Figure 5). La séquence pondérée en T1 permet d'obtenir une image « anatomique » de l'encéphale : la substance blanche apparaît plus claire que la substance grise et le LCS apparaîtra plus sombre (Figure 5A). Lors de tumeur, le gadolinium (Gd), qui est un produit de contraste, est utilisé pour mieux visualiser le processus néoplasique. La séquence pondérée en T2 est une image en contraste de la séquence T1 : l'eau et l'œdème apparaissent en hyper signal. Le FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) correspond à une image T2 dont le signal de l'eau a été atténué : il permet de mettre en évidence l'œdème péri-tumoral. Ainsi, ces séquences sont couramment utilisées dans l'exploration des masses tumorales cérébrales : le GBM apparaît en séquence T1-Gadolinium comme une masse contrastée, avec un anneau hyperdense et un centre hypodense qui correspond à un centre nécrotique. Les marges de la tumeur sont peu distinctes du fait de l'œdème péri-tumoral et de la nature infiltrante des gliomes diffus (Young et al. 2015).

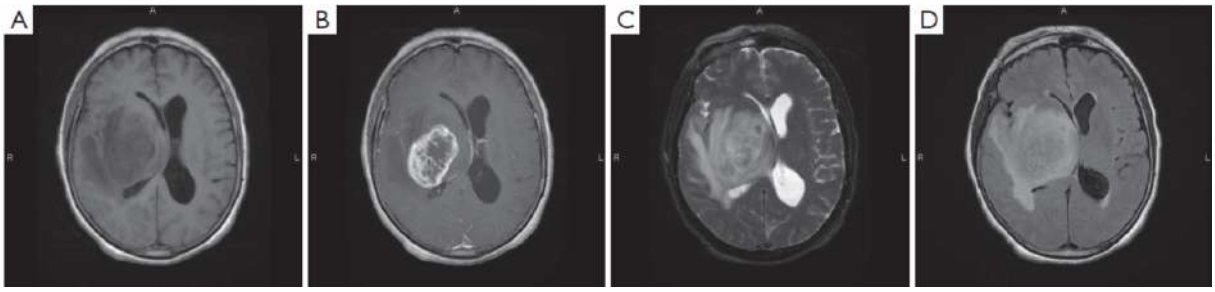


Figure 5 : *Images IRM obtenues chez un patient atteint de GBM.*

((A) Image pondérée en T1 sans produit de contraste montrant une masse tumorale comprimant le ventricule latéral droit. (B) Image pondérée en T1 avec injection de Gadolinium, montrant une masse sphérique avec une prise de contraste en anneau et un centre hypodense compatible avec un centre nécrotique. (C) Image pondérée en T2, montrant l'œdème péri-tumoral. (D) Image FLAIR montrant, comme le T2, l'œdème péri-tumoral (d'après Young et al, 2015)

Cette première partie de l'examen IRM permet l'évaluation de l'extension de la tumeur, sa localisation et la faisabilité de son exérèse chirurgicale. De plus, l'obtention d'une image 3D de haute résolution permet l'utilisation d'un cadre stéréotaxique avec les données cartésiennes afin de réaliser une biopsie à l'aiguille fine de la tumeur (Figure 6).

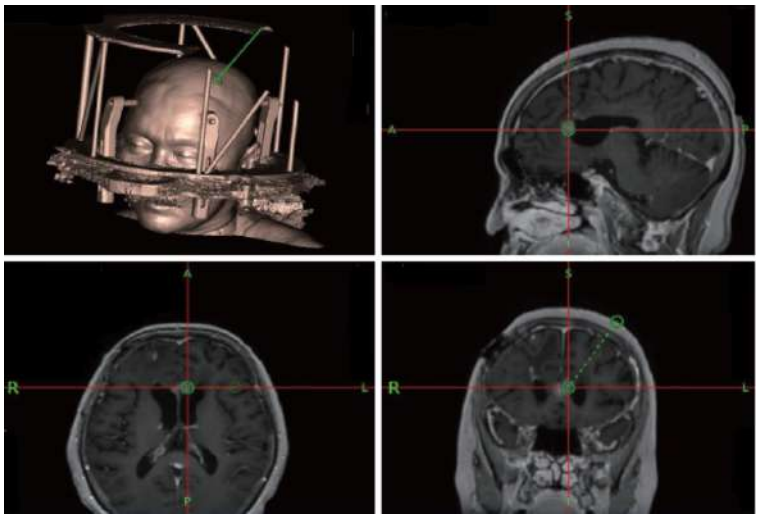


Figure 6 : *Représentation d'un cadre stéréotaxique et mise en évidence de la trajectoire de la biopsie. Présentation de 3 coupes du crâne : sagittale(en haut à droite), axiale (en bas à gauche) et coronale (en bas à droite) et de la trajectoire (en vert) de la biopsie. (Young et al., 2015)*

Afin de préciser le diagnostic et fournir des informations supplémentaires en vue de la chirurgie, d'autres techniques d'IRM peuvent être réalisées. La DTI (*Diffusion Tensor Imaging*) ou IRM du tenseur de diffusion, permet d'évaluer pour chaque molécule d'eau sa position et sa direction, sachant que celle-ci est influencée par la matière qui l'entoure. Or, l'organisation de la substance blanche, constituée de gaines de myéline entourant les axones et disposées de manière parallèle, facilite le

mouvement de l'eau le long de ces axes. Ainsi, indirectement, la DTI permet de mettre en évidence la trajectoire des fibres nerveuses et d'observer la connectivité cérébrale. Le développement d'une masse tumorale peut modifier la trajectoire des fibres et expliquer ainsi certains troubles (Figure 7) (Jellison et al. 2004). Le chirurgien doit connaître avec précision le trajet des fibres, afin d'éviter leur résection lors de l'exérèse chirurgicale large. L'IRMf (IRM fonctionnelle) peut être utilisée en association avec la DTI. Cette technique permet d'évaluer indirectement l'activité cérébrale, et de définir les aires du cerveau responsables des fonctions principales (les aires de Broca et Wernicke, responsables de la parole, aires motrices, …). Lorsqu'une zone du cerveau est activée, l'afflux de sang augmente et des variations hémodynamiques sont enregistrées. On mesure ainsi l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependent), liée à la différence d'aimantation entre l'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine.

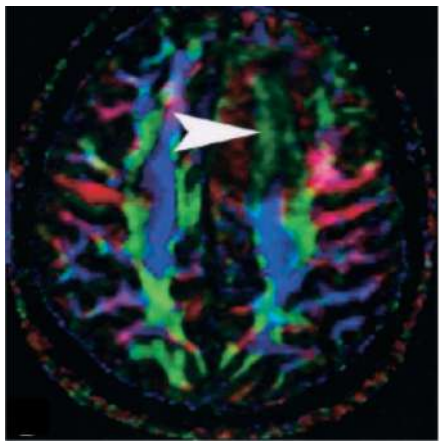


Figure 7 : *Imagerie du tenseur de diffusion réalisée chez un patient souffrant d'un astrocytome. La masse tumorale (indiquée par la pointe de flèche) modifie le trajet des fibres de substance blanche (Wolbers et al., 2014).*

La spectroscopie ou ISRM (Imagerie de Spectroscopie par Résonance Magnétique) est une technique d'imagerie non-invasive qui permet d'évaluer le métabolisme au sein d'un tissu. Elle se base sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Ainsi, chaque molécule aura une signature spécifique, en fonction des différents atomes qui la compose. La choline (Cho), le lactate, les lipides, la créatinine et le N-acétylaspartate (NAA) sont des métabolites couramment observés au sein du tissu nerveux sain et tumoral, dans des proportions spécifiques (Deviers et al. 2014). Par exemple, le lactate est le signe d'un métabolisme anaérobique observé au sein d'une tumeur (Caivano et al. 2013) (Figure 8). Par ailleurs, l'augmentation de

la choline et la diminution du pic de NAA sont associées à des critères de malignité : un ratio Cho/NAA>2 est en faveur de tumeurs malignes (Muruganandham et al. 2014).

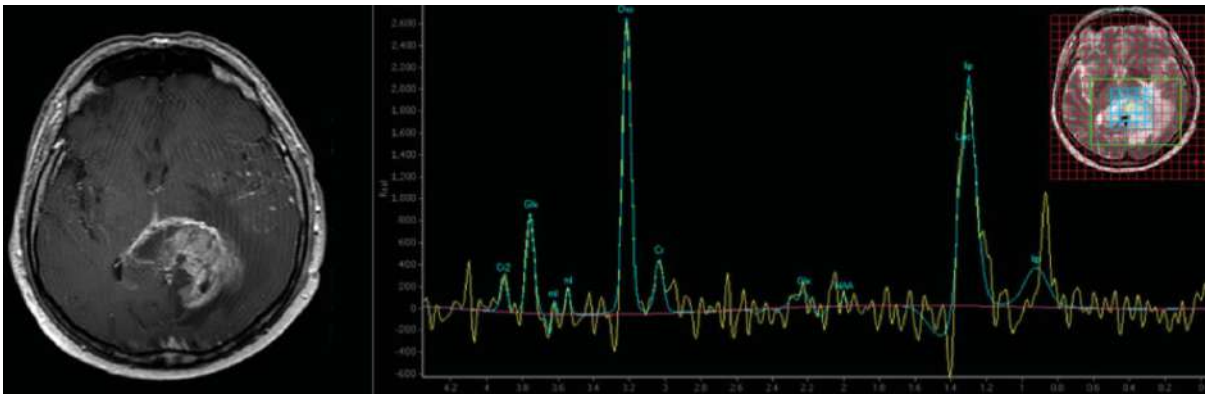


Figure 8 : *Imagerie de Spectroscopie par Résonance Magnétique réalisée chez un patient atteint de GBM. On observe un rapport Cho/Cr >2, un pic NAA diminué et un pic en lactate dans la région d'intérêt (Young et al., 2015)*

Ces modalités d'imagerie sont essentielles dans l'établissement du diagnostic de gliome mais aussi dans le suivi du patient, suite à son traitement multimodal. En effet, des IRM de suivi sont recommandées pour évaluer la réponse au traitement. De manière générale, l'évaluation de la réponse au traitement repose sur l'analyse d'images pondérées en T1 avec injection de Gadolinium. Cependant, on peut observer chez près de 50% des patients, une augmentation de la prise de contraste qui n'est pas liée à une progression tumorale, mais à une pseudo-progression, qui correspond à des modifications cellulaires induites par le traitement (Fink, Born, Chamberlain 2011). En effet, une étude méta-analytique a montré que l'IRM anatomique avec injection de produit de contraste a une sensibilité (68%) et une spécificité (77%) faibles pour distinguer la pseudo-progression d'une réelle progression ou résurgence tumorale. Cette évaluation ne peut pas être automatisée et sa sensibilité est dépendante de l'opérateur. La spectroscopie présente une sensibilité de 91% et une spécificité de 95% ce qui en fait la technique la plus précise pour évaluer de la réponse tumorale au traitement. Cependant, cette technique nécessite des temps d'acquisitions plus long du fait de la faible concentration des métabolites analysés. D'autres modalités IRM, telles que l'IRM de diffusion ou l'IRM de perfusion peuvent aussi être utilisés, en complément des méthodes citées ci-dessus (van Dijken et al. 2017)

(3) La tomographie à émission de positons (TEP)

Cette modalité d'imagerie permet d'identifier une activité métabolique au sein d'un tissu à partir des positons émis par un traceur radioactif, injecté au préalable. L'un des marqueurs les plus couramment utilisés est le ^{18}F-FDG (fluorodésoxyglucose marqué au ^{18}F) : ce glucose modifié est absorbé par les cellules, mais ne peut être métabolisé. Il va donc s'accumuler dans les cellules, de façon proportionnelle à leur consommation. Les cellules cancéreuses, hautement consommatrices de glucose vont donc être fortement marquées. Bien que les cellules du cerveau aient une demande importante en glucose, les cellules tumorales seront renforcées sur les images. De nombreux autres marqueurs sont à l'étude afin d'augmenter leurs spécificités vis-à-vis des différentes tumeurs. Une étude chinoise publiée en Avril 2016 évaluait la capacité du marqueur ^{18}F-RGD à caractériser la réponse précoce du GBM au traitement de radiochimiothérapie standard (Zhang et al. 2016). Le motif RDG (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) se fixe spécifiquement sur le récepteur intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui est exprimé par les cellules tumorales et qui permet l'expression et le maintien de l'angiogenèse tumorale. Cette molécule permet de visualiser les lésions du GBM et de prédire la réaction tumorale dès 3 semaines après la mise en place du traitement multimodal, comme on peut le noter sur la Figure 9.

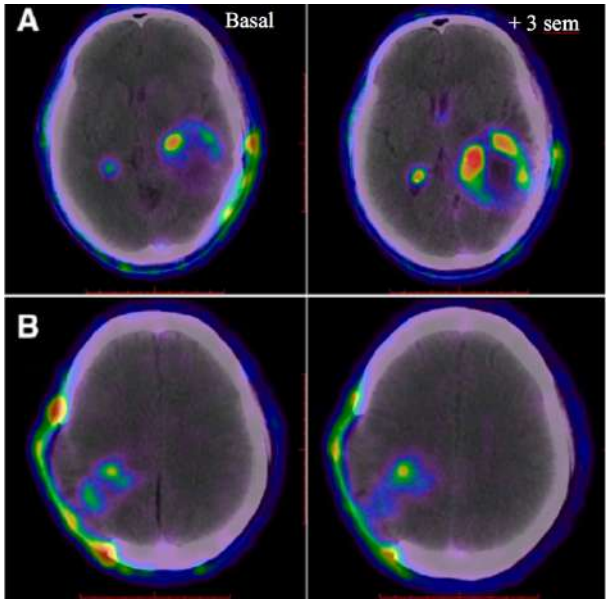


Figure 9 : *TEP et IRM associées, de deux patients atteints de GBM au début de leur traitement (Basal) et 3 semaines plus tard (+ 3 sem).*
Le patient A est un patient dont la tumeur est résistante tandis que pour le patient B, le volume tumoral est en régression par rapport à l'image de base établie avant l'initiation du traitement (d'après Zhang et al., 2016)

c) *Anatomopathologique*

L'une des dernières étapes dans l'établissement d'un diagnostic de certitude est la réalisation d'une biopsie pour examen anatomopathologique. A la microscopie, la morphologie des cellules et les critères de malignité tels que l'infiltration, les atypies cytonucléaires, l'index mitotique et la présence de néo-capillaires peuvent être observés afin d'établir un diagnostic lésionnel qui pourra être complété par des analyses immunohistochimiques et la recherche de marqueurs génétiques (mutation *ATRx* et codélétion 1p19q, cf. *ante*).

De récentes études ont montré l'intérêt d'utiliser l'ISRM pour guider la biopsie. Une étude américaine publiée en Juin 2016 a corrélé les voxels anormaux en ISRM (i.e. avec un ratio Cho/NAA élevé) aux lames histologiques obtenues après biopsie. Les régions présentant un ratio Cho/NAA anormal montrent aussi des anomalies histologiques et immunohistochimiques (Figure 10). Un panel de marqueurs a été évalué dont IDH, SOX2, p53, Ki67, EGFR, Olig2, GFAP… Par ailleurs, cette étude montre qu'un ratio Cho/NAA anormal au sein d'un tissu qui apparaît « sain » à l'IRM indique les zones d'infiltration tumorale (Cordova et al., 2016).

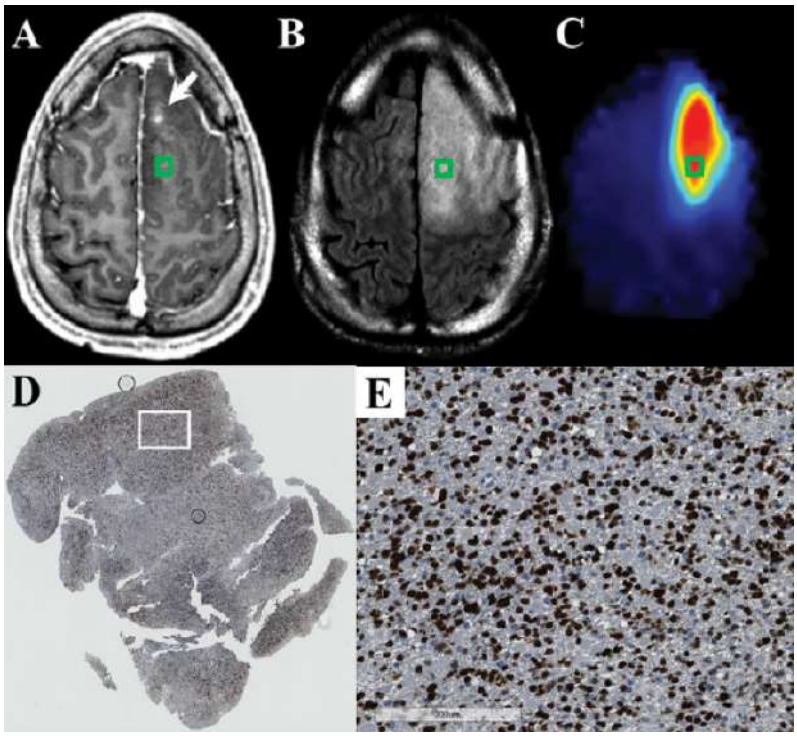


Figure 10 : *Corrélation entre un ratio Cho/NAA élevé et la surexpression de SOX-2. (A-C) Image pondérée en T1, image FLAIR et imagerie de spectroscopie par résonance magnétique d'un patient atteint d'un astrocytome anaplasique. (D-E) Immunohistochimie du tissu prélevé dans la région d'intérêt (i.e. carré vert présent sur les images précédentes) montrant une surexpression de la protéine SOX2 (d'après Cordova et al., 2016)*

d) *Biomarqueurs circulants*

Afin d'obtenir des diagnostics plus précoces et ainsi améliorer le taux de survie des patients en permettant une prise en charge plus précoce, des équipes de recherche s'intéressent aux biomarqueurs circulants. Ceux-ci sont détectables dans des échantillons du patient tels que des biopsies, mais aussi des échantillons de sang, d'urine ou de LCS. Bien que leurs concentrations soient infimes, elles peuvent être détectées à l'aide de technique protéomique et d'analyse moléculaire de pointe telles que la spectrométrie de masse ou la *droplet digital PCR (*ddPCR).

Parmi ces biomarqueurs circulants, on peut détecter des microARN (miARN) : ce sont des fragments d'ARN non codant de 20 à 22 nucléotides de longueur, qui modulent spécifiquement l'expression des gènes en dégradant l'ARN messager (ARNm) correspondant ou en empêchant sa traduction en bloquant son accès aux ribosomes. Ces miARN se retrouvent dans des conditions physiologiques mais aussi dans de nombreux processus tumoraux, dont les gliomes. Certains miARN (miR-21, miR-181d) sont impliqués dans l'altération de l'expression génique de PT53, favorisant la progression tumorale (Jesionek-Kupnicka et al. 2019).

Lors du développement tumoral et grâce à leur fort pouvoir invasif, certaines cellules tumorales peuvent franchir la barrière hémato-méningée et se retrouver dans la circulation générale ou le LCS. Elles peuvent alors être détectées et analysées par des techniques de sélection cellulaires basées sur l'immunofluorescence (MacArthur et al. 2014). Bien que ces cellules ne soient pas représentatives de la tumeur, leur analyse génétique, à partir d'un prélèvement de sang, permet de fournir des données diagnostiques et pronostiques de la tumeur cérébrale.

L'analyse protéomique du sérum de patients atteints de GBM révèle des modifications d'expression de nombreuses protéines, telles que des protéines associées à l'angiogenèse (VEGF) ou des métalloprotéases matricielles (MMP-2, MMP-9) (Silantyev et al. 2019). Une autre protéine d'intérêt est l'haptoglobine, une protéine sérique dont le rôle est de fixer l'hémoglobine extra-globulaire, en cas d'hémolyse vasculaire. Son taux est augmenté lors de phénomène inflammatoire, mais aussi lors de différents processus tumoraux tels que des carcinomes pulmonaires, des cancers vésicaux ou des gliomes. Le taux d'haptoglobine est significativement supérieur chez les patients atteints de gliomes, par rapport au groupe témoin. De plus,

sa concentration est corrélée avec le grade du gliome : plus le grade est élevé, plus la concentration sérique en haptoglobine est élevée, ce qui en fait un biomarqueur d'intérêt diagnostic dans le cadre des tumeurs gliales (Kumar et al. 2010).

La mise en évidence de ces biomarqueurs dans le sérum peut être compliquée par de possibles interactions avec les protéines sériques. Chez les patients atteints de gliomes, on peut aussi mettre en évidence une augmentation significative de la concentration de ces mêmes molécules dans leur urine ou dans le LCS qui est au contact direct du SNC. Ainsi, la présence des MMP dans l'urine pourrait être un marqueur prédictif de présence de tumeur cérébrale (Smith et al. 2008).

4. Traitement

a) Chirurgie

La chirurgie est la clé de voute du traitement des gliomes chez l'Homme. Cependant, la mise en place d'un traitement chirurgical repose sur certains facteurs. En effet, l'âge du patient, l' indice de performance (quantifié par l'indice de Karnofsky (KPS) ou l'indice fonctionnel de l'OMS) et la localisation tumorale peuvent indiquer ou non la prise en charge chirurgicale. Une indice KPS supérieur à 70% est en faveur de la chirurgie. La décision finale est une décision collégiale entre neurochirurgien, neurologue, oncologue et anesthésiste : elle évalue le bénéfice de la chirurgie par rapport aux risques per- et post-opératoires. L'étendue de la résection tumorale (EOR) est une évaluation, en pourcentage, de l'efficacité de l'ablation tumorale (Stupp et al. 2014). L'EOR est un facteur prédictif pour la survie post-opératoire du patient : meilleure est l'EOR, meilleure est la médiane de survie du patient. En effet, il a été démontré que l'on retrouve des cellules tumorales 20 mm au-delà des anomalies anatomiques objectivées en IRM, et chez les patients atteints de GBM, on peut les retrouver du côté contro-latéral. Chez les patients atteints de GBM, une EOR > 80% permet d'améliorer le taux de survie (Oppenlander et al. 2014; Brown et al. 2016).

L'imagerie préopératoire (DTI, IRMf) est essentielle puisqu'elle guide le chirurgien dans la résection de la tumeur et dans l'obtention de marge saine, on parle alors de résection supra-maximale. L'IRM intra-opératoire (IRMi) permet, quant à elle, une neuronavigation précise du chirurgien : par exemple elle permet d'objectiver un

déplacement partiel du cerveau fréquemment observé lors de la craniotomie, ou de la résection tumorale. Par ailleurs, cette technique d'imagerie intra-opératoire permet d'augmenter l'EOR, contrairement à une chirurgie conventionnelle (Senft et al. 2011; D'Amico et al. 2017). Cependant, cette technique est peu répandue actuellement du fait de l'augmentation du temps chirurgical et du surcoût associé à l'équipement nécessaire et à l'adaptation des salles opératoires. (Young et al. 2015). L'échographie intra-opératoire peut être une option économiquement plus abordable que l'IRMi, tout en apportant des informations complémentaires aux neurochirurgiens. Les images échographiques permettent en effet d'identifier les tumeurs résiduelles en temps réel, ainsi que la vascularisation péri-tumorale. Des études complémentaires sont nécessaires pour appuyer le développement de l'échographie intra-opératoire. La craniotomie éveillée est une méthode fréquemment employée, principalement lorsque la localisation de la tumeur est proche du « cortex éloquent », c'est-à-dire, proche des aires du cerveau dédiées à la parole ou au mouvement (aire de Broca, aire de Wernicke, gyrus précentral). Une fois la boîte crânienne ouverte, le patient est réveillé et le neurochirurgien délivre des neurostimulations aux aires corticales, afin de déterminer les limites tumorales. Simultanément, un neurologue évalue en continu les fonctions motrices et vocales du patient. Un défaut de l'élocution ou de la motricité lors de la neurostimulation traduit une stimulation corticale par le neurochirurgien : il définit ainsi le contour de la tumeur. Une fois l'ensemble de la tumeur délimitée, le patient est de nouveau endormi et l'exérèse se poursuit. Il existe des contre-indications à ce type d'intervention : les patients claustrophobes, avec des troubles psychiatriques, une toux chronique, une dysphagie, une hémiplégie, ne sont pas éligibles à ce type d'opération (Hervey-Jumper, Berger 2016; Chacko et al. 2013; Meyer et al. 2001).

Une autre méthode de délimitation de la tumeur consiste en l'administration orale préopératoire d'une prodrogue non-fluorescente; le 5-ALA (5-Aminolevulinic Acid). Celui-ci va être transformé et s'accumuler au sein des cellules cancéreuses sous forme de porphyrines fluorescentes (Protoporphyrine IX [PpIX] principalement). La concentration de ce marqueur fluorescent est maximale durant 12 heures. Le chirurgien, équipé de lentilles adaptées sur le microscope chirurgical, peut ainsi avoir une délimitation précise de la masse tumorale, sous lumière UV. Comme le montre la Figure 11, la fluorescence émise permet de retirer les résidus de cellules tumorales, qui auraient pu être laissées *in situ* sans cette approche. Le 5-ALA permet alors

d'obtenir une meilleure EOR et les patients bénéficient d'une augmentation de 50% du taux de survie à 6 mois (41% pour ceux traités avec le 5-ALA par rapport à 21.1% pour ceux traités en chirurgie conventionnelle) (Stummer et al. 2006). Cette technique à faible coût, facile d'utilisation et avec de faibles effets secondaires (photosensibilité du patient pendant 24-48 heures), est un outil de choix pour aider les neurochirurgiens dans la résection totale des tumeurs cérébrales. L'utilisation du 5-ALA combinée avec l'IRMi permet de meilleures résections tumorales par rapport à l'utilisation seule de l'IRMi (Bander, Magge, Ramakrishna 2018). Par ailleurs, certaines études ont démontré que la PpIX peut être utilisée pour la photothérapie dynamique. Sous l'action de la lumière, cette molécule va libérer des radicaux libres qui vont endommager des cibles cellulaires autres que l'ADN, comme les mitochondries.

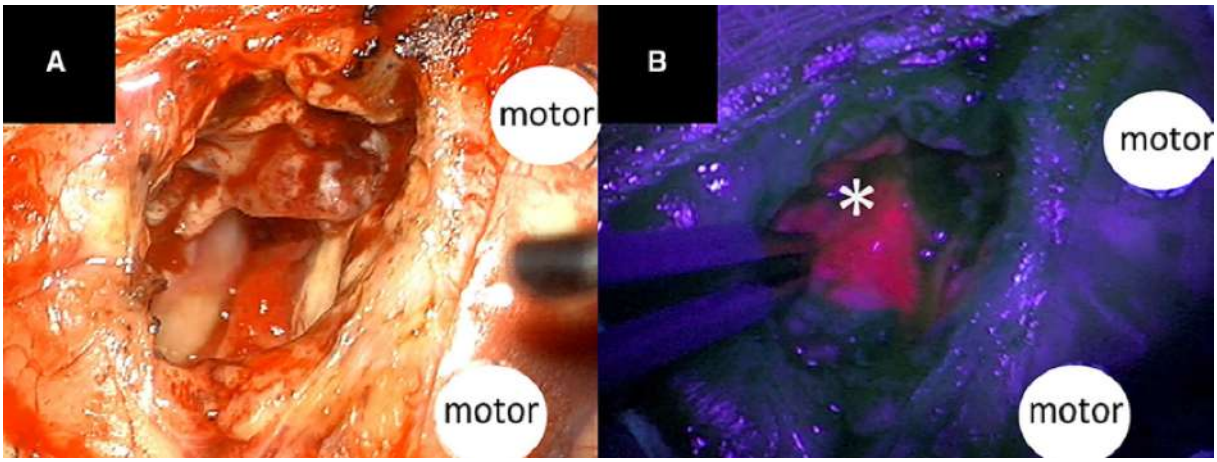


Figure 11 : *Photographies d'aires corticales motrices (cercle blanc) en présence de 5-ALA, (A) sous lumière blanche et (B) sous ultraviolet (UV).*
L'astérisque en (B) montre de la fluorescence émise par les cellules tumorales marquées par les protoporphyrines (d'après Stummer et al. 2006)

b) Radiothérapie

Dans la continuité de la chirurgie, la radiothérapie est indiquée à partir des gliomes de grade III, et des gliomes de grade II si la tumeur est non-résécable ou s'il existe des facteurs pronostiques négatifs. Les protocoles de radiothérapie reposent sur les travaux de Stupp (Stupp et al. 2005a). Les patients âgés de moins de 70 ans reçoivent une dose fractionnée de 2Gy quotidienne pendant 5 jours par semaine, durant 6 semaines consécutives : la tumeur reçoit ainsi une dose totale de 60 Gy. Cette dose est délivrée au volume tumoral macroscopique (i.e. résidus tumoraux post-

chirurgicaux prenant le contraste en T1-Gadolinium ou cavité opératoire en cas d'exérèse macroscopiquement complète) auquel s'ajoutent une marge de 2 à 3 cm et l'œdème péritumoral. Ce volume est calculé au préalable à l'aide de l'imagerie IRM préopératoire ou post-opératoire selon les cas (Stupp et al. 2005b). Actuellement, de nouvelles approches de RT sont à l'étude afin d'améliorer l'efficacité du traitement. L'hypofractionnement consiste à délivrer une dose totale identique de 60 Gy, en un nombre de fractions plus faible. Cette technique permet de diminuer le temps de RT et par conséquent, d'améliorer la qualité de vie du patient. Par ailleurs, la dose reçue pour chaque fraction étant plus élevée, un plus grand nombre de cellules tumorales sont touchées, ce qui ralentit le phénomène de repopulation cellulaire. La médiane de survie est identique à celle obtenue avec le protocole de Stupp (Panet-Raymond et al. 2009). Une étude de phase III randomisée multicentrique en cours vise à comparer la radiothérapie conventionnelle avec la radiothérapie avec modulation d'intensité pour laquelle une augmentation de dose localisée est guidée par ISRM. La tumeur reçoit une dose globale de 60 Gy selon le protocole de Stupp, et la zone d'intérêt (zones avec un ratio Cho/NAA>2) reçoit une dose cumulée de 72 Gy (Ken et al. 2015).

La protonthérapie est une forme de radiothérapie précise, qui repose sur l'émission d'un faisceau de protons qui déposent leur énergie à une profondeur donnée, sans affecter les tissus environnants. Les plans d'irradiation seront donc plus précis, comme on peut le voir sur la Figure 12. Ainsi, les effets secondaires sont moins marqués et des structures à risques telles que l'hippocampe ou la cochlée reçoivent, en dose cumulée, moins de rayons. Cette technique de radiothérapie offre un avantage conséquent lorsque les tumeurs sont localisées près de structures à risque ou lors de résurgence tumorale. Les données concernant l'utilisation de la protonthérapie dans le traitement des GBM sont peu nombreuses car seulement

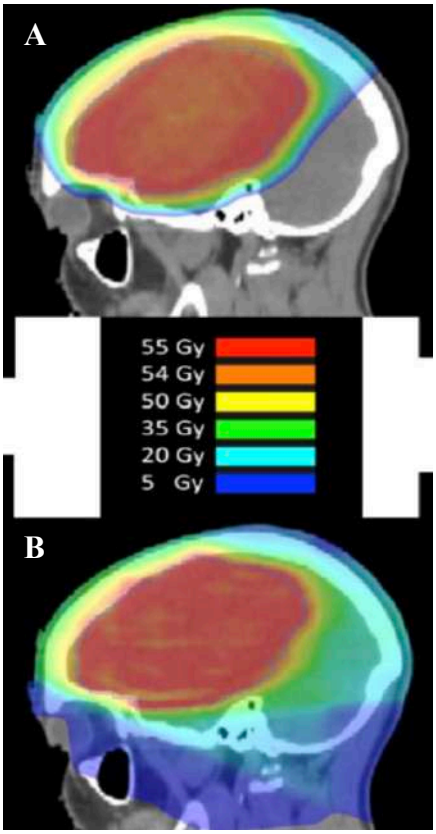


Figure 12 : *Plans dosimétriques comparant la protonthérapie (A) à la radiothérapie conventionnelle (B), d'après (Shih et al., 2015)*

quelques centres en sont équipés. L'utilisation de la protonthérapie sur des gliomes de bas-grade a montré une efficacité similaire par rapport à la radiothérapie conventionnelle, sans atteinte des fonctions cognitives (Shih et al. 2015).

Concernant les patients de plus de 70 ans, le protocole de RT n'est pas clairement défini. Elle augmente sensiblement la médiane de survie chez ces patients, par rapport à la chirurgie seule, sans conséquences négatives sur leur qualité de vie ou leurs fonctions cognitives (Keime-Guibert et al. 2007). La RT hypofractionnée semble plus adaptée car elle affecte moins la qualité de vie du patient et entraîne moins de troubles cognitifs (Sulman et al. 2016; Lévy, Chapet, Mazeron 2014; Roth, Gramatzki, Weller 2017).

c) Chimiothérapie

L'agent le plus utilisé en chimiothérapie pour le traitement des gliomes est le témozolomide (TMZ). Cette molécule est un agent alkylant efficace, bien tolérée par les patients et elle possède une bonne diffusion à travers la barrière hémato-méningée. Son utilisation entre dans le protocole Stupp et est concomitante à la RT : le patient reçoit la dose de 75mg/m² de surface corporelle par jour, 7 jours par semaine, week-end compris, du premier au dernier jour de RT. Le TMZ est par la suite utilisé en traitement adjuvant à la dose de 150mg/m²/jour pendant 5 jours. Puis pour le deuxième cycle, la dose est augmentée à 200mg/m²/j pendant 5 jours si le traitement est bien toléré. Les cures sont répétées tous les 28 jours pour une durée initiale de 6 cycles *in toto*. L'apport concomitant et adjuvant du TMZ a permis d'augmenter de manière significative la médiane de survie (14.6 mois *vs* 12.1 mois avec radiothérapie seule) (Stupp et al. 2005b). Une étude française de 2013 a montré que le prolongement de ce traitement semble augmenter la survie globale sans augmentation de la toxicité (Darlix et al. 2013).

Le principe actif du TMZ agit en alkylant la position ^{6}O de la guanine permettant la formation de la ^{6}O-méthyl-guanine (^{6}O-meG) qui entraîne des cassures double-brin de l'ADN responsable de la mort cellulaire, par apoptose ou autophagie. Le gène *MGMT* (^{6}O-methylguanine-DNA méthyltransférase) code une enzyme qui va réparer cette lésion. Lorsque le gène *MGMT* est fonctionnel, on observe alors une certaine résistance au TMZ. Au contraire, lorsque le promoteur du gène *MGMT* est méthylé, le

gène devient inactif, ce qui sera associé à une meilleure réponse du patient au TMZ. La méthylation du promoteur du gène *MGMT* sera alors recherchée afin d'évaluer la sensibilité de la tumeur à ce type de chimiothérapie (Villano, Seery, Bressler 2009). D'autres molécules, telles que la carmustine et la lomustine, sont également utilisées en seconde intention après le traitement au TMZ.

Une thérapie locale est fréquemment utilisée, en complément de la chirurgie. Un « patch » imprégné de carmustine est déposé sur les marges de la tumeur et va délivrer la molécule durant 2 à 3 semaines. Cette technique apporte un bénéfice de survie aux patients traités, sans conséquences néfastes pour le patient (Westphal et al. 2003).

Les gliomes de haut-grade tels que le GBM sont des tumeurs qui possèdent une vascularisation périphérique anarchique, tortueuse. Cette vascularisation est consécutive à la surexpression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) par les cellules gliales et a pour conséquence la mise en place d'un milieu hypoxique au sein de la tumeur, qui favorise les mécanismes de résistance des cellules tumorales. De plus, cette vascularisation anarchique limite la délivrance des molécules chimiothérapeutiques au sein de la tumeur. Ainsi, la lutte contre l'angiogenèse tumorale apparaît être une approche thérapeutique intéressante. C'est dans ce contexte que le bévacizumab (BVZ), un anticorps recombinant humain anti-VEGF a est étudié. Bien que les mécanismes du BVZ ne sont pas encore connus dans leur ensemble, cette molécule a montré des effets bénéfiques dans le traitement du cancer du sein et du colon. Le BVZ permet ainsi de limiter la néo-angiogenèse tumorale et de rétablir une bonne perfusion de la tumeur. Bien que l'essai randomisé de phase III AVAGLIO montre une augmentation significative de la durée de médiane de survie sans progression avec BVZ : 10.7 mois contre 7.3 mois lors du traitement conventionnel, la survie globale n'est pas augmentée (Fan et al. 2010; Chinot et al. 2014).

d) Immunothérapie

Malgré une prise en charge agressive reposant sur la chirurgie et la radiochimiothérapie, la médiane de survie des patients n'a que peu évolué depuis plusieurs années, du fait de chimiorésistance et de récurrences tumorales.

L'immunothérapie est une nouvelle approche dans la lutte anti-tumorale : elle peut cibler les cellules tumorales ou le microenvironnement tumoral qui participe à la croissance tumorale. Dans ce microenvironnement on retrouve notamment des cellules immunitaires recrutées par la tumeur ; elles représentent 30% des cellules présentes au sein de la tumeur. Ces cellules, microglie et macrophages associés au gliome (GAMs) n'ont pas d'activité anti-tumorale et ont même un profil immunosuppresseur, favorable au développement des cellules cancéreuses (Carvalho da Fonseca, Badie 2013). Les cellules tumorales surexpriment une protéine STAT3 qui inhibe l'activation des GAMs et les oriente vers un phénotype M2. Ces macrophages M2 vont sécréter dans le microenvironnement des molécules et des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) favorisant l'immunodépression locale. L'inhibition de STAT3 entraîne une activation des GAMs et un arrêt du développement tumoral *in vivo* sur modèle murin de gliome (Zhang et al. 2009). Des essais cliniques de phase I et II sont en cours pour évaluer l'efficacité de l'inhibition de STAT3 dans d'autres tumeurs malignes ; il serait également intéressant d'évaluer son efficacité dans le cas des gliomes. De même, les cellules tumorales peuvent surexprimer à leur surface la protéine PD-L1 dont le rôle est de se fixer au récepteur PD-1 sur les lymphocytes T. Celui-ci est un point de contrôle immunitaire puisque lorsqu'il est stimulé, le lymphocyte T est inactivé et la cellule tumorale peut ainsi échapper au système immunitaire. L'utilisation d'anticorps anti-PD-1 ou anti-PD-L1 sur un modèle préclinique de rongeur immunocompétent a montré des résultats prometteurs : on observe une diminution du volume des tumeurs avec une diminution des cellules immunosuppressives et une augmentation de cellules immunocompétentes dans le microenvironnement tumoral (Reardon et al. 2016). Un essai clinique de phase II est actuellement en cours avec des patients atteints de GBM récurrent.

Une autre approche de l'immunothérapie repose sur la vaccination tumorale visant à stimuler des cellules dendritiques avec des antigènes tumoraux fortement immunogènes. Ces cellules sont essentielles à l'établissement d'une réponse anti-tumorale ciblée, car ils présentent les antigènes tumoraux aux lymphocytes T qui sont alors capables de reconnaitre et détruire spécifiquement les cellules tumorales. Ces cellules dendritiques sont mises au contact d'un lysat de cellules tumorales du patient, afin d'obtenir une vaccination des cellules dendritiques autologue, spécifique à chaque patient. Les résultats préliminaires d'un essai clinique de phase III randomisé en

double aveugle sur un vaccin autologue de cellules dendritiques activées chez des patients atteints de GBM semble associé à une augmentation du taux de survie (Liau et al. 2018).

e) *Traitements adjuvants*

La prise en charge de la tumeur repose sur le traitement de la tumeur d'une part, mais aussi sur les complications liées à la tumeur en elle-même ou aux traitements mis en œuvre d'autre part. En effet, les tumeurs malignes ont des effets délétères impactant la qualité de vie des patients puisqu'en fonction de leur localisation elles peuvent être à l'origine de convulsions, de thromboembolies veineuses ou encore de troubles du comportement. Les traitements antitumoraux peuvent, eux aussi, entrainer des effets secondaires (Schiff et al. 2015).

Les convulsions sont fréquemment observées chez les personnes souffrant de tumeur cérébrale. Elles peuvent survenir lors du développement tumoral, et dépendant de la localisation, du type tumoral et de la vitesse de croissance. Les gliomes de bas-grade provoquent des crises convulsives dans 80% des cas, tandis qu'elles ne sont présentes que dans 20% des cas chez les patients atteints de gliomes de haut-grade. Les chimiothérapies à base de TMZ, ainsi que l'exérèse chirurgicale et la RT permettent de diminuer l'incidence de ces convulsions. L'utilisation d'antiépileptique peut s'avérer intéressante, notamment en préopératoire d'une craniotomie mais aucune étude n'a démontré l'effet bénéfique de cette médication. De plus, ces molécules peuvent présenter des effets négatifs, tels que des démangeaisons dans 18% des cas de patients recevant une radiothérapie (Mamon et al. 1999). Enfin, il semblerait que les antiépileptiques diminuent l'efficacité des corticoïdes.

Quant aux thromboembolies veineuses, des études rétrospectives ont montré que leur risque peut aller de 3 à 25 % dans les 6 semaines post-opératoires (Marras, Geerts, Perry 2000). Les facteurs de risque sont nombreux et reposent sur un âge élevé du patient (>75ans), un alitement prolongé, une tumeur de haut grade ou sur une taille de tumeur supérieure à 5 cm de diamètre. De plus, il a été démontré que les gliomes malins sont à l'origine d'un état hypercoagulable car ils produisent des molécules procoagulantes et antifibrinolytiques, telles que le facteur tissulaire, le VEGF. Enfin, d'après une étude datant de 2009, la chimiothérapie, la radiothérapie et les traitements anti-angiogéniques sont associés à des risques augmentés de thrombose (Jenkins et al. 2010; Zangari et al. 2009). Ainsi, la prévention des thromboses semble essentielle dans la prise en charge des tumeurs cérébrales. Elle repose sur une prophylaxie péri-opératoire ; les patients atteints de gliomes de haut-

grade reçoivent donc généralement un traitement préventif d'héparine de bas poids moléculaire, sur une période minimale d'un mois (Perry 2012).

La plupart des patients atteints de tumeur cérébrale sont amenés au cours de leur traitement à prendre des corticoïdes. Ces médicaments permettent de contrôler l'œdème cérébral et ainsi de limiter les troubles neurologiques et les convulsions associés. Par ailleurs, les corticoïdes ont un effet analgésique et ils permettent d'améliorer l'appétit et le comportement des patients. Généralement, le médicament utilisé en première intention est la dexaméthasone, car il ne perturbe pas l'axe corticotrope. Cependant, l'usage à long terme des corticoïdes ont des effets systémiques négatifs : la myopathie, associée à une faiblesse musculaire correspond à l'effet le plus fréquemment rencontré. De plus, des ulcères gastriques, une hyperglycémie ou de l'ostéoporose peuvent apparaître sur le long terme et nécessitent la prise de traitements supplémentaires (Pruitt 2011). Les doses de corticoïdes doivent donc être limitées dans le temps afin d'éviter ces complications, et la décroissance doit se faire lentement. Par ailleurs, un exercice physique doit être maintenu durant le traitement, ainsi qu'un régime hyposodé afin de maintenir une bonne hygiène de vie.

La chimiothérapie appartient à l'arsenal thérapeutique mis en place afin de lutter contre les gliomes. Le TMZ est l'anticancéreux utilisé en première intention. Cependant, l'emploi de ces molécules est associé à des effets secondaires, qui impactent la vie du patient. En effet, le TMZ possède une toxicité hématologique : des lymphopénies sont fréquemment observées à la suite des séances de chimiothérapie, des anémies plus rarement. L'utilisation conjointe d'agents chimiothérapiques et de corticoïdes déprime le système immunitaire et forme un terrain favorable aux infections. Malgré cette immunodépression, on observe seulement 2-3% d'infection du SNC faisant suite à une rupture de la barrière hémato-méningée lors de craniotomie. *Pneumocystis jirovecii* pneumoniae est un agent pathogène opportuniste qui profite de ce contexte pour entrainer des troubles pulmonaires. De plus, l'utilisation du TMZ a été associée à une réactivation d'Herpèsvirus ou du Cytomégalovirus (Ridola et al. 2011).

Enfin, lors d'atteinte tumorale, la fatigue et les troubles du sommeil sont des symptômes que l'on retrouve fréquemment chez les patients : 40 à 70% des patients rapportent une fatigue plus importante (Armstrong, Gilbert 2012). Ces symptômes sont d'origine biologique, mais aussi psychologique. L'inflammation cérébrale, induite par

la masse tumorale, provoque une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6). Ces molécules vont en conséquence perturber la neurotransmission, la production de mélatonine et vont conduire aux symptômes tels que l'insomnie et la fatigue. De même, les effets de la radiothérapie sont similaires : une étude de Hickok et al., a montré que la radiothérapie a un impact directement sur la fatigue des patients. Sur les 160 patients ne présentant pas de fatigue au début de la radiothérapie, 70% l'ont développé au cours des 3 à 5 semaines de cure. (Hickok et al. 2005). Cette fatigue chronique a aussi une origine psychologique liée à la détresse émotionnelle, à la peur que représente le diagnostic et le traitement du cancer. Nombre de patients souffrent par ailleurs de dépression, d'anxiété durant leur maladie : une étude de 2002 estime à environ 40%, le nombre de patients atteints de tumeur cérébrale, qui sont sujets à des symptômes de dépression (Pelletier et al. 2002). Des troubles cognitifs sont aussi présents, en lien avec la masse tumorale et l'œdème péri-tumoral. Ces troubles peuvent même affecter la capacité de prise de décision médicale du patient. Ceci serait lié à des déficits de la mémoire verbale à court terme (Triebel et al. 2009). Ces troubles sont très fréquents suite à la radiothérapie : 90% des patients déclarent des troubles cognitifs dans les 6 mois qui suivent le traitement aux RI (Crossen et al. 1994).

La prise en charge d'un patient atteint de cancer repose donc sur une médecine globale qui soigne le patient dans son ensemble. Certes, le traitement de la tumeur est primordial mais il semble tout aussi essentiel de traiter la personne sur le plan psychologique, émotionnel et nutritionnel. Il est aussi important de traiter les effets secondaires liés aux nombreux traitements.

f) Résistance aux traitements

Les gliomes de haut-grade font partie des cancers avec les plus mauvais taux de survie. Ces chiffres s'expliquent d'une part par l'agressivité de ces tumeurs, leur nature infiltrante rendant difficile voire impossible une exérèse complète. D'autre part, ces tumeurs sont connues pour être plus chimio-radiorésistantes que d'autres. Les mécanismes mis en jeu sont nombreux.

La Barrière Hémato-Méningée (BHM) représente un obstacle au passage des molécules du plasma dans le tissu nerveux. La BHM porte à sa surface des protéines

qui appartiennent à la famille des molécules MDR (*MultiDrug Resistance*) telles que la P-glycoprotéine (Pgp) ou d'autres molécules comme la MRP1 (*Multidrug resistance-related protein 1*). Ces molécules sont des pompes ATP-dépendantes qui éliminent dans le milieu extracellulaire les drogues intracellulaires. Ces deux molécules sont surexprimées au sein des gliomes, dans des proportions distinctes selon le grade du gliome. MRP1 sera préférentiellement exprimée au sein des gliomes de grade IV tandis que l'expression de Pgp sera plus importante dans les grades I et II. Ainsi, les chercheurs ayant réalisé cette étude, proposent que la surexpression du gène MRP1 soit un critère de malignité des gliomes. Le choix thérapeutique et les cibles anti-tumorales seraient donc dépendants du grade du gliome (de Faria et al. 2008).

Un autre critère de chimiorésistance déjà évoqué dans les paragraphes ci-dessus correspond à l'expression ou à la méthylation du promoteur du gène *MGMT*. Ce gène répare les lésions de l'ADN des cellules tumorales provoquées par le TMZ par la déméthylation en ^{6}O de la guanine. Or, le TMZ est un agent majeur de chimiothérapie contre les gliomes. Le statut méthylé ou non du promoteur de ce gène est donc primordial pour adapter au mieux l'arsenal thérapeutique.

L'hypoxie au sein de la tumeur entraîne l'expression des gènes HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*) qui permettent l'adaptation des cellules à un milieu pauvre en oxygène. En condition normale, HIF1α est dégradé par des enzymes PHDs (*specific prolyl hydroxylase-domain*). En condition hypoxique, ces enzymes sont inhibées et la molécule HIF1α peut entrer dans le noyau et se fixer sur une séquence ADN appelée HRE (*Hypoxia Responsive Element*) qui va transactiver des gènes favorisant l'angiogenèse, l'adaptation au métabolisme anaérobie, ou la résistance à l'apoptose. Ce gène joue ainsi de nombreux rôles dans la résistance des cellules à la chimiothérapie et à la radiothérapie. De plus, il est surexprimé au sein des Cellules Souches Cancéreuses (CSC) présentes dans les niches tumorales. Ces cellules sont responsables de la repopulation tumorale après la thérapie. (Zhao et al. 2015; Ishii et al. 2016). Les CSC ont la capacité de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différentier. Elles sont mises en évidence par des marqueurs spécifiques tels que le marqueur CD133, ou Notch. La résistance de ces cellules s'explique d'une part par des facteurs intrinsèques tels que l'expression de protéines Pgp, sa capacité à réparer les lésions à l'ADN, la quiescence et la résistance à l'apoptose. D'autre part, il semble que le microenvironnement tumoral prend une part importante dans les mécanismes

de résistance. Ces CSC sont présentes dans des niches, entourées par une matrice extracellulaire spécifique, riche en tenascin C, en SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*), à proximité des cellules endothéliales avec lesquelles elles communiquent. La sensibilité à l'apoptose des CSC suite à une dose unique de RI est liée à la sensibilité à l'apoptose des cellules endothéliales (Garcia-Barros, Paris 2003). La matrice extracellulaire peut contenir des molécules qui vont moduler la réponse aux RI tels que le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) ou former une niche favorable au développement des cellules qui auront résistées à la radiothérapie (Dean, Fojo, Bates 2005; Mannino, Chalmers 2011).

5. Pronostic

Les principaux facteurs influençant le pronostic sont le type tumoral et son degré de malignité. En ce qui concerne le GBM, les trois facteurs retenus pour donner un pronostic de survie sont :

- L'efficacité de la résection tumorale : plus la résection tumorale est large, meilleur sera le pronostic,

- L'âge du patient au moment du diagnostic : une étude allemande de 2007 sur les survies associées au GBM a montré que l'âge au moment du diagnostic était un facteur pronostic. Les patients de cette étude avaient une moyenne d'âge de 51 ans pour une médiane de survie de 7 ans, alors qu'elle était de 4.6 ans pour une cohorte d'une moyenne d'âge de 60.9 ans. Un jeune âge au moment du diagnostic apparaît donc comme un facteur pronostic positif (Krex et al. 2007),

- L'indice de Karnofsky (KPS) (Karnofsky, 1949) : cet indice de performance permet d'évaluer l'état de santé général du patient et sa capacité à effectuer les actes du quotidien. Il est utilisé en médecine humaine afin d'estimer la capacité du malade à supporter un traitement chimiothérapeutique dans un premier temps, puis à supporter l'ensemble des traitements oncolytiques. Cet indice repose sur une échelle de 0 à 100, où 100 correspond à un homme sain capable d'effectuer normalement une activité journalière et 0

correspond au décès du patient (Tableau 3). Les patients avec un indice supérieur à 70% en préopératoire ont des pronostics de survie meilleurs que ceux avec un indice inférieur (Chambless et al. 2015). Le KPS influence aussi le choix de réaliser ou non une chirurgie : la chirurgie peut être remise en question si le KPS est aussi inférieur à 70%, du fait de l'impact négatif de la chirurgie sur l'autonomie du patient en post-opératoire.

Tableau 3 : *Indice de Karnofsky (d'après social-sante.gouv.fr)*

Indice de Karnofsky		
Catégorie	**Indice**	**Description**
Capable de mener une activité normale	100%	Normal, pas de signes de maladie
	90%	Peut mener une activité normale, symptômes mineurs de la maladie, totalement autonome
	80%	Peut mener une activité normale, mais avec effort, symptômes ou signes mineurs, totalement autonome
Incapable de travailler, capable de vivre chez lui et d'assumer ses besoins personnels, une assistance variable est nécessaire	70%	Peut se prendre en charge, incapable de mener une activité normale, autonome mais à stimuler
	60%	Nécessite une aide occasionnelle mais peut prendre en charge la plupart des besoins, semi-autonome
	50%	Nécessite une aide suivie et des soins médicaux fréquents, semi autonome
	40%	Handicapé, nécessite une aide et des soins particuliers
Incapable de s'occuper de lui-même, nécessite des soins hospitaliers ou l'équivalent	30%	Sévèrement handicapé, dépendant
	20%	Très malade, soutien actif, absence totale d'autonomie
	10%	Moribond, processus fatal progressant rapidement
	0%	Mort du patient

Par ailleurs, le statut de méthylation du promoteur du gène *MGMT* est un facteur pronostique supplémentaire pour les patients souffrant de GBM. *MGMT* code une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN, la méthylation de son promoteur entraîne une perte d 'expression de l'enzyme. Une étude datant de 2005 a montré que l'extinction de l'expression de ce gène était favorable au traitement du GBM par le TMZ. Les patients avec une méthylation du promoteur de *MGMT* disposaient d'un allongement significatif de leur médiane de survie de 7 mois, par rapport au groupe contrôle (Hegi et al. 2005).

Cette première partie a montré que les gliomes diffus chez l'Homme sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et sont associées à un pronostic sombre, surtout en ce qui concerne le glioblastome. Malgré une approche thérapeutique multimodale reposant sur une chirurgie large, une radiothérapie ainsi qu'une chimiothérapie, les progrès en termes de médiane de survie sont limités depuis de nombreuses années.

Il apparaît donc nécessaire de rechercher de nouvelles thérapies innovantes qui puissent permettre aux cliniciens d'améliorer la qualité de vie de leurs patients sur le long terme. Dans ce contexte, il est essentiel de pouvoir tester ces nouvelles stratégies thérapeutiques sur un modèle animal qui reproduise fidèlement les différentes caractéristiques tumorales.

B. Le chien comme modèle d'étude en oncologie comparative

Le Chien est le « meilleur ami » de l'Homme : plus de 9,1 millions de canidés sont présents au sein de nos foyers en France en 2019 d'après la société I-CAD, en charge de l'identification des carnivores domestiques en France. Lors de sa domestication, qui aurait eu lieu entre 30 000 et 40 000 ans, le chien aurait aidé l'Homme à survivre d'une part en étant d'une aide primordiale lors de la chasse, et d'autre part en jouant un rôle de protecteur et de gardien du foyer, qu'on lui connait encore aujourd'hui. Depuis leur ancêtre commun, *Canis lupus,* les chiens ont été sélectionnés par l'Homme et se subdivisent en de nombreuses races. Cette sélection s'est accélérée au XIX^{ème} siècle, où les chiens n'étaient plus sélectionnés uniquement pour leur fonction, mais aussi pour leur forme, ce qui a conduit à la sélection intensive de certains traits, amenant à la diversité des races canines que nous connaissons aujourd'hui. Cette sélection repose sur le croisement de chiens possédant les mêmes caractéristiques morphologiques, amenant à la création de chiens dits « de pure race ». Ainsi, bien que l'espèce canine présente une variété génétique tout aussi riche que l'Homme, la diversité génétique au sein d'une race pure est faible, du fait de la sélection de nombreux gènes spécifiques de ces traits morphologiques (vonHoldt et al. 2010). Cette hyper-sélection s'est accompagnée de l'apparition de cancers propres à certaines races. A titre d'exemple, le Bouvier Bernois développe des sarcomes histiocytaires, ou le Golden retriever présente des ostéosarcomes dans des fréquences bien plus élevées que d'autres races canines (Dobson 2013). Cette faible diversité génétique facilite l'utilisation d'outils d'analyse génétique tels que l'étude d'associations pangénomiques (GWAS) qui étudie les variations de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) entre différents individus. Un SNP correspond à une variation d'une seule paire de bases à un endroit spécifique du génome (exon, intron, région non-codante), entre individus d'une même espèce. Ils sont à la base des différences dans notre susceptibilité à la maladie, ou sont responsables de modification structurelle des protéines, pouvant être à l'origine de mécanismes d'oncogenèse. De même, la gravité des maladies et la manière dont notre corps répond aux traitements sont aussi des manifestations de cette variation génétique.

L'homme et le chien ont ainsi coévolué ensemble et le chien partage aujourd'hui notre foyer, notre environnement et notre mode de vie : il occupe ainsi une

place particulière au sein de la famille. L'augmentation de leur espérance de vie, en lien avec une amélioration de la nutrition, une meilleure vaccination et de meilleurs soins vétérinaires, s'associe à une élévation du nombre de pathologies liées à l'âge telles que les cancers. En effet, aux États-Unis, plus de 1 million de cancers sont diagnostiqués chez les chiens chaque année (Paoloni et al, 2008).

C'est dans ce contexte que s'est développée ces dernières années l'oncologie comparative, un domaine de la recherche qui rassemble vétérinaires, médecins et scientifiques afin d'évaluer la convergence nosologique entre cancers canins et humains. La similarité pathologique entre les deux espèces permettrait d'utiliser le chien malade comme modèle pertinent pour améliorer notre compréhension, approche diagnostique et thérapeutique des cancers chez l'Homme et chez le Chien (Schiffman, Breen 2015). Le chien malade pourrait aussi être utilisé pour tester l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques, ce qui permettrait de récolter des arguments précliniques pertinents complémentaires à ceux déjà obtenus sur modèle murin. L'absence de traitement standard reconnu pour les gliomes chez le Chien permet aux vétérinaires de proposer en première intention des stratégies thérapeutiques innovantes sans se heurter à un problème éthique.

La section qui suit est consacrée à la démonstration de l'intérêt du modèle canin de gliomes en recherche translationnelle.

1. Intérêts du modèle canin

a) Arguments en faveur d'une convergence nosologique entre gliomes canins et humains

(1) Arguments épidémiologiques

L'incidence des tumeurs cérébrales canines est de 20 cas/10 0000 chiens/an (Snyder et al. 2006), ces tumeurs sont responsables de 1 à 3 % des décès chez le Chien (Dobson et al. 2002). L'incidence est équivalente à celle observée chez l'Homme qui est de 20,59 cas/100 000 par an (Dolecek et al. 2012). Une étude récente montre que les tumeurs intracrâniennes primitives chez le Chien représentent à elles-seules 2 à 5% de l'ensemble des cancers. Cependant, les données sont probablement sous-estimées du fait du manque de moyens diagnostiques en médecine vétérinaire ou du choix des propriétaires à réaliser une euthanasie suite à l'apparition des troubles neurologiques. En effet, en comparaison avec la médecine humaine en France, le droit à l'euthanasie est accepté chez les animaux domestiques et le manque de ressources financières du propriétaire en rapport avec un pronostic toujours réservé et des thérapeutiques peu développées représente un frein à la poursuite des soins (LeBlanc et al. 2016). La proportion de gliomes par rapport aux tumeurs cérébrales primitives est également similaire chez le Chien (36,6%) et l'Homme (24%), avec toutefois une différence quant au type de gliomes le plus fréquemment rencontré (oligodendrogliome anaplasique chez le Chien, GBM chez l'Homme) (R.B. Song et al. 2013; Dolecek et al. 2012).

Comme chez l'Homme, l'âge représente un facteur de risque, avec une moyenne d'âge au moment du diagnostic de l'ordre de 7-8 ans. Pour l'instant, aucune prédisposition sexuelle n'a été mise en évidence chez le Chien. Le facteur prédisposant le plus notable demeure la race : les chiens brachycéphales, avec un museau court, sont les plus fréquemment touchés. Parmi eux, les Boston Terriers, Boxers, Bouledogues anglais et français sont les plus sensibles (R.B. Song et al. 2013). Il semblerait donc que des gènes de prédisposition au développement de gliomes existent et qu'ils aient été conservés *via* la sélection et l'élevage de certaines races brachycéphales. La majorité des gliomes chez le Chien se localisent dans les

hémisphères cérébraux, préférentiellement dans les mêmes lobes que chez l'Homme soit le lobe frontal, le lobe temporal et le lobe pariétal (Kishimoto et al. 2020).

Les signes cliniques associés aux gliomes chez le Chien sont identiques à ceux identifiés chez l'Homme : le signe le plus fréquemment rencontré est l'apparition de crises convulsives chez près de 50% des chiens. Ces crises sont la conséquence directe de l'effet masse exercé par la tumeur sur le tissu cérébral, ou elles sont secondaires à l'œdème péri-tumoral ou à la neuro-inflammation induite par le gliome. Ces crises, après exclusion des causes extra-crânienne, seront explorées *via* des techniques d'imagerie telles que la tomodensitométrie ou l'IRM. Les chiens présentent aussi d'autre signes cliniques non spécifiques tels que léthargie, inappétence ou perte de poids (Miller, Miller, Rossmeisl 2019).

(2) Arguments génétiques

La faible variation génétique au sein d'une race canine facilite l'identification de gènes impliqués dans l'oncogenèse, gènes dont la modification d'expression peut ensuite être recherchée chez l'Homme.

La prédisposition des races brachycéphales au développement de gliomes rappelle les syndromes humains de prédisposition au cancer, pour lesquels des mutations génétiques héréditaires conduisent à l'apparition de tumeurs (mutation de *TSC1 et TSC2* pour la sclérose tubéreuse, *NF1* pour la neurofibromatose de type 1 et 2, *VHL* pour la maladie de Von Hippel Lindau, *TP53* pour le syndrome de Li-Fraumeni) (Wrensch et al. 1997) (Farrell et al., 2015). Jusqu'à présent, aucune étude n'a mis en évidence de mutation germinale de ces gènes chez les chiens atteints de gliomes.

Des facteurs de susceptibilité associés au développement de gliomes chez le chien ont été récemment mis en évidence par la réalisation d'une analyse d'association pangénomique (Truvé et al. 2016). Cette approche a permis d'identifier trois gènes candidats. La comparaison du tissu tumoral avec le tissu sain a montré que l'expression de deux de ces gènes candidats (*CAMKK2, P2RX7)* était modifiée au sein de la tumeur, à la fois chez le Chien et l'Homme. Des études plus approfondies sont nécessaires afin d'évaluer exactement le rôle de ces gènes dans le développement oncogénique des gliomes canins et humains.

(3) Arguments étiopathogéniques

Dans la mesure où les gliomes du Chien se développent de manière spontanée, il peut être supposé que les mécanismes oncogéniques soient similaires chez le Chien et chez l'Homme.

La recherche d'altérations génétiques héréditaires et de gènes de susceptibilité impliqués dans le développement tumoral est toujours une voie active de recherche, comme cela vient d'être évoqué.

Plusieurs études sur l'oncogenèse des gliomes ont montré que tous les grades de gliomes humains comportaient des cellules souches cancéreuses (CSC), une sous-population cellulaire supposée initier et maintenir le développement tumoral par sa capacité à s'auto-renouveler (Reya et al. 2001; Wilson et al. 2004; Rebetz et al. 2008). Selon l'hypothèse des CSC, les gliomes sont organisés de manière hiérarchique avec, en haut de la pyramide, des CSC autonomes se différenciant en cellules progénitrices, précurseurs et différenciées des lignées astrocytaire et oligodendrogliale. Il est également supposé que les CSC soient à l'origine des échecs thérapeutiques car elles sont plus chimio- et radiorésistantes que les cellules différenciées et peuvent reformer localement la tumeur après traitement (Eyler, Rich 2008; Bao et al. 2006). Deux études ont pour l'instant démontré la présence de CSC dans les gliomes canins : l'étude de Stoica et *al.* pour laquelle les CSC isolées à partir d'un GBM canin ont reproduit la tumeur chez des souris Nude une fois implantées dans l'encéphale (Stoica et al. 2009a). ; et l'étude de Fernandez et *al.* pour laquelle la présence de CSC a été mise en évidence par immunohistochimie dans un panel de 20 cas de gliomes diffus canins allant du grade II au grade IV (Figure 13) (Fernández et al. 2016). Dans cette dernière étude, l'utilisation de marqueurs de différentiation des lignées astrocytaire, oligodendrogliale et neuronale avaient montré que les cellules Nestine+ et CD133+ (marqueurs de cellules souches) étaient présentes dans tous les grades de gliomes, avec un enrichissement plus important pour les haut-grades comme cela est le cas pour les gliomes humains.

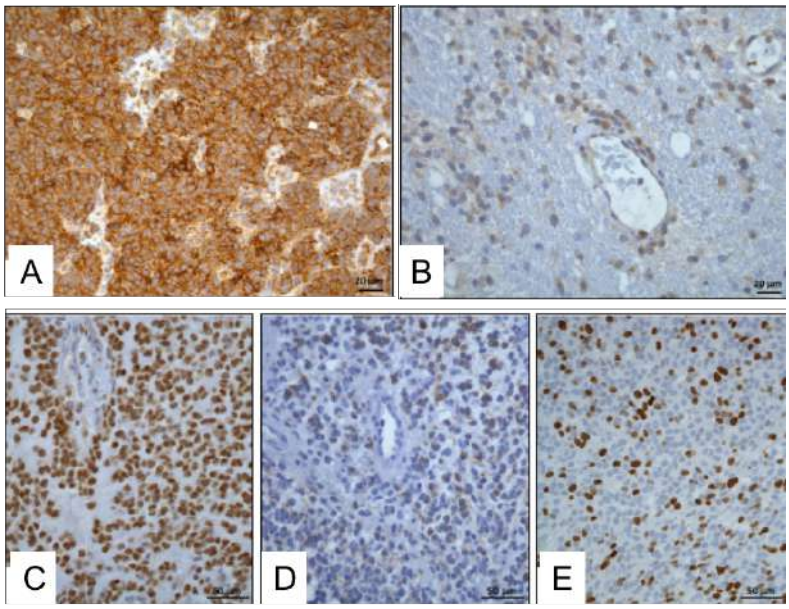


***Figure** 13 : Exemple de résultats immunohistochimiques obtenus pour un GBM canin (A : Marquage nestin, B : Marquage CD133, C : Marquage Olig2, D : Marquage DCx, E : marquage Ki67)(Fernandez et al., 2016)*

Certains évènements génétiques ont lieu de manière chronologique dans le développement tumoral, et sont d'ailleurs utilisés dans la nouvelle classification OMS 2016 pour aider dans le diagnostic des gliomes diffus chez l'Homme. Il s'agit de la mutation d'*IDH1* (événement précoce considéré comme une mutation « driver »), de la codélétion 1p19q pour les oligodendrogliomes et de la mutation d'*ATRx* pour les astrocytomes. La mutation d'*IDH1* et la codélétion 1p19q ont été recherchées dans les gliomes canins mais n'ont pas été retrouvées (Reitman et al. 2010; Thomas et al. 2009). La mutation IDH1R32H a été recherchée sur 31 gliomes de chien par IHC et aucune mutation n'a été détectée, tandis que l'expression de pan-IDH1 était positive dans 100% des échantillons. Il se peut que la mutation d'*IDH1* concerne une autre région que celle affectée chez l'Homme (et donc testée chez le Chien) ; d'autre part, il est également possible que des modifications portant sur un autre gène aient les mêmes conséquences que celles dues à la mutation d'*IDH1* (i.e. hyperméthylation d'un certain nombre de promoteurs). Ces différentes pistes sont en cours d'investigation. La présence d'une mutation du gène *ATRx* n'a quant à elle toujours pas été évaluée chez le Chien.

(4) Arguments morphologiques

En ce qui concerne les caractéristiques anatomiques macroscopiques et microscopiques des gliomes, les similitudes sont nombreuses entre Homme et Chien.

Les quelques données publiées sur l'aspect IRM des gliomes canins tendent à montrer un aspect similaire à celui rencontré chez l'Homme : il s'agit de masses hyperintenses en T2 et iso- à hypo-intense en T1, sans prise de contraste pour les bas-grades et une prise de contraste variable pour les haut-grades (Wrensch et al. 1997; Lipsitz et al. 2003). La Figure 14 met en parallèle deux coupes coronales pondérées en T1 après injection de gadolinium chez un patient humain atteint de GBM et un patient canin atteint de GBM. Dans les deux cas, la tumeur apparaît comme une volumineuse masse comprimant le ventricule latéral, avec une prise de contraste périphérique et un centre nécrotique.

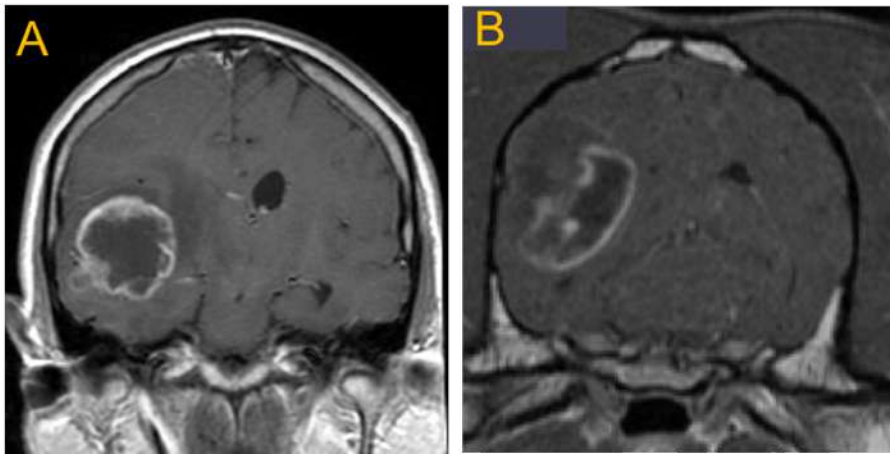


Figure 14 : *Coupes coronales issues d'une séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium chez un patient humain (A) et un patient canin (B) atteints de GBM temporal gauche.*
On note la même organisation avec un centre nécrotique, entouré d'une zone hyperintense.
Images issues de : *http://neurowiki2014.wikidot.com/group:neurooncology (image A) et http://www.vetmed.vt.edu/clinical-trials/canine-glioma/brain-tumors-in-dogs.asp (image B)*

D'un point de vue histologique, les gliomes diffus canins présentent des caractéristiques morphologiques cellulaires, une infiltration péri-tumorale, des critères d'anaplasie (atypies cytonucléaires, index mitotique élevé, hyperplasie microvasculaire) et des critères pathognomoniques du GBM (capillaires « gloméruloïdes », foyers de nécrose entourés de pseudo-palissades) identiques à ceux des gliomes diffus humains.

Un consortium multidisciplinaire sur les tumeurs cérébrales comparatives réunissant des vétérinaires et des médecins neuropathologistes a proposé une mise

à jour de la classification des gliomes chez le Chien en 2018. Cette classification simplifiée, donnée sur la Figure 15, et essentiellement basée sur l'analyse histologique des tumeurs, permet l'ajout des futures données moléculaires sur le gliome chez le Chien. L'immunohistochimie (IHC) est un outil complémentaire à cette classification et reste un élément important dans le diagnostic des gliomes chez les chiens (Koehler et al. 2018).

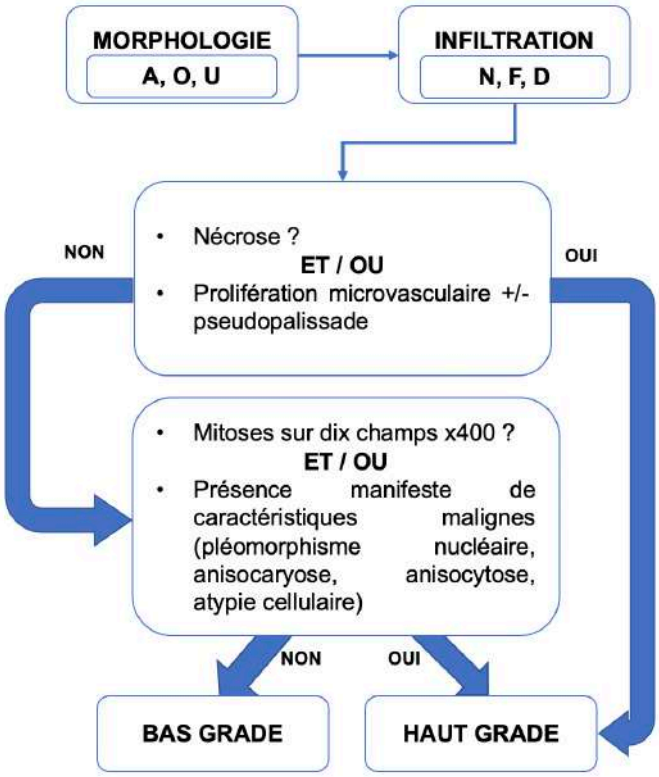


Figure 15 : *Arbre de décision pour la classification des gliomes canins. (A = morphologie astrocytaire ; O = morphologie oligodendrogliale ; U =morphologie non définie : N = sans infiltration ; F : infiltration focale ; D : infiltration diffuse*

Les principaux marqueurs utilisés pour caractériser les lignées tumorales de gliomes canins sont les suivantes :

- CD133 est un marqueur spécifique des cellules souches,
- DCx (Doublecortine) est un marqueur des cellules progénitrices neuronales,
- Olig2 est un marqueur antigénique des cellules progénitrices gliales,
- GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) et Vimentine sont spécifiquement présents à la surface des astrocytes matures,
- βIII-tubuline et NeuN (*Neuronal Nuclei*) sont des marqueurs de neurones matures,
- Ki67 est un marqueur de prolifération cellulaire.

La classification OMS des tumeurs du SNC du Chien n'ayant pas été remise à jour depuis 1999 (Koestner et al., 1999), les récentes publications vétérinaires sur les gliomes diffus ont utilisé la classification humaine pour leurs études (Higgins et al. 2010; York et al. 2012; Bentley et al. 2013; Fernández et al. 2016) montrant par là même que la similitude morphologique de ces tumeurs entre les deux espèces est telle qu'elle permet l'utilisation d'un unique schéma de classification.

Par ailleurs, des modifications de l'expression du gène *EGFR* (amplification d'*EGFR* et du chromosome orthologue de 7p) et des gènes codant d'autres récepteurs tyrosine kinase (surexpression de *PDGFR* et *VEGFR*), ainsi que des altérations des voies de signalisation cellulaire p53/MDM2/p21, PI3K/Akt/mTOR et Rb1/p26 ont été observées dans les gliomes canins de manière similaire à ce qui est décrit chez l'Homme (Higgins et al. 2010; York et al. 2012; Stoica et al. 2004; Boudreau et al. 2015; Dickinson et al. 2008). Une analyse moléculaire récente entre les gliomes chez le Chien, l'adulte et l'enfant montre des altérations communes entre ces trois populations sur les récepteurs tyrosine kinase, la protéine PT53 ou dans les voies de régulation du cycle cellulaire. De manière intéressante, les profils de méthylation de l'ADN et la fréquence d'aneuploïdie rencontrés chez le Chien sont fortement similaires à ceux observés dans les gliomes pédiatriques chez l'Homme (Amin et al. 2020).

L'expression d'EGFR chez le Chien est significativement plus élevée dans les gliomes de haut-grade que dans les gliomes de bas-grade (Fraser et al. 2016). De même, l'étude de l'expression de miARN en condition hypoxique dans trois lignées cellulaires de GBM canins montre des analogies entre l'Homme et le Chien. miR-210 est surexprimé lors d'hypoxie dans les GBM chez l'Homme et son expression est fortement corrélée avec l'expression du VEGF. Sa surexpression dans les GBM chez l'Homme est associée à une diminution de l'apoptose et à une augmentation de la prolifération cellulaire (Koehler et al. 2020).

b) *Avantages du modèle canin par rapport au modèle murin*

Les modèles murins de gliomes diffus correspondent à des xénogreffes orthotopiques de lignées cellulaires tumorales humaines. De nombreux inconvénients sont associés à ce modèle tels que l'immunodépression des animaux utilisés et l'absence de diversité génétique des tumeurs induites. Ces souris sont maintenues dans un environnement sans aucun pathogène, avec une alimentation identique, sans variation de leurs facteurs environnementaux. Le chien co-évolue avec l'Homme : cette proximité entre l'Homme et le Chien amène à partager un microbiote commun, qui peut influencer la réponse immunitaire et inflammatoire (Se Jin Song et al. 2013). De plus, le Chien est exposé aux mêmes facteurs environnementaux que l'Homme. Ainsi, l'utilisation du modèle canin permet de pallier ces problèmes et ainsi d'obtenir des données pertinentes sur animaux immunocompétents présentant des tumeurs génétiquement variées. Le Chien apparaît ainsi comme modèle intéressant dans les études sur l'immunothérapie, car l'interaction des cellules immunitaires avec les cellules tumorales et le micro-environnement est primordiale. Le Chien serait complémentaire aux études faites sur le modèle murin et aux essais cliniques chez l'Homme (Park et al. 2016).

En outre, la taille de l'encéphale des souris nécessite un matériel d'imagerie et de RT spécifiquement adaptés, ce qui rend difficile la transposition des résultats obtenus sur ce modèle directement à l'Homme. La grande taille de l'encéphale du Chien permet au contraire de pouvoir utiliser exactement le même matériel d'imagerie (scanner IRM) et de RT qu'en médecine humaine (Bentley et al. 2016) et de pouvoir utiliser le chien malade comme substitut de la pathologie humaine dans les mêmes conditions de traitement et de suivi radiologique. Dans le cadre spécifique de la radio-oncologie comparative, le modèle canin semble particulièrement adapté car il présente une réponse clinique à la RT similaire à celle des patients (apparition de rechutes tumorales locales), des modalités de traitement proches (dose variant de 35 à 54.5 Gy délivrée en fractions de 2 Gy) et des facteurs de radiorésistance extrinsèque identiques (hypoxie tissulaire associée au grand volume tumoral) (Spugnini et al. 2000).

Même si le Chien apparaît comme un modèle d'étude pertinent des gliomes, son utilisation en préclinique pour évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie thérapeutique destinée à l'Homme ne pourra être envisageable qu'après validation de

preuves de concept indispensables que sont (i) l'efficacité de cette nouvelle stratégie thérapeutique sur les cellules gliomateuses canines et (ii) l'homologie de réponse au traitement entre cellules gliomateuses humaines et canines. La validation de ces preuves de concept doit se faire *in vitro* sur un spectre de lignées cellulaires de gliomes canins suffisamment large pour assurer une représentativité adéquate de l'hétérogénéité génétique de ces tumeurs. Ces dernières permettront non seulement d'évaluer la réponse des tumeurs à la nouvelle stratégie testée, mais également de différencier les lignées sensibles, des résistantes et d'identifier les facteurs moléculaires à l'origine de ce différentiel de réponse.

2. Les lignées cellulaires de gliomes canins comme modèle d'étude *in vitro*

Jusqu'à présent, quatre lignées cellulaires établies à partir de gliomes canins ont fait l'objet de plusieurs publications : les J3T, J3TBg, SDT3 et G06A (Tableau 4). Les cellules J3T ont été utilisées pour établir des modèles animaux de gliomes canins (Berens et al. 1999; Rainov et al. 2000a; Inoue et al. 2012), et toutes ces lignées cellulaires se sont montrées utiles dans la compréhension des mécanismes oncogéniques des gliomes de haut-grade canins (Dickinson et al. 2016; York et al. 2012; Boudreau et al. 2015; Chen et al. 2012), dans l'évaluation de leur sensibilité à différents chimiothérapeutiques (Lai et al. 2017), thérapies ciblées (Debinski et al. 2013; Schlein et al. 2019; Feldhaeusser et al. 2015; York et al. 2018) et vecteurs viraux (Rainov et al. 2000b), ainsi que dans l'évaluation de leur profil miRNA en réponse à l'hypoxie (Koehler et al. 2020). Récemment, une nouvelle lignée de gliome canin appelée Raffray, dérivée d'une tumeur initialement classée comme oligodendrogliome anaplasique chez un Boxer de 7 ans, a été développée dans un laboratoire Français (Dupont-Monod 2014).

Ces lignées cellulaires sont utilisées au sein des laboratoires qui les ont isolées et ne sont pas disponibles dans une banque de cellules. Seules les J3T ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique et génotypique publiée. Le Tableau 4 récapitule l'origine de ces lignées et les différentes analyses qui ont été réalisées dessus, en se concentrant sur les critères de caractérisation cellulaire.

Tableau 4 : *Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires.*

		J3T	J3T-Bg	SDT-3	G06A	RAFFRAY
Tumeur d'origine						
		Astrocytome anaplasique d'un Boston Terrier mâle de 10 ans (Berens et al., 1993)	Lignée dérivée à partir des J3T après un passage sous-cutané sur souris Beige Nude XID (York et al. 2012)	GBM d'un Bouledogue anglais mâle de 12 ans (York et al. 2012)	GBM d'un berger australien, femelle stérilisée, de 2 ans (York et al. 2012)	Oligodendrogliome anaplasique d'un boxer de 7 ans (Dupont-Monod, 2014)
Caractérisation						
(I) Méthodes pour démontrer l'identité d'une lignée cellulaire	Empreinte ADN/ *Profiling*	-	-	-	-	-
	Analyse cytogénétique, caryotype	Nombre modal de chromosomes = 84 7 chromosomes métacentriques et submétacentriques + 1 petit chromosome acrocentrique non apparié	-	-	-	-
(II) Méthodes pour mettre en évidence l'espèce d'origine de la lignée cellulaire	-Analyse d'isoenzymes -Microsatellites -Caryotype	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine	-	-	-	-
(III) Méthodes pour mettre en évidence les caractéristiques générales d'une lignée cellulaire	Morphologie	Astrocytaire	-	-	-	-
	Temps de doublement	- 49 heures (Berens et al., 1993) - 28 heures (Rainov et al. 2000a)	-	-	-	-
	Clonage sur plastique/En agar	-	-	-	-	-

	Profil d'expression de protéines	- 90 % des cellules sont fortement GFAP + - Quelques cellules sont très positives à EGFR, avec un pattern diffus	-	-	-	- Vimentine +++ - GFAP + et inconstant - Olig2 négatif - S100 négatif
		J3T	**J3T-Bg**	**SDT-3**	**G06A**	**RAFFRAY**
(IV) Méthodes pour confirmer la tumorogénicité d'une lignée cellulaire	Conservation du pattern histologique lors de transplantation sous-cutanée chez la souris	Même profil histologique mais devient faiblement GFAP + après transplantation	-	-	-	-
(V) Méthodes pour déterminer le profil de sensibilité aux traitements d'une lignée cellulaire	Evaluation de la chimiosensibilité	**Hygromycine, puromycine, ganciclovir, G418** (Rainov et al. 2000a)	**Pt(iv)-prodrogue de cisplatine, cisplatine** et **carboplatine** (Feldhaeusser, et al., 2015) **CCNU, CPT-11 et TMZ** (LeBlanc et al. 2016)	**CCNU, CPT-11** (Boudreau et al. 2015)	**CCNU, CPT-11** **IL-13 canin couplé à une cytotoxine** (Debinski et al. 2013)	**Doxorubicine**
	Evaluation de la radiosensibilité	-	-	-	-	-
Étude moléculaire				**Perte gènes : CDKN2A, CDKN2B, NF1** **Gain gènes : EGFR, EREG, EPGN,PIK3CA, AKT1, FZD6, GLI4, EPHA5** (Dickinson et al.2016)	**Perte gènes : CDKN2A, CDKN2B, EREG, EPGN, FAS, EPHA5** (Dickinson et al.2016)	
		Pas de mutation des exons 3 à 9 sur *TP53* (York et al. 2012)				

La revue bibliographique sur les lignées cellulaires de gliome canin révèle que peu de données relatives à la caractérisation sont disponibles. Il sera donc nécessaire de pallier ce manque avant toute étude sur ces lignées cellulaires.

D'autre part, la réponse radio-induite de ces lignées n'a jamais été évaluée. Pourtant, dans la mesure où la RT est une modalité thérapeutique incontournable dans le traitement des gliomes et que les nouveaux traitements testés sont généralement associés à la RT, il semble indispensable d'évaluer l'homologie de réponse radio-induite entre gliomes canins et humains avant d'utiliser le chien comme modèle d'étude pour l'Homme.

Afin de compléter l'arsenal d'outils diagnostiques et thérapeutiques à disposition des médecins, les nanoparticules, et en particulier les nanotubes de carbone (NTC), font l'objet d'une attention particulière dans de nombreuses équipes de recherche. En effet, ces NTC présentent des propriétés physiques particulières qui pourraient être utilisées dans de nombreuses applications biomédicales telles qu'en imagerie en tant que biomarqueurs, ou en thérapeutiques pour cibler les cellules tumorales.

Ainsi, dans la partie qui suit, nous allons étudier la structure et les différentes propriétés des NTC, à l'origine des différentes applications que nous décrirons dans un deuxième temps.

C. Les nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone sont des éléments de taille nanométrique, découverts il y a bientôt 30 ans par Iijima, en 1991, lors de la synthèse de fullerènes par arc électrique (Iijima 1991). Ce sont des structures tubulaires constituées d'une ou plusieurs couches de graphène, enroulées sous forme de cylindre, ce qui peut impacter leurs propriétés. En effet, il existe les NTC simples (SWNT) avec un seul feuillet de carbone, et les NTC multiples (MWNT) qui sont constitués de plusieurs feuillets de carbone, disposés de manière concentriques. Ces différents NTC vont avoir des propriétés intrinsèques, utiles dans certaines applications médicales ou industrielles. Cependant, les NTC peuvent être fonctionnalisés, c'est-à-dire que l'on peut « greffer » à leur surface un très grand nombre de molécules (ADN, molécule chimiothérapique, agent de solubilisation, fluorophore) permettant d'améliorer leurs propriétés, telles que leur dispersibilité, leur ciblage cellulaire ou leur capacité à être détectées en imagerie médicale.

Ainsi, au cours de cette partie, nous présenterons les différentes structures des NTC, puis nous aborderons les différentes techniques de synthèse, de fonctionnalisation des NTC et leurs différentes applications biomédicales. Nous étudierons également les outils permettant de les caractériser, et de les détecter *in vivo* et enfin, nous considèrerons l'intérêt des NTC dans l'approche diagnostique et thérapeutique des gliomes.

1. Structure des nanotubes de carbone

a) Une nouvelle forme allotropique du carbone

Le carbone est un élément ubiquitaire, présent dans des composés inorganiques tels que le dioxyde de carbone (CO_2) ou le méthane (CH_4), mais aussi dans une grande variété de composés organiques (protéines, lipides, glucides). De plus, certains éléments sont exclusivement constitués de carbone : on parle des formes allotropiques de carbone, représentées sur la Figure 16.

Parmi les plus connues, on reconnaît le diamant, matériau naturel le plus dur connu à ce jour, et le graphite dont la dureté est à l'opposé de celle du diamant. La différence entre ces deux structures cristallines du carbone repose sur l'hybridation du

carbone. Dans le diamant, les atomes de carbone sont hybridés de type sp^3 et forment des liaisons covalentes simples entre eux et se disposent de façon tétragonale. L'organisation du graphite est différente et se compose de feuillets de graphène, eux-mêmes constitués d'un réseau hexagonal de carbone hybridé sp^2, qui forment des liaisons covalentes entre eux. Ainsi, ces feuillets adoptent une structure en nid d'abeille plane, dont la cohésion est assurée par des liaisons faibles de type π-π. Cette liaison repose sur l'interaction des noyaux aromatiques des différents feuillets de graphène et définit une distance entre les feuillets de 3,4 Å.

A l'état naturel, il existe deux autres formes allotropiques du carbone : le carbone amorphe, où les atomes de carbone sont désorganisés, et la lonsdaléite, qui a une structure cristalline proche du diamant (Falcao, Wudl 2007).

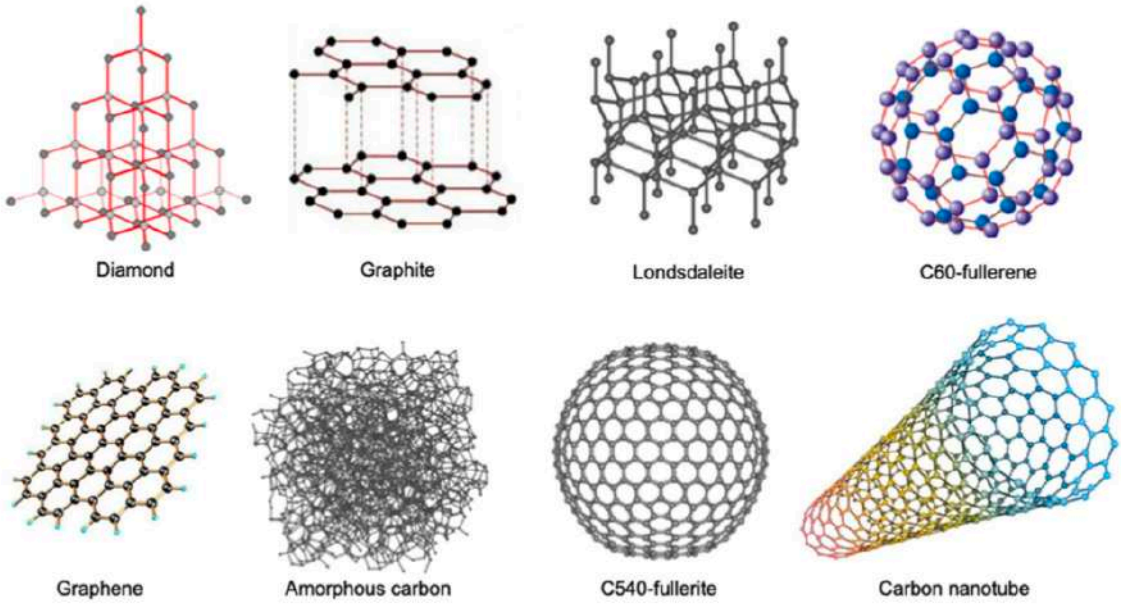


Figure 16 : *Représentation moléculaire des différentes allotropiques du carbone (d'après Negri et al. 2020)*

De nouvelles formes allotropiques du carbone ont été créées artificiellement à partir des années 1980. Les fullerènes C_{60} ont été synthétisés en 1985 par ablation laser du graphite et prennent la forme d'une sphère composée de 60 atomes de carbone, à l'image d'un ballon de football comme le décrit Kroto et son équipe (Kroto et al. 1985). Les nanotubes de carbone, découverts par Iijima en 1991, se formaient sur l'anode utilisée pour l'arc électrique lors de la synthèse des fullerènes. L'analyse au microscope électronique à transmission de ces éléments a montré une structure tubulaire, formé par l'enroulement d'un nombre variable de feuillets de graphène. Ce

sont donc des cylindres creux fermés à leur extrémité par un demi-fullerène, avec des défauts pentagonaux qui permettent de former les pointes. Bien que la structure des NTC soit un réseau hexagonal de carbone sp^2 issu du graphène, on peut trouver des défauts tels que des carbones hybridés sp^3, ou des paires heptagone-pentagone au sein du réseau hexagonal. Ces points de faiblesse, formés lors de la synthèse du NTC, sont responsables de courbures des NTC et peuvent être des sites de fonctionnalisation afin d'ajouter de nouveaux groupes fonctionnels sur les parois (Hirsch 2002).

b) Classification des nanotubes de carbone

Les NTC sont des structures tubulaires creuses formées d'une ou plusieurs couches de graphène, enroulée(s) en cylindre. Ainsi, nous pouvons classer ces nanotubes selon le nombre de feuillets de graphène qui les composent ; ces différents NTC sont représentés dans la figure 18. Les nanotubes de carbone monoparoi ou Single-Walled carbon NanoTubes (SWNT) sont formés d'une seule feuille de graphène, dont le diamètre varie entre 0,4 et 4 nm. Ils ont été synthétisés pour la première fois en 1993 par deux équipes indépendantes dont les travaux ont été publiés dans la même revue (Iijima, Ichihashi 1993; Bethune et al. 1993).

Les nanotubes de carbones multiparois ou Multi-Walled carbon NanoTubes (MWNT) sont constitués de plusieurs couches de graphène, formant des couches concentriques dont le nombre varie entre 2 et 50, comme on peut l'observer sur la Figure 17 ci-contre. Ainsi, les diamètres de ces MWNT varie entre 2 et plus de 100 nm et la distance entre chaque couche, de 3,4 Å, suit la même règle d'interaction faible π-π que celle entre les feuillets de graphène dans le graphite. Enfin, les nanotubes de carbone bi-parois ou Double-Walled carbon NanoTubes (DWNT) sont des structures intermédiaires entre les SWNT et les MWNT, avec des propriétés communes à ces deux formes de NTC.

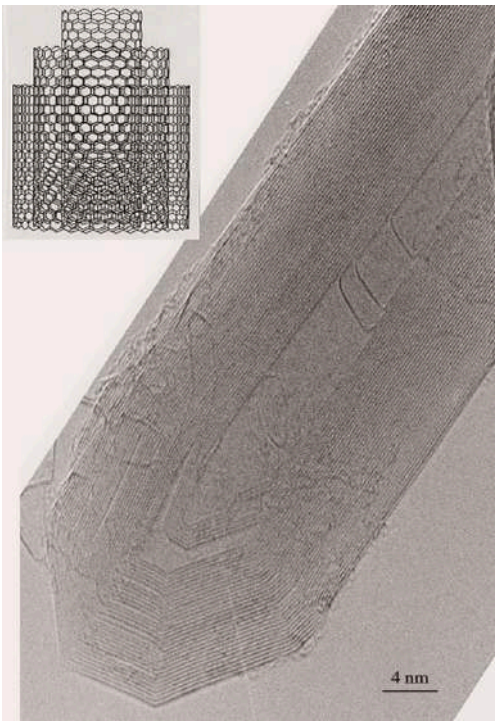


Figure 17 : *Image au microscope électronique à transmission d'un MWNT en vue longitudinale, montrant l'embriquement des feuillets de graphène*

Les SWNT et les DWNT ont tendance à se rassembler pour former des cordes, dont la longueur peut être de l'ordre de plusieurs centaines de micromètres, tandis que les MWNT ont tendance à s'agglomérer en des amas non-ordonnés (Eatemadi et al. 2014).

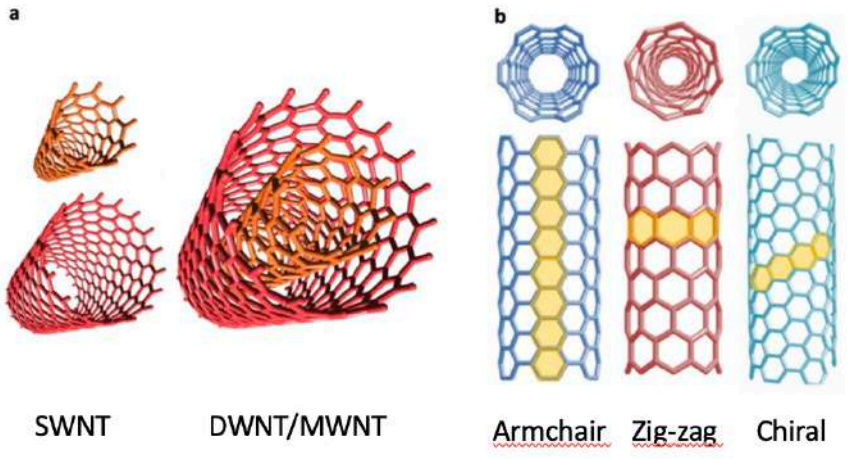


Figure 18 : *Classification des nanotubes de carbone (a) selon le nombre de parois où on peut distinguer les SWNT des DWNT/MWNT (b) selon le type d'enroulement des feuillets de graphène airmchair, zig-zag ou chiral (d'après Negri et al. 2020)*

Par ailleurs, une deuxième classification des NTC repose sur l'enroulement du feuillet de graphène qui peut avoir un impact sur leurs propriétés. En effet, cet enroulement se fait selon un vecteur, appelé vecteur d'hélicité et selon un certain angle, variant entre 0 et 30°. On peut ainsi définir trois catégories de NTC, représentés sur la figure 18 ci-dessus :

- NTC de type *armchair*
- NTC de type zigzag
- NTC de type chiral

Ces types de NTC n'auront pas les mêmes propriétés physiques ni électroniques. Par exemple, les NTC de type *armchair* auront toujours des propriétés métalliques, tandis que les autres formes seront soit métalliques, soit semi-conducteurs.

2. Synthèse des nanotubes de carbone et purification

Plusieurs techniques de synthèse de NTC ont été développées. Bien que différents, tous ces procédés nécessitent les mêmes éléments :

- Une source de carbone, gazeuse ou solide,
- De l'énergie, sous forme de chaleur ou de pression,
- Un catalyseur

Nous l'avons vu précédemment, la synthèse de fullerènes par arc électrique est la technique qui a permis de découvrir les NTC au début des années 1990. Cette technique a ensuite été utilisée pour former des NTC ; elle repose sur la création d'un arc électrique entre deux électrodes de graphite, sous une atmosphère réduite en gaz inerte. Elle se fait à des températures élevées, pour former un plasma dans la chambre de réaction, où le carbone de l'anode va être vaporisé, avant de former des NTC sur la cathode, ainsi que des produits secondaires. Cette technique va permettre la synthèse de MWNT mais également de SWNT si l'on ajoute des catalyseurs métalliques (Cobalt, Nickel,…) avec le graphite au niveau de l'anode (Popov 2004; Journet et al. 1997). Cette synthèse par arc électrique a l'inconvénient de produire de nombreux autres produits que les NTC qui nécessiteront des étapes de purification supplémentaires.

Une deuxième technique synthèse de NTC peut se faire par ablation laser et repose elle aussi sur des températures élevées. Cette méthode consiste à exposer une pastille de graphite contenant des catalyseurs à un faisceau laser de haute énergie dans un four maintenu à 1200°C, sous atmosphère inerte. Ce faisceau va vaporiser le graphite et amener à la formation de NTC, et d'autres produits carbonés, entrainés par un flux gazeux dans un collecteur où ils sont filtrés et refroidis (Guo et al. 1995). De nombreux paramètres peuvent influencer la structure des NTC tels que la composition et la pureté de la pastille du graphite, la température du four ou les propriétés du laser. L'ajout des catalyseurs dans la pastille de graphite est essentiel à l'obtention de SWNT. Cette technique de synthèse permet de fournir des NTC avec une pureté élevée, mais elle n'est pas avantageuse d'un point de vue économique et la quantité de NTC synthétisé est faible.

A ce jour, la technique standard pour former des NTC (SWNT, DWNT et MWNT) en grandes quantités est la synthèse par Dépôt Chimique Catalytique en phase Vapeur (CCVD). Cette méthode repose sur la décomposition chimique d'un composé carboné (hydrocarbures, CO) sur des nanoparticules, à des températures comprises

entre 600 et 1200°C. En utilisant cette approche, il est possible de contrôler avec précision la longueur, le diamètre ainsi que l'alignement des NTC (Rodriguez 1993). Le procédé de synthèse consiste à faire circuler un flux de gaz carboné (méthane CH_4, acétylène C_2H_2 ou propylène C_3H_6) avec un mélange de dihydrogène H_2 dans une proportion donnée, sur des nanoparticules catalytiques, au sein d'un four. A partir d'une certaine température (variable selon le type de gaz, sa concentration ainsi que le catalyseur utilisé) la décomposition catalytique a lieu au contact des nanoparticules métalliques. C'est en leur surface que le carbone va diffuser jusqu'à dépasser sa solubilité limite puis précipiter en formant un chapeau de graphène. Celui-ci va venir coiffer le NTC lorsque celui-ci va se mettre à croître. Si plusieurs chapeaux se forment à la surface de la nanoparticule, plusieurs feuillets vont se former, amenant à la formation d'un MWNT. Ainsi, la taille de la nanoparticule influe sur le diamètre du NTC. De plus, les particules de catalyseur peuvent se retrouver sur l'extrémité des NTC une fois la synthèse terminée (Bhushan 2004). Généralement, ces catalyseurs sont des nanoparticules métalliques utilisées seules (le nickel, le cobalt ou le fer) ou en combinaison (cobalt/molybdène) (Cassell et al. 1999). Ces nanoparticules peuvent être générées et stabilisées au sein d'une poudre composite inerte faite de MgO ou d' Al_2O_3 permettant ainsi de limiter la coalescence des nanoparticules métalliques (Flahaut et al. 1999).

3. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone

Suite à la synthèse des NTC, des nanoparticules métalliques peuvent être retrouvées dans l'échantillon. Celles-ci doivent être retirées car elles peuvent interagir avec les cellules lors d'utilisations biologiques des NTC. De plus, les NTC bruts ont tendance à s'agglomérer entre eux, du fait d'une énergie de surface élevée, et des interactions de type van der Waals entre les nanotubes. Ainsi, les NTC bruts sont peu dispersibles dans un milieu aqueux, ce qui limite leur application biomédicale. Il est donc indispensable de modifier leurs propriétés par une étape dite de fonctionnalisation des NTC. Elle permettra par exemple d'augmenter leur diffusion, leur dispersibilité ou encore de réduire leur toxicité…

Il existe deux manières de catégoriser les fonctionnalisations de NTC. La première repose sur la localisation de cette fonctionnalisation. La fonctionnalisation endohédrique correspond aux modifications apportées sur la face interne du NTC. Il n'y a pas de liaisons entre le NTC et les groupes fonctionnels lors de fonctionnalisation

endohédrique, cela correspond à un remplissage du tube. Ce remplissage a été fait pour la première fois avec de l'eau par capillarité hydrique, mais il peut aussi être rempli par des molécules hydrophobes (Ajayan, Iijima 1993; Campo et al. 2016). Cette approche endohédrique reste cependant limitée du fait du faible volume dans le NTC, qui ne peut être rempli que par des composés de petites tailles. Par opposition, la fonctionnalisation exohédrique fait référence aux ajouts de fonctions sur la surface externe des NTC.

Ces fonctionnalisations peuvent être de nature covalente ou non-covalente. L'ajout de fonctions covalentes va modifier la surface du NTC de façon durable, et donc modifier ses propriétés intrinsèques, tandis que les liaisons non-covalentes préservent le squelette du NTC et reposent sur les interactions d'empilement π-π et/ou les forces de Van der Waals.

a) Purification des nanotubes de carbone

La purification des NTC constitue la première étape de fonctionnalisation des NTC, car la majorité des méthodes de synthèse ne permettent pas d'obtenir des NTC purs. Ils sont mélangés avec les résidus de catalyseurs métalliques et des produits secondaires du carbone tels que de la suie, du carbone désorganisé, du graphite… Les nanoparticules métalliques doivent généralement être retirées car elles sont réactives et peuvent causer des lésions cellulaires, ce qui limite l'utilisation des NTC dans un contexte biomédical. Cette purification repose principalement sur des traitements par oxydation en solution, utilisant du HNO_3 seul ou mélangé avec du H_2SO_4 concentré selon le rapport de dilution (1 : 3), pendant plusieurs heures.

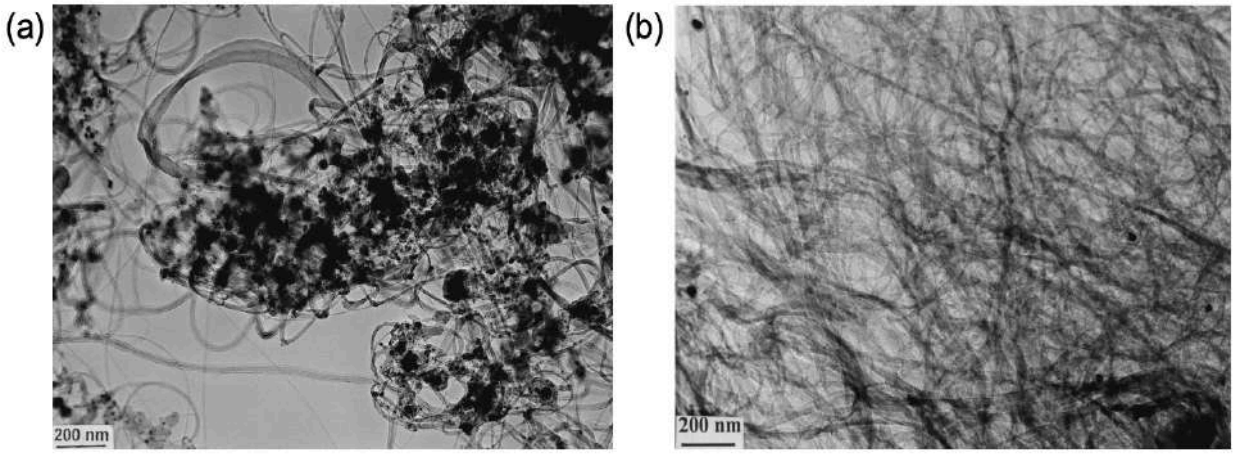


Figure 19 : *Images obtenues au microscope électronique à transmission de SWNT avant et après purification. (a) Échantillon de SWNT avec un grand nombre d'impuretés. (b) SWNT après traitement de purification (HNO_3 et H_2SO_4) où la plupart des impuretés ont disparu (d'après Monthioux et al. 2001)*

L'utilisation de ces traitements permet d'éliminer les nanoparticules métalliques sur des SWNT ou des DWNT, comme nous pouvons le voir sur la Figure 19 (Monthioux et al. 2001; Zhang et al. 2007). Ces traitements permettent aussi d'éliminer certaines espèces carbonées (Bortolamiol et al. 2014).

Cette purification des NTC peut également se faire en utilisant d'autres solutions oxydantes telles que du $KMnO_4$ ou du $K_2Cr_2O_7$, associé à de l'acide sulfurique (Aitchison et al. 2007; Wang, Wang, Qu 2011). La limite de cette technique repose sur le fait que les traitements oxydants s'attaquent aux défauts de structure des NTC, entrainant ainsi l'ajout de groupements fonctionnels (carboxyles, hydroxyles) ou encore le raccourcissement des NTC (Bortolamiol et al. 2014).

Pour ce qui est de la technique de Dépôt Chimique Catalytique en phase Vapeur (CCVD), la purification des NTC présents dans la poudre composite, passe par l'élimination des nanoparticules métalliques et du support inerte. Ceci requière l'utilisation de traitements agressifs telles que des solutions caustiques chaudes (KOH, NaOH) pour l'élimination d'Al_2O_3 ou HF pour l'élimination du SiO_2. Cependant, ils n'éliminent pas les impuretés métalliques ni les produits carbonés secondaires. À noter que l'utilisation d'une solution solide de MgCoO associée à du molybdène permet la synthèse de NTC d'une très bonne qualité avec la technique de CCVD. Dans ce cas, la purification se fait par un lavage avec une solution aqueuse de HCl, qui est rapide et sûre, sans modification structurale des NTC. Ce lavage élimine la majeure partie de la poudre composite, à l'exception de nanoparticules de Cobalt encapsulées dans des oignons de carbone, qui sont totalement inertes (Flahaut et al. 2000). Les NTC obtenus sont très majoritairement des DWNT (80%) (Flahaut et al. 2003).

b) Fonctionnalisation covalente

La fonctionnalisation covalente des NTC implique l'ajout de nouvelles liaisons chimiques qui vont modifier leur structure. Ainsi, l'hybridation des atomes de carbone va changer et passer de sp^2 à sp^3, ce qui va modifier les différentes propriétés des NTC, en particulier des SWNT. Afin de limiter cette altération structurale et cette perte de fonction, les DWNT semblent plus prometteurs. En effet, ils appartiennent aux MWNT mais avec un nombre de parois minimal, égal à deux. Ainsi, leur diamètre très proche des SWNT leur confère des propriétés équivalentes. La fonctionnalisation des DWNT n'affecte que la paroi externe, tandis que la paroi interne reste intègre permettant ainsi de conserver les propriétés intrinsèques des NTC.

Malgré cet inconvénient, la fonctionnalisation covalente reste très intéressante car elle permet une fixation forte et durable de groupes fonctionnels très variables (Dyke, Tour 2004). Ces groupes fonctionnels peuvent augmenter la dispersibilité des NTC dans les solvants, favoriser leur diffusion dans les tissus biologiques, ou apporter des propriétés supplémentaires, utiles dans les applications biomédicales. Singh et al. résument les principales techniques utilisées pour fonctionnaliser les NTC, présentées sur la Figure 20 (Singh et al. 2009).

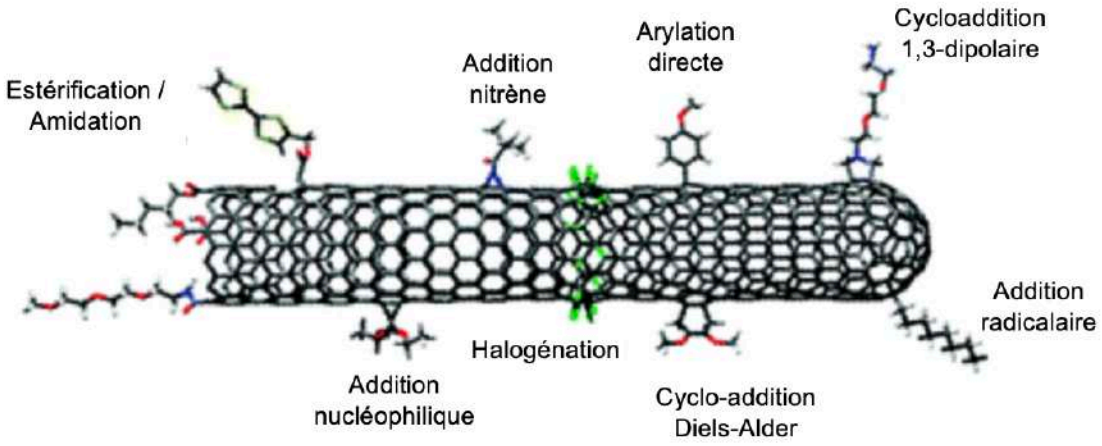


Figure 20 : *Résumé des différentes techniques de fonctionnalisation covalente des NTC (d'après Singh et al. 2009)*

Ces techniques de fonctionnalisation permettent par ailleurs d'augmenter la réactivité des NTC. À titre d'exemple, l'halogénation apporte des groupements fluor sur la surface externe et crée des liaisons faibles C-F qui peuvent ensuite être utilisées pour des fonctionnalisations secondaires (Mickelson et al. 1998).

Nous l'avons vu précédemment, lors de leur synthèse, les NTC peuvent présenter des défauts structuraux au niveau de leurs parois latérales ou de leurs extrémités. Durant l'étape de purification, l'utilisation de solutions agressives telles que H_2SO_4/HNO_3 sont peu sélectives et vont oxyder l'ensemble des défauts de surface, ainsi qu'un nombre conséquent de doubles liaisons entre les atomes de carbone. L'utilisation de K_2FeO_4 permet d'oxyder uniquement les défauts de structure, sans détruire d'autres doubles liaisons, préservant ainsi les propriétés des NTC (Zhang, Xu 2015). Ces sites oxydés pourront être des sites d'estérification ou d'amidation secondaire, utiles à la fonctionnalisation.

c) *Fonctionnalisation non-covalente*

Les fonctionnalisations non-covalentes n'impliquent pas la formation de nouvelles liaisons chimiques, ce qui préserve l'hybridation sp^2 des atomes de carbone, et permet le maintien des propriétés des nanotubes. L'établissement de ces liaisons non-covalentes s'appuie sur des interactions faibles entre le NTC et les particules comme les forces de Van der Waals, les interactions π-π ou électrostatiques. Lors de modifications de facteurs du milieu, tels que la température, le pH ou le solvant, les groupes fonctionnels peuvent se détacher des tubes de carbone. D'un point de vue médical, cette fonctionnalisation réversible est intéressante puisqu'en pénétrant dans les cellules, les NTC vont dans certains cas subir une variation de pH et les molécules adsorbées à sa surface vont se détacher et diffuser dans le cytoplasme.

La catégorisation des fonctionnalisations non-covalentes peut se faire soit selon les molécules qui s'y adsorbent soit selon les interactions mises en jeu.

Les dérivés aromatiques tels que le pyrène, les dérivés de la porphyrine ou les macrocycles aromatiques peuvent fonctionnaliser les parois latérales des NTC grâce aux interactions π-π. Ceci est permis par le caractère électronique et aromatique de ces molécules. Ainsi, l'addition d'aminopyrènes à des MWNT modifie leur propriétés électromagnétiques : ces NTC fonctionnalisés vont aligner leur grand axe parallèlement au champ magnétique, ce qui pourrait avoir des applications en IRM (Calle et al. 2018). Les molécules fluorescentes sont des molécules qui peuvent se fixer de manière non-covalente à la paroi des NTC. En effet, leur composition

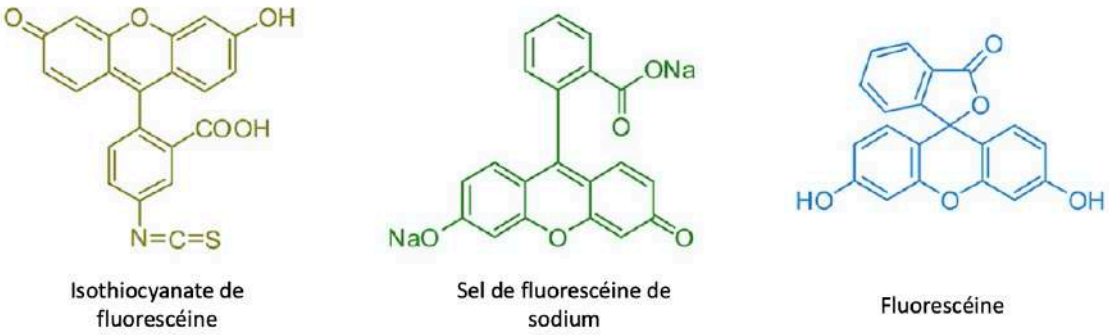


Figure 21 : *Structure des molécules fluorescentes utilisées dans la fonctionnalisation non-covalente des NTC (d'après Koh et al., 2012)*

aromatique et conjuguée permet d'avoir une interaction de type π-π avec les NTC, comme on peut le voir sur la figure 21. Ces fluorophores vont s'adsorber à la surface des NTC et améliorer leur dispersion dans une solution aqueuse. Le FITC est le

fluorophore qui disperse le mieux les NTC par rapport aux autres marqueurs. De plus, le marquage cellulaire est augmenté lorsqu'il est associé aux NTC par rapport à un marquage classique sans NTC (Koh et al. 2012).

Les tensioactifs forment le deuxième groupe de molécules capables de fonctionnaliser les NTC de manière non-covalente. En effet, ce sont des molécules amphiphiles qui possèdent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. La queue de ces molécules va ainsi s'enrouler autour du NTC, tandis que la tête va interagir avec le solvant. Si la queue possède des fragments aromatiques tels que le SDBS, des interactions supplémentaires π-π vont renforcer l'adsorption de ces molécules. Les tensio-actifs, comme le polyéthylène glycol (PEG) sont largement utilisés pour disperser les NTC dans des solutions aqueuses (Singh et al. 2012).

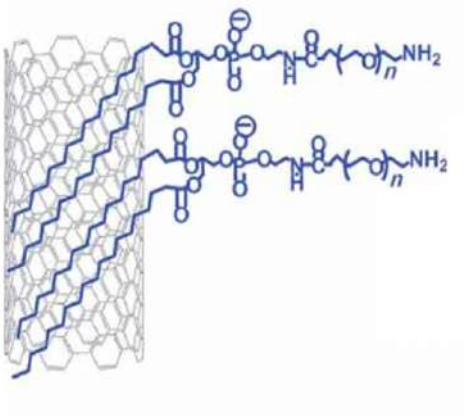


Figure 22 : *Fonctionnalisation de NTC par du phospholipide-PEG (d'après Liu et al., 2009)*

Enfin, de nombreuses biomolécules, issues du corps humain, peuvent fonctionnaliser les NTC, ce qui peut avoir des applications médicales intéressantes. De nombreuses protéines peuvent fonctionnaliser les NTC ; en particulier, les protéines possédant des acides aminés aromatiques comme le tryptophane. Ainsi, les protéines sériques vont interagir avec les NTC dans la circulation sanguine, et réduire leur cytotoxicité (Ge et al. 2011). L'ADN ainsi que ses dérivés, comme l'ARNm ou les siARN peuvent s'adsorber aux NTC, en formant des hélices autour du feuillet externe. Enfin, les phospholipides, sont des tensioactifs biologiques qui agissent comme les tensioactifs non-biologiques et sont utilisés pour disperser et stabiliser les nanotubes. Le phospholipide-PEG est une molécule intéressante car sa queue va s'enrouler autour du NTC, tandis que la tête peut subir des fonctionnalisations secondaires qui pourront avoir des applications cliniques variées, telles que le ciblage cellulaire, la délivrance de médicaments ou le radiomarquage (Figure 22) (Liu et al. 2009)

4. Caractérisation des nanotubes de carbone

Les différentes techniques de synthèse de nanotubes vont fournir des éléments hétérogènes. Ainsi, le diamètre, la longueur, le nombre de parois ou le type peuvent varier selon les échantillons. La caractérisation de ces produits de synthèse est une

étape préalable avant une utilisation ultérieure en biomédecine. Ces méthodes de caractérisation permettent d'évaluer les propriétés intrinsèques des NTC, d'identifier les fonctionnalisations covalentes, les défauts de structure, ainsi que d'estimer la présence des nanoparticules métalliques restantes. La caractérisation complète des NTC repose sur plusieurs techniques de caractérisation qui sont présentées succinctement ci-dessous

a) La spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique largement utilisée dans l'étude des NTC puisqu'elle fournit des informations à la fois qualitatives et quantitatives sur leur diamètre, leur pureté et leur structure. Elle est rapide, non destructive pour l'échantillon et ne nécessite pas de préparation. Cette approche étudie le déplacement en fréquence de photons, induit lorsqu'ils interagissent avec les NTC. Ainsi, on reconnait des bandes caractéristiques des NTC en spectroscopie Raman, visibles sur la Figure 23 suivante.

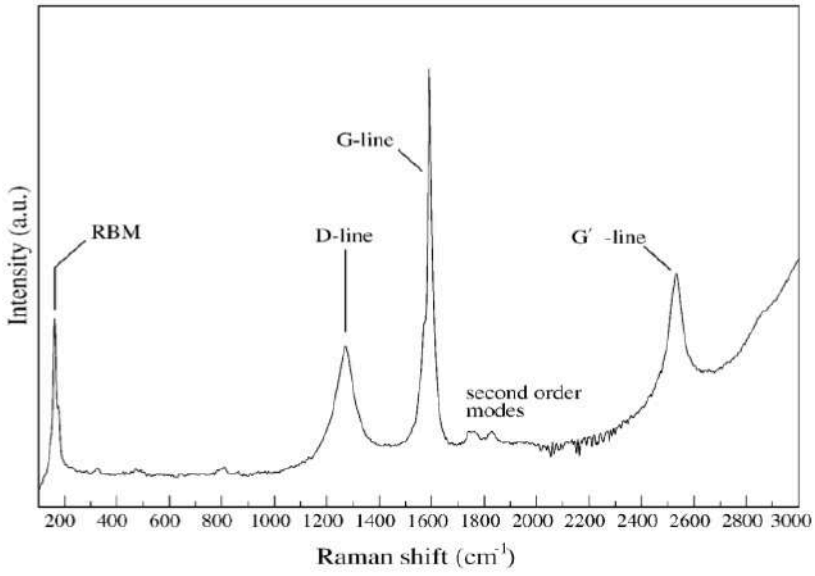


Figure 23 : *Spectre Raman de NTC montrant les bandes caractéristiques associées (d'après Belin et al, 2005)*

Les pics RBM (*Radial Breathing Mode)* présents à des fréquences inférieures à 200 cm^{-1} renseignent sur le diamètre des NTC. La bande G, de fréquence de l'ordre de 1600 cm^{-1}, est commune à toutes les formes de carbone sp^2. La bande D, avec une fréquence proche de 1340cm^{-1}, est révélatrice de la présence de défauts au sein du carbone hybridé sp^2. Le rapport entre les bandes D et G peut fournir des informations

quantitatives sur la proportion de défauts et les modifications apportées par les fonctionnalisations (Belin, Epron 2005; Dresselhaus et al. 2010).

b) *La microscopie électronique*

La microscopie électronique permet de visualiser directement la morphologie des NTC, à l'aide de deux techniques : la microscopie électronique à transmission (MET) et la microscopie électronique à balayage (MEB). On peut ainsi évaluer le nombre de parois qui les composent, mesurer les diamètres interne et externe, ainsi que la longueur des NTC. De plus, la microscopie électronique permet d'avoir une indication qualitative de la présence d'impuretés (métalliques et/ou carbonées) dans l'échantillon comme on peut le voir sur la figure 24 ci-dessous et sur la figure 19.a (Rodríguez-Manzo et al. 2009; Herrero-Latorre 2014).

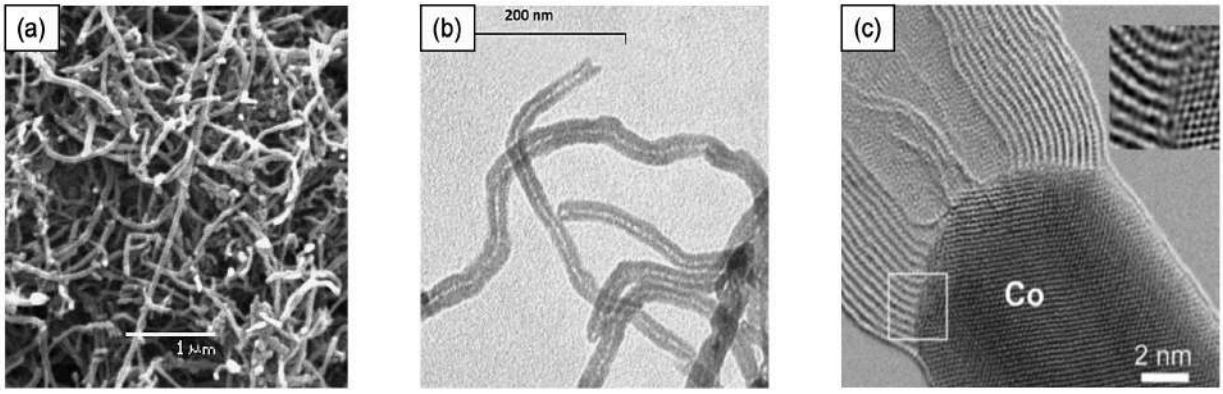


***Figure** 24 : Images de NTC obtenues par microscopie électronique (a) images obtenues au MEB (b) images obtenues au MET (c) images haute-résolution de MWNT lié à une nanoparticule de Cobalt (Co) au MET, où on peut dénombrer le nombre de parois (d'après Rodriguez-Manzo et al. 2009; Herrero-Latorre et al. 2014)*

c) *La microscopie à sonde locale*

Cette approche est une technique de microscopie qui permet d'évaluer le relief des NTC à l'échelle nanométrique. On peut distinguer plusieurs techniques issues de cette microscopie. La microscopie à force atomique permet l'évaluation de la rigidité et de la résistance des NTC, ainsi que leur taille. La microscopie à effet tunnel, elle, permet d'évaluer la structure atomique d'un nanotube et d'évaluer sa fonctionnalisation (Singh et al. 2009).

d) *Autres techniques de caractérisation des NTC*

La spectroscopie infrarouge est une technique complémentaire de la spectrographie Raman, elle fournit des informations sur les impuretés présentes à la surface des NTC, ainsi que sur les groupes fonctionnels présents à la surface lors de liaisons covalentes. Cependant, cette approche manque de sensibilité dans la détection de certains groupes fonctionnels et ne fournit pas de données quantitatives sur ces-derniers (Wepasnick et al. 2010).

La spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) et l'analyse thermogravimétrique permettent d'évaluer elles-aussi la concentration des fonctions qui sont liées à la surface des NTC. La technique XPS évalue l'énergie des photoélectrons éjectés des NTC suite à leur exposition aux rayons X (Okpalugo et al. 2005). L'analyse thermogravimétrique mesure les changements de masse des NTC lorsque la température varie. Cette analyse se base sur les températures de décomposition plus basses des molécules adsorbées, par rapport à un échantillon de NTC purs (Negri et al. 2020).

5. Toxicité des nanotubes de carbone

La toxicité induite par les nanotubes de carbone est un point largement étudié depuis de nombreuses années par différentes équipes de recherche à travers le monde, qui ne trouve pas de réponses claires à l'heure actuelle. En effet, la structure de certains nanotubes de carbone peut s'apparenter à des fibres d'amiante, ce qui peut générer des craintes pour la santé humaine. Cependant, les variations de type, de longueur, de fonctionnalisation sont autant de paramètres qui influent sur leur toxicité, ce qui fait qu'il est difficile d'arriver à un consensus.

La longueur des NTC semble jouer un rôle important dans leur toxicité. En effet, ceux dont la taille excède 10 µm perturbent les macrophages tissulaires et limitent leur capacité à les prendre en charge et à les déplacer. Ainsi ils peuvent s'accumuler et entrainer une toxicité locale chronique, comme au niveau des alvéoles pulmonaire où ils sont responsables de l'apparition de granulomes inflammatoires (Flahaut et al. 2018).

Par ailleurs, la fonctionnalisation des nanotubes de carbone permet d'influencer leur toxicité. En effet, des nanotubes fonctionnalisés sont plus dispersés, individualisés et peuvent facilement interagir avec les cellules et les tissus. Ils sont ainsi plus

facilement éliminés par les reins. Au contraire, des NTC peu fonctionnalisés vont avoir tendance à s'agréger entre eux et ils vont s'accumuler dans des organes filtres tels que le foie et la rate (Yang, Liu 2012; Menard-Moyon, Bianco 2014).

Les impuretés métalliques, issues de la synthèse des nanotubes de carbone, peuvent aussi s'avérer toxique pour l'organisme, en provoquant la formation de radicaux libres qui vont endommager le contenu cellulaire (Francis, Devasena 2018).

La fonctionnalisation va ainsi permettre d'une part d'éliminer les impuretés métalliques qui peuvent s'avérer toxiques pour les cellules, et d'autre part, elle permet d'améliorer leur dispersion et facilite ainsi leur élimination. L'interaction des NTC avec les protéines sériques par des liaisons non-covalentes permet aussi de modifier et de réduire leur toxicité.

6. Propriétés et différentes applications des NTC

La structure et la taille nanométrique des nanotubes de carbone confèrent un grand nombre de propriétés intéressantes dans les domaines industriels et médicaux.

S'agissant des propriétés exploitées dans des applications industrielles, les NTC présentent une résistance exceptionnelle à la déformation pour une masse largement inférieure à l'acier, et dans certaines conditions, leur dureté est supérieure à celle des diamants. De plus, ils peuvent transporter des densités de courant 100 fois supérieures aux métaux couramment utilisés comme le cuivre, ce qui en fait des candidats intéressant dans le domaine de la micro-électronique. La conductivité thermique des nanotubes de carbone est supérieure à celle du cuivre et du diamant ce qui les place parmi les meilleurs conducteurs thermiques connus à ce jour. Cette conductivité élevée est due principalement à la rigidité de ces structures composées de liaisons covalentes entre les atomes de carbone favorisant une transmission de la chaleur efficace (Marconnet, Panzer, Goodson 2013).

Dans le domaine biomédical, plusieurs propriétés sont retenues. Les nanotubes de carbone sont capables de pénétrer au sein des cellules, sans forcément avoir d'effets cytotoxiques. Il existe trois voies de pénétration dans les cellules, la première étant la phagocytose par des cellules qui en sont capables. Ils peuvent également diffuser au travers des membranes plasmiques grâce à leur petite taille et leur caractère hydrophobe. Enfin, ils peuvent pénétrer dans les cellules par des mécanismes actifs d'endocytose (Pantarotto et al. 2004; Nerl et al. 2011). Une fois

dans le cytoplasme cellulaire, ils peuvent interagir avec les organites cellulaires et s'accumuler en périphérie du noyau (Raffa et al. 2010). A l'image de la pénétration cellulaire par endocytose, les NTC peuvent être éliminés dans le milieu extracellulaire par la voie active de l'exocytose (Jin, Heller, Strano 2008).

Les NTC sont donc capables d'interagir avec les cellules et de pénétrer dans leur cytoplasme selon différentes voies, ce qui est en fait des candidats très intéressants pour des applications biomédicales comme agent de contraste avec différentes modalités d'imagerie ou comme agent thérapeutique.

(a) Imagerie

Les nanotubes peuvent être associés à des agents de contraste et être détectables avec différentes techniques d'imagerie. L'IRM est un outil d'imagerie puissant, qui permet de détecter des lésions dans des tissus apparemment sains avec une grande sensibilité et de manière non invasive. Les NTC peuvent, sur le principe, être visualisés en IRM sans fonctionnalisation préalable, grâce aux impuretés métalliques résiduelles. Cependant, on peut accentuer la prise de contraste en IRM en y associant du gadolinium, par fonctionnalisation endohédrique où les sels de gadolinium vont diffuser dans le NTC pour y former des nanocristaux 1D. Cette fonctionnalisation peut aussi se faire sur la surface des NTC *via* la fixation de polymères d'acide polyacrylique chargés en gadolinium, ce qui va d'une part augmenter leur dispersion et d'autre part améliorer leur visualisation en IRM (Rodríguez-Galván et al. 2020; Kuźnik, Tomczyk 2016).

Nous l'avons vu précédemment, des molécules fluorescentes, comme le FITC peuvent être greffées à la surface des NTC de manière covalente ou non-covalente. Ainsi, la fluorescence pourra être directement visible par microscopie à fluorescence ou confocale (Figure 25) (Bartelmess, Quinn, Giordani 2015).

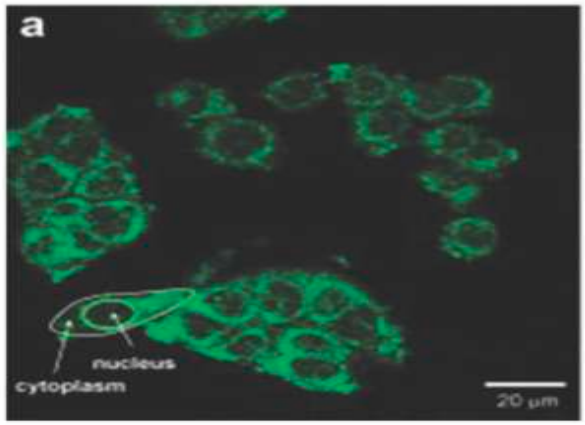


Figure 25 : *Image confocale de cellules WiDr incubées avec des SWNT-fluorescéine (émission mesurée à 500-530nm) (d'après Bartelmess et al., 2015)*

Par ailleurs, les NTC émettent une fluorescence intrinsèque dans un rayonnement proche de l'infra-rouge. Il est donc possible de les visualiser par microscopie de fluorescence infrarouge, sans fonctionnalisation au préalable. Des NTC purs incubés avec des macrophages, ont été excités à une longueur d'onde de 660nm, et une fluorescence a été émise dans des longueurs d'onde comprise entre 1125 et 1600nm. Cette fluorescence était localisée au niveau des phagosomes des macrophages ce qui a permis de mettre en évidence l'entrée des NTC dans la cellule par phagocytose (Cherukuri et al. 2004). De plus, les propriétés d'absorption du rayonnement proche infrarouge peuvent être utilisées pour évaluer la biodistribution des NTC, et être couplées à la photothérapie. Des NTC couplés à du polyéthylène glycol ont été injectés dans des tumeurs mammaires hétérotopiques chez des souris BALB/c. L'imagerie fluorescente infrarouge a été suivie au cours du temps et a montré une diffusion des NTC le long des vaisseaux lymphatiques jusqu'à un nœud lymphatique métastasique, où ils se sont accumulés, comme on peut le voir sur la figure 26. De plus, l'excitation des NTC est associée à un effet photothermique : on enregistre une augmentation de la température supérieure à 45°C dans les tissus, après deux minutes d'exposition au laser. Les souris qui ont reçues une irradiation au niveau de la tumeur primaire et de la métastase, ont une médiane de survie significativement supérieure aux souris du groupe contrôle, ce qui montre un effet significatif de la thérapie photothermique (Liang et al. 2014).

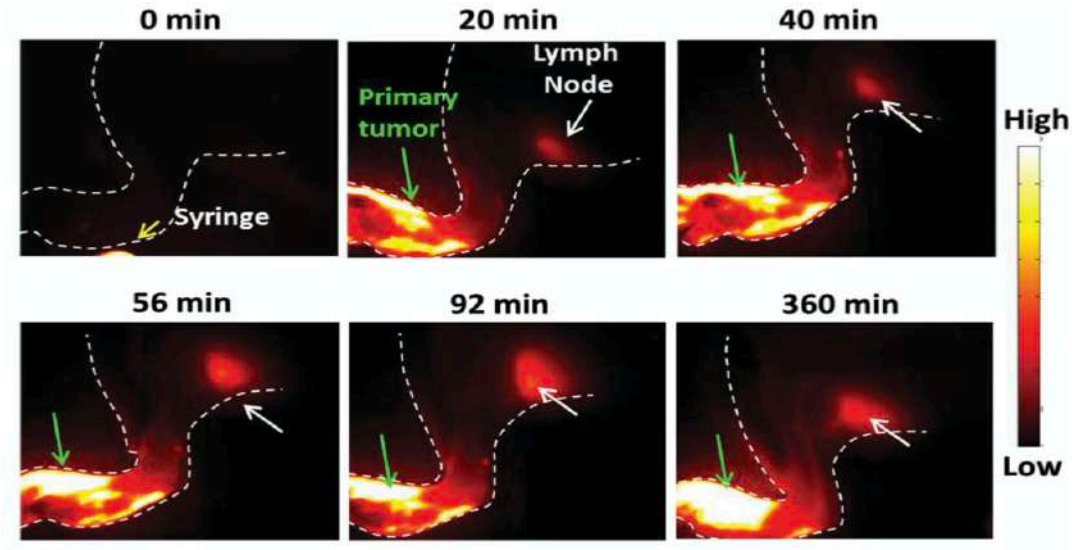


Figure 26 : *Suivi de la distribution de SWNT-PEG par fluorescence infrarouge au cours du temps. La flèche verte indique la tumeur primaire et la flèche blanche, le nœud lymphatique (d'après Liang et al. 2014)*

Les NTC peuvent être associés à des radio-isotopes tels que le ^{14}C, l'^{125}I ou ^{99m}Tc ce qui en font des agents de contraste prometteurs en médecine nucléaire. De plus, il peut être greffé sur ces NTC des anticorps qui vont cibler spécifiquement des épitopes surexprimés par des cellules cibles pour concentrer les radio-isotopes dans ces cellules et améliorer leur détection en tomographie par émission de positons (Figure 27) (Sanginario, Miccoli, Demarchi 2017).

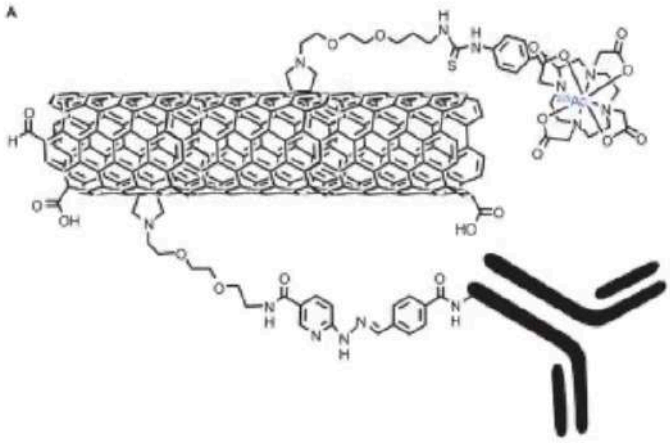


Figure 27 : *Double-fonctionnalisation d'un NTC associant un anticorps et un groupe portant un radio-nucléotide*

(b) Thérapeutique

Nous venons de le voir au cours du paragraphe précédent, les NTC peuvent aider à la détection de cellules cancéreuses en imagerie médicale en les fonctionnalisant avec un agent de contraste comme le gadolinium. Les NTC peuvent aussi être utilisés à but thérapeutique pour délivrer des médicaments au sein des cellules. Un grand nombre d'agents thérapeutiques peuvent être fonctionnalisés sur les NTC, de manière covalente ou non-covalente. Dans le cadre des traitements classiques du cancer par chimiothérapie, l'utilisation de ces médicaments engendre une toxicité générale car le produit ne cible pas spécifiquement les cellules tumorales. De plus, dans certains cas, ces médicaments diffusent peu dans ces cellules. Les NTC fonctionnalisés offrent l'opportunité d'améliorer la chimiothérapie, en ciblant spécifiquement les cellules tumorales et en permettant l'accumulation intracellulaire des agents de chimiothérapie, tout en réduisant leur toxicité générale. Un grand nombre d'agents anti-cancéreux ont été fonctionnalisés sur les NTC tels que des ARNsi, des chimiosensibilisateurs, des radiosensibiliteurs ou des antimétabolites (Wong et al. 2013). Des SWNT fonctionnalisés avec de l'acide hyaluronique et de la doxorubicine, ont été utilisés dans des modèles *in vitro* de cancer du sein, pour cibler les cellules surexprimant le marqueur CD44 et améliorer la délivrance de la doxorubicine. L'utilisation de ces NTC fonctionnalisés a montré une augmentation de la délivrance intracellulaire de la doxorubicine, associée à une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose (Dan Liu et al. 2019). Enfin, les NTC peuvent avoir des applications théranostiques en intégrant à la fois des capacités diagnostiques et thérapeutiques. Nous avons pu l'observer avec la photothérapie thermique où l'excitation des NTC en lumière infrarouge permet à la fois de localiser les NTC, mais aussi d'appliquer un traitement photothermique local. Cette approche théranostique peut être développée de façon plus précise, car de nombreux groupes différents peuvent être fonctionnalisés simultanément sur le même nanotube : ainsi, on peut greffer un groupe permettant de cibler des cellules, un groupe permettant de délivrer un médicament (anti-cancéreux, ARNsi). Ainsi, l'équipe d'Al Faraj a fonctionnalisé des SWNT à des fins théranostiques dans le cadre du traitement des cellules souches tumorales sur modèle animal. La surface des NTC a été fonctionnalisée avec des polyéthylène glycols (PEG) afin d'augmenter leur biocompatibilité. Puis ils ont été complexés avec du paclitaxel ou de la salinomycine qui sont des molécules anticancéreuses. La liaison de ces molécules au PEG est

sensible à des variations de pH, de manière à les libérer dans le cytoplasme, une fois que les SWNT ont pénétré dans la cellule. Enfin, des anticorps anti-CD44 sont conjugués avec le complexe de SWNT, pour améliorer le ciblage spécifique des cellules cancéreuses et particulièrement les cellules souches cancéreuses (Figure 28a).

Trois semaines après l'injection des cellules tumorales, les souris ont reçu trois injections intraveineuses à 3 jours d'intervalle, soit une combinaison des SWNT conjugués aux molécules anticancéreuses, soit un seul type de SWNT conjugué, soit les molécules libres. Les résultats ont montré un effet thérapeutique amélioré avec la thérapie combinée par rapport aux nanotubes combinés à une seule molécule ou aux molécules libres (Figures 28b, 28c, 28d) (Al Faraj et al. 2016).

Les NTC peuvent aussi être fonctionnalisés par des ARNsi qui vont être relargués dans le cytoplasme cellulaire où ils vont se fixer à leur ARNm pour les inactiver ou ils peuvent interagir avec l'ADN dans le noyau. Ceci va ainsi perturber la synthèse protéique et perturber les voies métaboliques, ce qui va conduire à l'apoptose cellulaire (Taghavi et al. 2017).

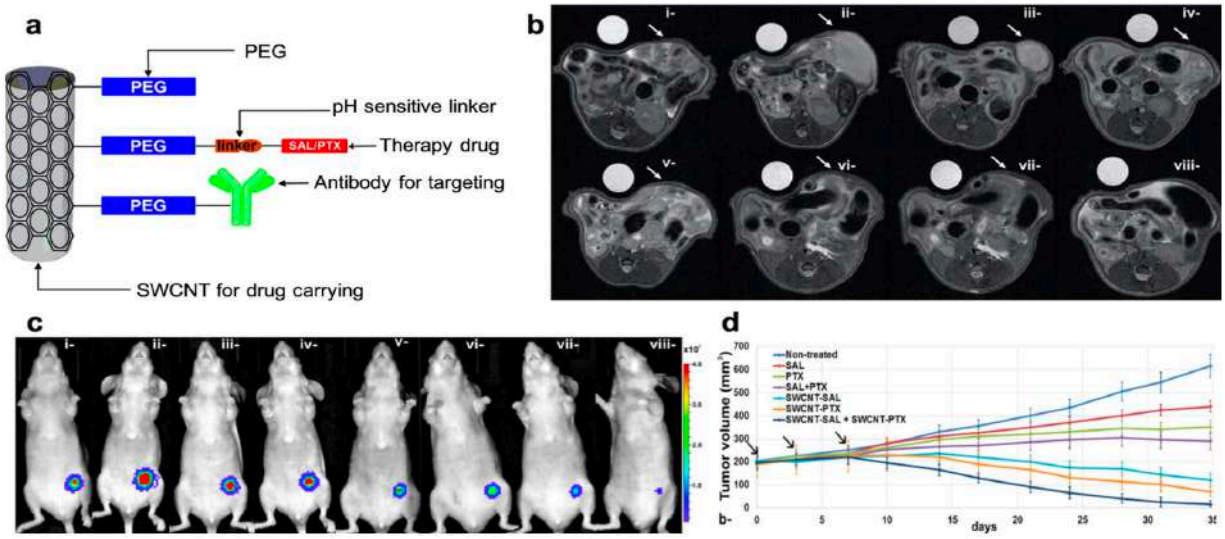


Figure 28 : *Évaluation de l'efficacité thérapeutique de SWNT conjugué (a), par évaluation IRM du volume tumoral (b) et bioluminescence tumorale (c). Le volume tumorale a été évalué deux fois par semaine par IRM et est reporté dans le tableau (d) (i. pré-injection; ii: souris non-traité; iii. Salinomycine (SAL); iv. Paclitaxel (PTX); v. combinaison SAL+PTX; vi. SAL conjugué au SWCNT (SWNT-SAL); vii. PTX conjugué au SWCNT (SWNT-PTX); viii. Combinaison SWCNT-SAL + SWCNT-PTX (d'après Al Faraj, et al. 2016)*

7. Intérêts des NTC dans le traitement du gliome

Dans la première partie de cet exposé, nous avons vu que le GBM est la tumeur cérébrale primaire maligne la plus courante et la plus agressive chez l'homme. Malgré un traitement multimodal et agressif, associé à des immunothérapies innovantes, la survie des patients GBM reste faible. Les principaux défis du traitement du GBM sont l'administration de médicaments à travers la barrière hémato-encéphalique, l'infiltration du tissu tumoral dans le tissu sain, et l'échappement des cellules tumorales aux traitements. Les NTC sont des éléments intéressant dans l'approche thérapeutique des GBM car leurs petites tailles leur permet de traverser la barrière hémato-méningée et ils peuvent être fonctionnalisés pour cibler spécifiquement les cellules tumorales (Gonzalez-Carter et al. 2019). Des études *in vitro* et *in vivo* sur modèle rongeur ont montré une cytotoxicité induite par des MWNT, en association avec le TMZ sur une lignée de GBM, ce qui suggère qu'ils pourraient être utilisés en complément du traitement standard (Romano-Feinholz et al. 2017).

Des NTC ont été conjugués avec des anticorps monoclonaux anti-CD133, qui est un marqueur spécifique des cellules souches tumorales. Ces NTC conjugués ont été incubés avec des cellules de GBM-CD133^{+} et GBM CD133^{-}, puis exposés à des lasers dans le proche infrarouge. Les résultats montrent que seules les cellules CD133^{+} ont été détruites par la photothérapie. Ainsi, ces NTC conjugués sont des candidats potentiels pour la photothérapie ciblée des cellules souches tumorales des tumeurs cérébrales (Wang et al. 2011; Lal, Verma, Van Noorden 2014).

Par ailleurs, les NTC sont capables d'interagir avec les cellules tumorales mais aussi avec le microenvironnement tumoral. Or, ce microenvironnement participe au développement tumoral et à l'immunosuppression locale. Il oriente les cellules de la microglie vers un profil de type M2 anti-inflammatoire. Une étude a montré que des MWNT fonctionnalisés pouvaient interagir avec les cellules de la microglie et induire un phénotype M1, pro-inflammatoire dès 24h d'exposition, ce qui pourrait être intéressant dans l'activation du système immunitaire dans le microenvironnement tumoral (Fiorito et al. 2018). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'interaction précise entre les NTC et les cellules de la microglie car il semble qu'après 48h d'exposition, les cellules activées basculent vers un profil M2 anti-inflammatoire.

Enfin, les nanotubes de carbone (NTC) font partie des nanoparticules d'intérêts dans la lutte contre le cancer en tant qu'agent radiosensibilisant. En effet, différents

travaux *in vitro* ont montré que ces éléments pénètrent facilement au sein des cellules tumorales (Neves et al., 2012), et sont aussi responsables d'une augmentation de la proportion de ces cellules en phase G2/M (Fiorito et al., 2014). Or, au cours de cette étude, nous avons pu remarquer que cette phase du cycle cellulaire correspond à la phase la plus radiosensible du cycle cellulaire (Pawlik, Keyomarsi 2004). Ainsi, une fois la caractérisation des lignées cellulaires de gliomes canins terminée, il semble pertinent d'évaluer le pouvoir radiosensibilisant des NTC sur celles-ci. Le modèle de GBM canin serait alors un modèle translationnel pertinent dans l'évaluation préclinique de l'association de la RT avec les NTC, en vue d'un développement chez l'homme.

Synthèse de la revue bibliographique et objectifs de la thèse

Les gliomes diffus chez l'Homme, et plus particulièrement le glioblastome, sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et les plus agressives. Malgré une approche thérapeutique multimodale, ces cancers sont associés à une médiane de survie faible ainsi qu'à un taux de récidive important dus à l'apparition d'une chimio- et d'une radio-résistance précoce des cellules cancéreuses. Il apparait donc indispensable de proposer des thérapies innovantes permettant aux cliniciens d'améliorer la qualité de vie de leurs patients sur le long terme. Lors de l'évaluation préclinique de ces thérapies destinées au traitement des gliomes chez l'Homme, la capacité des modèles animaux utilisés à reproduire la pathologie humaine revêt un caractère fondamental. Dans ce contexte, le Chien spontanément atteint de gliomes diffus apparaît comme un modèle d'étude pertinent et complémentaire au modèle murin actuellement utilisé.

Bien que les gliomes diffus chez l'Homme présentent des propriétés de radiorésistance responsables de récidives locales dans les champs irradiés, la radiothérapie (RT) est utilisée de manière systématique pour le traitement de ces tumeurs car elle prolonge significativement la survie des patients. Les traitements innovants actuellement en cours d'élaboration seront destinés soit à être administrés en association à la RT (si traitement de première intention), soit à être administrés dans les mois qui suivent la fin de la RT (si traitement à la rechute). Dans un cas comme dans l'autre, le modèle animal sur lequel sera testé le nouveau traitement devra suivre un protocole thérapeutique similaire au patient humain, et donc subir des séances de RT. Ainsi, avant d'envisager une étude préclinique chez le Chien spontanément atteint de gliomes diffus, il est primordial de vérifier que celui-ci constitue effectivement un bon modèle en radio-oncologie comparative. Pour cela, les paramètres radiobiologiques des gliomes diffus canins doivent être évalués *in vitro* sur lignées cellulaires. Cette évaluation repose sur :

- la réalisation de tests de clonogénicité qui fournissent différents paramètres tels que la Mean Inactivation Dose (MID). Cette mesure est un outil utile pour étudier

la radiosensibilité intrinsèque des lignées cellulaires : elle correspond à la dose de RI nécessaires pour tuer la moitié de la population et s'exprime en Gray. Les MID présentées dans la littérature pour les lignées de GBM humains varient de 1.6 à 4.6 Gy (Fertil et al. 1984).

- la recherche de marqueurs impliqués dans la radiorésistance tels que CD133, un marqueur de cellules souches dont la présence est l'une des principales causes de résistance et de rechute des gliomes de haut-grade (Rycaj, Tang 2014).

La prédiction de la sensibilité tumorale *in vivo* passe donc par la réalisation de tests de clonogénicité *in vitro* sur lignées cellulaires. Pour optimiser cette prédiction, il est ainsi nécessaire de disposer d'un modèle *in vitro* fiable et robuste, composé d'un spectre large de lignées cellulaires caractérisées, i.e. pour lesquelles les données phénotypiques, génotypiques et la capacité tumorogène susceptibles d'impacter la réponse radio-induite sont connues. Comme indiqué dans la revue bibliographique, les lignées cellulaires de gliome canin de haut-grade décrites dans la littérature (J3T, J3TBg, SDT3, G06A et Raffray) sont utilisées au sein des laboratoires qui les ont isolées et ne sont pas disponibles dans une banque de cellules. Seules les J3T ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique et génotypique complète avec évaluation de la tumorogénicité.

Ainsi, le premier objectif de ce travail de thèse a été de réaliser la caractérisation de cinq lignées cellulaires de gliome canin de haut-grade de malignité et de caractériser leur réponse radio-induite.

Ces dernières années, l'utilisation de nanoparticules est apparue comme une option pertinente pour le diagnostic et le traitement du cancer. Les nanotubes de carbone (NTC) sont des structures tubulaires de taille nanométrique, constituées de graphène. Leur petite taille ainsi que leur caractère hydrophobe leur permettent de traverser la membrane plasmique et d'interagir avec les différents constituants cellulaires. Ils sont également capables de bloquer les cellules tumorales en phase G2/M du cycle cellulaire et de produire des radicaux oxygénés. Ces arguments laissent supposer que les NTC seraient capables de radiosensibiliser les cellules tumorales. L'association RT + NTC pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique prometteuse pour améliorer le mauvais pronostic lié aux gliomes diffus, stratégie dont l'efficacité pourrait être évaluée en préclinique chez le Chien spontanément atteint de gliomes.

Le second objectif de ce travail de thèse a été de valider la capacité des NTC à radiosensibiliser les cellules tumorales chez les chiens spontanément atteints de gliomes diffus. L'intérêt de l'association RT + NTC a été évaluée sur les lignées cellulaires de gliomes canins précédemment caractérisées et validées en tant que modèle d'étude en radio-oncologie comparative : l'internalisation des NTC, leur cytotoxicité et leur impact sur la réponse radio-induite ont été étudiés.

II. Étude expérimentale

A. Caractérisation de lignées cellulaires de gliomes canins à but translationnel : article en cours de soumission auprès de *Frontiers in Veterinary Sciences*

EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF CHARACTERIZED CANINE GLIOBLASTOMA CELL LINES TO RADIATION THERAPY

Benjamin Cartiaux[1*], Alexandra Deviers[2], Caroline Delmas[1,4], Jérôme Abadie[5], Martí Pumarola Battle[3], Giovanni Mogicato[2], Elizabeth Cohen-Jonathan Moyal[1,4]

[1]INSERM UMR.1037-Cancer Research Center of Toulouse (CRCT)/University Paul Sabatier Toulouse III, 31037 Toulouse, France.
[2] ToNIC, Toulouse NeuroImaging Center, Université de Toulouse, Inserm, UPS, ENVT, Toulouse, France
[3]Unit of Murine and Comparative Pathology, Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Autonomous University of Barcelona, Spain.
[4] IUCT-oncopole, Toulouse, France
[5] Department of Biology, Pathology and Food Sciences, Laboniris, Nantes, France.

*** Correspondence:**
Benjamin Cartiaux
benjamin.cartiaux@envt.fr

Keywords: glioma, canine, characterization, translational, radiation.

Abstract

Using radio-potentiators is a promising therapeutic approach to improve the poor prognosis associated with diffuse high-grade gliomas in human patients. The pre-clinical evaluation of such a strategy requires a translational animal model that recapitulates the major pathologic features and radiation-induced response of the tumor. As dogs with spontaneous high-grade glioma represent a relevant pre-clinical model, the aim of this study was to characterize 5 canine high-grade glioma cell lines and to evaluate their intrinsic radiosensitivity.

Karyotypic and phenotypic characteristics of J3T, J3TBg, SDT3G, G06A and Raffray cells were evaluated. The cellular intrinsic radiation sensitivity has been measured using a colony formation assay with single fractions of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 Gy.

In addition to chromosomal abnormalities, canine high-grade glioma cell lines demonstrated an immunohistochemical profile consistent with poorly differentiated astrocytes, based on the expression of different markers of lineage differentiation. The mean inactivation dose, ranging from 4 to 5.7 Gy, indicated radioresistant cells.

As their human counterparts, canine high-grade glioma cell lines exhibit radioresistance. These results support high-grade glioma bearing dogs as relevant models in comparative radio-oncology.

1. Introduction

Gliomas are the most frequent primary brain tumors in adults [1]. Among them, high-grade diffuse gliomas are devastating tumors associated with a poor prognosis despite a multimodal treatment combining surgery, radiotherapy (RT) and chemotherapy. The median overall survival of patients with glioblastoma, the most malignant tumor in this group, is around 20 months [2], [3]. Although RT significantly prolongs patient survival and is standard of care treatment of high-grade diffuse gliomas [4]–[6], infield recurrences occur within months after the completion of RT in glioblastoma and IDH-wildtype anaplastic astrocytoma, suggesting insufficient killing of tumor-initiating cells [7], [8]. In order to improve tumor local control and patient survival, it is necessary to explore new ways by which RT could be enhanced. In this context, the use of radiosensitizers such as targeted therapies [9]–[12], nanoparticles [13]–[15] or oncolytic viruses [16] is a promising approach.

The use of such innovate therapies in the clinical setting requires prior demonstration of their efficacy in pre-clinical animal models. The ability of these models to accurately recapitulate human pathology is therefore essential. Pet dogs with spontaneously arising high-grade gliomas are becoming widely acknowledged as relevant translational models that could be used in addition to murine models. Indeed, the spontaneous oncogenesis of canine glioma is inherently associated with inter-tumor heterogeneity, genetic variability and anti-tumoral immune response that are lacking in immunocompromised xenograft mouse models. Canine high-grade gliomas closely resemble their human counterparts regarding oncogenic mechanisms [17]–[19], cancer stem cells [20]–[22], histopathological features [23], molecular alterations [24]–[28] and immune microenvironment [18], [29]. Furthermore, the large size of their brain enables the use of the same RT devices and MRI scanners that those used in human medicine [30], [31]. Taken all together, these data suggest that glioma-bearing dogs could be a well-suited pre-clinical model to predict the efficacy of radiosensitizers in human patients.

In order to validate the value of the canine glioma model in comparative radio-oncology research, it is necessary to evaluate the radiosensitivity of canine high-grade gliomas and compare it with the radiosensitivity of their human counterparts. Even if the clinical response to RT is similar in canine and human gliomas [30], to date there has been no published work evaluating the radiobiologic parameters of canine high-grade gliomas. These parameters are obtained in vitro by performing clonogenic

assays which are considered as the gold standard for determining reproductive tumor cell death induced by ionizing radiation (IR) [32]. The surviving fraction at 2 Gy (SF2), the fraction of cells surviving a single 2 Gy dose of IR, and the mean inactivation dose (MID) are parameters that can be derived from clonogenic assays. SF2 and MID are useful tools to study the intrinsic radiosensitivity of cell lines and to predict in vivo tumor sensitivity to radiation [33]–[35]. So far, four canine high-grade glioma cell lines have been put forward in the literature: J3T, J3T-Bg, SDT-3G and G06A. The J3T cells were used to develop animal models of canine gliomas [36]–[38], and all of these cell lines have proven useful in understanding the mechanisms of oncogenesis in canine high-grade gliomas [17], [25], [26], [39], evaluating their sensitivity to chemotherapeutics [26], [40], targeted therapies [41]–[44] and viral vectors [37], as well as examining their miRNA profile in response to hypoxia [45]. Recently, a new glioma cell line called Raffray, derived from a tumor originally classified as an anaplastic oligodendroglioma in a 7-year-old Boxer, was developed in a French laboratory [46].

In this context, the aim of the present study was to evaluate the intrinsic radiation sensitivity of these five canine high-grade glioma cell lines by performing clonogenic assays and examining the SF2 value and MID. As the tumor response to irradiation is dependent on the growth properties of cells and the proportion of tumorigenic cells, we have also evaluated the general and phenotypic characteristics of these cell lines and assessed their tumorigenicity.

2. Materials and Methods

2.1. Cell culture

Canine cell lines were generously provided by Dr. Michael Berens (J3T), Dr. Peter Dickinson (J3T-Bg, SDT-3G, G06A) and Dr. Jérôme Abadie (Raffray). The J3T cell line was derived from an anaplastic astrocytoma in a 10 year-old male Boston Terrier [47]. The J3T-Bg glioma cell line was derived from the canine J3T cell line following passage as a subcutaneous tumor through Biege-Nude-xid mice [25]. The SDT3G and G06A cell lines were derived from glioblastomas in a 12 year-old male English Bulldog and a 2-year old female ovariohysterectomized Australian Shepherd respectively [26]. Raffray cell line was derived from an anaplastic oligodendroglioma in a 10 year-old female Boxer. Human U87 glioblastoma cells were purchased from ATCC (LGC Standards). All cell lines were grown in T-25 cm2 flasks with Dulbecco's Modified Eagle Medium (GibcoTM), supplemented with 10% fetal bovine serum, 1%

penicillin/streptomycin (Gibco-BRL). Cells were maintained in an incubator at 37°C with 5% CO2.

2.2. Cell proliferation

Cells of each cell line were seeded at a concentration of 1x105 cells per well in 6-well plates and maintained in supplemented DMEM at 37°C for 5 days. Every 24 hours, two wells were trypsinized for 5 minutes at 37°C and the cells were counted using a Thomas cell counting chamber after a dilution 1: 1 with Trypan Blue. The average was carried out between the two wells. Replicates from three 6-well plates were scored each day. The doubling times of each cell line were computed using the "cell calculator++" tool (doubling-time. com; Roth V., 2006).

2.3. Chromosome number

Metaphase cells were harvested by physical shaking and centrifuged at 500g for 10 minutes, then they were resuspended in hypotonic solution of fetal calf serum (1:6) for 20 minutes, at 37°C. Cells were then centrifuged at 500g for 10 minutes and fixed in ethanol: acetic acid (3:1) for at least an hour, at 4°C. Cells were spread on a slide and stained with 1% Giemsa solution to generate GTG banding. At least 20 metaphases were evaluated for each cell line to count the total number of chromosomes and the number of metacentric chromosomes per cell.

2.4. Orthotopic xenograft generation

Orthotopic canine high-grade xenografts were established in 8 week-old female nude mice (Janvier Labs) as previously described [48]. Briefly, mice were anesthetized with intraperitoneal ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and received a stereotaxically guided injection of 2,5 × 105 cells suspended in 5 µL DMEM, using a Hamilton syringe. The injection was precisely located into the right forebrain (2 mm lateral and 1 mm anterior to the bregma at a 5-mm depth from the skull surface). The mice were observed for behavior changes suggestive of brain tumor. When such changes were detected, they were humanely euthanized. Otherwise mice were followed for behavior changes for a year. After euthanasia, brains were collected for subsequent histological and immunohistochemical analysis. All animals were treated

according to the European Communities Council directive (2010/63/EU) regarding the care and use of animals, and all the experimental procedures were approved by the Institution animal ethics committee with authorization number 2018031614514282.

2.5. Histo-cyto-pathology and immunohistochemistry

Canine high-grade glioma cells cultured in supplemented DMEM were scraped off with a sterile scalpel and transferred into a 15 mL centrifuge tube. They were centrifuged at 400 rpm for 5 minutes, then resuspended in 10 mL phosphate-buffered saline (PBS) after removal of the supernatant. This operation was repeated one more time. The resulting cell suspension was centrifuged at 400 rpm for 5 minutes and resuspended in 1 mL of 70% ethanol after removal of the supernatant. The cell suspension was then transferred in a 1,5 mL microcentrifuge tube and centrifuged at 400 rpm for 5 minutes. Once the supernatant was discarded, the resulting pellet was resuspended in 50 µL of liquefied HistoGel™ (Thermo Scientific Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA) and the cell suspension was gently mixed to distribute cells evenly within the gel matrix prior to solidification [49]. HistoGel-encapsulated cells were transferred in pathology cassettes, fixed in 10% neutral buffered formalin and processed as usual before embedding in paraffin. Forty-six excised tumor-bearing brains and three normal brains were fixed in 10% neutral buffered formalin. Paraffin-embedded excised brains and HistoGel-encapsulated cells were sectioned (5 µm) and stained with haematoxylin and eosin (HE) for microscopic evaluation. Immunohistochemistry (IHC) was performed in collaboration with the laboratory team of Dr. Martí Pumarola [21]. Several IHC markers were used: CD133 as a stem cell marker, Olig2 protein and doublecortin (DCx) as glial and neuronal progenitor cell markers respectively; glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Vim) as mature astrocyte markers; S-100 protein as a mature oligodendroglial and astrocytic marker and βIII-tubulin and NeuN protein as mature neuron markers. Immunohistochemistry was performed in both HistoGel-encapsulated cells and excised brains of mice which have developed tumors. Procedures relative to antigen retrieval, endogenous peroxidase and non-specific binding blocking, antibody labeling and detection were performed as previously described [21]. Primary antibodies, dilution and pre-treatment are summarized in Table 1. The positive control used for GFAP, Olig2, S-100, VIM, DCx, NeuN, and βIII-tubulin was normal canine brain tissue including grey and white matter. Positive control for CD133 was adult canine healthy kidney tissue, because it

is expressed by tubular epithelial cells. In all experiments, negative controls were obtained by omitting the primary antibody.

Table 1 : *Immunohistochemical markers used for the study of HistoGel-encapsulated cells and/or excised brains of mice*

	Antibody name	Company	Dilution	Pretreatment	Specimen
CD133	Rabbit Polyclonal to CD133 stem cell marker	Abcam 19898	1:200	Citrate buffer 0.01M pH 6, 20' water bath + 30' room temperature.	HistoGel-encapsulated cells and excised brains
DCx	Rabbit Polyclonal to Duble cortin neuronal marker	Abcam ab18723	1:1000	Citrate buffer 0.01M pH 6, 20' water bath + 30' room temperature.	HistoGel-encapsulated cells
ßIII	Mouse monoclonal anti-tubulin ßIII isoform	Millipore MAB1637	1:200	Citrate buffer 0.01M pH 6, 20' water bath + 30' room temperature.	HistoGel-encapsulated cells
NeuN	Mouse anti neuronal nuclei	Chemicom MAB377	1:500	Citrate buffer 0.01M pH 6, 20' water bath + 30' room temperature.	HistoGel-encapsulated cells and excised brains
Olig2	Rabbit anti Olig 2 Polyclonal Antibody	Millipore (Chemicon) AB 9610	1:100	Citrate buffer 0.01M pH 6, 20' water bath + 30' room temperature.	HistoGel-encapsulated cells and excised brains
GFAP	Rabbit Anti-Cow Glial Fibrillary Acidic Protein	Dako Z0334	1:500	Citrate buffer 0.01M pH 6, 20' water bath + 30' room temperature.	HistoGel-encapsulated cells and excised brains
S-100	Rabbit anti S-100	Dako Z0311	1:1000	Citrate buffer 0.01M pH 6, 20' water bath + 30' room temperature.	Excised brains
VIM	Mouse Monoclonal anti vimentin clone V9	Dako M0725	1:200	Without pretreatment	HistoGel-encapsulated cells and excised brains

A proportion score (corresponding to the percentage of positive neoplastic cells in each sample) and an intensity score (corresponding to the labeling intensity of positive neoplastic cells in each sample) were evaluated. An IHC score was then calculated (Table 2).

Table 2 : *Evaluation of the immunohistochemical score*

Proportion score (PS)	Percentage of positive neoplastic cells	Intensity score (IS)	Labeling intensity of positive neoplastic cells	Immunohistochemical score	PSxIS
0	<5%	0	No labeling	Negative	0
1	5-30%	1	weak	+	From 1 to 3
2	30-60%	2	mild	++	From 4 to 6
3	60-90%	3	intense	+++	From 7 to 9
4	>90%	-	-	++++	From 10 à 12

2.6. Radiosensitivity

Radiosensitivity was evaluated with a clonogenic survival assay. Canine high-grade glioma cell lines were dissociated, plated in T-25cm2 flasks (1500 cells/well) and irradiated at escalating doses (0, 1, 2, 4, 6, 8 and 10 Gy) with the Gamma-cell Exactor 40 (Nordion, Ottawa, ON, Canada), as previously described [50]. Irradiated cells were subsequently incubated at 37°C for 15 days, to allow colony cell formation. Then, flasks were rinsed with 0,9% NaCl, fixed with FAA (Formalin – Acetic acid – Alcohol) fixative, and stained by 0,1% crystal violet. Each colony with more than 50 cells was considered as survivor. To calculate the surviving fraction at a given dose, the number of colonies is divided by the number of seeded cells and normalized to the plating efficiency of the not irradiated controls. The plating efficiency of not irradiated controls was determined as: (number of colonies formed/ number of cells inoculated)x100. At least three independent experiments were carried out, from which a survival curve was drawn. Mean Inactivation Dose (MID) was obtained from curves, using algorithm described by Fertil [33].

2.7. Statistical analysis

All results are presented as mean +/- standard deviation (SD). For statistical analysis, XLSTAT software (Data Analysis and Statistical Solution for Microsoft Excel, Addinsoft, Paris, France 2017). Kaplan-Meier estimate was used to evaluate the overall survival of mice with orthotopic xenografts of canine glioma cell lines. Log-rank test was assessed to analyze significant differences between the overall survival of different groups of cell lines. Results with p value <0,05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. General characteristics of canine glioma cell lines

General characteristics of each cell line were established by assessing doubling time, plating efficiency, karyotype as well as cell morphology and protein expression profile (Table 3). Doubling times were in the same range (21 to 26 hours) for all the cell lines except Raffray cells (56 hours). The determination of plating efficiency, comprised between 16,4% (Raffray) and 23% (G06A), demonstrated that all glioma cell lines were able to give rise to colonies, which was the necessary condition to evaluate their radiosensitivity by in vitro clonogenic assay. Karyotyping revealed a number of chromosomes per cell slightly higher than the normal diploid chromosomal count for canines (78) and the presence of metacentric chromosomes from rearrangements.

Cell morphology and protein expression profile were similar for J3T, J3T-Bg, G06A and Raffray cells: they appeared as spindle- to star-shaped tumoral cells when observed in HE-stained slides and expressed the glial marker Olig2 as well as the astrocytic markers GFAP (low immunohistochemical score) and Vimentin (high immunohistochemical score). SDT-3 cells were smaller and more rounded, they showed a strong positive reaction to Olig2 and Vimentin but were negative to GFAP. All the glioma cell lines were positive to the stem cell marker CD133. Neuronal markers (DCx, NeuN and βIII-tubulin) were negative. Interestingly, Olig2 marking is localized into cellular cytoplasm instead of being localized in the nucleus (Figure 1) Taken all together, the immunohistochemical results suggest a protein expression profile compatible with poorly differentiated astrocytic cell lines. Positive immunohistochemical results are displayed in Figure 2 for the cell line J3T.

Table 3 : *General genotypic and phenotypic characteristics of the canine glioma cell lines Abbreviations : DT (Doubling Time), PE (Plating Efficiency), NA (Not Assessable). Metacentric chromosomes of SDT3 cell lines was not assessable due to important chromosomal rearrangements.*

	J3T	J3T-Bg	SDT3	G06A	Raffray
DT (hr)	20,6	25,8	25,6	22,4	55,9
PE (%)	21,0	19,7	21,6	23,0	16,4
No of chromosomes	78 to 82	78 to 81	59 to 61	78 to 82	76 to 81
No of metacentric chromosomes	2	2	NA	1	2
Olig2	+++	+++	++++	++++	+++
GFAP	++	+	Neg	+	+
Vim	+++	++++	+++	++++	++++
DCx	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
βIII tubulin	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
NeuN	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
CD133	+++	++++	+++	++++	+++

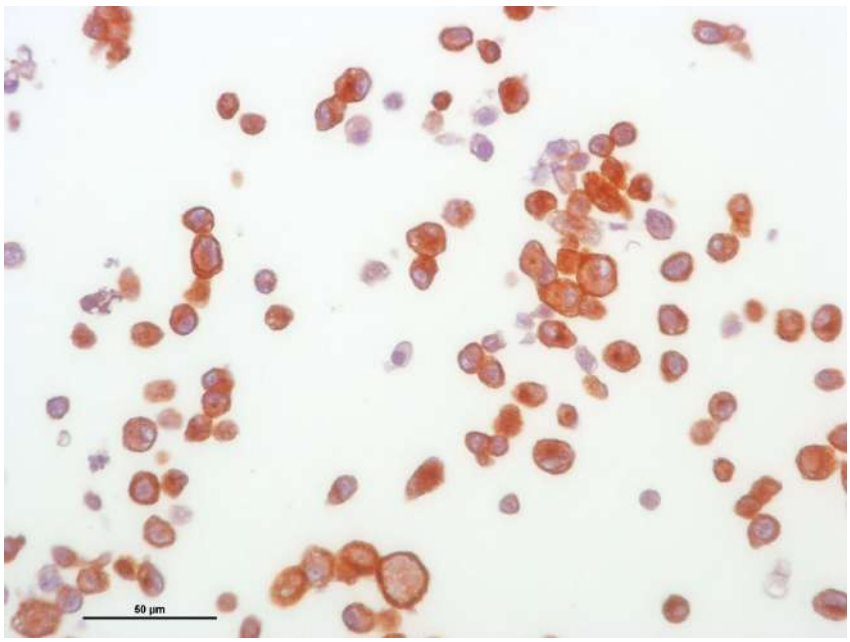


Figure 1 : *RAFFRAY cells immunohistochemistry included in HistogelTM, for the Olig2 marker. The cells show diffuse cytoplasmic labeling.*

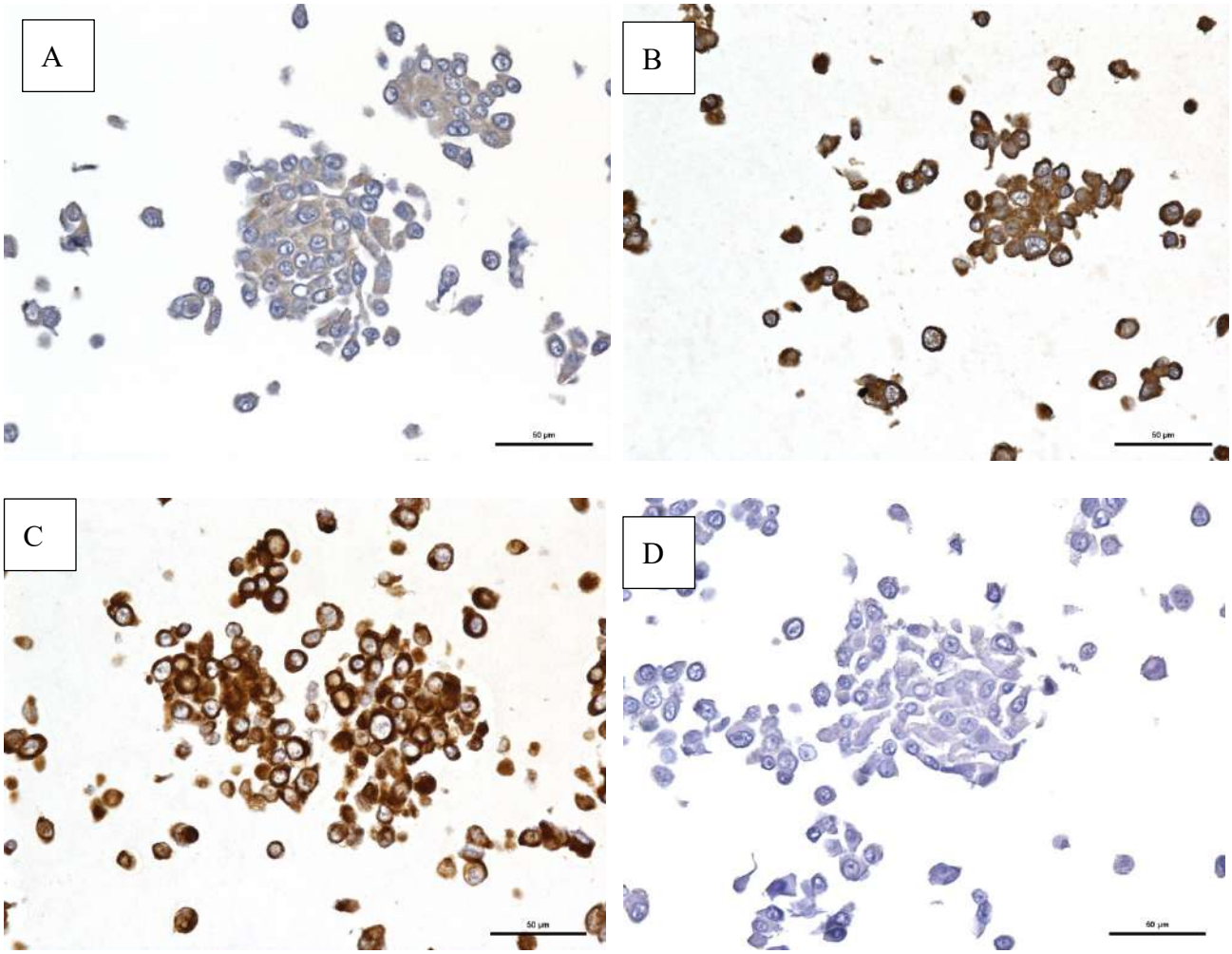


Figure 2 : *Immunohistochemical features of J3T cell line embedded in HistoGel. (A) Diffuse positivity GFAP immunolabelling was observed for the cell line. (B) CD133 immunoreactivity observed was strong and intense. (C) Vimentin immunochemistry revealed a high positive expression. (D) NeuN expression was negative and corroborated the astrocytic profile of J3T cell line.*

3.2. Radiosensitivity

Dose–response curves were evaluated for each cell line and radiobiologic parameters were extracted and presented in Table 4. The radio-induced response was similar between the different cell lines. MID ranged from 4 Gy to 5,7 Gy which correspond to cell lines with similar high radioresistance, compared to the human U87 glioblastoma cell line. α/β ratio is low with all five canine cell lines gliomas corresponding to a low sensitivity to conventional radiation therapy.

Table 4 : *Parameters of radiation sensitivity of different canine cell lines.*

	J3T	J3T-Bg	SDT3	G06A	Raffray
α (Gy^{-1})	0,0718	0,0285	0,0006	0,0313	0,0021
β (Gy^{-2})	0,0332	0,0322	0,0251	0,0301	0,0298
α/β ratio (Gy)	2,1599	0,8854	0,0248	1,0391	0,0714
SF2 (%)	0,7303	0,9113	0,9310	0,8453	0,7937
MID (Gy)	4	4,6	5,7	4,7	5,2

3.3. Tumorogenicity

All the canine cell lines proved to be tumorigenic after orthotopic implantation, with a tumor take rate varying from 25% for G06A cell line to 100% for J3T and J3T-Bg cell lines (Table 5).

Table 5: *Parameters of stereotactic injection of glioma canine cell lines into Biege-Nude-xid mice. * Due to marked autolysis, three brains could not be analyzed (1 brain from the G06A group and two brains from the Raffray group).*

	Number of mice inoculated intracerebrally with tumor cells	Number of brains submitted to microscopic examination	Number of brains harboring a tumor	Tumor take rate	Median survival (in days)
J3T	12	12	12	100%	129
J3T-Bg	9	9	9	100%	22
SDT3	9	9	8	89%	115
G06A	9	8*	2	25%	216
Raffray	10	8*	4	50%	186

The median survival of canine glioma-derived mouse orthotopic xenografts was significantly different depending on the cell line that was injected in the brain. The median overall survival was the highest for G06A- (216 days, 95% CI: 212-218) and for Raffray-derived mouse orthotopic xenografts (186 days, 95% CI:162-210). In these

two groups, mice were still alive at the endpoint of experiment (represented by white circles in Figure 2). The lowest median survival was 22 days (20-23) for J3T-Bg.

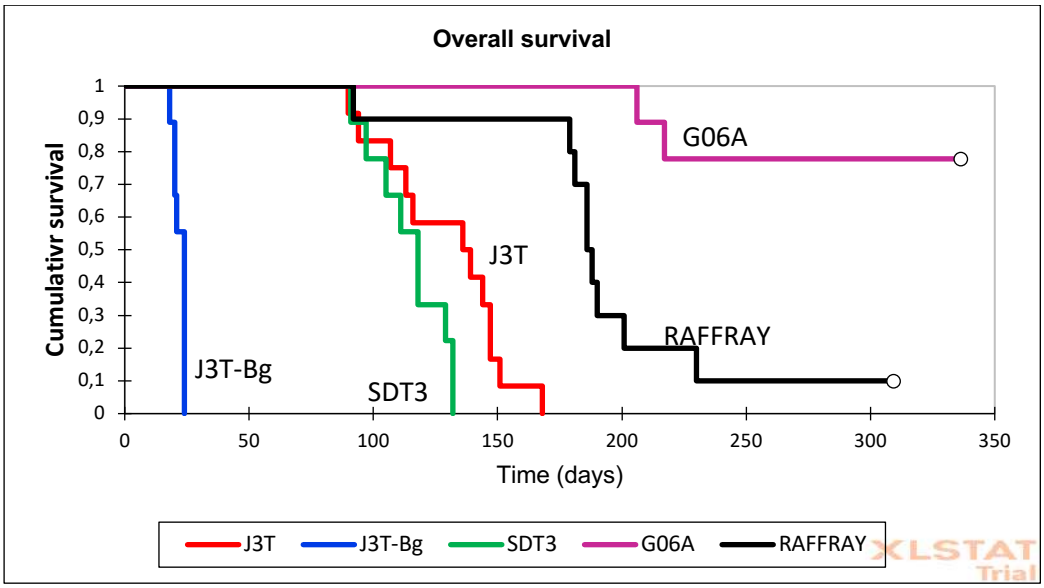


Figure 3: *Kaplan-Meier analysis of overall survival in canine glioma-derived mouse orthotopic xenografts*

Histological examination of the xenografts revealed densely cellular neoplasms with different growth patterns defined as : (i) focal infiltration (well-demarcated neoplasms with multifocal foci of infiltration) for SDT3 and G06-derived xenografts, (ii) diffuse infiltration (poorly demarcated neoplasms with a significant infiltration of the surrounding parenchyma and/or leptomeninges) for 50% of J3T-derived xenografts and (iii) diffuse infiltration associated with striking perivascular cuffing for 50% of J3T, 75% of Raffray and 100% of J3T-Bg derived xenografts (Figure 4 A-C). In this latter group, perivascular cuffs were large and coalescent leading to the formation of a multinodular mass at the injection site. With regard to architectural patterns, cell morphology, cellular atypias and mitotic rate, all the xenografts were morphologically consistent with diffuse gliomas. G06A xenografts exhibited features of high-grade oligodendrogliomas. They were composed of sheets of round to polygonal cells with a central nucleus, varying from round and hyperchromatic to irregular with loose chromatin, surrounded by a moderately abundant pale cytoplasm (Figure 4H). The mitotic rate was comprised between 1 and 3 mitoses per high-power-field (Table 6). Xenografts derived from J3T, J3T-Bg, SDT3 and Raffray cells were suggestive of an astrocytic differentiation. Their core was composed of either (i) interlacing or parallel fascicles of eosinophilic spindle cells with elongated nucleus, (ii) sheets and small packets of large polygonal cells with a prominent vesicular nucleus, (iii) a combination of both. Tumor cells were also either spindle-shaped or polygonal in perivascular cuffs

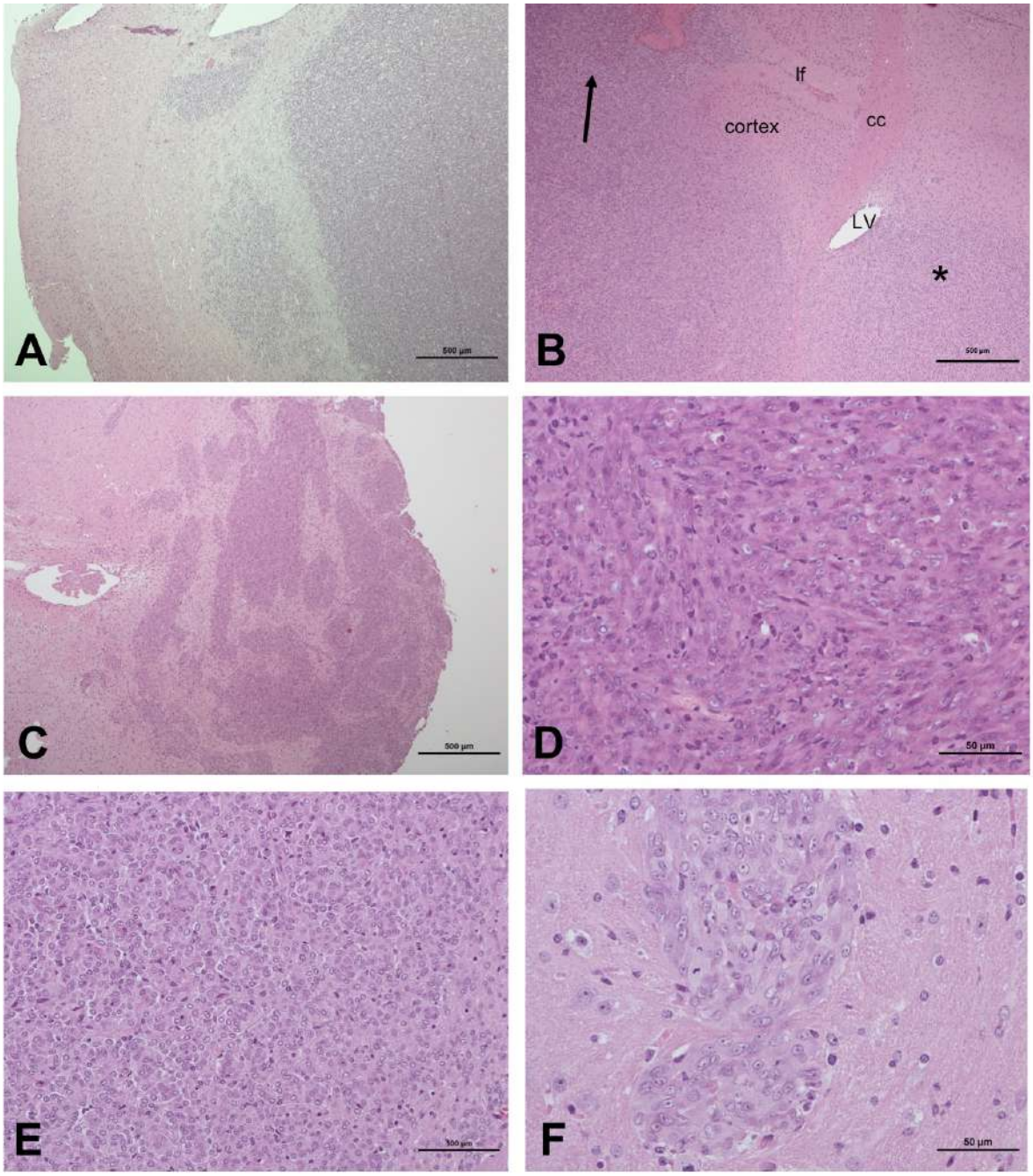
(Figure 4 D-G). These xenografts were assigned as high-grade tumors on the basis of the mitotic rate (Table 6) and the presence of geographic necrosis with peripheric palisading in two J3T, two J3T-Bg and one Raffray-derived tumors (Figure 4J). Numerous branching thin-walled capillary vessels were consistently seen in the tumors but microvascular proliferation could not be observed in any of the samples (Figure 4I).

Regarding J3T, SDT3, Raffray and G06-A-derived xenografts, Olig2 immunostaining confirmed the diagnosis of diffuse gliomas as 95.6% of these tumors exhibited a high IHC score for this marker (Table 7). The absence of expression of the NeuN marker in these tumors corroborated their glial differentiation. All the J3T, SDT3 and Raffray-derived tumors were positive to GFAP with a medium IHC score, confirming their astrocytic origin. The absence of GFAP immunolabeling in G06A xenografts supported the oligodendroglial phenotype observed in H&E-stained sections (Figure 5D). The value of the glial marker S100 in the characterization of xenografts appeared limited in our study as the glial tumors with a high IHC score for Olig2 exhibited a weak or absent S100 immunostaining. Vimentin was not expressed in the core of the tumors but a weak immunopositivity to this marker was observed in J3T and Raffray perivascular cuffs.

Regarding J3T-Bg-derived xenografts, the tumor core did not express any of the markers; however, a weak cytoplasmic labeling was present in perivascular tumor cells for Vimentin and CD133 (Figure 5F). Despite the absence of Olig2 labeling, J3TBg tumors were assigned as diffuse gliomas considering their close morphology with J3T tumors (confirmed to be high-grade astrocytomas) and the presence of typical palisading necrotic areas in 2 tumors. Because of their lack of immunopositivity to different glial markers, they were considered to be poorly differentiated gliomas.

Table 6: *Histologic features of xenografts*

	J3T xenografts		J3T-Bg xenografts		SDT3 xenografts	G06 xenografts	Raffray xenografts	
	Tumor core	Perivascular cuffs	Tumor core	Perivascular cuffs	Tumor core	Tumor core	Tumor core	Perivascular cuffs
Number of samples	12	6	9	9	8	2	4	3
Cell morphology -Architectural pattern								
Spindle cells	**4**	**3**	**6**	**1**	**8**	0	**3**	**3**
Polygonal cells	**3**	**3**	0	**6**	0	0	0	0
Spindle + Polygonal	**5**	0	**3**	**2**	0	0	**1**	0
Polygonal oligo type	0	0	0	0	0	**2**	0	0
Cytonuclear atypias								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	**3**
Moderate	0	0	0	0	0	**2**	0	0
Maked	**12**	**6**	0	0	**8**	0	**4**	0
Severe	0	0	**9**	**9**	0	0	0	0
Mitotic rate								
Low (<1 per HPF)	0	0	0	0	0	0	0	**3**
Moderate (1-3 per HPF)	**3**	**3**	0	0	**8**	**2**	**4**	0
High (>3 per HPF)	**9**	**3**	**9**	**9**	0	0	0	0
Vascular features								
Branching capillaries	7		0		7	1	0	
Vasculitis	1		5		0	0	0	
Enlarged and hyalinized capillary wall	0	0	0	0	0	0	0	**3**
Nécrose								
Serpentine, with peripheric palisading	**2**		**2**		0	0	**1**	


A
500 µm
B
lf
cortex
cc
LV
*
500 µm
C
500 µm
D
50 µm
E
100 µm
F
50 µm

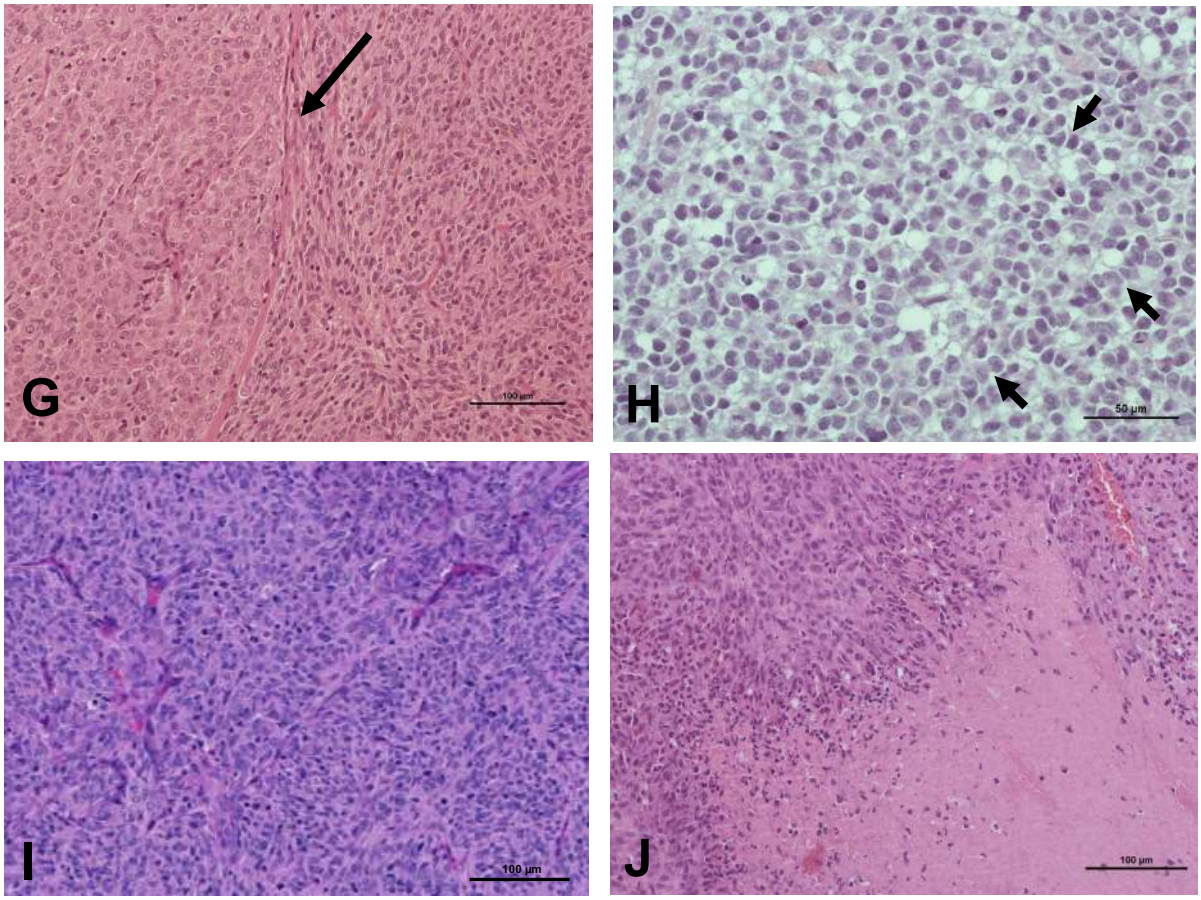


Figure 4 : *Pathologic features of xenografts : growth patterns (A-C), cell morphology and architectural patterns (D-H) (A) Focal infiltration, tumor G06A (H&E, scale bar: 500 µm): the interface between the tumor and the adjacent parenchyma, albeit readily identifiable, is multifocally infiltrated. (B) Diffuse infiltration, tumor J3T (H&E, scale bar: 500 µm): a diffuse neoplastic infiltrate is present within the caudate putamen (star) parietal cortex and leptomeninges (arrow). cc: corpus callosum, lf: longitudinal fissure of the brain, LV: lateral ventricle. (C) Diffuse infiltration associated with perivascular cuffing, J3T-Bg tumor (H&E, scale bar: 500 µm): coalescence of large perivascular cuffs forms a multinodular mass with distinct borders. (D) J3T-Bg tumor (H&E, scale bar: 50 µm): spindle cells organized in bundles. (E) J3T tumor (H&E, scale bar: 100 µm): polygonal cells organized in packets separated by a fine capillary network. (F) Tumor J3T-Bg (H&E, scale bar: 50 µm): polygonal cells organized in perivascular cuffs. (G) J3T tumor (H&E, scale bar: 100 µm): coexistence of a polygonal cell area and a spindle cell area separated from each other by the corpus callosum (arrow). (H) Tumor G06A (H&E, scale bar: 50 µm): sheets of round to polygonal cells with hyperchromatic nucleus and a pale perinuclear halo, associated with nuclear rowing (arrows). (I) J3T tumor (H&E, scale bar: 100 µm): there are many branching thin-walled capillaries within the tumor core. (J) J3T tumor (H&E, scale bar: 100 µm): geographic necrosis with palisading at the edges.*

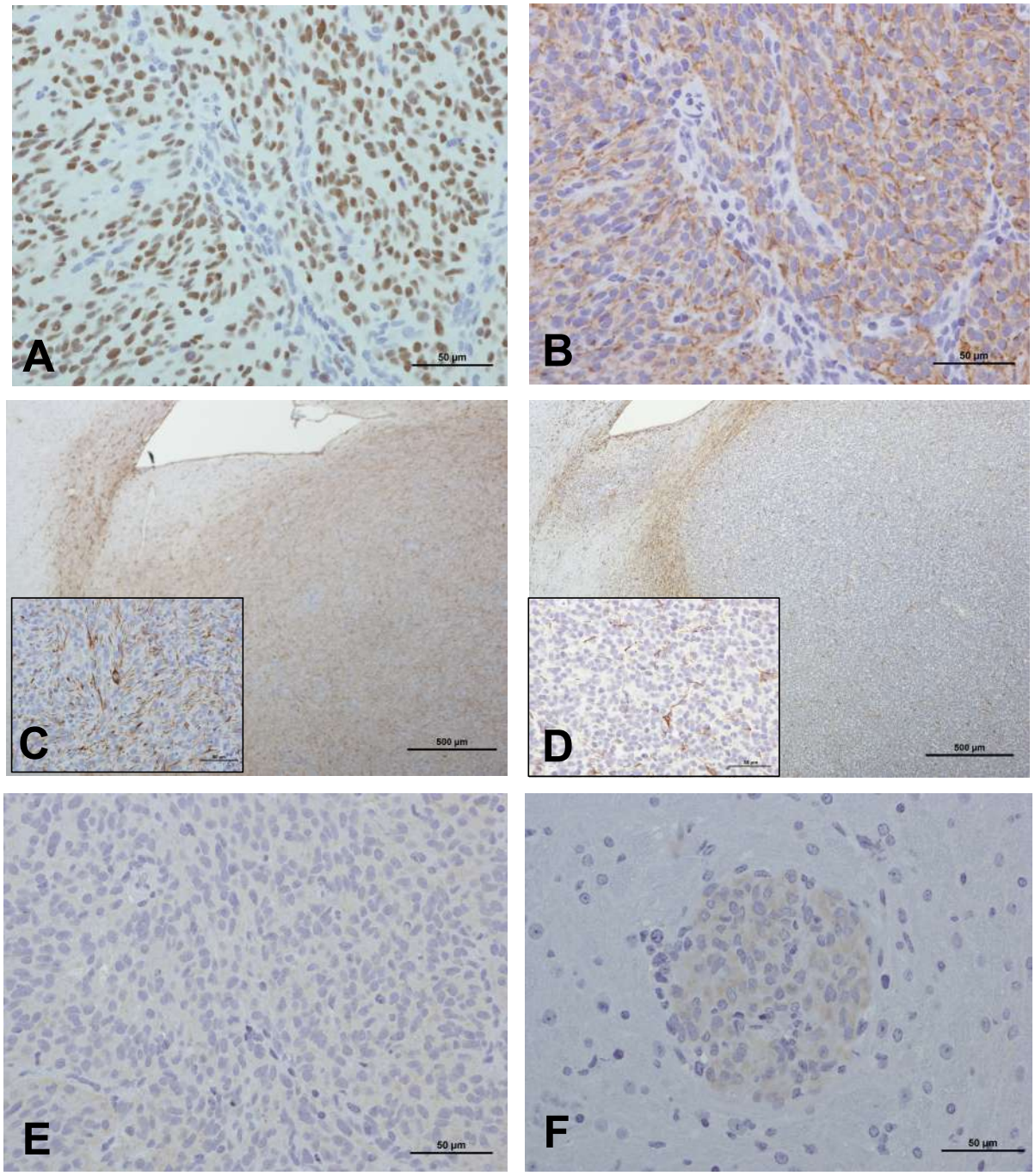


Figure 5: *Immunohistochemical characterization of xenografts. (A) Raffray tumor (IHC Olig2, scale bar: 50 µm): nuclear staining is intense in more than 90% of the tumor population (IHC score: ++++). (B) Raffray tumor, same tumor area as shown in panel A (IHC GFAP, scale bar: 50 µm): 60 to 90% of the cells exhibit a cytoplasmic staining of medium intensity (IHC score: ++). (C) SDT3 tumor (IHC GFAP, scale bar: 500 µm): in this focally infiltrative tumor, GFAP labeling can be seen in the interface between tumor and adjacent parenchyma, but also in the tumor core where 30 to 60% of the cells are positive with a moderately intense finely granular cytoplasmic labeling (IHC score: ++). Inset (scale bar: 50 µm) : a labeled mitotic tumor cell is present in the center of the image. (D) G06A (IHC GFAP, scale bar: 500 µm): in this focally infiltrative tumor, GFAP labeling can only be seen in the interface between tumor and adjacent parenchyma and corresponds to immunostaining of reactive normal astrocytes. There is no labeling of cells within the tumor core (inset scale bar: 50 µm), few normal astrocyte processes interspersed between neoplastic cells are labeled (IHC score: 0). (E) Raffray tumor, same tumor area as in panels A and B (IHC Vimentin, scale bar: 50 µm): tumor cells are negative to Vimentin (IHC score: 0). (F) J3T-Bg (IHC Vimentin, scale bar: 50 µm) : perivascular cuffs exhibit a weak cytoplasmic immunolabeling (IHC score : +).*

Table 7 : *Immunohistochemical features of xenografts. IHC: Immunohistochemical. Neg: negative. (*): In 7/9 J3T-Bg tumors and 2/3 Raffray tumors, a cytoplasmic and diffuse Olig2 staining was observed within perivascular cuffs but was considered negative in the absence of a concomitant nuclear labeling*

	J3T		J3T-Bg		SDT3	G06	Raffray	
	Tumor core	Perivascular cuffs	Tumor core	Perivascular cuffs	Tumor core	Tumor core	Tumor core	Perivascular cuffs
Olig2								
Number of xenografts analyzed	9	6	9	9	8	2	4	3
Number of positive xenografts	9	6	0	0*	8	2	3	0*
Mean IHC score	**+++**	**+**	**Neg**	**+**	**+++**	**++++**	**+++**	**+**
GFAP								
Number of xenografts analyzed	2	2	2	2	2	2	2	2
Number of positive xenografts	2	2	0	0	2	0	2	1
Mean IHC score	**+++**	**++**	**Neg**	**Neg**	**++**	**Neg**	**++**	**+**
Vimentine								
Number of xenografts analyzed	2	2	2	2	2	2	2	2
Number of positive xenografts	0	2	0	2	1	0	1	2
Mean IHC score	**Neg**	**++++**	**Neg**	**+**	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**+**
S100								
Number of xenografts analyzed	2	2	2	2	2	2	2	2
Number of positive xenografts	2	1	0	0	2	0	2	1
Mean IHC score	**+**	**++**	**Neg**	**Neg**	**+**	**Neg**	**++**	**+**
NeuN								
Number of xenografts analyzed	2	2	2	2	2	2	2	2
Number of positive xenografts	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean IHC score	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**Neg**
CD133								
Number of xenografts analyzed	2	2	2	2	2	2	2	2
Number of positive xenografts	0	0	0	2	0	0	0	0
Mean IHC score	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**+**	**Neg**	**Neg**	**Neg**	**Neg**

4. Discussion

In this study, we present general and phenotypic characteristics as well as the radiobiologic parameters of five canine high-grade glioma cell lines. This study provides useful information on these canine glioma cell lines for future research in which dog could be used as a naturally occurring model for cancer research and therapy. Doubling time is similar between J3T, J3T-Bg, SDT3 and G06A in vitro, but interestingly, following stereotactic injection, the J3T-Bg median survival is at least five times lower than the other lines. This assumes growth differences between in vitro and in vivo. Same differences have been observed with human oral cancer between two most studied human oral cancer cell lines – SCC-15 and SCC-25. The cell proliferation rate between these two cell lines was four times higher for SCC-15 between in vivo and in vitro, than SCC-25[51]. This assumes genetic differences which could impact growth rate between in vitro and in vivo, such as expression of the focal adhesion kinase which is higher in SCC-25 than SCC-15.

The selection of dog breeds over the last centuries for their phenotype has also selected genetic diseases in predisposed breeds. Thus, brachycephalic breeds have a higher risk of developing gliomas than dolichocephalic breeds [52]. The limited genetic diversity found in these breeds facilitate gene analysis using Genome-wide Association Studies (GWAS) in dogs. Such analysis have been performed with canine glioma cell lines, including J3T, J3T-Bg, SDT3 and G06A[53], [54]. Theses analysis show numerous gene modification in several pathway such retinoblastoma pathway, TP53 pathway or RTK pathway. The expression of these genes is different between glioma cell lines, which could explain differences observed in our study concerning doubling times, radiosensitivity or tumorogenicity [17].

Regarding the response of the 5 canine glioma cell lines to ionizing radiation, they all exhibit a radioresistant character with MIDs and SF2s higher than what has been described for high-grade human gliomas of malignancy: MID is between 1.1 to 3.94 Gy and the average SF2 is 0.51 +/- 0.14 according to Taghian [55]. In addition, the α / β ratios of canine glioma cell lines are less than or equal to 2 Gy. In humans, the value of the α / β ratio for GBMs is said to be intermediate and between 5 and 10 Gy [56]. Values observed on canine glioma cell lines are only found in prostatic cancers and malignant melanoma in humans, where the ratio is close to 2 Gy [57]. In dogs, such a ratio have been demonstrated in stem cells from various extracranial tumors [58]. The immunohistochemistry of the canine glioma lines studied shows a poorly

differentiated character with a strong expression of the strain marker CD133. This poorly differentiated character could partly explain this low α / β ratio. According to the quadratic model, tumors with ratio less than 2 are more sensitive to hypofractionation and therefore at doses greater than 2Gy. These results corroborates hypofractionated irradiation for canine tumors, which is the technique used in the classic approach with dogs. This is because, unlike in humans, ionizing radiation therapy requires general anesthesia in the dog in order to allow total immobilization during irradiation. Thus, the doses delivered between each session are hypofractionated in order to limit too frequent general anesthesia [59]. A 2018 study compared a hypofractionated radiation protocol on intracranial tumors of dogs. This hypofractionated approach (10x4Gy) offers the same overall survival as the classic approach (20x2.5Gy), without additional side effects, which allows the number of general anesthesias suffered by the dog to be halved [60].

The intracerebral implantation of the five cell lines available to us in the laboratory has confirmed their ability to reproduce high-grade gliomas of malignancy when they are implanted orthotopically: astrocytomas for J3T, SDT3 and Raffray, Oligodendroglioma for G06A and poorly differentiated glioma for J3T-Bg.The xenograft phenotype is consistent with that of the original tumor for J3T cells (from anaplastic astrocytoma) and SDT3 (from glioblastoma). The very little differentiated character of J3T-Bg can be explained by the fact that these cells were recovered after subcutaneous implantation of J3T cells in Biege Nude XID mice, this passage potentially having led to the selection of a cell subpopulation. The Raffray were isolated from a grade III oligodendroglioma. The in vitro analysis of the expression profile of the cell line carried out by the laboratory that isolated them revealed a poorly differentiated astrocytic phenotype, a phenotype confirmed by the analysis we carried out on these cells included in HistoGel. The orthotopic implantation of Raffray therefore confirms what had been observed in vitro: the isolated tumor cells reproduce a high-grade astrocytoma and not an oligodendroglioma, which seems to indicate a selection of astrocytic tumor cells during the establishment of the cell line. Finally, the tumors obtained from the G06A do not reproduce the original tumor both in terms of phenotype (the xenograft is oligodendroglial, the tumor of astrocytic origin) and of grade of malignancy (grade III for the xenograft, grade IV for the original tumor). The rate of engraftment of G06A cells (only 25%) and the phenotype that they induce when injected make them the least interesting cell line to use in a perspective of future implementation of a model of murine study of canine diffuse glioma.

5. Conclusion

Evaluation of the sentivity of characterized canine glioblastoma cell lines shows a strong similarity between the characteristics of human and canine glial tumors. In fact, all of the canine lines studied exhibit a doubling time, a karyotype, a clonality test equivalent to the elements observed in humans. Likewise for radioresistance, the canine and human lines have the same criteria for radioresistance. Finally, the expression of surface antigens is identical between these two species and after orthotopic injection, each cell lines reproduce the original tumor. Thus, a strong similarity between man and dog is present concerning the cellular, molecular and cellular behavior to ionizing therapy, and these elements are in favor of the choice of the dog as a study model for gliomas in humans.

References

[1] Q. T. Ostrom et al., « The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review », Neuro-Oncol., vol. 16, no 7, p. 896-913, juill. 2014, doi: 10.1093/neuonc/nou087.

[2] M. R. Gilbert et al., « A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma », N. Engl. J. Med., vol. 370, no 8, p. 699-708, févr. 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1308573.

[3] M. Weller et al., « Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial », Lancet Oncol., vol. 18, no 10, p. 1373-1385, 2017, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30517-X.

[4] G. Simonetti, P. Gaviani, A. Botturi, A. Innocenti, E. Lamperti, et A. Silvani, « Clinical management of grade III oligodendroglioma », Cancer Manag. Res., vol. 7, p. 213-223, 2015, doi: 10.2147/CMAR.S56975.

[5] M. D. Walker et al., « Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial », J. Neurosurg., vol. 49, no 3, p. 333-343, sept. 1978, doi: 10.3171/jns.1978.49.3.0333.

[6] K. Kristiansen et al., « Combined modality therapy of operated astrocytomas grade III and IV. Confirmation of the value of postoperative irradiation and lack of potentiation of bleomycin on survival time: a prospective multicenter trial of the Scandinavian Glioblastoma Study Group », Cancer, vol. 47, no 4, p. 649-652, févr. 1981.

[7] M. Rapp, J. Baernreuther, B. Turowski, H.-J. Steiger, M. Sabel, et M. A. Kamp, « Recurrence Pattern Analysis of Primary Glioblastoma », World Neurosurg., vol. 103, p. 733-740, juill. 2017, doi: 10.1016/j.wneu.2017.04.053.

[8] J. H. Im et al., « Recurrence patterns after maximal surgical resection and postoperative radiotherapy in anaplastic gliomas according to the new 2016 WHO classification », Sci. Rep., vol. 8, no 1, Art. no 1, janv. 2018, doi: 10.1038/s41598-017-19014-1.

[9] I. Ader et al., « Preclinical evidence that SSR128129E – A novel small-molecule multi-fibroblast growth factor receptor blocker – Radiosensitises human glioblastoma », Eur. J. Cancer, vol. 50, no 13, p. 2351-2359, sept. 2014, doi: 10.1016/j.ejca.2014.05.012.

[10] A. Kowalski-Chauvel et al., « Alpha-6 integrin promotes radioresistance of glioblastoma by modulating DNA damage response and the transcription factor Zeb1 », Cell Death Dis., vol. 9, no 9, Art. no 9, août 2018, doi: 10.1038/s41419-018-0853-x.

[11] G. J. Cerniglia 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., vol. 82, no 6, p. 1230-1240, déc. 2012, doi: 10.1124/mol.112.080408.

[12] W. Wang et al., « NVP-BEZ235, a novel dual PI3K/mTOR inhibitor, enhances the radiosensitivity of human glioma stem cells in vitro », Acta Pharmacol. Sin., vol. 34, no 5, Art. no 5, mai 2013, doi: 10.1038/aps.2013.22.

[13] V. M. Lu, F. Crawshay-Williams, B. White, A. Elliot, M. A. Hill, et H. E. Townley, « Cytotoxicity, dose-enhancement and radiosensitization of glioblastoma cells with rare earth nanoparticles », Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol., vol. 47, no 1, p. 132-143, déc. 2019, doi: 10.1080/21691401.2018.1544564.

[14] J. F. Hainfeld, S. M. Ridwan, Y. Stanishevskiy, R. Panchal, D. N. Slatkin, et H. M. Smilowitz, « Iodine nanoparticles enhance radiotherapy of intracerebral human glioma in mice and increase efficacy of chemotherapy », Sci. Rep., vol. 9, no 1, Art. no 1, mars 2019, doi: 10.1038/s41598-019-41174-5.

[15] C. Mirjolet et al., « The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept », Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol., vol. 108, no 1, p. 136-142, juill. 2013, doi: 10.1016/j.radonc.2013.04.004.

[16] S. M. O'Cathail, T. D. Pokrovska, T. S. Maughan, K. D. Fisher, L. W. Seymour, et M. A. Hawkins, « Combining Oncolytic Adenovirus with Radiation—A Paradigm for the Future of Radiosensitization », Front. Oncol., vol. 7, juill. 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00153.

[17] P. J. Dickinson, D. York, R. J. Higgins, R. A. LeCouteur, N. Joshi, et D. Bannasch, « Chromosomal Aberrations in Canine Gliomas Define Candidate Genes and Common Pathways in Dogs and Humans », J. Neuropathol. Exp. Neurol., vol. 75, no 7, p. 700-710, 2016, doi: 10.1093/jnen/nlw042.

[18] S. B. Amin et al., « Comparative Molecular Life History of Spontaneous Canine and Human Gliomas », Cancer Cell, vol. 37, no 2, p. 243-257.e7, févr. 2020, doi: 10.1016/j.ccell.2020.01.004.

[19] N. P. Connolly et al., « Cross-species transcriptional analysis reveals conserved and host-specific neoplastic processes in mammalian glioma », Sci. Rep., vol. 8, no 1, Art. no 1, janv. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-19451-6.

[20] G. Stoica, G. Lungu, H. Martini-Stoica, S. Waghela, J. Levine, et R. Smith, « Identification of cancer stem cells in dog glioblastoma », Vet. Pathol., vol. 46, no 3, p. 391-406, mai 2009, doi: 10.1354/vp.08-VP-0218-S-FL.

[21] F. Fernández et al., « Presence of neural progenitors in spontaneous canine gliomas: A histopathological and immunohistochemical study of 20 cases », Vet. J. Lond. Engl. 1997, vol. 209, p. 125-132, mars 2016, doi: 10.1016/j.tvjl.2015.10.039.

[22] T. E. Kishimoto et al., « Expression of Oligodendrocyte Precursor Cell Markers in Canine Oligodendrogliomas », Vet. Pathol., vol. 55, no 5, p. 634-644, 2018, doi: 10.1177/0300985818777794.

[23] J. W. Koehler et al., « A Revised Diagnostic Classification of Canine Glioma: Towards Validation of the Canine Glioma Patient as a Naturally Occurring Preclinical Model for Human Glioma », J. Neuropathol. Exp. Neurol., vol. 77, no 11, p. 1039-1054, nov. 2018, doi: 10.1093/jnen/nly085.

[24] R. J. Higgins et al., « Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFRalpha and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping », J. Neurooncol., vol. 98, no 1, p. 49-55, mai 2010, doi: 10.1007/s11060-009-0072-5.

[25] D. York et al., « TP53 mutations in canine brain tumors », Vet. Pathol., vol. 49, no 5, p. 796-801, sept. 2012, doi: 10.1177/0300985811424734.

[26] C. E. Boudreau, D. York, R. J. Higgins, R. A. LeCouteur, et P. J. Dickinson, « Molecular signalling pathways in canine gliomas: Glioma pathways », Vet. Comp. Oncol., p. n/a-n/a, mars 2015, doi: 10.1111/vco.12147.

[27] P. J. Dickinson et al., « Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Expression and Peritumoral Edema in Canine Primary Central Nervous System Tumors », Vet. Pathol., vol. 45, no 2, p. 131-139, mars 2008, doi: 10.1354/vp.45-2-131.

[28] D. Mitchell et al., « Common Molecular Alterations in Canine Oligodendroglioma and Human Malignant Gliomas and Potential Novel Therapeutic Targets », Front. Oncol., vol. 9, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00780.

[29] A. Filley et al., « Immunologic and gene expression profiles of spontaneous canine oligodendrogliomas », J. Neurooncol., vol. 137, no 3, p. 469-479, mai 2018, doi: 10.1007/s11060-018-2753-4.

[30] E. P. Spugnini, D. E. Thrall, G. S. Price, N. J. Sharp, K. Munana, et R. L. Page, « Primary irradiation of canine intracranial masses », Vet. Radiol. Ultrasound Off. J. Am. Coll. Vet. Radiol. Int. Vet. Radiol. Assoc., vol. 41, no 4, p. 377-380, août 2000.

[31] J. H. Rossmeisl et al., « Invited Review-Neuroimaging response assessment criteria for brain tumors in veterinary patients : Brain Tumor Response Assessment », Vet. Radiol. Ultrasound, vol. 55, no 2, p. 115-132, mars 2014, doi: 10.1111/vru.12118.

[32] N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, et C. van Bree, « Clonogenic assay of cells in vitro », Nat. Protoc., vol. 1, no 5, p. 2315-2319, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.339.

[33] B. Fertil, H. Dertinger, A. Courdi, et E. P. Malaise, « Mean inactivation dose: a useful concept for intercomparison of human cell survival curves », Radiat. Res., vol. 99, no 1, p. 73-84, juill. 1984.

[34] B. Fertil et E. P. Malaise, « Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: Analysis of 101 published survival curves », Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., vol. 11, no 9, p. 1699-1707, sept. 1985, doi: 10.1016/0360-3016(85)90223-8.

[35] T. Björk-Eriksson, C. West, E. Karlsson, et C. Mercke, « Tumor radiosensitivity (SF2) is a prognostic factor for local control in head and neck cancers », Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., vol. 46, no 1, p. 13-19, janv. 2000, doi: 10.1016/s0360-3016(99)00373-9.

[36] M. E. Berens, A. Giese, J. R. Shapiro, et S. W. Coons, « Allogeneic astrocytoma in immune competent dogs », Neoplasia N. Y. N, vol. 1, no 2, p. 107-112, juin 1999.

[37] N. G. Rainov, S. Koch, M. Sena-Esteves, et M. E. Berens, « Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models », J. Neuropathol. Exp. Neurol., vol. 59, no 7, p. 607-613, juill. 2000.

[38] S. Inoue et al., « Novel animal glioma models that separately exhibit two different invasive and angiogenic phenotypes of human glioblastomas », World Neurosurg., vol. 78, no 6, p. 670-682, déc. 2012, doi: 10.1016/j.wneu.2011.09.005.

[39] Y.-T. Chen, K. A. Tan, L. Y. Pang, et D. J. Argyle, « The class I PI3K/Akt pathway is critical for cancer cell survival in dogs and offers an opportunity for therapeutic intervention », BMC Vet. Res., vol. 8, no 1, p. 73, 2012, doi: 10.1186/1746-6148-8-73.

[40] S. R. Lai, S. A. Castello, A. C. Robinson, et J. W. Koehler, « In vitro anti-tubulin effects of mebendazole and fenbendazole on canine glioma cells », Vet. Comp. Oncol., vol. 15, no 4, p. 1445-1454, déc. 2017, doi: 10.1111/vco.12288.

[41] L. J. Schlein et al., « Immunohistochemical Characterization of Procaspase-3 Overexpression as a Druggable Target With PAC-1, a Procaspase-3 Activator, in Canine and Human Brain Cancers », Front. Oncol., vol. 9, p. 96, 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00096.

[42] B. Feldhaeusser et al., « Evaluation of nanoparticle delivered cisplatin in beagles », Nanoscale, vol. 7, no 33, p. 13822-13830, 2015, doi: 10.1039/C5NR03447G.

[43] W. Debinski, P. Dickinson, J. H. Rossmeisl, J. Robertson, et D. M. Gibo, « New Agents for Targeting of IL-13RA2 Expressed in Primary Human and Canine Brain Tumors », PLoS ONE, vol. 8, no 10, p. e77719, oct. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0077719.

[44] D. York, C. D. Sproul, N. Chikere, P. J. Dickinson, et J. M. Angelastro, « Expression and targeting of transcription factor ATF5 in dog gliomas », Vet. Comp. Oncol., vol. 16, no 1, p. 102-107, mars 2018, doi: 10.1111/vco.12317.

[45] J. Koehler, M. Sandey, N. Prasad, S. A. Levy, X. Wang, et X. Wang, « Differential Expression of miRNAs in Hypoxia (“HypoxamiRs”) in Three Canine High-Grade Glioma Cell Lines », Front. Vet. Sci., vol. 7, p. 104, 2020, doi: 10.3389/fvets.2020.00104.

[46] J. Dupont-Monod, J. Abadie, Université Claude Bernard (Lyon), et VetAgro Sup, « Etablissement et exploitation d’une lignée cellulaire de gliome canin pour la recherche thérapeutique », [s.n.], S.l., 2014.

[47] M. E. Berens, G. Bjotvedt, D. C. Levesque, M. D. Rief, J. R. Shapiro, et S. W. Coons, « Tumorigenic, invasive, karyotypic, and immunocytochemical characteristics of clonal cell lines derived from a spontaneous canine anaplastic astrocytoma », Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim., vol. 29, no 4, p. 310-318, avr. 1993, doi: 10.1007/BF02633959.

[48] P. Dahan et al., « Ionizing radiations sustain glioblastoma cell dedifferentiation to a stem-like phenotype through survivin: possible involvement in radioresistance », Cell Death Dis., vol. 5, p. e1543, 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.509.

[49] K. S. Joiner et E. A. Spangler, « Evaluation of HistoGelTM-embedded specimens for use in veterinary diagnostic pathology », J. Vet. Diagn. Investig. Off. Publ. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. Inc, vol. 24, no 4, p. 710-715, juill. 2012, doi: 10.1177/1040638712445763.

[50] F. Dalenc et al., « Increased expression of a COOH-truncated nucleophosmin resulting from alternative splicing is associated with cellular resistance to ionizing radiation in HeLa cells », Int. J. Cancer, vol. 100, no 6, p. 662-668, août 2002, doi: 10.1002/ijc.10558.

[51] A. Gavish, E. Krayzler, et R. Nagler, « Tumor Growth and Cell Proliferation Rate in Human Oral Cancer », Arch. Med. Res., vol. 47, no 4, p. 271-274, mai 2016, doi: 10.1016/j.arcmed.2016.07.007.

[52] J. M. Dobson, « Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs », ISRN Vet. Sci., vol. 2013, p. 1-23, 2013, doi: 10.1155/2013/941275.

[53] B. M. vonHoldt et al., « Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication », Nature, vol. 464, no 7290, p. 898-902, avr. 2010, doi: 10.1038/nature08837.

[54] M. Paoloni et C. Khanna, « Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans », Nat. Rev. Cancer, vol. 8, no 2, p. 147-156, févr. 2008, doi: 10.1038/nrc2273.

[55] A. Taghian et al., « In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme », Int. J. Radiat. Oncol., vol. 23, no 1, p. 55-62, janv. 1992, doi: 10.1016/0360-3016(92)90543-Q.

[56] C. M. van Leeuwen et al., « The alfa and beta of tumours: a review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies », Radiat. Oncol., vol. 13, no 1, p. 96, déc. 2018, doi: 10.1186/s13014-018-1040-z.

[57] C. Hennequin et B. Dubray, « Le rapport alpha/bêta revisité à l'heure de l'hypofractionnement », Cancer/Radiothérapie, vol. 17, no 5-6, p. 344-348, oct. 2013, doi: 10.1016/j.canrad.2013.06.035.

[58] T. Deguchi, K. Hosoya, Y. Murase, S. Koangyong, S. Kim, et M. Okumura, « Analysis of radiosensitivity of cancer stem-like cells derived from canine cancer cell lines », Vet. Comp. Oncol., vol. 17, no 2, p. 119-129, juin 2019, doi: 10.1111/vco.12452.

[59] M. Dolera et al., « Frameless stereotactic radiotherapy alone and combined with temozolomide for presumed canine gliomas: DOLERA ET AL. », Vet. Comp. Oncol., vol. 16, no 1, p. 90-101, mars 2018, doi: 10.1111/vco.12316.

[60] P. Schwarz et al., « Comparative evaluation of a novel, moderately hypofractionated radiation protocol in 56 dogs with symptomatic intracranial neoplasia », J. Vet. Intern. Med., vol. 32, no 6, p. 2013-2020, nov. 2018, doi: 10.1111/jvim.15324.

Les données obtenues lors de cette première étude sont synthétisées sur le Tableau 5. Les données notées en rouge correspondent aux données apportées par notre étude, et celles notées en bleu sont des études ultérieures qui pourraient être faites pour affiner la caractérisation de ces lignées cellulaires.

Tableau 5 : *Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique et des résultats obtenus concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires (rouge : résultats obtenus ; bleu : expérimentation à réaliser).*

		J3T	J3T-Bg	SDT-3	G06A	Raffray
Tumeur d'origine						
		Astrocytome anaplasique d'un Boston Terrier mâle de 10 ans (Berens et al., 1993	Lignée dérivée à partir des J3T après un passage sous-cutané sur souris Beige Nude XID (York et al. 2012)	GBM d'un Bouledogue anglais mâle de 12 ans (York et al. 2012)	GBM d'un berger australien, femelle stérilisée, de 2 ans (York et al. 2012)	Oligodendrogliome anaplasique d'un boxer de 7 ans (Dupont-Monod, 2014)
Caractérisation						
(I) Méthodes pour démontrer l'identité d'une lignée cellulaire	Empreinte ADN/ Profiling	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites
	Analyse cytogénétique, caryotype	Nombre modal de chromosomes = 84/ Nombre de chromosomes < 82 sur 20 métaphases observées 7 chromosomes métacentriques et submétacentriques + 1 petit chromosome acrocentrique non apparié 2 chromosomes métacentriques issus de remaniement	Nombre de chromosomes : entre 78 et 81 sur 20 métaphases observées Présence de 2 chromosomes métacentriques issus de remaniements	Nombre de chromosomes : entre 59 et 61 sur 20 métaphases observées Chromosomes remaniés difficiles à identifier	Nombre de chromosomes : entre 78 et 82 sur 20 métaphases observées Présence de 3 chromosomes métacentriques issus de remaniements	Nombre de chromosomes : entre 78 et 82 sur 20 métaphases observées Présence de 2 chromosomes métacentriques issus de remaniements
(II) Méthodes pour mettre en évidence l'espèce d'origine de la lignée cellulaire	-Analyse d'isoenzymes -Microsatellites -Caryotype	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine/ idem	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine	Seulement caryotype réalisé, caryotype de chien très remanié ou espèce inconnue	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine
(III) Méthodes pour mettre en évidence	Morphologie	Astrocytaire/ idem	Compatible avec cellule gliale tumorale	Compatible avec cellule gliale tumorale	Compatible avec cellule gliale tumorale	Compatible avec cellule gliale tumorale

les caractéristiques générales d'une lignée cellulaire	Temps de doublement	- 49 heures (Berens et al., 1993) - 28 heures (Rainov et al. 2000a) - 21 heures	26 heures	26 heures	23 heures	56 heures
		J3T	**J3T-Bg**	**SDT-3**	**G06A**	**Raffray**
	Clonage sur plastique/En agar	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones
(III) Méthodes pour mettre en évidence les caractéristiques générales d'une lignée cellulaire (suite)	Profil d'expression de protéines	- GFAP : 90 % des cellules avec marquage intense/ >90% des cellules marquées faiblement - EGFR : quelques cellules sont très positives, avec un pattern diffus/ non évalué - DCx, NeuN et BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage moyen - Olig2 : > 90% des cellules avec marquage cytoplasmique moyen - CD133 : > 90% des cellules avec marquage moyen En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot	- GFAP : 60 à 90% des cellules marquées faiblement, - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage intense - Olig2 : 60 à 90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - CD133 : > 90% des cellules avec marquage intense En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot	- GFAP : négatif - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage moyen - Olig2 : > 90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - CD133 : > 90% des cellules avec marquage moyen En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot	- GFAP : 5 à 30% des cellules marquées faiblement, - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage intense - Olig2 : 60 à 90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - CD133 : > 90% des cellules avec marquage intense En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot	- GFAP + et inconstant/ idem : 5-30% des cellules avec maruage faible - Olig2 négatif/ 60-90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - Vimentine : +++/idem : >90% des cellules avec marquage intense - S100 négatif/ non évalué - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - CD133 : > 90% des cellules avec marquage moyen En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot
(IV) Méthodes pour confirmer la tumorogénicité	Conservation du pattern histologique lors	Expression de la même morphologie tumorale	Expression de la même morphologie tumorale	Expression de la même morphologie tumorale	Expression de la même morphologie tumorale	Expression de la même morphologie tumorale

d'une lignée cellulaire	de transplantation sous-cutanée chez la souris					
		J3T	**J3T-Bg**	**SDT-3**	**G06A**	**Raffray**
(V) Méthodes pour déterminer le profil de sensibilité aux traitements d'une lignée cellulaire	Evaluation de la chimiosensibilité	Hygromycine, puromycine, ganciclovir, G418 (Rainov et al. 2000a)	Pt(iv)-prodrogue de cisplatine, cisplatine et carboplatine (Feldhaeusser, et al., 2015) CCNU, CPT-11 et TMZ (LeBlanc et al. 2016)	CCNU, CPT-11 (Boudreau et al. 2015)	CCNU, CPT-11 IL-13 canin couplé à une cytotoxine (Debinski et al. 2013)	Doxorubicine
	Evaluation de la radiosensibilité	MID = 4 Gy	MID = 4,6 Gy	MID = 5,7 Gy	MID = 4,7 Gy	MID = 5,2 Gy
Etude moléculaire				**Perte gènes : CDKN2A, CDKN2B, NF1** **Gain gènes : EGFR, EREG, EPGN,PIK3CA, AKT1, FZD6, GLI4, EPHA5** (Dickinson et al.2016)	**Perte gènes : CDKN2A, CDKN2B, EREG, EPGN, FAS, EPHA5** (Dickinson et al.2016)	
		Pas de mutation des exons 3 à 9 sur *TP53* (York et al. 2012) En prévision : évaluation de l'expression de marqueurs de radiorésistance				

B. Étude de l'effet radiosensibilisant des NTC sur les lignées de gliomes canins

Les gliomes diffus sont des tumeurs qui présentent le plus faible taux de guérison malgré un traitement multimodal associant chirurgie, RT et chimiothérapie. Plusieurs axes de recherche sont donc aujourd'hui consacrés au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à améliorer le pronostic associé à ces tumeurs. Parmi celles-ci, l'utilisation de NTC en association à la RT pour radiosensibiliser ces cellules, apparaît comme une option prometteuse. En effet, l'étude bibliographique a montré que les NTC pénètrent très facilement dans de nombreuses cellules tumorales humaines (Neves et al. 2012), entraînent une augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire et la modulation de l'autophagie (Fiorito et al. 2014)**.** Or cette phase du cycle cellulaire est la phase la plus sensible aux RI. Ces derniers arguments, qui s'ajoutent à la mise en évidence de la production de radicaux oxygénés par les cellules au contact des NTC (Meunier et al. 2012)**,** laissent supposer que ceux-ci peuvent radiosensibiliser les cellules tumorales. Par ailleurs, les NTC peuvent être fonctionnalisés par des sels de Gadolinium, agent de contraste en IRM permettant d'augmenter la prise de contraste lors d'acquisition en T1 : on parle alors de gadoNTC. Ainsi, si leur capacité à radiosensibiliser des cellules tumorales est démontrée, les gadoNTC pourraient être des agents théranostiques lors d'études ultérieures. Ils permettraient de détecter les cellules tumorales, infiltrées dans le tissu sain en IRM, et d'abaisser leur seuil de radiorésistance, afin d'améliorer l'efficacité de la RT.

Suite à la caractérisation des différentes lignées cellulaires de gliomes canins effectuée dans la première partie de cette thèse, nous allons évaluer la capacité des NTC à radiosensibiliser ces cellules. En effet, l'étude de la réponse radio-induite de ces cellules, à l'aide des études de clonogénicité, a montré la présence d'un profil radiorésistant avec :

(i) une MID élevée, comprise entre 4 et 5,7 Gy, similaires à celle présentée par les gliomes de haut-grade humains radiorésistants,

(ii) un ratio α/β inférieur à 2, associé à une résistance aux doses couramment utilisées

Ainsi, afin d'évaluer l'effet radiosensibilisant des NTC sur les lignées de gliome canin radiorésistantes, nous présenterons dans un premier temps la méthodologie utilisée pour cette deuxième étude puis nous présenterons les différents résultats obtenus concernant :

(i) la capacité des NTC à pénétrer au sein des cellules tumorales

(ii) l'effet perturbateur des NTC sur le cycle cellulaire

(iii) l'aptitude des NTC à radiosensibiliser les différentes lignées cellulaires de gliome canins, à l'aide de tests de clonogénie.

1. Matériel et méthode

a) Préparation des NTC

(1) Synthèse des NTC

Les Nanotubes de carbone utilisés dans le cadre de cette étude ont été synthétisés au CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux) - UMR CNRS 5085 à Toulouse par Pierre Lonchambon, Assistant Ingénieur Chimie des Matériaux. Les NTC ont été produits selon la technique de CCVD, et suit le protocole établi dans la thèse universitaire de Clarisse Line (Line 2019). Elle utilise une poudre catalytique constituée d'un mélange de MgCoMoO dont les avantages sont décrits dans la partie bibliographique, dans la partie I) C) 3) a). Cette poudre permet la synthèse de NTC composés à 80% de DWNT dont l'extraction à l'acide chlorhydrique est facile et non destructrice.

(a) Synthèse de la poudre catalytique

Une poudre de catalyseur de composition élémentaire $Mg_{0,99}(Co_{3/4}Mo_{1/4})_{0,01}O$ a été utilisée pour la synthèse de DWCNT avec du méthane selon le protocole décrit par E. Flahaut (Flahaut et al. 2003). Cette poudre a été préparée par combustion citrique à partir des précurseurs suivants :

- heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$),
- nitrate de magnésium ($Mg(NO_3)_2$, $6H_2O$)
- nitrate de cobalt ($Co(NO_3)_2$, $6H_2O$)

L'acide citrique est dissous à 50-60 °C dans de l'eau désionisée. Puis, sous agitation, l'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté est ajouté suivi des deux autres précurseurs. Le chauffage et l'agitation ont été arrêtés après dissolution complète des précurseurs. La combustion citrique est dans un four à moufle à 550 °C et 15 minutes sont nécessaires pour achever la réaction redox exothermique et pour transformer la solution en un solide friable. Enfin, cette poudre est broyée manuellement afin d'en réduire le volume. La poudre obtenue est alors prête pour la calcination.

La calcination de la poudre catalytique permet une élimination complète du carbone résiduel, la décomposition des nitrates métalliques et la formation d'oxydes

de cobalt et de molybdène. Cette calcination se réalise en plaçant la poudre dans un four à moufle à 450 °C pendant 1 heure sous flux d'air. Après cette étape, la poudre était prête à être utilisée pour la synthèse des CNT.

(b) Synthèse des NTC avec du méthane par CCVD

Une nacelle en alumine contenant 4 à 5 g de poudre catalytique $Mg_{0,99}(Co_{3/4}Mo_{1/4})_{0,01}O$ est placée au centre d'un réacteur en quartz. La synthèse des NTC va se réaliser dans ce réacteur placé dans un four tubulaire (Figure 29).

Cette synthèse se décompose en 3 étapes :

(i) Augmentation de la température jusqu'à 1000°C à une vitesse de 5°C.cm^{-1}, sous atmosphère H_2 et CH_4 (18% CH4) avec un débit de 15L.h^{-1}. Sous le flux de dihydrogène, le cobalt (II) est réduit de manière sélective et forme des nanoparticules de cobalt. Le méthane, qui fournit le carbone, peut alors être décomposé catalytiquement sur les nanoparticules de cobalt / molybdène. C'est ainsi que les DWCNT sont formés et le molybdène agit comme catalyseur et contribue à la décomposition de la source de carbone.

(ii) Refroidissement jusqu'à 120°C à une vitesse de 5°C.min^{-1}, sous atmosphère H_2 et CH_4 avec un débit de 15L.h^{-1}.

(iii) Rinçage du réacteur à l'azote (N_2) jusqu'à atteindre la température ambiante pendant 20 minutes. Cette dernière étape permet d'éliminer toute trace d'H_2 et de CH_4 avant l'ouverture du réacteur.

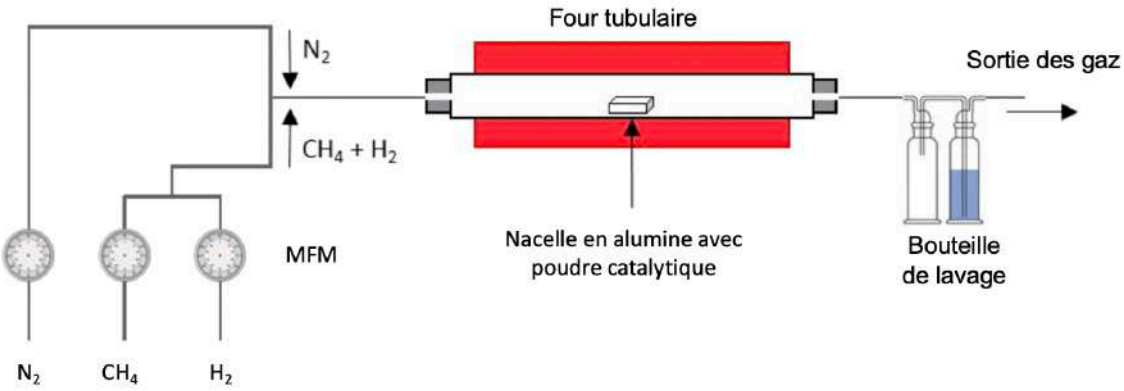


Figure 29 : *Schéma du montage expérimental utilisé pour la synthèse de NTC par CCVD à partir de CH4. Les débits de gaz sont régulés à l'aide de débitmètres massiques (MFM). Une bouteille de lavage est placée à la sortie pour surveiller le débit de gaz et une autre pour éviter le reflux dans le réacteur tubulaire (d'après Line, 2019)*

L'échantillon obtenu après la synthèse est une poudre noire compacte appelée poudre composite, contenant environ 12% de NTC en poids. Le reste correspond au support de magnésie et aux nanoparticules métalliques. Après cette synthèse, la poudre composite est broyée manuellement à l'aide d'une spatule. Plusieurs lots de synthèse sont mélangés afin d'obtenir un échantillon unique utilisé pour toutes les expériences à venir.

(2) Extraction et rinçage des NTC

Afin d'extraire 10mg de NTC, 100,6g de poudre composite est introduit dans un Erlenmeyer et humidifié avec 3-4 g d'eau désionisée avant d'ajouter lentement 5mL de HCl à 37% sous sorbonne. L'erlenmeyer est plongé dans un bain de glace car cette réaction est exothermique, puis le mélange est soniqué (agité par des ultrasons) dans un bain à ultrasons pendant 10 min. La dissolution de MgO, Co et Mo donne une coloration bleu-vert à la solution. Le mélange est ensuite placé sous sorbonne pendant une nuit afin de parvenir à une dissolution complète des nanoparticules métalliques accessibles. Puis la solution est ensuite filtrée sur une membrane en nitrate de cellulose (Merck Millipore, 0,45 µm). Enfin, les NTC sont rincés plusieurs fois avec de l'eau désionisée jusqu'à atteindre le pH de l'eau désionisée. Les NTC vont pouvoir être fonctionnalisés par du gadolinium ou dispersés directement dans du milieu de culture.

Le HCl n'étant pas oxydant, l'extraction n'endommage pas la structure du NTC. Cependant, elle ne permet pas l'élimination des particules métalliques encapsulées dans des coques de carbone, ou toute autre forme de carbone (carbone désorganisé).

(3) Fonctionnalisation endoédrique des NTC par du chlorure de gadolinium

Les NTC sont mélangés dans un mortier avec une quantité de $GdCl_3$ afin d'obtenir un rapport molaire $GdCl_3$/NTC de 1,3. Puis ce mélange de $GdCl_3$-NTC est introduit dans deux ampoules en verre placées sous vide. Le mélange et le remplissage des ampoules se fait dans une tente sous N_2 pour éviter la contamination de l'eau et de l'air. Puis l'ampoule est purgée avec du N_2 trois fois consécutives avant d'être laissée sous vide pendant 1h et scellée.

L'ampoule va alors être placée dans un four et subir le traitement thermique suivant :

- Augmentation de la température ambiante à 639°C à 5°C.min^{-1},
- Maintien de la température à 639°C pendant 24h,
- Diminution de 639 °C à 589 °C à 0,1°C.min^{-1},
- Diminution de 589 °C à 489 °C à 1°C.min^{-1},
- Diminution de 489 °C à température ambiante à 5°C.min^{-1}

L'ampoule est ouverte et le mélange obtenu est lavé avec 200mL d'un mélange HCl (37%) / H_2O (50/50) cinq fois afin d'éliminer le $GdCl_3$ en excès. L'échantillon final est ensuite congelé et séché par lyophilisation. Ces NTC fonctionnalisés avec du gadolinium seront nommés gadoNTC dans la suite de cette présentation.

(4) Dispersion des NTC

Les NTC et gadoNTC vont être mis en suspension dans un milieu de culture cellulaire DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium)* (Gibco™) complété avec 10% de SVF et 100 unité/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco-BRL). Les protéines présentes dans le SVF vont s'adsorber aux NTC et permettre d'augmenter leur solubilité de manière à avoir une suspension de NTC durable. La concentration finale des solutions mères de NTC et gadoNTC seront de 100 mg/L : 10mg de NTC vont ainsi être dispersés dans 100mL de DMEM.

Dans un flacon de 250mL, 50mL de DMEM est ajouté aux 10mg de NTC. Cette suspension est placée 30 minutes à l'ultra turax (petit diamètre) à la vitesse maximale. Puis 50mL de DMEM est ajouté pour atteindre la concentration souhaitée. Afin de disperser efficacement les NTC, une sonde ultrasonique (Vibra Cell 75042, 20 kHz, 500 W, tige de 12,5 mm de diamètre) est immergée dans la suspension durant 30 min à 30 % d'amplitude 3s ON / 3s OFF.

L'agitation moléculaire provoquée par le turax et la sonde ultrasonique nécessite de placer le flacon dans un bain de glace, afin de limiter l'augmentation de la température et améliorer de l'efficacité de la dispersion.

b) Évaluation de la pénétration des NTC dans les cellules de gliomes canins

(1) Microscopie biphotonique

Afin d'évaluer la pénétration des NTC dans les cellules, l'utilisation de la microscopie biphotonique est un outil adapté car elle permet de faire des coupes en Z

des cellules. Ainsi, elle permet de localiser précisément les NTC, et discriminer les NTC qui sont intracellulaires, de ceux qui sont présents dans le milieu extracellulaire. Par ailleurs, cette technique utilise la fluorescence des NTC pour pouvoir les détecter dans les cellules marquées au DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) ou au PI (Iodure de Propidium). L'analyse au microscope biphotonique a été réalisée en partenariat avec le Dr. Élizabeth Bellard, de l'IPBS (Institut de Biologie et Pharmacologie Structurale).

L'observation de la pénétration des NTC s'est faite sur les lignées cellulaires fixées et vivantes. Pour cela, elles ont été ensemencées dans différentes chambres de culture :

- Les cellules destinées à être observées fixées sont cultivées dans des LAB-TEK I sur lame à 8 compartiments,

- Les cellules observées vivantes sont cultivées dans des chambres de culture LAB-TEK I sur lamelle à 8 compartiments, afin de permettre une observation en microscopie inversée. L'exposition des cellules au NTC ou gadoNTC est décrite selon le protocole suivant pour l'étude des cellules fixées et est schématisée sur le tableau 6 :

- Mise en culture de $5x10^4$ cellules par chambre de culture pendant 1 heure, sur une LAB-TEK I sur lame
- Retrait du milieu de culture et dépôt des NTC aux concentrations de 0, 1, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml
- Incubation à 37°C, à 5% de CO_2 pendant 12 heures
- Retirer les NTC par aspiration et rincer avec 200µL de PBS trois fois
- Déposer 200µL de PFA à 4%, pendant 20 minutes à température ambiante
- Retirer le PFA et rincer avec 200µL de PBS trois fois
- Dépôt de 20µL DAPI ou IP dilué au $1/100^{ème}$ dans du PBS, pendant 10 minutes à l'obscurité
- Retirer le marqueur et rincer avec 200µL de PBS trois fois
- Déposer une lamelle avec le liquide de montage CMF3 et souder la lamelle à la lame.

Pour l'étude des cellules vivantes, le protocole est identique :

- Mise en culture de $5x10^4$ cellules par chambre de culture pendant 1 heure sur une LAB-TEK I sur lamelle

- Retrait du milieu de culture et dépôt des NTC aux concentrations de 0, 1, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml
- Incubation à 37°C, à 5% de CO_2 pendant 12 heures

Une fois montées sur lame, ou après exposition aux NTC pendant 12 heures, les cellules ont été observées au microscope biphotonique à l'IPBS.
Les images obtenues ont ensuite été analysées par le logiciel libre FIJI qui permet de reconstituer les images en 3D (Schindelin et al. 2012).

Tableau 6 : *Représentation schématique de la répartition des cellules et des NTC/gadoNTC par puits d'une lame LAB-TEK*

	5.10^4cellules	5.10^4cellules +NTC 1µg/ml	5.10^4cellules +NTC 5µg/ml	5.10^4cellules +NTC 10µg/ml
	5.10^4cellules +NTC 20µg/ml	5.10^4cellules +NTC 50µg/ml	5.10^4cellules +NTC 100µg/ml	

(2) Spectroscopie Raman

La spectroscopie de Raman a été réalisée par Charlotte Allard, de l'Université de Montréal, sous la direction de Pr Richard Martel. Seule la lignée J3T a pu être étudiée avec la spectroscopie Raman.
Les cellules ont été cultivées sur une lame LAB-TEK I selon le même protocole cité ci-dessus pour étudier les cellules fixées. Elles ont été exposées aux mêmes concentrations de gadoNTC. L'image du signal Raman a été obtenue en extrayant l'image à 1585 cm^{-1}, caractéristique de la bande G et en y soustrayant l'autofluorescence des cellules.

c) Évaluation de la cytoxicité des NTC

(1) Évaluation au bleu de trypan

La viabilité cellulaire des cellules de gliomes canins a également été évaluée par le test au bleu de trypan. Le test d'exclusion de colorant est basé sur le principe

que les cellules viables possèdent des membranes cellulaires intactes qui excluent certains colorants, tels que le bleu de trypan. Ainsi au microscope optique, les cellules viables apparaissent non colorées et les cellules mortes apparaissent colorées en bleu. Après une exposition de 24, 48 et 72 heures à différentes concentrations de NTC (1, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml), les cellules sont rincées deux fois avec du PBS, puis 500µL de trypsine à 37°C est ajouté pendant 5 minutes, puis on ajoute 1,5ml de DMEM. Enfin 20 µL de suspension cellulaire est prélevé et dilué avec du bleu de trypan avec un rapport 1 : 1.

La viabilité cellulaire est déterminée au microscope optique, et elle est exprimée en pourcentage de cellules viables non colorées sur le total des cellules analysées.

(2) Évaluation au WST-1

Les cellules de gliome canin sont ensemencées en triple exemplaire dans des microplaques à 96 puits à une densité de 5 000 cellules par puits. Après 4 heures de culture, elles sont exposées à différentes doses de NTC (1, 5, 10, 20, 50 et 100 µg/ml) pendant 24, 48 et 72 heures. Au moment indiqué, les puits sont vidés, rincés deux fois par 200µL de PBS, puis on dépose 100µL de DMEM avec 10µL de réactif WST-1 (Roche Diagnostics) pendant 2h à 37°C, à l'obscurité. Le colorant formazan est quantifié à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (FLUOstar Optima, BMG Labtech).

L'évaluation de la cytotoxicité cellulaire au WST-1 a été préférée au test au MTT, car il a été démontré que les NTC peuvent interagir avec le MTT et induire une fausse toxicité à des concentrations élevées en NTC (Guadagnini et al. 2015).

d) Étude du cycle cellulaire

Les cellules J3T ont été exposées à différentes concentrations de NTC (0, 1, 10 et 50µg/ml) pendant 24 heures. Puis elles ont été fixées dans de l'éthanol glacé à 70% pendant 1 heure à 4°C. Après lavage, le culot cellulaire est remis en suspension dans un tampon de coloration à l'iodure de propidium (PI) (50µg/ml de PI, 10µg/ml de RNAse A) et incubé pendant 15 min à 37°C. La teneur en ADN a été analysée par cytométrie en flux (cytomètre BD AccuriTM C6). Le pourcentage de cellules en phases sub-G1, G1, S et G2/M est quantifié avec le logiciel BD Accuri C6 (Le Pont de Claix, France).

e) *Étude de l'effet radiosensibilisant des NTC*

Plusieurs protocoles ont été étudiés pour évaluer l'effet radiosensibilisant des NTC.

(1) Test de survie SF2

Les lignées cellulaires de gliome canin sont exposées à différentes concentrations de NTC (0, 20 et 50µg/ml) pendant 24 heures. Le milieu est ensuite retiré, les cellules dissociées et elles sont ensemencées à 1, 2, 4, 5, ou 7 cellules par puits dans une plaque 96 puits, dans 150µL de DMEM.

Il faut 2 plaques 96 puits par condition et pour chaque condition, deux plaques seront irradiées et deux plaques ne le seront pas. Ainsi, pour cette étude, il y a 6 conditions au total, soit 60 plaques 96 puits à préparer par lignée cellulaire étudiée. La moitié des plaques sont irradiées à 2Gy avec le Gamma-cell Exactor 40 (Nordion, Ottawa, ON, Canada), puis elles sont placées à l'incubateur. Après 10 jours de culture, le milieu est retiré, 20µL de fixateur FAA (Formalin - Acide Acétique - Alcool) est déposé dans le puits, puis ils ont rincés et colorés par 0,1% de cristal violet. Les puits positifs, ceux où une colonie s'est développée, sont reportés dans un tableur.

L'exploitation des résultats se fait en traçant un graphique avec en abscisse le nombre de cellules par puits et en ordonnées la valeur correspondant à la formule suivante : $\ln\left(\frac{puits\ vides}{96}\right)$

La valeur du SF2 correspond au rapport des pentes de la série irradiée sur la série non irradiée.

(2) Test de clonogénicité

Deux protocoles de clonogénie ont été évalués :

- Protocole A : les lignées cellulaires sont exposées à différentes concentrations de NTC (0 et 50 µg/ml) **pendant 24 heures** puis le milieu contenant les NTC est remplacé par du DMEM, les cellules sont trypsynées et 1500 cellules sont ensemencées dans des boites de culture,
- Protocole B : Les lignées cellulaires sont ensemencées à 1500 cellules dans des boites de cultures. Après 12 heures de culture, le milieu est retiré et est remplacé par du DMEM associé à des NTC à différentes

concentrations (1 et 5 µg/ml), et les cellules seront **exposées pendant 10 jours** aux NTC

Une fois les cellules ensemencées à 1500 cellules par boite de culture, la suite du protocole est identique à celui présenté dans la partie II) A) 3) 6).

Ainsi, les cellules du protocole B vont rester au contact des NTC pendant l'irradiation et pendant toute la période où les colonies cellulaires vont se développer.

2. Résultats

a) Évaluation de la pénétration des NTC dans les cellules de gliome canin

(1) Microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique réalisée sur les différentes lignées de gliome canin a permis de mettre en évidence la présence de NTC localisés dans le compartiment cellulaire. Deux colorants ont été utilisés pour colorer la cellule et aider à la localisation des NTC : le DAPI et l'IP. Ces deux molécules fluorescentes vont se fixer à l'ADN et colorer le noyau intensément en bleu pour le DAPI et en rouge pour l'IP. On retrouve aussi des traces de fluorescence dans le cytoplasme cellulaire ce qui permet de bien délimiter le contour cellulaire.

Le marquage cellulaire au DAPI visible sur la Figure 30 ci-dessous montre une coloration marquée du noyau. On peut observer un amas de NTC pointé par la flèche

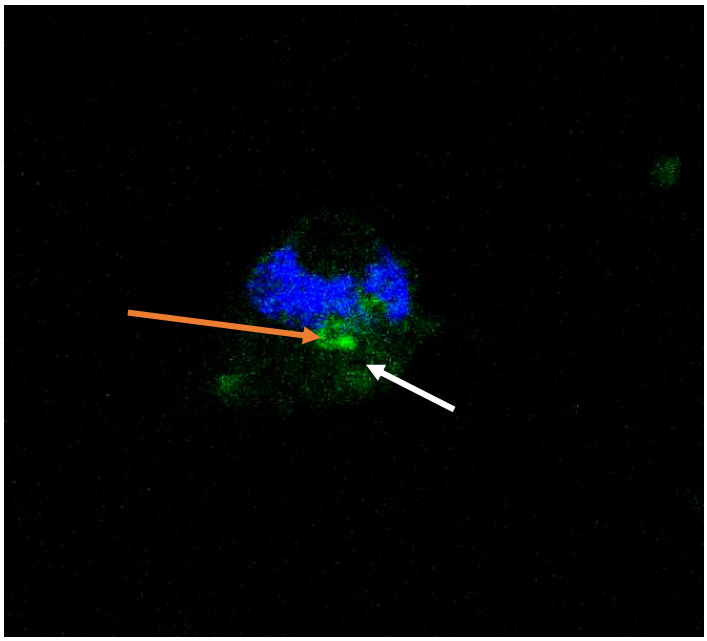


Figure 30 : *Image en microscopie biphotonique d'une cellule J3T cultivée avec des NTC à 20µg/ml, et marquage nucléaire au DAPI. On distingue le noyau marqué en bleu, ainsi qu'un amas de NTC (flèche orange). La flèche blanche montre le bruit diffus dans le cytoplasme*

orange sur la Figure 30. Un bruit diffus présent dans le cytoplasme de la cellule est indiqué par la flèche blanche. Ceci est causé par un chevauchement des spectres d'émission du DAPI, où le pic d'émission maximal est de 456 nm, avec un épaulement vers le vert et celui des NTC, compris en 500 et 550 nm. Ainsi, la distinction entre le DAPI et les NTC peut être difficile.

Pour pallier ce problème, un autre colorant a été utilisé : le Iodure de Propidium. Cette molécule fluorescente a l'avantage d'avoir un spectre d'émission décalé vers le rouge, dont le pic d'émission maximal est de 636nm. Ainsi, les deux spectres d'émission des NTC et de l'IP seront bien distincts et le bruit sera limité.

L'observation des différentes cellules de gliome canin au microscope biphotonique avec le marquage à l'IP permet de mettre en évidence la présence de NTC et de gadoNTC dans le compartiment cellulaire, avec toutes les concentrations, y compris aux plus faibles dilutions (Figure 31). La microscopie biphotonique permet de faire des coupes en Z : cela permet d'évaluer avec précision l'épaisseur cellulaire et d'avoir une localisation des NTC et gadoNTC. On peut ainsi avoir une appréciation qualitative de la pénétration des NTC : plus la concentration d'exposition aux NTC/gadoNTC augmente, plus ils sont présents en position intracellulaire.

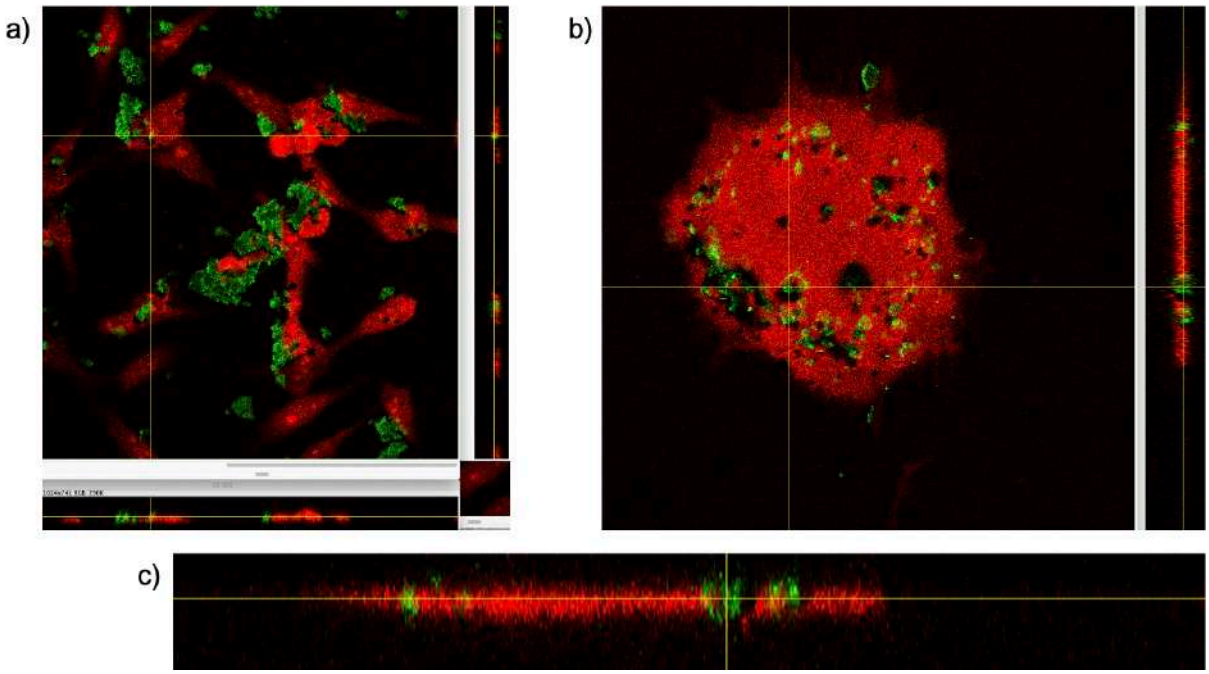


Figure 31 : *Images obtenues par microscopie biphotonique de différentes lignées de gliomes avec des concentrations de NTC a) J3T-Bg avec 50µg/ml de NTC b) Raffray avec 20µg/ml de NTC c) agrandissement de coupe orthogonale YZ vue sur l'image (b) permet de bien visualiser la position des NTC en position intracellulaire.*

Ces lignées cellulaires ont aussi été observées vivantes par microscopie inversée. Concernant la distribution des NTC et gadoNTC, on retrouve exactement les mêmes images qu'avec les cellules fixées. Plus les cellules ont été exposées à des concentrations élevées de nanotubes de carbone, plus on en retrouve dans le cytosol de la cellule. Cependant, l'observation des cellules vivantes apporte une information supplémentaire. En effet, dans les minutes suivant l'observation des cellules au laser, des modifications cellulaires importantes étaient observées, avec l'apparition de vacuoles compatibles avec une mort cellulaire induite par le laser (Figure 32). Aucune mort cellulaire n'a été observée avec les cellules non-exposées aux NTC. Il semble donc que cette mortalité ait été induite par une interaction entre le faisceau laser et les NTC.

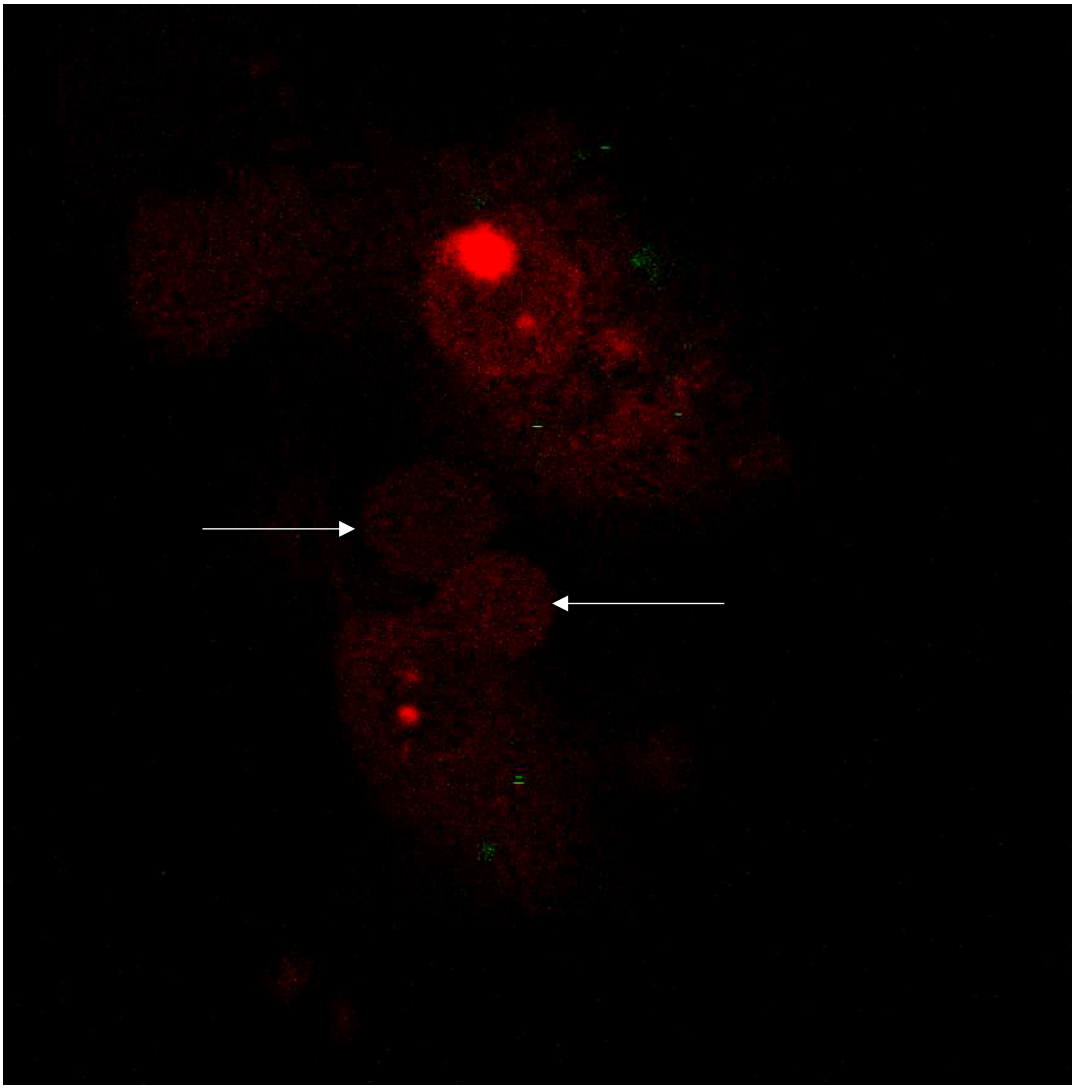


Figure 32 : *Images de cellules J3T vivantes observées au microscope inversé, exposée à une concentration de NTC de 20µg/ml. Les cellules sont marquées à l'IP (rouge), les NTC sont en verts. Les flèches blanches indiquent les vacuoles qui apparaissent lors de l'induction de la mort cellulaire.*

(2) Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman des cellules J3T, exposées à différentes concentrations de gadoNTC arrive à les détecter avec l'apparition d'un pic marqué à 1595 cm^{-1}, caractéristique de la bande G des NTC (Figure 33). On peut remarquer dans chaque échantillon, un pic Raman autour de 1610cm^{-1}, indépendant des NTC. La quantité de gadoNTC visibles sur les échantillons est corrélée à l'augmentation de la concentration d'exposition. Les données à plus basses concentrations sont plus difficiles à analyser du fait de la présence d'artefacts provenant de l'échantillon et du montage, mais on parvient tout de même à identifier des zones présentant du signal propre à la bande G des nanotubes.

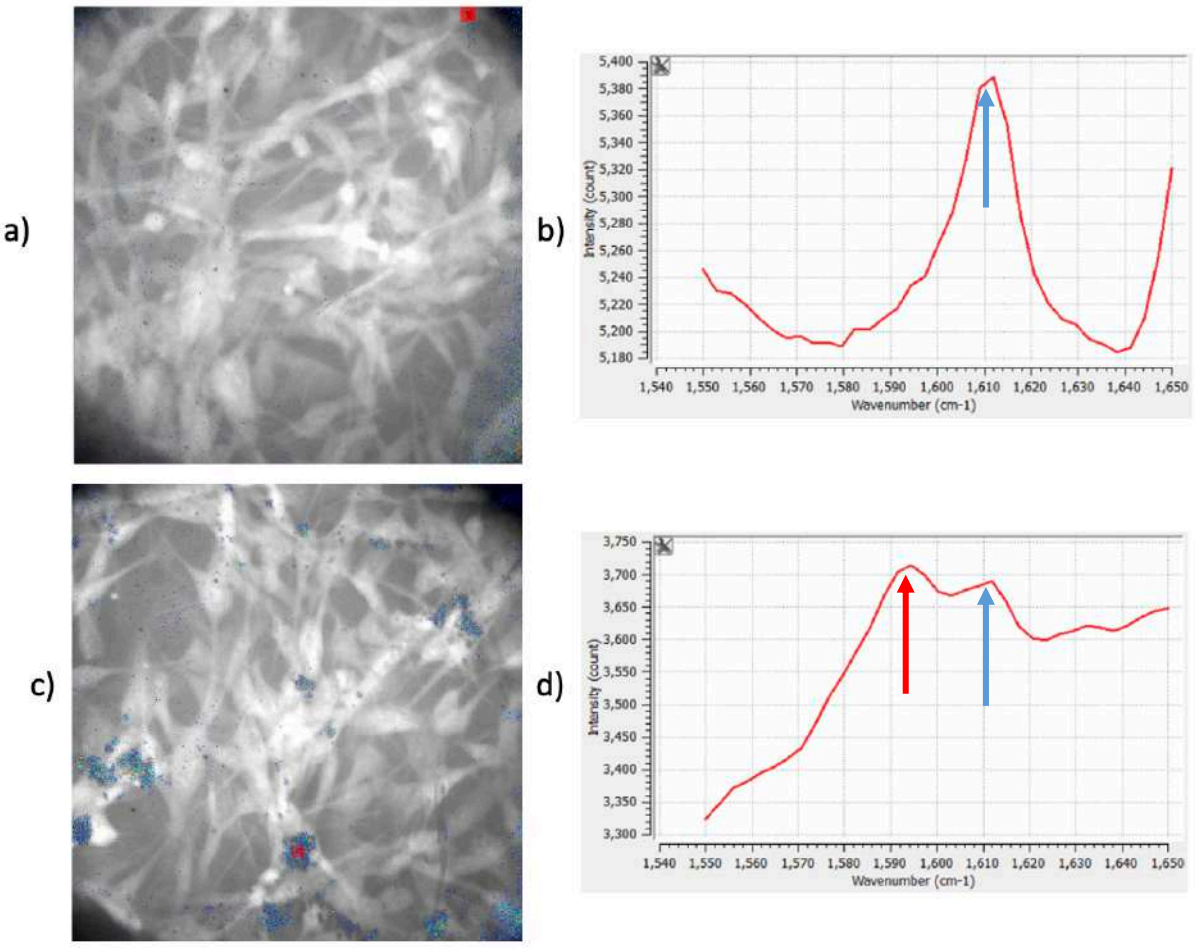


Figure 33 : *a) et b) Résultats Raman des J3T, non exposées aux NTC c) et d) Résultats Raman des J3T exposées à 20 µg/ml de gadoNTC. Flèche bleue : Pic Raman d'origine inconnue ; Flèche Rouge : Pic Raman spécifique de la bande G des NTC*

b) *Évaluation de la cytotoxicité des NTC*

(1) Évaluation de la cytotoxicité au bleu de trypan

En utilisant une gamme de concentrations allant de 1 à 100µg/ml, l'évaluation au bleu de trypan ne montre pas de cytoxicité des NTC que ce soit après 24, 48 et 72 heures de contact, et quelle que soit la lignée cellulaire (Figure 34).

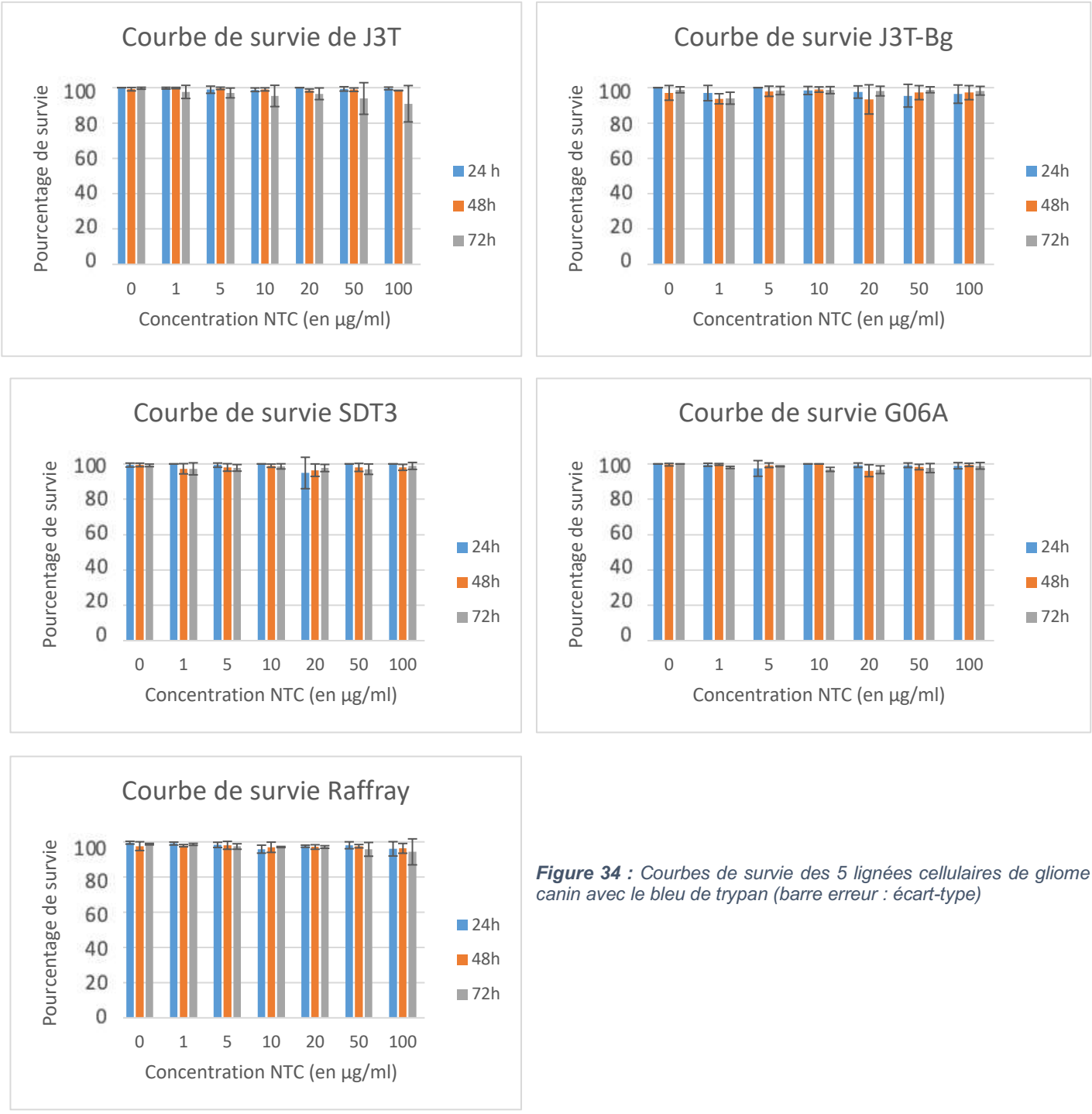


Figure 34 : *Courbes de survie des 5 lignées cellulaires de gliome canin avec le bleu de trypan (barre erreur : écart-type)*

(2) Évaluation au WST1

L'évaluation de la cytotoxicité via le dosage colorimétrique WST-1 montre pour les lignées J3T et J3T-Bg, l'apparition d'une toxicité modérée pour les doses de 20, 50 et 100µg/ml, après 72 heures d'exposition aux NTC (Figure 35). Pour des expositions à 24 et 48 heures, aucune concentration de NTC ne montre d'effet cytotoxique.

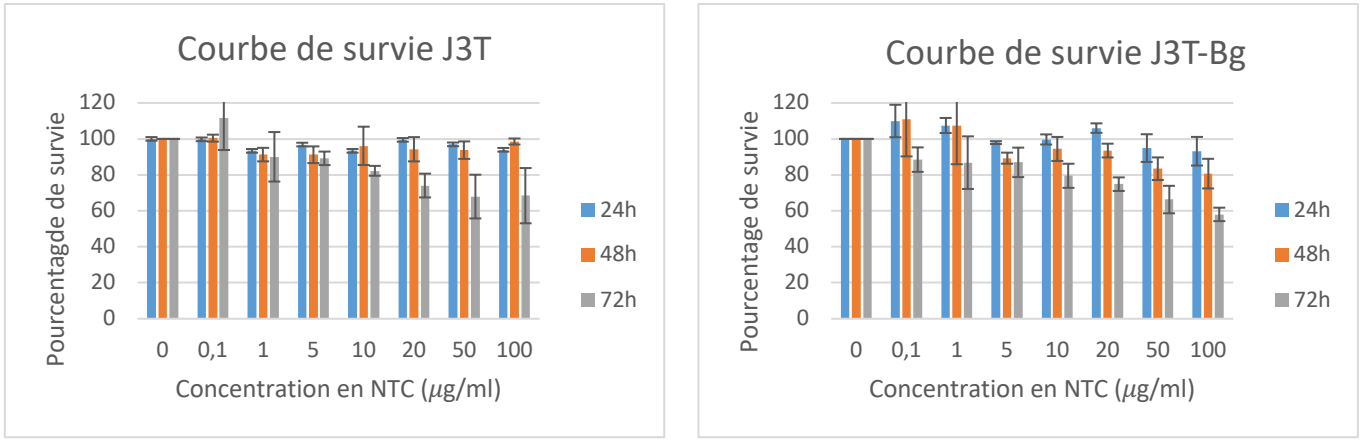


Figure 35 : *Courbes de survie des lignées J3T et J3T-Bg au test colorimétrique WST1 à différentes concentrations de NTC, pendant 24, 48 et 72 heures d'exposition (barre erreur : écart-type)*

Concernant les lignées SDT3, G06A et Raffray, l'exposition à différentes concentrations de NTC n'entraîne aucune cytoxicité des cellules jusqu'à 72 heures d'exposition (Figure 36). On peut noter dans certains cas un pourcentage de survie supérieur à 100%. Ceci s'observe dans les cas où les cellules ont une croissance supérieure à celles des cellules témoins qui n'ont pas été exposées aux NTC.

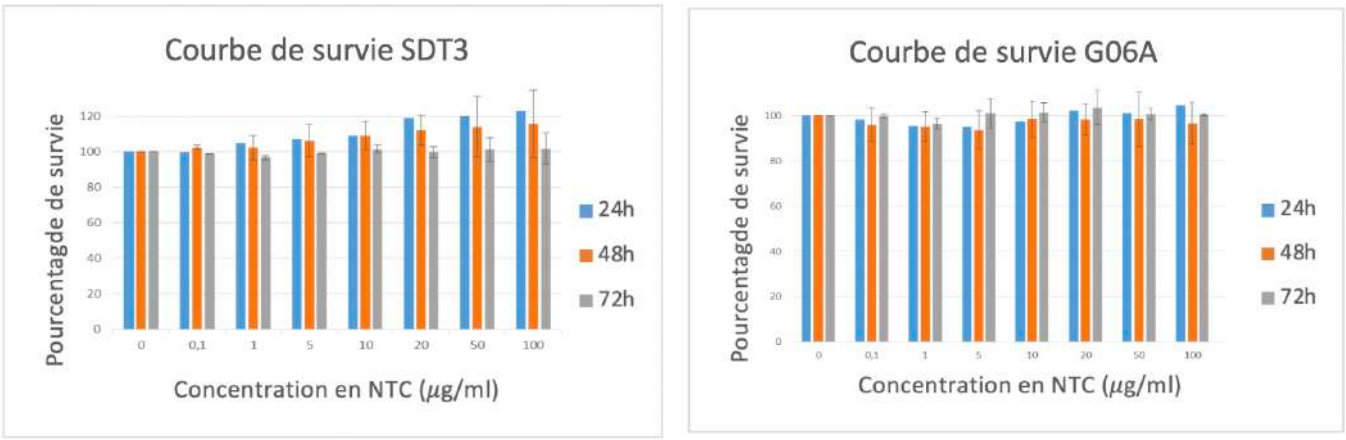


Figure 36 : *Courbes de survie des lignées SDT3 et G06A au test colorimétrique WST1 à différentes concentrations de NTC, pendant 24, 48 et 72 heures d'exposition (barre erreur : écart-type)*

c) *Évaluation de l'effet de NTC sur le cycle cellulaire*

Le protocole pour évaluer le cycle cellulaire a nécessité de nombreuses mises au point afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules à analyser. Les difficultés de la mise au point de ce protocole seront présentées dans la discussion des résultats de cette deuxième partie expérimentale.

Une seule lignée de gliome canin a été utilisée pour réaliser cette étude préliminaire : la lignée de gliome canin J3T.

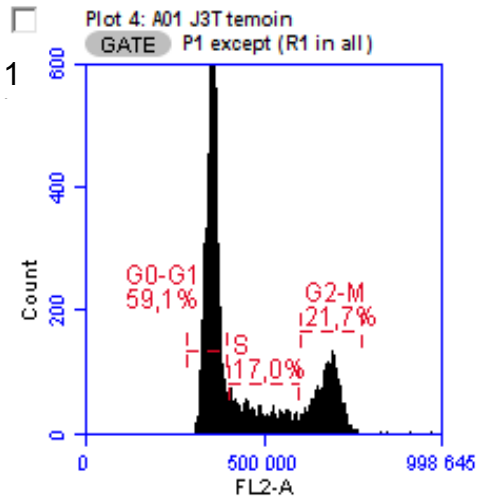


Figure 37 : *Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux de la lignée J3T sans exposition aux NTC*

Les données obtenues par la technique de cytométrie en flux avec de l'iodure de propidium sont présentées sur la Figure 37 ci-contre, pour les cellules non exposées aux NTC. Ces données ont par la suite été analysées par le logiciel BD Accuri C6, et sont présentées dans la Figure 38.

L'analyse du cycle pour cette lignée montre une augmentation de la proportion de cellules bloquées dans la phase du cycle G2/M. En effet, pour des doses de 50 µg/ml, la proportion de cellules dans cette phase augmente de 8% par rapport aux cellules non exposées aux NTC. Des études supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ou infirmer ce blocage dans la phase G2/M pour la lignée J3T, mais aussi pour les autres lignées cellulaires de gliome canin.

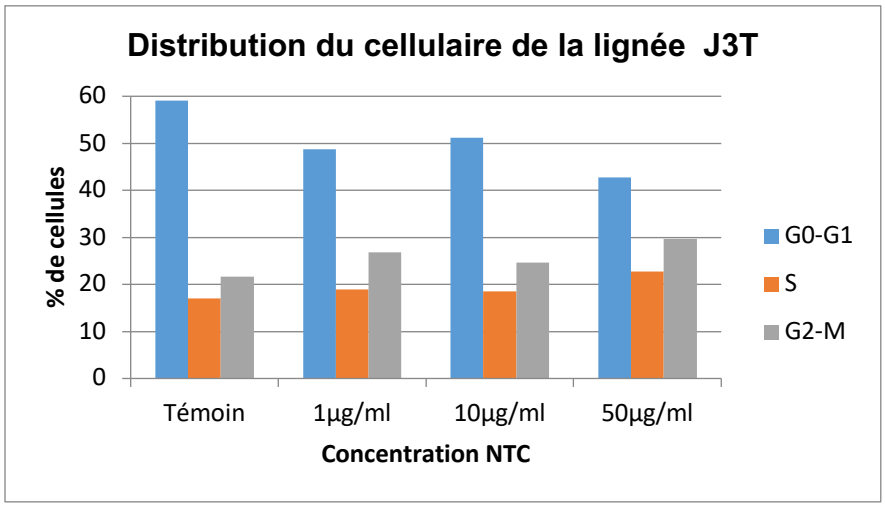


Figure 38 : *Distribution des phases du cycle cellulaire de la lignée J3T, exposée à des concentrations croissantes de NTC (0, 1, 10 et 50µg/ml de NTC)*

d) Étude de la radiosensibilisation de la lignée cellulaire de gliome canin J3T par les NTC

(1) Calcul des valeurs SF2

L'étude de la radiosensibilisation de la lignée J3T par les NTC est réalisée par un test de clonogénicité qui va permettre de comparer la pente d'une « série » sans NTC avec celle d'une « série avec NTC » pour une dose donnée (Figure 39).

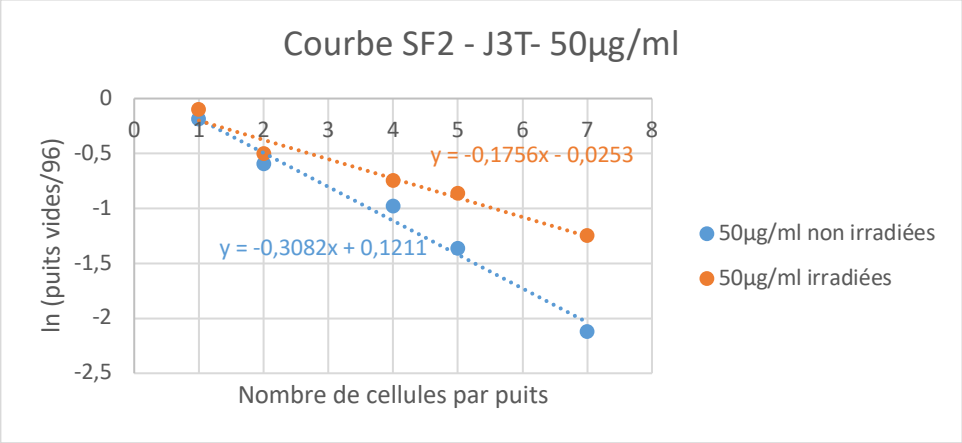


Figure 39 : *Courbe de survie de la lignée J3T exposée à la dose de 50µg/ml de NTC*

A partir des courbes de radiosensibilité, la SF2 (fraction survivante de cellules suite à l'irradiation d'une dose unique de 2Gy) qui est extraite permet de caractériser la radiosensibilité d'une lignée cellulaire.

Les valeurs de SF2 avec et sans exposition aux NTC pour la lignée J3T sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 7). Les données obtenues avec le test de clonogénicité ne montrent pas d'effet radiosensibilisant des NTC. La dose de 20µg/ml semble augmenter de manière significative la fraction de cellules survivantes à la dose de 2Gy, et aurait ainsi l'effet contraire à celui attendu.

Tableau 7 : *Valeurs SF2 pour la lignée J3T, exposée à différentes doses de NTC*

SF2 de la lignée J3T (en pourcentage +/- écart-type)		
Cellules sans NTC	Cellules exposées à 20µg/ml de NTC	Cellules exposées à 50µg/ml de NTC
0,603 +/- 0,054	0,7636 +/-0,036	0,567 +/- 0, 003

(2) MID

(a) Protocole A

Ce protocole vise à étudier l'effet radiosensibilisant des NTC auprès de la lignée J3T après une exposition de 24 heures aux NTC. Le milieu est remplacé par du DMEM seul, les cellules sont trypsinées puis irradiées

Les résultats pour ce premier protocole sont présentés sur le tableau 8 et la figure 40 ci-dessous. Il n'apparaît pas de différences significatives entre le lot témoin et le lot exposé à la dose de 50µg/ml de NTC pendant 24 heures.

Tableau 8 : *MID de la lignée J3T exposée ou non à une dose de 50µg/ml de NTC*

MID (en Gy)	Témoin	J3T + 50µg/ml de NTC
	3,53 +/- 0,09	3,695 +/- 0,77

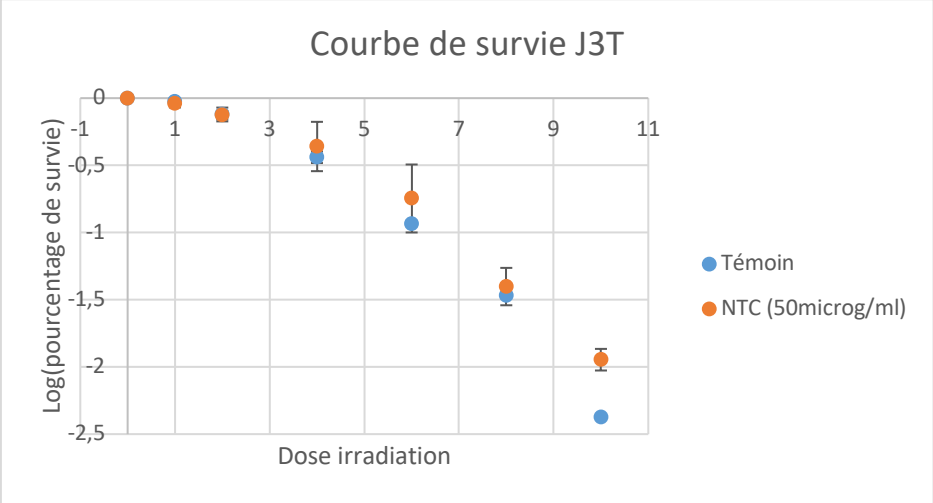


Figure 40 : *Courbe de radiosensibilité des cellules J3T en fonction des doses d'irradiation, selon leur exposition aux NTC*

Suite aux résultats obtenus avec ce protocole, un second protocole a été mis en place et est présenté ci-dessous.

(b) Protocole B

Le protocole B est une adaptation du protocole A et consiste à laisser les NTC au contact des cellules tumorales pendant et après l'irradiation afin d'être au plus proche des conditions d'utilisation potentielles où les NTC resteraient *in situ.* Pour cela, les concentrations de NTC ont été modifiées car aux concentrations du protocole A,

ils entrainaient un augmentation de la mortalité cellulaire sur des durées d' exposition d'une semaine. Ainsi, des doses d'exposition réduites ont été utilisées pour ce second protocole, les cellules J3T ont été exposées à des doses de 1 et 5 µg/ml de NTC.

Les résultats de ce protocole sont présentés dans le tableau ci-dessous et il n'y a aucune différence entre les MID des cellules exposées à 1 et 5 µg/ml et les cellules témoins.

Tableau 9 : *MID de la lignée J3T exposée ou non à 1 et 5µg/ml de NTC*

MID	Témoin	1μg/ml de NTC	5μg/ml de NTC
	4,88	4,27	4,83

3. Discussion

Parce qu'ils sont responsables de l'augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M, phase la plus radiosensible du cycle cellulaire (Fiorito et al. 2014), les nanotubes de carbone (NTC) pourraient être radiosensibilisants**.** De plus, au contact des cellules, les NTC sont responsables de la production de radicaux oxygénés (Meunier et al. 2012)**,** ce qui rend les cellules tumorales plus sensibles à la radiothérapie. À l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à la capacité des NTC à radiosensibiliser les tumeurs, notamment les gliomes. Ainsi, cette étude vise à évaluer l'effet radiosensibilisant des NTC sur des lignées cellulaires de gliomes canins de haut-grade, car le Chien pourrait représenter un modèle d'étude pré-clinique pour l'Homme si cette stratégie prouve son efficacité *in vitro.*

Des études préliminaires ont été nécessaires avant d'évaluer l'effet radiosensibilisant des NTC :

- Détermination d'une dose de NTC non toxique pour les cellules de gliome canin à l'aide de différents tests de cytotoxicité. Aucune cytotoxicité n'a été observée jusqu'à des concentrations de 50 μg/ml après 48 heures d'exposition.

- Évaluation de la capacité des NTC à pénétrer dans les cellules de gliome canin. Les NTC et les gadoNTC sont capables de pénétrer dans toutes les lignées de gliome canins après 12 heures d'exposition, y compris pour des concentrations faibles en NTC,

- Évaluation de l'effet des NTC sur le cycle des cellules de gliome canin avec recherche d'un blocage en phase G2/M: l'étude du cycle cellulaire sur la lignée J3T a montré une augmentation de 8% des cellules dans la phase G2/M.

L'étude de la pénétration des NTC dans les cellules de gliome canin à l'aide de la microscopie biphotonique a montré une pénétration efficace des NTC au sein du compartiment cellulaire. En effet, les NTC et les gadoNTC ont pu être localisés dans le milieu intracellulaire pour toutes les concentrations étudiées. La majorité des cellules observées présentaient des NTC internalisés dans leur cytoplasme. Cependant, cette étude n'a observé l'internalisation des NTC que pour un temps donné, après 12 heures d'exposition, et ne propose pas de cinétique d'internalisation. De plus, la microscopie biphotonique n'apporte que des données qualitatives mais elle ne permet pas d'évaluer la quantité de NTC présents dans la cellule. Les données de la littérature montrent que les NTC pénètrent rapidement dans les cellules : dès 4 heures post-exposition, les NTC se localisent dans le milieu intracellulaire (Kafa et al. 2015). La cytométrie en flux (CMF) est une approche permettant une analyse quantitative de la pénétration et la distribution des NTC au sein des cellules. En effet, couplés à des fluorophores tels que du FITC, ces NTC peuvent facilement être détectés et quantifiés par CMF (Summers et al. 2017). Une autre approche quantitative repose sur la microscopie à perfusion, qui permet d'étudier les mouvements des NTC dans les cellules. Ainsi, les NTC couplés à des fluorophores, peuvent être suivis sous microscope dans les cellules vivantes, ce qui donne des données précises sur la pénétration et l'accumulation des NTC au sein des cellules (Jin, Heller, Strano 2008).

L'observation au microscope biphotonique a permis de visualiser l'effet photothermique décrit dans la revue bibliographique de ce travail de thèse, à l'échelle d'une cellule (Liang et al. 2014). Dans les minutes suivant l'excitation des NTC par les photons du laser, des modifications cellulaires importantes sont apparues, avec une perte de la morphologie des cellules et l'apparition des vacuoles à leurs surfaces. Cet effet photothermique a été évalué dans d'autres études où des NTC ont été fonctionnalisés pour cibler des cellules souches de GBM $CD133^{+}$, et la photothermie a permis d'éliminer spécifiquement ces cellules (Wang et al. 2011). Une étude de Lu et al., de 2019, a utilisé la thérapie photothermique pour cibler des cellules tumorales

de pancréas sur un modèle rongeur. Ces NTC fonctionnalisés pénétraient spécifiquement dans les cellules tumorales et l'exposition des NTC au laser était associée à une augmentation de la température locale supérieure à 45°C. Par ailleurs, ils ont démontré que l'excitation des NTC au sein des cellules par photothérapie, entraînait une forte augmentation de la production de radicaux libres dans la cellule qui pouvait avoir un effet supplémentaire en plus de l'effet thermique dans l'activité anti-tumorale des NTC (Lu et al. 2019).

Les tests de cytotoxicité au bleu de trypan et au WST-1 n'ont pas montré d'effets cytotoxiques, sur les différentes lignées de gliomes canins. Au-delà de 50 μg/ml, après 48 heures d'exposition, une cytotoxicité des NTC sur les cellules est mise en évidence. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer les mécanismes associés à cette mort cellulaire. De nombreux mécanismes peuvent être impliqués dans la mortalité cellulaire liée à l'exposition aux NTC tels que l'apoptose qui peut être évaluée par le dosage à l'Annexine V et des caspases, ou l'autophagie, qui peut être évaluée par le dosage du LC3 (*microtubule-associated protein 1 light-chain 3*) ou par la coloration à l'Acridine Orange des vésicules autophagiques (Nerl et al. 2011; Romano-Feinholz et al. 2017). Des études *in vitro* sur cellules de gliome de rats ont montré l'induction d'apoptose suite à l'exposition à différents types de MWNT.

L'étude du cycle cellulaire montre une légère augmentation de la proportion des cellules dans la phase du cycle G2/M, similaire à celle observée dans l'étude de Fiorito et al, en 2014. Ceci laisserait supposer que les NTC pourraient potentiellement radiosensibiliser les gliomes canins. Cependant, d'autres mécanismes pouvant entraîner une radiosensibilisation cellulaire auraient pu être évalués telles que la production de ROS (Lu et al. 2018) ou l'inhibition des enzymes de réparation de l'ADN. Dans la continuité de l'étude de Fiorito qui avait montré une augmentation de la production de radicaux libres des cellules d'adénocarcinome colique de rat au contact des NTC (Fiorito et al. 2014), il aurait ainsi été intéressant de mesurer la production de ROS dans les différentes lignées de gliomes canins à différentes concentrations de NTC. Une étude de 2017 concernant l'exposition de cellules de gliomes de rat à des MWNT n'avait pas montré d'augmentation de la production de ROS suite une exposition pendant 24 heures à une concentration de 50μg/ml. Enfin, les NTC sont capables d'interagir avec l'ADN (Öner et al. 2018) ou des enzymes de réparation telles que l'enzyme APE1. Cette inhibition par encombrement stérique limite les réparations de lésions de l'ADN (Kumari et al. 2016). Ainsi, d'autres mécanismes de réparation de

l'ADN pourraient être modifiés en présence de NTC. Dans l'évaluation de la sensibilité à la radiothérapie, l'évaluation des cassures double brin et l'analyse des foyers γH2AX associés à ces réparations sont fréquemment étudiées (Mah, El-Osta, Karagiannis 2010). L'analyse des foyers γH2AX, avec et sans NTC, lors d'irradiation des lignées cellulaires de gliomes canins aurait fourni des données supplémentaires quant à l'évaluation de l'effet des NTC sur des mécanismes permettant la radiosensibilisation cellulaire.

Enfin, l'évaluation de l'effet radiosensibilisant des NTC avec la lignée J3T, n'a pas montré d'effet significatif par rapport aux cellules non exposées. Des manipulations supplémentaires (γH2AX, production de radicaux libres, mécanismes d'apoptose) citées ci-dessus auraient pu être faites en complément de l'analyse du cycle cellulaire afin d'évaluer précisément le pouvoir radiosensibilisant des NTC et comprendre l'absence d'effet radiosensibilisant. Par ailleurs, cette étude aurait pu être complétée par l'utilisation de lignées de gliomes humains pour lesquelles la réponse à la RT et les paramètres radiobiologiques sont connus. Les protocoles auraient pu être réalisés sur une lignée cellulaire radiosensible et une lignée cellulaire radiorésistante, afin d'essayer de mettre en évidence des différences de réponse au traitement associant RT et NTC.

4. Perspectives futures

La caractérisation des lignées de gliome canins réalisée dans la première partie de cette étude expérimentale fournit à la communauté scientifique une base de données complètes pour des études ultérieures. Cependant, cette caractérisation pourrait se compléter par une étude des SNP de ces lignées, afin d'obtenir des données précises concernant leur profil génétique. De plus, ces cellules n'ont été étudiées que dans des conditions adhérentes, or elles peuvent aussi être cultivées dans des milieux permettant la formation de neurosphères, (Stoica et al. 2009b). Ces neurosphères, enrichies en cellules souches de GBM auront des propriétés de radiorésistance et d'invasion *in vivo* différentes des cellules adhérentes. Il serait ainsi intéressant d'effectuer cette caractérisation supplémentaire.

L'évaluation préliminaire de la cytoxicité des NTC sur la lignée J3T n'a pas montré d'effet radiosensibilisant. Cependant, des études élargies aux autres lignées cellulaires de gliome canins et humains sont nécessaires afin de confirmer ou infirmer

les résultats préliminaires. Par ailleurs, la cytotoxicité des gadoNTC sur les lignées cellulaires n'a pas pu être évaluée sur les lignées de gliome canins et devra être réalisée à l'avenir. De nombreuses études ont montré que l'injection de différents types de NTC dans l'encéphale ne montre pas de toxicité chez la souris. Ainsi, s'ils ne présentent pas d'effet cytotoxique sur les cultures *in vitro*, l'injection intracrânienne de gadoNTC dans le cerveau de souris de laboratoire sera une étape supplémentaire à réaliser pour évaluer leur détection en IRM. Une fois les tests effectués sur cerveaux de souris, il faudra évaluer la toxicité de l'injection intracrânienne des NTC ainsi que la visualisation des gadoNTC en IRM chez le Chien sain, dans l'optique d'une approche diagnostique et/ou thérapeutiques chez des chiens atteints de gliomes.

Les images IRM seront réalisées sur la plateforme INSERM IRM haut champ 3T recherche du Pavillon Baudot au CHU de Purpan avec l'équipe DEVIN (**DE**veloppement et **V**alidation de biomarqueurs en **I**RM et médecine **N**ucléaire) de l'unité ToNIC (**To**ulouse **N**euro**I**maging **C**enter) (UMR INSERM UPS 1214). Cette équipe a mis au point toutes les séquences IRM nécessaires à la visualisation de l'encéphale de chien que ce soit *in vivo* et *ex vivo* (Figure 41). Ces séquences ont été effectuées sur Beagles sains (Boucher 2019). Nous pourrons donc évaluer la visualisation *in vivo* et *ex vivo* des gadoNTC dans l'encéphale de chien et ensuite la valider par histologie.

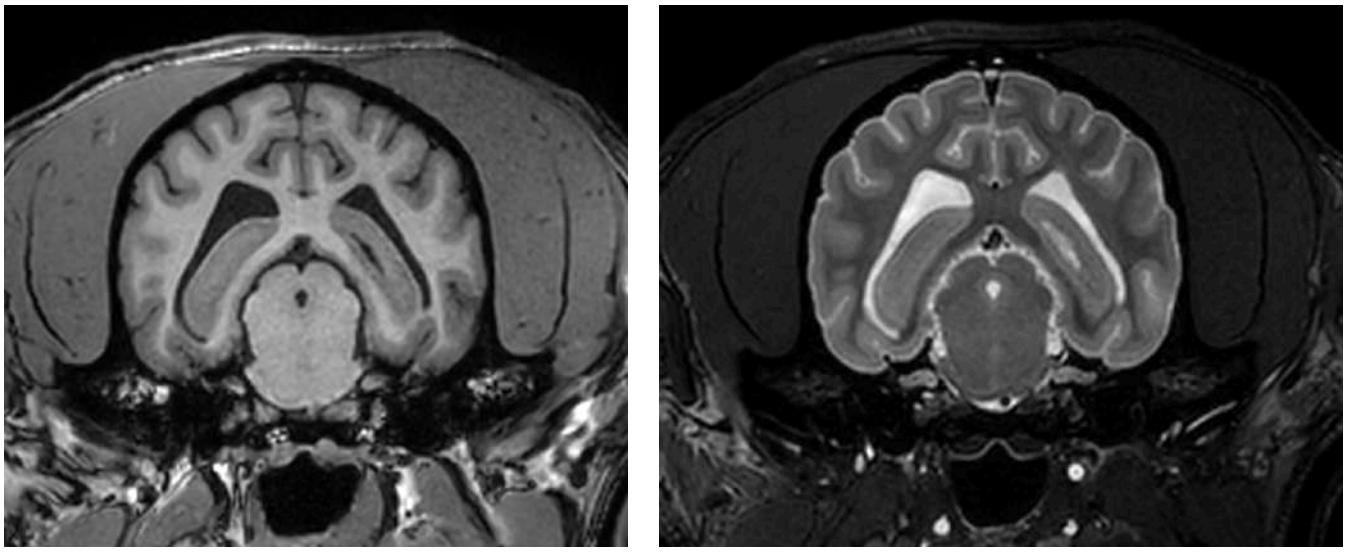


Figure 41 : *Images IRM 3T en pondération T1 (à gauche) et T2 (à droite) réalisées à la plateforme INSERM (Pavillon Baudot, CHU Purpan) d'un chien Beagle anesthésié.*

Une fois que l'innocuité et l'efficacité des gadoNTC seront démontrées, la dernière étape sera de proposer cette thérapie sur des chiens atteints de gliomes. Pour proposer une telle thérapie aux propriétaires, il faut s'assurer d'imager les animaux dans les meilleures conditions possibles, notamment en minimisant les risques lors de l'anesthésie. C'est pour cela que l'équipe DEVIN va acquérir d'ici la fin de l'année 2020 une machine d'anesthésie volatile amagnétique compatible avec l'IRM 3T de la plateforme d'imagerie de Purpan. Enfin, étant donné la rareté des chiens atteints de gliomes, nous nous sommes rapprochés de cliniques vétérinaires de référence du Grand Sud-Ouest (6 centres) afin d'obtenir un recrutement nécessaire à cette étude (recrutement total possible au CHUV de l'ENVT et dans les 6 centres vétérinaires : 15 cas sur 18 mois).

En parallèle de cette étude, il serait également intéressant d'explorer d'autres modalités d'imagerie fonctionnelle utiles en neuro-oncologie, telles que l'Imagerie de Spectroscopie par Résonance Magnétique (ISRM) ou l'IRM de diffusion. Ce sont des techniques non invasives et non ionisantes qui utilisent les outils de l'IRM conventionnelle pour évaluer respectivement la concentration/distribution spatiale de métabolites tissulaires et la densité cellulaire. La mise en évidence par ISRM de différences de concentrations en métabolites dans la tumeur par rapport au tissu nerveux sain permet de fournir des informations pertinentes quant au processus pathologique. Le ratio Choline (Cho, composé membranaire) sur N-Acetyl-Aspartate (NAA, neurotransmetteur) supérieur à 2 (CNR2) est ainsi considéré comme un outil de référence pour mettre en évidence des infiltrations tumorales métaboliquement actives non objectivées avec les séquences anatomiques d'IRM. Seulement quelques données sont disponibles dans la littérature concernant l'ISRM chez le Chien, sur cadavres ou chiens atteints de tumeurs intracrâniennes (Martin-Vaquero et al. 2012; Stadler et al. 2014). Les protocoles d'acquisition en ISRM ont été établis sur Beagle

sain, au sein de l'équipe DEVIN et pourront être utilisés pour des chiens présentant des tumeurs cérébrales (Figure 42).

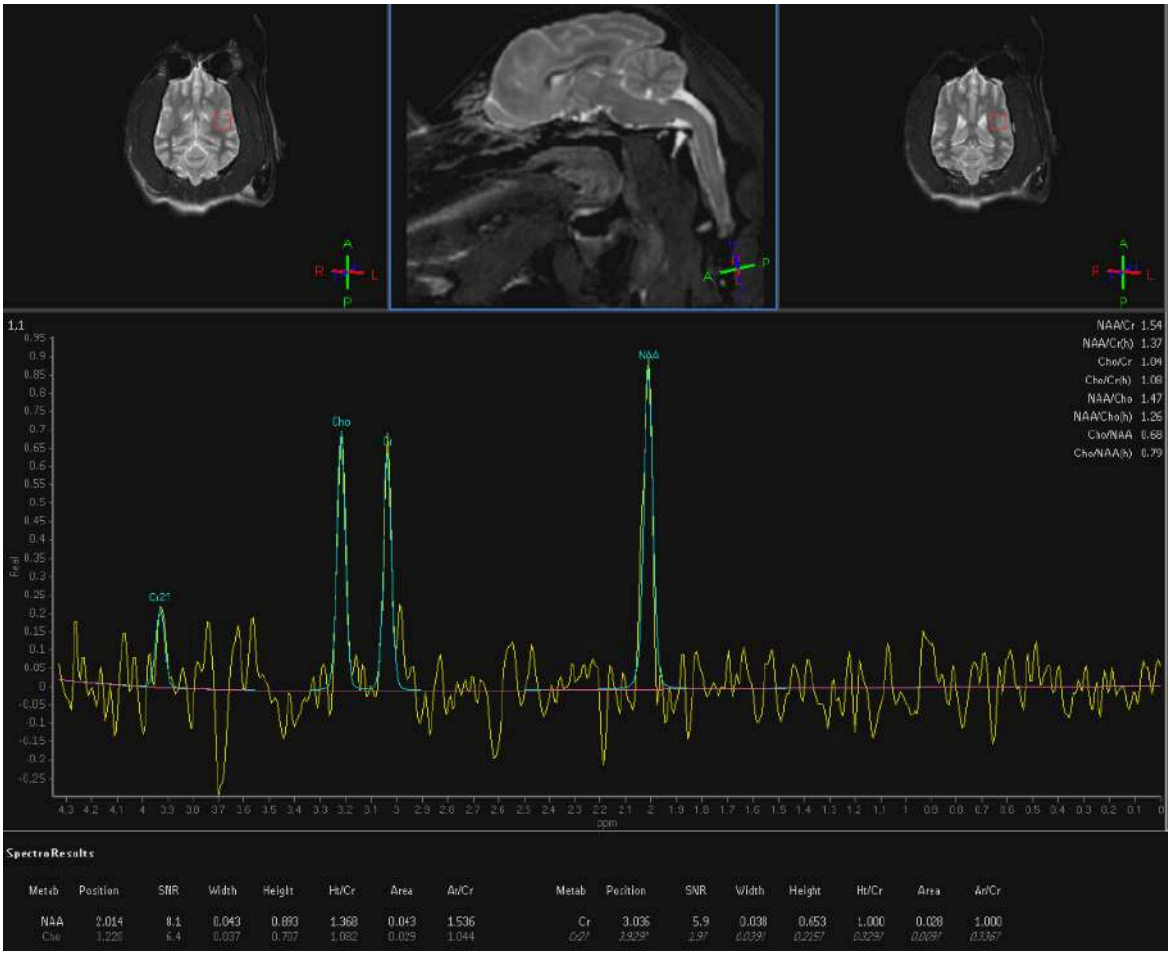


Figure 42 : *Données métaboliques ISRM d'un Beagle de laboratoire sain anesthésié*

De plus, le Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT) va prochainement accueillir un centre de hadronthérapie, permettant l'accès aux patients atteints de GBM à la radiothérapie par protons. Des conventions ont déjà été établies pour permettre l'accès à des animaux de laboratoire ou des chiens de propriétaires à cette technique de radiothérapie novatrice. Ainsi, il sera possible d'obtenir des images IRM de haute précision avec l'équipe DEVIN au Pavillon Baudot du CHU de Purpan puis de réaliser des irradiations ciblées par protonthérapie au CRCT à des chiens de propriétaires, chez qui il n'existe aucun protocole standard de traitement. Ce serait une occasion unique de tester de nouvelles séquences IRM ou de nouveaux plans de traitement, chez le Chien qui est un modèle d'étude préclinique intéressant pour l'Homme du fait de la grande taille de son encéphale, de son système immunitaire immunocompétent et d'un développement tumoral identique.

Enfin, les protocoles de caractérisation des gliomes canins étant établis, le recrutement de nouveaux chiens atteints de gliomes pour les études nommées ci-dessus pourrait s'accompagner de la réalisation d'une banque de données. Les tumeurs cérébrales des chiens inclus seraient prélevées, aliquotées et caractérisées selon le protocole décrit dans la première partie de cette thèse. On pourrait ainsi créer une banque de données ouverte, constituée d'un panel de tumeurs cérébrales du Chien complètement caractérisées pour des études ultérieures.

Conclusion générale

A travers cette étude, nous avons pu démontrer que le Chien pouvait être un modèle d'étude intéressant dans l'étude translationnelle des gliomes chez l'Homme. En effet, l'étude bibliographique a permis de montrer que ce modèle semble plus pertinent que le modèle d'étude actuel, du fait du développement spontané de tumeurs, de la taille du cerveau du Chien qui permet d'utiliser les mêmes outils qu'en médecine humaine et de l'immunocompétence du modèle canin. Or, il apparaît de plus en plus évident que le système immunitaire tient un rôle essentiel dans le microenvironnement tumoral et dans le développement tumoral. Par ailleurs, la première partie de cette étude expérimentale a démontré une forte similarité entre les caractéristiques de tumeurs gliales humaines et canines. Effectivement, l'ensemble des lignées canines étudiées présentent un temps de doublement, un caryotype, un test de clonalité équivalent aux éléments observés chez l'Homme. De même pour la radiorésistance, les lignées canines et humaines possèdent les mêmes critères de radiorésistance. Enfin, l'injection orthotopique de ces différentes lignées de gliomes canins a montré un comportement des tumeurs induites similaire à celui des tumeurs initiales. L'expression des antigènes de surface est identique entre ces deux espèces. Ainsi, sur les plans cellulaires, moléculaires et sur le comportement cellulaire vis-à-vis de la thérapie ionisante, une forte similarité entre l'Homme et le Chien est présente et ces éléments sont en faveur du choix du Chien comme modèle d'étude des gliomes chez l'Homme.

Ces dernières années, l'utilisation de nanoparticules est apparue comme une option pertinente pour le diagnostic et le traitement du cancer. Les nanotubes de carbone (NTC) sont des structures tubulaires de taille nanométrique, constituées de graphène. Capables de pénétrer dans les cellules, de les bloquer en phase G2/M du cycle cellulaire et de produire des radicaux oxygénés, les nanotubes de carbone pourraient également être capables de radiosensibiliser les cellules tumorales. L'association RT + NTC pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique prometteuse pour améliorer le mauvais pronostic lié aux gliomes diffus, stratégie dont l'efficacité pourrait être évaluée en préclinique chez le Chien spontanément atteint de gliomes. La seconde partie expérimentale a montré que ces NTC pénètrent efficacement au sein des lignées tumorales sans engendrer d'effets cytotoxiques pour des concentrations élevées de nanotubes de carbone. L'étude préliminaire sur une

lignée cellulaire de gliome canin montre un blocage des cellules dans la phase G2/M, mais aucun effet radiosensibilisant n'a pu être mis en évidence à l'heure actuelle. Des études complémentaires sont nécessaires avec un plus grand nombre de lignées cellulaires canine et humaine pour savoir s'ils ont un effet radiosensibilisant.

Publications scientifiques

Communication scientifique à des congrès ou colloques

Congrès du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire (ECVP) et de la Société Européenne de Pathologie Vétérinaire (ESVP), Bologne, Septembre 2016 (Poster) : prix du meilleur poster

B. Cartiaux, J-B. Tanis, C. Delmas, M. Pumarola, A. Deviers, M. Delverdier, J. Abadie, C. Ibisch, P. Dickinson, G. Mogicato, S. Bertagnoli and E. Moyal-Cohen -Evaluation of the Sensitivity of Characterized Canine Glioblastoma Cell Lines to Radiation Therapy and to the Oncolytic Effect of an Attenuated Myxomavirus Strain

12èmes journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (CGSO), Novembre 2016 :

B. Cartiaux, J-B. Tanis, C. Delmas, M. Pumarola, A. Deviers, M. Delverdier, J. Abadie, C. Ibisch, P. Dickinson, G. Mogicato, S. Bertagnoli and E. Moyal-Cohen - Évaluation de la sensibilité de cinq lignées de glioblastome canin à la radiothérapie et à l'effet oncolytique d'une souche sauvage atténuée de myxomavirus

Journées École Doctorale Biologie-Santé-Biotechnologie, Avril 2018 :

Cartiaux, E. Flahaut, E. Bellard, M. Pumarola, P. Dickinson, A. Deviers, G. Mogicato, and E. Moyal-Cohen - Preliminary Study of Carbon Nanotubes Radiosensitization Upon Canine and Human Glioblastoma

EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF CHARACTERIZED CANINE GLIOBLASTOMA CELL LINES TO RADIATION THERAPY AND TO THE ONCOLYTIC EFFECT OF AN ATTENUATED MYXOMAVIRUS STRAIN

B. Cartiaux[a], J-B. Tanis[a], C. Delmas[b], M. Pumarola[c], A. Deviers[d], M. Delverdier[a], J. Abadie[e], C. Ibisch[e], P. Dickinson[f], G. Mogicato[d] and S. Bertagnoli[a]

[a]IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France, [b]INSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, Oncopole, Toulouse, France, [c]Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain, [d]ToNIC, Université de Toulouse, INSERM, ENVT, Toulouse, France, [e]AMaROC Unit, L'UNAM University, Oniris, Nantes, France, [f]Department of Surgical and Radiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of California at Davis, Davis, United States of America

Combining **oncolytic viruses** with **radiotherapy** is a promising therapeutic approach to improve the poor prognosis associated with **glioblastoma (GBM)** in human patients. The dog appears as a relevant **translational animal model** for the pre-clinical testing of this innovative strategy, as **spontaneous canine GBM** recapitulates the major pathologic features of their human counterparts (**Fernández F. et *al*., Vet J 2016;209:125-32**). *In vitro* characterization of canine GBM cell lines and evaluation of the efficiency of the above mentioned treatment modalities (i.e. oncolytic virus and radiotherapy) are the necessary prerequisites before any *in vivo* study in GBM-bearing dogs.

AIMS OF THE STUDY :

(1) To characterize **5 canine GBM cell lines** (J3T, J3TBg, SDT3G, G06A and RAFFRAY)

(2) To assess the **sensitivity** of these cell lines **to radiotherapy** and **to the SG33 attenuated strain of myxomavirus (patent EP2440218B1)**

MATERIAL AND METHODS :

(1) Cell line characterization :

- **Phenotypic characterization** : cultured cell lines were embedded in HistoGel™ and routinely processed. Immunohistochemical (IHC) characteristics were evaluated using different markers of lineage differentiation : **CD133** for neural stem cells, doublecortin (**Dcx**) for neural progenitor cells, **Olig2** for glial progenitor cells, Glial Fibrillary Acidic Protein (**GFAP**) and **Vimentin (Vim)** for glial cells, **NeuN** and **βIII tubulin** for neurons.
- **Cytogenetic characterization** consisted in achieving a karyotype.

(2) Assessment of cell sensitivity to radiation and SG33 :

- **Intrinsic cellular radiosensitivity** was evaluated by a colony formation assay with single fractions of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 Gy delivered by a cobalt-60 clinical machine, as indicated in **Figure 1**. It resulted in a dose survival curve for each cell line, from which the **MID (Mean Inactivation Dose)**, a biological index of radiosensitivity, was extracted (**Table 1**).
- The **oncolytic effect of SG33** was assessed with a MTS assay, performed **48 hours after viral infection** of cell lines, at a **MOI** (Multiplicity Of Infection) of **4**. The percentage of **viable cells** was defined as the ratio between absorbance of infected cells and absorbance of uninfected cells (**Figure 4**).

Figure 1 : Colony formation assay
Cells from an exponential growing were plated out at T25 flasks, allowed to attach for 12 hours and irradiated. After irradiation, cell colonies were allowed to grow until their size was sufficient enough for accurate counting. After fixation with 70% alcohol, cells were stained with 0.025% crystal violet and colonies of ≥50 cells were scored as surviving colonies.

RESULTS:

(1) Cell line characterization :

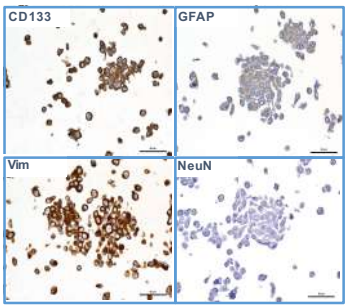


Figure 2 : Examples of immunohistochemical results for 4 markers of differentiation, obtained with HistoGel-embedded J3T-Bg cell line.
Scale bar = 50 µm

Figure 3 : Karyotype of RAFFRAY cells. Pink arrows indicate chromosome rearrangements.

*Chromosomal abnormalities and IHC profile are consistent with **poorly differentiated malignant astrocytes** for all the cell lines.*

(2) Assessment of cell sensitivity to radiation and SG33 :

	J3T	J3T-Bg	SDT3G	G06A	RAFFRAY
MID (Mean +/- SD*)	4.0 +/-0.70	4.6 +/-0.49	5.7 +/-0.57	4.7 +/-0.58	5.2 +/-0.36

Table 1 : Mean Inactivation Dose (MID) of the different canine GBM cell lines.
(* SD : Standard Deviation, calculation of Mean and SD was performed on 3 independent experiments)

*The mean inactivation dose indicates **radioresistant cells**.*

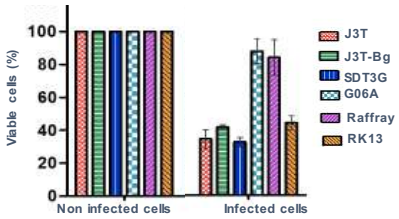


Figure 4 : Sensitivity of the different canine GBM cell lines and RK13 (a renal cell line from rabbit used as positive control) to the SG33 attenuated strain of myxomavirus.

*The MTS assay reveals a **differential sensitivity to SG33**, with G06A and RAFFRAY being more resistant to the viral oncolytic effect.*

CONCLUSION: As their human counterparts, canine GBM cell lines exhibit **radioresistance**. Their **sensitivity to SG33** make them relevant models for **future translational *in vitro* studies** aiming at evaluating the **synergystic cytotoxic effect of this virus combined with radiotherapy.**

Figure 43 : *Poster présenté lors du Congrès du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire à Bologne en Septembre 2016*

ÉVALUATION DE LA SENSIBILITÉ DE CINQ LIGNÉES DE GLIOBLASTOME CANIN A LA RADIOTHÉRAPIE ET A L'EFFET ONCOLYTIQUE D'UNE SOUCHE SAUVAGE ATTENUÉE DE MYXOMAVIRUS

B. Cartiaux[a], J-B. Tanis[a], C. Delmas[b], M. Pumarola[c], A. Deviers[d], M. Delverdier[e], J. Abadie[e], C. Ibisch[e], P. Dickinson[f], G. Mogicato[d], S. Bertagnoli[a] et E. Moyal-Cohen

[a]IHAP, Université de Toulouse, INRA, ENVT, Toulouse, France, [b]INSERM UMR1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Oncopole, Toulouse, France, [c]Department de médecine et de chirurgie des petits animaux, faculté vétérinaire, Université autonome de Barcelone, Barcelone, Espagne, [d]ToNIC, Université de Toulouse, INSERM, ENVT, Toulouse, France, [e]Unité AMaROC, L'UNAM Université, Oniris, Nantes, France, [f]Department of Surgical and Radiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of California at Davis, Davis, United States of America

L'association de la **virothérapie oncolytique** à la radiothérapie est une approche thérapeutique prometteuse afin d'améliorer le mauvais pronostic associé au **glioblastome (GBM)** chez des patients humains. Le chien représente un **modèle d'étude translationnel** pertinent pour des essais précliniques visant à évaluer l'efficacité de cette stratégie thérapeutique innovante, étant donné que les principales caractéristiques pathologiques du **GBM canin spontané** sont identiques à leurs homologues humains (**Fernández F. et *al.*, Vet J 2016;209:125-32**). La caractérisation *in vitro* de lignées cellulaires de GBM canin ainsi que l'évaluation de l'effet de la radiothérapie et virothérapie oncolytique sur ces lignées, sont les prérequis nécessaires à une future étude *in vivo* sur chiens atteints de GBM.

OBJECTIFS DE L' ÉTUDE :

(1) Caractériser **5 lignées cellulaires de GBM canin** (J3T, J3TBg, SDT3G, G06A and RAFFRAY)

(2) Evaluer la **sensibilité** de ces lignées à la **radiothérapie** et à une **souche sauvage d'un myxomavirus SG33** (brevet **EP2440218B1**)

MATÉRIEL ET MÉTHODES :

(1) Caractérisation des lignées cellulaires :

- **Caractérisation phénotypique** : une immunohistochimie (IHC) a été réalisée sur les cellules en culture, après inclusion de celles-ci en HistoGel™. Divers marqueurs de différenciation ont été évalués : **CD133** pour les cellules souches neuronales, **doublecortine (Dcx)** pour les cellules progénitrices neuronales, **Olig2** pour les cellules progénitrices gliales, Glial Fibrillary Acidic Protein (**GFAP**) and **Vimentin (Vim)** pour les cellules gliales, **NeuN** and **βIII tubulin** pour les neurones.
- Pour la **caractérisation cytogénétique,** un caryotype a été réalisé.

(2) Evaluation de la sensibilité des cellules à la radiothérapie et au SG33 :

- **La radiosensibilité cellulaire intrinsèque** a été évaluée par un test de clonogénie, pour lequel une dose unique de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 ou 14 Gy a été délivrée par une machine clinique Cobalt-60 (**Figure1**). Les résultats sont présentés sous la forme d'une courbe de survie en fonction de la dose reçue pour chaque lignée cellulaire, à partir de laquelle on obtient la **MID (Mean Inactivation Dose)**, un indice biologique de radiosensibilité (**Table 1**).
- Le **pouvoir oncolytique du SG33** a été évalué par un essai MTS, réalisé **48 heures après l'infection virale** des lignées cellulaires, à la **MOI** (Multiplicity Of Infection) de **4**. Le pourcentage de viabilité cellulaire est défini par le ratio entre l'absorbance des cellules infectées et l'absorbance des cellules non-infectées (**Figure 4**).

Figure 1. Test de clonogénie
Les cellules sont mises en culture dans des flasques T25 durant 12h pour permettre l'adhérence au support puis elles sont irradiées. Elles sont remises en culture le temps nécessaire permettant un comptage des colonies. Après fixation à l'alcool à 70°C, les cellules sont colorées avec une solution de cristal violet à 0.025%. Les colonies avec un nombre de cellules supérieur à 50, sont considérées comme des colonies survivantes.

RÉSULTATS :

(1) Caractérisation des lignées cellulaires :

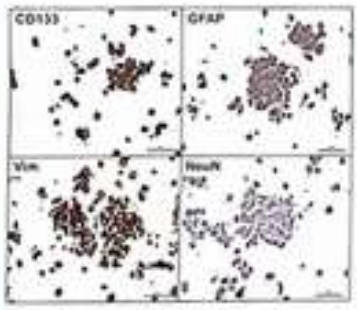


Figure 2.
Exemple de résultats immunohistochimiques pour 4 marqueurs de différenciation, obtenus sur la lignée cellulaire J3T-Bg inclus en HistoGel™.
Barre d'échelle = 50 µm

Figure 3. Caryotype des cellules RAFFRAY. Les flèches roses indiquent des réarrangements chromosomiques.

Les réarrangements chromosomiques et les profils IHC sont en faveur d'astrocytes tumoraux faiblement différenciés pour toutes les lignées cellulaires.

(2) Evaluation de la sensibilité des cellules à la radiothérapie et au SG33 :

	J3T	J3T-Bg	SDT3G	G06A	RAFFRAY
MID (Mean +/- SD*)	4.0 +/-0.70	4.6 +/-0.45	5.7 +/-0.57	4.7 +/-0.58	5.2 +/-0.36

Table 1 : Mean Inactivation Dose (MID) des différentes lignées de GBM canin
(* SD : Standard Deviation, les valeurs de la moyenne et de SD ont été réalisés à partir de 3 expériences indépendantes)

*La MID indique une **radiorésistance** des lignées cellulaires canines.*

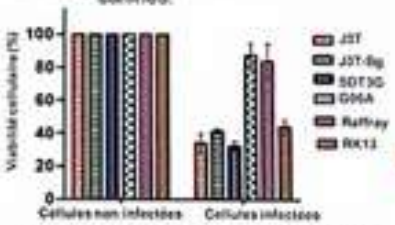


Figure 4. Sensibilité des différentes lignées de GBM canin et des cellules RK13 (une lignée cellulaire rénale de lapin utilisée comme contrôle positif) à la souche atténuée du myxovirus SG33.

*L'essai MTS montre une **différence de sensibilité au SG33, les cellules G06A et RAFFRAY** sont **plus résistantes** aux effets du virus oncolytique.*

CONCLUSION : Comme leurs homologues humains, les lignées cellulaires de GBM canin sont **radiorésistantes**. Leur **sensibilité au SG33** font d'elles des modèles d'étude intéressants pour de **futures études translationnelles *in vitro***, visant à évaluer la **synergie** potentielle entre **l'effet cytotoxique du SG33** et la **radiothérapie**.

Figure 44 : *Poster présenté lors des 12èmes journées CGSO en Novembre 2016*

Preliminary Study of Carbon Nanotubes Radiosensitization Upon Canine and Human Glioblastoma

B. Cartiaux[a], **E. Flahaut**[b], **E. Bellard**[c], **M. Pumarola**[d], **P. Dickinson**[e], **A. Deviers**[f], **G. Mogicato**[f], and **E. Moyal-Cohen**[a]

[a]INSERM UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, Oncopole, Toulouse, France, [b]CIRIMAT UPS Site, UMR CNRS 5085, 31062 TOULOUSE Cedex 9 – France, [c]IPBS, UMR 5089, BP64182, Toulouse, France, [d]Department of Animal Medecine and Surgery, Veterinary Faculty, Universitat autonomia de Barcelona, Barcelona, Spain, [e]Department of Surgical and Radiological Sciences, School of Veterinary Medicine, University of California at Davis, Davis, United States of America, [f]ToNIC, Université de Toulouse, INSERM, ENVT, Toulouse, France,

Glioblastoma (**GBM**), the most frequent primary brain tumor in adults, is associated with a poor prognosis despite a multimodal treatment relying on **radiation therapy**. Main failures are related to cell radioresistance. As **carbon nanotubes** (**CNT**) are able to block tumor cells into the most radiosensitive cell cycle phase (Mirjolet C, *et al.* 2013), they are supposed to improve the current treatment. The evaluation of GBM radiosensitization by CNT requires relevant animal models and **dogs**, that spontaneously develop GBM microscopically similar to their human counterpart, are an attractive model.

AIMS OF THE STUDY

(1) Canine GBM cell lines are **relevant models** in comparative radio-oncology

(2) Evaluation of **CNT penetration** into tumor cell lines without inducing significant **cytotoxicity**

MATERIAL AND METHODS

(1a) Cell line characterization

- **Phenotypic characterization:** cultured cell lines were embedded in HistoGelTM and routinely processed. Immunohistochemical (IHC) characteristics were evaluated using different markers of lineage differentiation : **CD133** for neural stem cells, doublecortin (**Dcx**) for neural progenitor cells, **Olig2** for glial progenitor cells, Glial Fibrillary Acidic Protein (**GFAP**) and Vimentin (**Vim**) for glial cells, **NeuN** and **βIII tubulin** for neurons.
- **Cytogenetic characterization** consisted in achieving a karyotype.

(1b) Assessment of cell sensitivity to radiation

- **Intrinsic cellular radiosensitivity** was evaluated by a colony formation assay with single fractions of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 Gy delivered by a cobalt-60 clinical machine, as indicated in **Figure 1**. It resulted in a dose survival curve for each cell line, from which the **MID (Mean Inactivation Dose),** a biological index of radiosensitivity, was extracted (**Table 1**).

(2a) Evaluation of CNT penetration into tumor cell lines

- Penetration of CNT into tumor cell lines was performed using **multiphoton microscopy** and **propidium iodide**, on both living and fixed cell lines, in collaboration with IPBS.

(2b) WST-1 cytotoxic assay of CNT with different GBM cell lines

- CNT cytotoxicity was evaluated with **WST-1 assay** upon canine and human GBM cell lines using CNT concentration of 0 / 0,1 / 1 / 10 / 20 / 50 / 100 µg/ml.

Figure 1: Colony formation assay
Cells from an exponential growing were plated out at T25 flasks, allowed to attach for 12 hours and irradiated. After irradiation, cell colonies were allowed to grow until their size was sufficient enough for accurate counting. After fixation with 70% alcohol, cells were stained with 0.025% crystal violet and colonies of ≥50 cells were scored as surviving colonies.

RESULTS

(1a) Canine cell line characterization

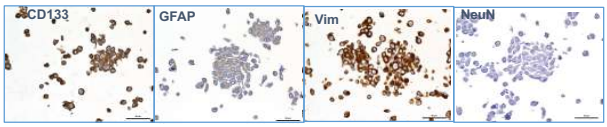


Figure 2: Examples of immunohistochemical results for 4 markers of differentiation, obtained with HistoGel-embedded J3T-Bg cell line. Scale bar = 50 µm

*Chromosomal abnormalities and IHC profile are consistent with **poorly differentiated malignant astrocytes** for all the canine cell lines.*

(1b) Assessment of canine cell sensitivity to radiation

	J3T	J3T-Bg	SDT3G	G06A	RAFFRAY
MID (Mean +/- SD*)	4.0 +/-0.70	4.6 +/-0.49	5.7 +/-0.57	4.7 +/-0.58	5.2 +/-0.36

Table 1: Mean Inactivation Dose (MID) of the different canine GBM cell lines. (* SD : Standard Deviation, calculation of Mean and SD was performed on 3 independent experiments).

*The mean inactivation dose indicates **radioresistant cells**.*

(2a) CNT penetration in different GBM cell lines

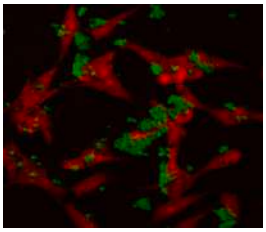


Figure 3: Example of multiphoton view of canine fixed cell lines with 100 µg/ml of CNT. Cell lines with Propidium Iodide are red with nucleus highlighted. CNT emission is green.

*Multiphoton microscopy confirms **CNT penetration** into different GBM cell lines*

(2b) WST-1 cytotoxic assay

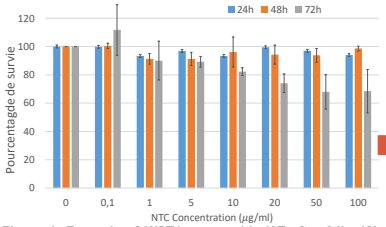


Figure 4: Example of WST1 assay with J3T after 24h, 48h and 72h initial 24h CNT exposure. SD was performed on 2 independent experiments.

WST1 assay shows no cytotoxic effects up to 100µg/ml 48h after exposure, on different cell lines.

CONCLUSION: As their human counterparts, canine GBM cell lines exhibit similar **specifications** and **radioresistance**. Multiphoton microscopy shows **CNT penetration** into cell lines and WST-1 assays prove **no cytotoxic effects** of CNT up to 100µg/ml 48h after exposure.

Figure 45 : *Poster présenté lors des journées de l'École Doctorale BSB en Avril 2018*

Bibliographie

AITCHISON, Tony J., GINIC-MARKOVIC, Milena, MATISONS, Janis G., SIMON, George P. et FREDERICKS, Peter M., 2007. Purification, Cutting, and Sidewall Functionalization of Multiwalled Carbon Nanotubes Using Potassium Permanganate Solutions. *The Journal of Physical Chemistry C*. février 2007. Vol. 111, n° 6, pp. 2440-2446. DOI 10.1021/jp066541d.

AJAYAN, P. M. et LIJIMA, Sumio, 1993. Capillarity-induced filling of carbon nanotubes. *Nature*. janvier 1993. Vol. 361, n° 6410, pp. 333-334. DOI 10.1038/361333a0.
AL FARAJ, Achraf, SHAIK, Asma Sultana, RATEMI, Elaref et HALWANI, Rabih, 2016. Combination of drug-conjugated SWCNT nanocarriers for efficient therapy of cancer stem cells in a breast cancer animal model. *Journal of Controlled Release*. mars 2016. Vol. 225, pp. 240-251. DOI 10.1016/j.jconrel.2016.01.053.

ALIFIERIS, Constantinos et TRAFALIS, Dimitrios T., 2015. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*. août 2015. Vol. 152, pp. 63-82.

Allen Perkins, MD et LIU, Gerald, 2016. Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment. *American family physician* [en ligne]. 2016. [Consulté le 20 décembre 2016]. Disponible à l'adresse : http://ccfmrp.com/assets/primary-brain-tumors-in-adults.pdf

AMIN, Samirkumar B., ANDERSON, Kevin J., BOUDREAU, C. Elizabeth, MARTINEZ-LEDESMA, Emmanuel, KOCAKAVUK, Emre, JOHNSON, Kevin C., BARTHEL, Floris P., VARN, Frederick S., KASSAB, Cynthia, LING, Xiaoyang, KIM, Hoon, BARTER, Mary, LAU, Ching C., NGAN, Chew Yee, CHAPMAN, Margaret, KOEHLER, Jennifer W., LONG, James P., MILLER, Andrew D., MILLER, C. Ryan, PORTER, Brian F., RISSI, Daniel R., MAZCKO, Christina, LEBLANC, Amy K., DICKINSON, Peter J., PACKER, Rebecca A., TAYLOR, Amanda R., ROSSMEISL, John H., WOOLARD, Kevin D., HEIMBERGER, Amy B., LEVINE, Jonathan M. et VERHAAK, Roel G.W., 2020. Comparative Molecular Life History of Spontaneous Canine and Human Gliomas. *Cancer Cell*. février 2020. Vol. 37, n° 2, pp. 243- 257.e7. DOI 10.1016/j.ccell.2020.01.004.

AMIRIAN, E. S., ZHOU, R., WRENSCH, M. R., OLSON, S. H., SCHEURER, M. E., IL'YASOVA, D., LACHANCE, D., ARMSTRONG, G. N., MCCOY, L. S., LAU, C. C., CLAUS, E. B., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S., SCHILDKRAUT, J., ALI-OSMAN, F., SADETZKI, S., JOHANSEN, C., HOULSTON, R. S., JENKINS, R. B., BERNSTEIN, J. L., MERRELL, R. T., DAVIS, F. G., LAI, R., SHETE, S., AMOS, C. I., MELIN, B. S. et BONDY, M. L., 2016. Approaching a Scientific Consensus on the Association between Allergies and Glioma Risk: A Report from the Glioma International Case-Control Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 1 février 2016. Vol. 25, n° 2, pp. 282-290. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-15-0847.

ARMSTRONG, T. S. et GILBERT, M. R., 2012. Practical strategies for management of fatigue and sleep disorders in people with brain tumors. *Neuro-Oncology*. 1 septembre 2012. Vol. 14, n° suppl 4, pp. iv65-iv72.

BANDER, Evan D., MAGGE, Rajiv et RAMAKRISHNA, Rohan, 2018. Advances in Glioblastoma Operative Techniques. *World Neurosurgery*. août 2018. Vol. 116, pp. 529-538. DOI 10.1016/j.wneu.2018.04.023.

BAO, Shideng, WU, Qiulian, MCLENDON, Roger E., HAO, Yueling, SHI, Qing, HJELMELAND, Anita B., DEWHIRST, Mark W., BIGNER, Darell D. et RICH, Jeremy N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 7 décembre 2006. Vol. 444, n° 7120, pp. 756-760. DOI 10.1038/nature05236.

BARTELMESS, J., QUINN, S. J. et GIORDANI, S., 2015. Carbon nanomaterials: multi-functional agents for biomedical fluorescence and Raman imaging. *Chemical Society Reviews*. 2015. Vol. 44, n° 14, pp. 4672-4698. DOI 10.1039/C4CS00306C.

BAUCHET, Luc et OSTROM, Quinn T., 2019. Epidemiology and Molecular Epidemiology. *Neurosurgery Clinics of North America*. janvier 2019. Vol. 30, n° 1, pp. 1-16. DOI 10.1016/j.nec.2018.08.010.

BELIN, T. et EPRON, F., 2005. Characterization methods of carbon nanotubes: a review. *Materials Science and Engineering: B*. mai 2005. Vol. 119, n° 2, pp. 105-118. DOI 10.1016/j.mseb.2005.02.046.

BENTLEY, R. Timothy, AHMED, Atique U., YANKE, Amy B., COHEN-GADOL, Aaron A. et DEY, Mahua, 2016. Dogs are man's best friend: in sickness and in health. *Neuro-Oncology*. 13 juin 2016. pp. now109.

BENTLEY, R.T., OBER, C.P., ANDERSON, K.L., FEENEY, D.A., NAUGHTON, J.F., OHLFEST, J.R., O'SULLIVAN, M.G., MILLER, M.A., CONSTABLE, P.D. et PLUHAR, G.E., 2013. Canine intracranial gliomas: Relationship between magnetic resonance imaging criteria and tumor type and grade. *The Veterinary Journal*. novembre 2013. Vol. 198, n° 2, pp. 463-471. DOI 10.1016/j.tvjl.2013.08.015.

BERENS, Michael E., GIESE, Alf, SHAPIRO, Joan R. et COONS, Stephen W., 1999. Allogeneic Astrocytoma In Immune Competent Dogs. *Neoplasia*. juin 1999. Vol. 1, n° 2, pp. 107-112. DOI 10.1038/sj.neo.7900020.

BETHUNE, D. S., KIANG, C. H., DE VRIES, M. S., GORMAN, G., SAVOY, R., VAZQUEZ, J. et BEYERS, R., 1993. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature*. juin 1993. Vol. 363, n° 6430, pp. 605-607. DOI 10.1038/363605a0.

BHUSHAN, Bharat (éd.), 2004. *Springer handbook of nanotechnology: with ... 71 tables*. Berlin : Springer. Springer handbook. ISBN 978-3-540-01218-4.

BORTOLAMIOL, Tifania, LUKANOV, Petar, GALIBERT, Anne-Marie, SOULA, Brigitte, LONCHAMBON, Pierre, DATAS, Lucien et FLAHAUT, Emmanuel, 2014. Double-walled carbon nanotubes: Quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening. *Carbon*. novembre 2014. Vol. 78, pp. 79-90. DOI 10.1016/j.carbon.2014.06.051.

BOUCHER, Samuel, 2019. *Développement des outils d'imagerie par résonance magnétique nécessaires à l'étude du chien, du cheval et du mouton en neuroimagerie*.

BOUDREAU, C. E., YORK, D., HIGGINS, R. J., LECOUTEUR, R. A. et DICKINSON, P. J., 2015. Molecular signalling pathways in canine gliomas: Glioma pathways. *Veterinary and Comparative Oncology*. mars 2015. pp. n/a-n/a. DOI 10.1111/vco.12147.

BRAGANZA, M. Z., KITAHARA, C. M., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., INSKIP, P. D., JOHNSON, K. J. et RAJARAMAN, P., 2012. Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: a systematic review. *Neuro-Oncology*. 1 novembre 2012. Vol. 14, n° 11, pp. 1316-1324. DOI 10.1093/neuonc/nos208.

BROWN, Timothy J., BRENNAN, Matthew C., LI, Michael, CHURCH, Ephraim W., BRANDMEIR, Nicholas J., RAKSZAWSKI, Kevin L., PATEL, Akshal S., RIZK, Elias B., SUKI, Dima, SAWAYA, Raymond et GLANTZ, Michael, 2016. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology*. 1 novembre 2016. Vol. 2, n° 11, pp. 1460. DOI 10.1001/jamaoncol.2016.1373.

CAIVANO, R., LOTUMOLO, A., RABASCO, P., ZANDOLINO, A., D'ANTUONO, F., VILLONIO, A., LANCELLOTTI, M. I., MACARINI, L. et CAMMAROTA, A., 2013. 3 Tesla magnetic resonance spectroscopy: cerebral gliomas vs. metastatic brain tumors. Our experience and review of the literature. *International Journal of Neuroscience*. août 2013. Vol. 123, n° 8, pp. 537-543.

CALLE, Daniel, NEGRI, Viviana, MUNUERA, Carmen, MATEOS, Luis, TOURIÑO, Isabel Lado, VIÑEGLA, Piedad Ros, RAMÍREZ, Mariola O., GARCÍA-HERNÁNDEZ, Mar, CERDÁN, Sebastián et BALLESTEROS, Paloma, 2018. Magnetic anisotropy of functionalized multi-walled carbon nanotube suspensions. *Carbon*. mai 2018. Vol. 131, pp. 229-237. DOI 10.1016/j.carbon.2018.01.104.

CAMPO, J., PIAO, Y., LAM, S., STAFFORD, C. M., STREIT, J. K., SIMPSON, J. R., HIGHT WALKER, A. R. et FAGAN, J. A., 2016. Enhancing single-wall carbon nanotube properties through controlled endohedral filling. *Nanoscale Horizons*. 2016. Vol. 1, n° 4, pp. 317-324. DOI 10.1039/C6NH00062B.

CANDOLFI, Marianela, CURTIN, James F., NICHOLS, W. Stephen, MUHAMMAD, AKM G., KING, Gwendalyn D., PLUHAR, G. Elizabeth, MCNIEL, Elizabeth A., OHLFEST, John R., FREESE, Andrew B., MOORE, Peter F. et OTHERS, 2007. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of neuro-oncology*. 2007. Vol. 85, n° 2, pp. 133–148.

CARVALHO DA FONSECA, Anna Carolina et BADIE, Behnam, 2013. Microglia and Macrophages in Malignant Gliomas: Recent Discoveries and Implications for Promising Therapies. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. Vol. 2013, pp. 1-5. DOI 10.1155/2013/264124.

CASSELL, Alan M., RAYMAKERS, Jeffrey A., KONG, Jing et DAI, Hongjie, 1999. Large Scale CVD Synthesis of Single-Walled Carbon Nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B*. août 1999. Vol. 103, n° 31, pp. 6484-6492. DOI 10.1021/jp990957s.

CHACKO, Ari George, THOMAS, Santhosh George, BABU, K. Srinivasa, DANIEL, Roy Thomas, CHACKO, Geeta, PRABHU, Krishna, CHERIAN, Varghese et KORULA, Grace, 2013. Awake craniotomy and electrophysiological mapping for eloquent area tumours. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. mars 2013. Vol. 115, n° 3, pp. 329-334.

CHAMBLESS, Lola B., KISTKA, Heather M., PARKER, Scott L., HASSAM-MALANI, Laila, MCGIRT, Matthew J. et THOMPSON, Reid C., 2015. The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*. janvier 2015. Vol. 121, n° 2, pp. 359-364.

CHEN, Yu-Ting, TAN, Karen AL, PANG, Lisa Y et ARGYLE, David J, 2012. The class I PI3K/Akt pathway is critical for cancer cell survival in dogs and offers an opportunity for therapeutic intervention. *BMC Veterinary Research*. 2012. Vol. 8, n° 1, pp. 73. DOI 10.1186/1746-6148-8-73.

CHERUKURI, Paul, BACHILO, Sergei M., LITOVSKY, Silvio H. et WEISMAN, R. Bruce, 2004. Near-Infrared Fluorescence Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes in Phagocytic Cells. *Journal of the American Chemical Society*. décembre 2004. Vol. 126, n° 48, pp. 15638-15639. DOI 10.1021/ja0466311.

CHINOT, Olivier L., WICK, Wolfgang, MASON, Warren, HENRIKSSON, Roger, SARAN, Frank, NISHIKAWA, Ryo, CARPENTIER, Antoine F., HOANG-XUAN, Khe, KAVAN, Petr, CERNEA, Dana, BRANDES, Alba A., HILTON, Magalie, ABREY, Lauren et CLOUGHESY, Timothy, 2014. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 20 février 2014. Vol. 370, n° 8, pp. 709-722. DOI 10.1056/NEJMoa1308345.

CROSSEN, J. R., GARWOOD, D., GLATSTEIN, E. et NEUWELT, E. A., 1994. Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. mars 1994. Vol. 12, n° 3, pp. 627-642.

D'AMICO, Randy S., ENGLANDER, Zachary K., CANOLL, Peter et BRUCE, Jeffrey N., 2017. Extent of Resection in Glioma–A Review of the Cutting Edge. *World Neurosurgery*. juillet 2017. Vol. 103, pp. 538-549. DOI 10.1016/j.wneu.2017.04.041.

DAN LIU, Dan Liu, QI ZHANG, Qi Zhang, JING WANG, Jing Wang, LI FAN, Li Fan, WENQUAN ZHU, Wenquan Zhu et DEFU CAI, Defu Cai, 2019. Hyaluronic acid-coated single-walled carbon nanotubes loaded with doxorubicin for the treatment of breast cancer. . février 2019. N° 2, pp. 83-90. DOI 10.1691/ph.2019.8152.

DARLIX, Amelie, BAUMANN, Cedric, LORGIS, Veronique, GHIRINGHELLI, Francois, BLONSKI, Marie, CHAUFFERT, Bruno, ZOUAOUI, Sonia, PINELLI, Catherine, RECH, Fabien, BEAUCHESNE, Patrick et OTHERS, 2013. Prolonged administration of adjuvant temozolomide improves survival in adult patients with glioblastoma. *Anticancer research*. 2013. Vol. 33, n° 8, pp. 3467–3474.

DE FARIA, Giselle Pinto, DE OLIVEIRA, José Antônio, DE OLIVEIRA, José Gustavo Pugliese, ROMANO, Sérgio de Oliveira, NETO, Vivaldo Moura et MAIA, Raquel Ciuvalschi, 2008. Differences in the Expression Pattern of P-Glycoprotein and MRP1 in Low-Grade and High-Grade Gliomas. *Cancer Investigation*. janvier 2008. Vol. 26, n° 9, pp. 883-889.

DEAN, Michael, FOJO, Tito et BATES, Susan, 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*. avril 2005. Vol. 5, n° 4, pp. 275-284.

DEBINSKI, Waldemar, DICKINSON, Peter, ROSSMEISL, John H., ROBERTSON, John et GIBO, Denise M., 2013. New Agents for Targeting of IL-13RA2 Expressed in Primary Human and Canine Brain Tumors. LESNIAK, MaciejÂ S. (éd.), *PLoS ONE*. 16 octobre 2013. Vol. 8, n° 10, pp. e77719. DOI 10.1371/journal.pone.0077719.

DEVIERS, Alexandra, KEN, Soléakhéna, FILLERON, Thomas, ROWLAND, Benjamin, LARUELO, Andrea, CATALAA, Isabelle, LUBRANO, Vincent, CELSIS, Pierre, BERRY, Isabelle, MOGICATO, Giovanni, COHEN-JONATHAN MOYAL, Elizabeth et LAPRIE, Anne, 2014. Evaluation of the Lactate-to-N-Acetyl-aspartate Ratio Defined With Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging Before Radiation Therapy as a New Predictive Marker of the Site of Relapse in Patients With Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. octobre 2014. Vol. 90, n° 2, pp. 385-393. DOI 10.1016/j.ijrobp.2014.06.009.

DICKINSON, Peter J., STURGES, B. K., HIGGINS, R. J., ROBERTS, B. N., LEUTENEGGER, C. M., BOLLEN, A. W. et LECOUTEUR, Richard A., 2008. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and peritumoral edema in canine primary central nervous system tumors. *Veterinary Pathology Online*. 2008. Vol. 45, n° 2, pp. 131–139.

DICKINSON, Peter J., YORK, Dan, HIGGINS, Robert J., LECOUTEUR, Richard A., JOSHI, Nikhil et BANNASCH, Danika, 2016. Chromosomal Aberrations in Canine Gliomas Define Candidate Genes and Common Pathways in Dogs and Humans. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. juillet 2016. Vol. 75, n° 7, pp. 700-710. DOI 10.1093/jnen/nlw042.

DIMOU, L. et GOTZ, M., 2014. Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiological Reviews*. 1 juillet 2014. Vol. 94, n° 3, pp. 709-737.

DOBSON, J. M., SAMUEL, S., MILSTEIN, H., ROGERS, K. et WOOD, J. L. N., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of small animal practice*. 2002. Vol. 43, n° 6, pp. 240–246.

DOBSON, Jane M., 2013. Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. *ISRN Veterinary Science*. 2013. Vol. 2013, pp. 1-23. DOI 10.1155/2013/941275.

DOLECEK, T. A., PROPP, J. M., STROUP, N. E. et KRUCHKO, C., 2012. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncology*. 1 novembre 2012. Vol. 14, n° suppl 5, pp. v1-v49. DOI 10.1093/neuonc/nos218.

DRESSELHAUS, Mildred S, JORIO, Ado, HOFMANN, Mario, DRESSELHAUS, Gene et SAITO, Riichiro, 2010. Perspectives on Carbon Nanotubes and Graphene Raman Spectroscopy. *Nano Lett.* 2010. pp. 8.

DUNN, Gavin P., ANDRONESI, Ovidiu C. et CAHILL, Daniel P., 2013. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH1/2 in glioma. *Neurosurgical focus*. 2013. Vol. 34, n° 2, pp. E2.

DUPONT-MONOD, Juliette, 2014. *Établissement et exploitation d'une lignée cellulaire de gliome canin pour la recherche thérapeutique*.

DYKE, Christopher A. et TOUR, James M., 2004. Covalent Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes for Materials Applications. *The Journal of Physical Chemistry A*. décembre 2004. Vol. 108, n° 51, pp. 11151-11159. DOI 10.1021/jp046274g.

EATEMADI, Ali, DARAEE, Hadis, KARIMKHANLOO, Hamzeh, KOUHI, Mohammad, ZARGHAMI, Nosratollah, AKBARZADEH, Abolfazl, ABASI, Mozhgan, HANIFEHPOUR, Younes et JOO, Sang, 2014. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. *Nanoscale Research Letters*. 2014. Vol. 9, n° 1, pp. 393. DOI 10.1186/1556-276X-9-393.

EYLER, C. E. et RICH, J. N., 2008. Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 10 juin 2008. Vol. 26, n° 17, pp. 2839-2845.

FALCAO, Eduardo HL et WUDL, Fred, 2007. Carbon allotropes: beyond graphite and diamond. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. juin 2007. Vol. 82, n° 6, pp. 524-531. DOI 10.1002/jctb.1693.

FAN, Xiaohui, SHAO, Li, FANG, Hong, TONG, Weida et CHENG, Yiyu, 2010. Bevacizumab and radiotherapy for the treatment of glioblastoma: brothers in arms or unholy alliance? . 2010.

FELDHAEUSSER, Brittany, PLATT, Simon R., MARRACHE, Sean, KOLISHETTI, Nagesh, PATHAK, Rakesh K., MONTGOMERY, David J., RENO, Lisa R., HOWERTH, Elizabeth et DHAR, Shanta, 2015. Evaluation of nanoparticle delivered cisplatin in beagles. *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, n° 33, pp. 13822-13830. DOI 10.1039/C5NR03447G.

FERNÁNDEZ, Francisco, DEVIERS, Alexandra, DALLY, Claire, MOGICATO, Giovanni, DELVERDIER, Maxence, CAUZINILLE, Laurent, GNIRS, Kirsten, AÑOR, Sònia, DE LA FUENTE, Cristian, FONDEVILA, Dolors et PUMAROLA, Martí, 2016. Presence of neural progenitors in spontaneous canine gliomas: A histopathological and immunohistochemical study of 20 cases. . mars 2016.

FERTIL, B., DERTINGER, H., COURDI, A. et MALAISE, E. P., 1984. Mean Inactivation Dose: A Useful Concept for Intercomparison of Human Cell Survival Curves. *Radiation Research*. juillet 1984. Vol. 99, n° 1, pp. 73. DOI 10.2307/3576448.

FINK, James, BORN, Donald et CHAMBERLAIN, Marc C., 2011. Pseudoprogression: Relevance With Respect to Treatment of High-Grade Gliomas. *Current Treatment Options in Oncology*. septembre 2011. Vol. 12, n° 3, pp. 240-252. DOI 10.1007/s11864-011-0157-1.

FIORITO, Silvana, FLAHAUT, Emmanuel, RAPINO, Stefania, PAOLUCCI, Francesco, ANDREOLA, Federica, MORONI, Noemi, PITTALUGA, Eugenia, ZONFRILLO, Manuela, VALENTI, Giovanni, MASTROFRANCESCO, Arianna, GROPPI, Flavia, SABBIONI, Enrico, BAKALIS, Evangelos, ZERBETTO, Francesco et SERAFINO, Annalucia, 2014. Redox active Double Wall Carbon Nanotubes show intrinsic anti-proliferative effects and modulate autophagy in cancer cells. . 2014. pp. 14.

FIORITO, Silvana, RUSSIER, Julie, SALEMME, Adele, SOLIGO, Marzia, MANNI, Luigi, KRASNOWSKA, Ewa et TOGNA, Anna Rita, 2018. Switching on microglia with electro-conductive multi walled carbon nanotubes. *Carbon*. avril 2018. Vol. 129, pp. 572-584. DOI 10.1016/j.carbon.2017.12.069.

FLAHAUT, E., GOVINDARAJ, A., PEIGNEY, A., LAURENT, Ch., ROUSSET, A. et RAO, C.N.R., 1999. Synthesis of single-walled carbon nanotubes using binary (Fe, Co, Ni) alloy nanoparticles prepared in situ by the reduction of oxide solid solutions. *Chemical Physics Letters*. janvier 1999. Vol. 300, n° 1-2, pp. 236-242. DOI 10.1016/S0009-2614(98)01304-9.

FLAHAUT, E., PEIGNEY, A., LAURENT, Ch. et ROUSSET, A., 2000. Synthesis of single-walled carbon nanotube–Co–MgO composite powders and extraction of the nanotubes. *Journal of Materials Chemistry*. 2000. Vol. 10, n° 2, pp. 249-252. DOI 10.1039/a908593i.

FLAHAUT, Emmanuel, BACSA, Revathi, PEIGNEY, Alain et LAURENT, Christophe, 2003. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes. *Chemical Communications*. 2003. N° 12, pp. 1442. DOI 10.1039/b301514a.

FLAHAUT, Emmanuel, EVARISTE, Lauris, GAUTHIER, Laury, LARUE, Camille, LINE, Clarisse, MEUNIER, Étienne et MOUCHET, Florence, 2018. Toxicité des nanotubes de carbone envers l'homme et l'environnement. . 2018. pp. 22.

FRANCIS, Arul Prakash et DEVASENA, Thiyagarajan, 2018. Toxicity of carbon nanotubes: A review. *Toxicology and Industrial Health*. mars 2018. Vol. 34, n° 3, pp. 200-210. DOI 10.1177/0748233717747472.

FRASER, A. R., BACCI, B., LE CHEVOIR, M. A. et LONG, S. N., 2016. Epidermal Growth Factor Receptor and Ki-67 Expression in Canine Gliomas. *Veterinary Pathology*. novembre 2016. Vol. 53, n° 6, pp. 1131-1137. DOI 10.1177/0300985816644301.

GARCIA-BARROS, Monica et PARIS, Francois, 2003. Tumor Response to Radiotherapy Regulated by Endothelial Cell Apoptosis. *Science*. 2003. Vol. 300, n° 5622, pp. 1152–1155.

GE, C., DU, J., ZHAO, L., WANG, L., LIU, Y., LI, D., YANG, Y., ZHOU, R., ZHAO, Y., CHAI, Z. et CHEN, C., 2011. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11 octobre 2011. Vol. 108, n° 41, pp. 16968-16973. DOI 10.1073/pnas.1105270108.

GILBERT, Mark R, BLUMENTHAL, Deborah T, CHAKRAVARTI, Arnab, JAECKLE, Kurt A, WERNER-WASIK, Maria et CURRAN, Walter J, 2014. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *n engl j med*. 2014. pp. 10.

GONZALEZ-CARTER, Daniel, GOODE, Angela E., KIRYUSHKO, Darya, MASUDA, Seigo, HU, Sheng, LOPES-RODRIGUES, Rosalia, DEXTER, David T., SHAFFER, Milo S. P. et PORTER, Alexandra E., 2019. Quantification of blood–brain barrier transport and neuronal toxicity of unlabelled multiwalled carbon nanotubes as a function of surface charge. *Nanoscale*. 2019. Vol. 11, n° 45, pp. 22054-22069. DOI 10.1039/C9NR02866H.

GUADAGNINI, Rina, HALAMODA KENZAOUI, Blanka, WALKER, Laura, POJANA, Giulio, MAGDOLENOVA, Zuzana, BILANICOVA, Dagmar, SAUNDERS, Margaret, JUILLERAT-JEANNERET, Lucienne, MARCOMINI, Antonio, HUK, Anna, DUSINSKA, Maria, FJELLSBØ, Lise M, MARANO, Francelyne et BOLAND, Sonja, 2015. Toxicity screenings of nanomaterials: challenges due to interference with assay processes and components of classic *in vitro* tests. *Nanotoxicology*. 25 mai 2015. Vol. 9, n° sup1, pp. 13-24. DOI 10.3109/17435390.2013.829590.

GUO, T, NIKOLAEV, P, THESS, A, COLBERT, D T et SMALLEY, R E, 1995. Catalytic growth of single-walled nanotubes by laser vaporization. *Chemical Physics Letters*. 1995. pp. 6.

HARDELL, L., CARLBERG, M., SODERQVIST, F., MILD, K. H. et MORGAN, L. L., 2007. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for >=10 years. *Occupational and Environmental Medicine*. 16 janvier 2007. Vol. 64, n° 9, pp. 626-632.

HEGI, Monika E., DISERENS, Annie-Claire, GORLIA, Thierry, HAMOU, Marie-France, DE TRIBOLET, Nicolas, WELLER, Michael, KROS, Johan M., HAINFELLNER, Johannes A., MASON, Warren, MARIANI, Luigi et OTHERS, 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005. Vol. 352, n° 10, pp. 997–1003.

HERRERO-LATORRE, C, 2014. Characterization of carbon nanotubes and analytical methods for their determination in environmental and biological samples: A review. . 2014. pp. 18.

HERVEY-JUMPER, Shawn L. et BERGER, Mitchel S., 2016. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *Journal of Neuro-Oncology*. 12 mai 2016.

HICKOK, Jane T., ROSCOE, Joseph A., MORROW, Gary R., MUSTIAN, Karen, OKUNIEFF, Paul et BOLE, Christopher W., 2005. Frequency, severity, clinical course, and correlates of fatigue in 372 patients during 5 weeks of radiotherapy for cancer. *Cancer*. 15 octobre 2005. Vol. 104, n° 8, pp. 1772-1778.

HIGGINS, Robert J., DICKINSON, Peter J., LECOUTEUR, Richard A., BOLLEN, Andrew W., WANG, Huamin, WANG, Hua, CORELY, Linda J., MOORE, Lynnette M., ZANG, Wei et FULLER, Gregory N., 2010. Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFRα and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *Journal of Neuro-Oncology*. mai 2010. Vol. 98, n° 1, pp. 49-55. DOI 10.1007/s11060-009-0072-5.

HIRSCH, Andreas, 2002. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2002.

IIJIMA, Sumio et ICHIHASHI, Toshinari, 1993. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature*. 17 juin 1993. Vol. 363, n° 6430, pp. 603-605. DOI 10.1038/363603a0.

IIJIMA, Sumio, 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*. 354. 1991. pp. 56-58.

INOUE, Satoshi, ICHIKAWA, Tomotsugu, KUROZUMI, Kazuhiko, MARUO, Tomoko, ONISHI, Manabu, YOSHIDA, Koichi, FUJII, Kentaro, KAMBARA, Hirokazu, CHIOCCA, E. Antonio et DATE, Isao, 2012. Novel Animal Glioma Models that Separately Exhibit Two Different Invasive and Angiogenic Phenotypes of Human Glioblastomas. *World Neurosurgery*. décembre 2012. Vol. 78, n° 6, pp. 670-682. DOI 10.1016/j.wneu.2011.09.005.

ISHII, Aya, KIMURA, Tokuhiro, SADAHIRO, Hirokazu, KAWANO, Hiroo, TAKUBO, Keiyo, SUZUKI, Michiyasu et IKEDA, Eiji, 2016. Histological Characterization of the Tumorigenic “Peri-Necrotic Niche” Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. HJELMELAND, Anita B. (éd.), *PLOS ONE*. 22 janvier 2016. Vol. 11, n° 1, pp. e0147366. DOI 10.1371/journal.pone.0147366.

JELLISON, Brian J., FIELD, Aaron S., MEDOW, Joshua, LAZAR, Mariana, SALAMAT, M. Shariar et ALEXANDER, Andrew L., 2004. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *American Journal of Neuroradiology*. 2004. Vol. 25, n° 3, pp. 356–369.

JENKINS, E. O., SCHIFF, D., MACKMAN, N. et KEY, N. S., 2010. Venous thromboembolism in malignant gliomas. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. février 2010. Vol. 8, n° 2, pp. 221-227.

JESIONEK-KUPNICKA, Dorota, BRAUN, Marcin, TRĄBSKA-KLUCH, Berenika, CZECH, Joanna, SZYBKA, Małgorzata, SZYMAŃSKA, Bożena, KULCZYCKA-WOJDALA, Dominika, BIEŃKOWSKI, Michał, KORDEK, Radzisław et ZAWLIK, Izabela, 2019. MiR-21, miR-34a, miR-125b, miR-181d and miR-648 levels inversely correlate with MGMT and TP53 expression in primary glioblastoma patients. *Archives of Medical Science*. 2019. Vol. 15, n° 2, pp. 504-512. DOI 10.5114/aoms.2017.69374.

JIN, Hong, HELLER, Daniel A. et STRANO, Michael S., 2008. Single-Particle Tracking of Endocytosis and Exocytosis of Single-Walled Carbon Nanotubes in NIH-3T3 Cells. *Nano Letters*. juin 2008. Vol. 8, n° 6, pp. 1577-1585. DOI 10.1021/nl072969s.

JOURNET, C., MASER, W. K., BERNIER, P., LOISEAU, A., DE LA CHAPELLE, M. Lamy, LEFRANT, S., DENIARD, P., LEE, R. et FISCHER, J. E., 1997. Large-scale production of single-walled carbon nanotubes by the electric-arc technique. *Nature*. août 1997. Vol. 388, n° 6644, pp. 756-758. DOI 10.1038/41972.

KAFA, Houmam, WANG, Julie Tzu-Wen, RUBIO, Noelia, VENNER, Kerrie, ANDERSON, Glenn, PACH, Elzbieta, BALLESTEROS, Belén, PRESTON, Jane E., ABBOTT, N. Joan et AL-JAMAL, Khuloud T., 2015. The interaction of carbon nanotubes with an in vitro blood-brain barrier model and mouse brain in vivo. *Biomaterials*. juin 2015. Vol. 53, pp. 437-452. DOI 10.1016/j.biomaterials.2015.02.083.

KEIME-GUIBERT, Florence, LUC, Taillandier, STÉPHANIE, Cartalat-Carel, MARC, Frenay, GUY, Kantor, JEAN-SÉBASTIEN, Guillamo, ERIC, Jadaud, PHILIPPE, Colin, PIERRE-YVES, Bondiau, PHILIPPE, Meneï, HUGUES, Loiseau, VALÉRIE, Bernier, JÉRÔME, Honnorat, MARYLINE, Barrié, KARIMA, Mokhtari, JEAN-JACQUES, Mazeron, ANNE, Bissery et JEAN-YVES, Delattre, 2007. Radiotherapy for Glioblastoma in the Elderly. *The New England Journal of Medicine*. 2007. pp. 9.

KEN, Soléakhéna, DEVIERS, Alexandra, FILLERON, Thomas, CATALAA, Isabelle, LOTTERIE, Jean-Albert, KHALIFA, Jonathan, LUBRANO, Vincent, BERRY, Isabelle, PÉRAN, Patrice, CELSIS, Pierre, MOYAL, Elizabeth Cohen-Jonathan et LAPRIE, Anne, 2015. Voxel-based evidence of perfusion normalization in glioblastoma patients included in a phase I–II trial of radiotherapy/tipifarnib combination. *Journal of Neuro-Oncology*. septembre 2015. Vol. 124, n° 3, pp. 465-473. DOI 10.1007/s11060-015-1860-8.

KETTENMANN, Helmut, 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*. janvier 2013. Vol. 77, n° 1, pp. 10-18.

KISHIMOTO, Takuya E., UCHIDA, Kazuyuki, CHAMBERS, James K., KOK, Mun Keong, SON, Nguyen V., SHIGA, Takanori, HIRABAYASHI, Miyuki, USHIO, Nanako et NAKAYAMA, Hiroyuki, 2020. A retrospective survey on canine intracranial tumors between 2007 and 2017. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2020. Vol. 82, n° 1, pp. 77-83. DOI 10.1292/jvms.19-0486.

KLEIHUES, Paul, BURGER, Peter C. et SCHEITHAUER, Bernd W., 1993. The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology*. 1993. Vol. 3, n° 3.

KLEIHUES, Paul, LOUIS, David N., SCHEITHAUER, Bernd W., RORKE, Lucy B., REIFENBERGER, Guido, BURGER, Peter C. et CAVENEE, Webster K., 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2002. Vol. 61, n° 3, pp. 215–225.

KOEHLER, Jennifer, SANDEY, Maninder, PRASAD, Nripesh, LEVY, Shawn A., WANG, Xiaozhu et WANG, Xu, 2020. Differential Expression of miRNAs in Hypoxia ("HypoxamiRs") in Three Canine High-Grade Glioma Cell Lines. *Frontiers in Veterinary Science*. 28 février 2020. Vol. 7, pp. 104. DOI 10.3389/fvets.2020.00104.

KOEHLER, Jennifer W, MILLER, Andrew D, MILLER, C Ryan, PORTER, Brian, ALDAPE, Kenneth, BECK, Jessica, BRAT, Daniel, CORNAX, Ingrid, CORPS, Kara, FRANK, Chad, GIANNINI, Caterina, HORBINSKI, Craig, HUSE, Jason T, O'SULLIVAN, M Gerard, RISSI, Daniel R, MARK SIMPSON, R, WOOLARD, Kevin, SHIH, Joanna H, MAZCKO, Christina, GILBERT, Mark R et LEBLANC, Amy K, 2018. A Revised Diagnostic Classification of Canine Glioma: Towards Validation of the Canine Glioma Patient as a Naturally Occurring Preclinical Model for Human Glioma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1 novembre 2018. Vol. 77, n° 11, pp. 1039-1054. DOI 10.1093/jnen/nly085.

KOH, Byumseok, KIM, Gwangseong, YOON, Hyung Ki, PARK, Jong Bae, KOPELMAN, Raoul et CHENG, Wei, 2012. Fluorophore and Dye-Assisted Dispersion of Carbon Nanotubes in Aqueous Solution. *Langmuir*. 14 août 2012. Vol. 28, n° 32, pp. 11676-11686. DOI 10.1021/la302004p.

KREX, D., KLINK, B., HARTMANN, C., VON DEIMLING, A., PIETSCH, T., SIMON, M., SABEL, M., STEINBACH, J. P., HEESE, O., REIFENBERGER, G., WELLER, M., SCHACKERT, G. et FOR THE GERMAN GLIOMA NETWORK, 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*. 1 octobre 2007. Vol. 130, n° 10, pp. 2596-2606.

KROTO, H. W., HEATH, J. R., O'BRIEN, S. C., CURL, R. F. et SMALLEY, R. E., 1985. C60: Buckminsterfullerene. *Nature*. novembre 1985. Vol. 318, n° 6042, pp. 162-163. DOI 10.1038/318162a0.

KRUKEMEYER, MG, 2015. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology* [en ligne]. 2015. Vol. 06, n° 06. [Consulté le 14 octobre 2020]. DOI 10.4172/2157-7439.1000336.

KUMAR, Durairaj Mohan, THOTA, Balaram, SHINDE, Sridevi Vijay, PRASANNA, K V, HEGDE, A S, ARIVAZHAGAN, A, CHANDRAMOULI, B A, SANTOSH, Vani et SOMASUNDARAM, Kumaravel, 2010. Proteomic Identification of Haptoglobin α2 as a Glioblastoma Serum Biomarker: Implications in Cancer Cell Migration and Tumor Growth. . 2010. pp. 11.

KUMARI, Rina, MONDAL, Titash, BHOWMICK, Anil K. et DAS, Prolay, 2016. Impeded repair of abasic site damaged lesions in DNA adsorbed over functionalized multiwalled carbon nanotube and graphene oxide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. juin 2016. Vol. 803-804, pp. 39-46. DOI 10.1016/j.mrgentox.2016.05.007.

KUŹNIK, Nikodem et TOMCZYK, Mateusz Michał, 2016. Multiwalled carbon nanotube hybrids as MRI contrast agents. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 27 juillet 2016. Vol. 7, pp. 1086-1103. DOI 10.3762/bjnano.7.102.

LAI, S. R., CASTELLO, S. A., ROBINSON, A. C. et KOEHLER, J. W., 2017. *In vitro* anti-tubulin effects of mebendazole and fenbendazole on canine glioma cells: Effects of benzimidazoles in canine glioma. *Veterinary and Comparative Oncology*. décembre 2017. Vol. 15, n° 4, pp. 1445-1454. DOI 10.1111/vco.12288.

LAL, Sumit, VERMA, Jyoti et VAN NOORDEN, Cornelis J.F., 2014. Nanoparticles for hyperthermic therapy: synthesis strategies and applications in glioblastoma. *International Journal of Nanomedicine*. juin 2014. pp. 2863. DOI 10.2147/IJN.S57501.

LEBLANC, Amy K., MAZCKO, Christina, BROWN, Diane E., KOEHLER, Jennifer W., MILLER, Andrew D., MILLER, C. Ryan, BENTLEY, R. Timothy, PACKER, Rebecca A., BREEN, Matthew, BOUDREAU, C. Elizabeth, LEVINE, Jonathan M., SIMPSON, R. Mark, HALSEY, Charles, KISSEBERTH, William, ROSSMEISL, John H., DICKINSON, Peter J., FAN, Timothy M., CORPS, Kara, ALDAPE, Kenneth, PUDUVALLI, Vinay, PLUHAR, G. Elizabeth et GILBERT, Mark R., 2016. Creation of an NCI comparative brain tumor consortium: informing the translation of new knowledge from canine to human brain tumor patients. *Neuro-Oncology*. septembre 2016.

LEECE, Rebecca, XU, Jordan, OSTROM, Quinn T, CHEN, Yanwen, KRUCHKO, Carol et BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S, 2017. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007. *Neuro-Oncology*. 19 octobre 2017. Vol. 19, n° 11, pp. 1553-1564. DOI 10.1093/neuonc/nox091.

Les cancers en France - Edition 2015 - Ref : ETKFRANCE16 | Institut National Du Cancer, 2016. .

LÉVY, S., CHAPET, S. et MAZERON, J.-J., 2014. Prise en charge des gliomes. *Cancer/Radiothérapie*. octobre 2014. Vol. 18, n° 5-6, pp. 461-467. DOI 10.1016/j.canrad.2014.07.147.

LIANG, Chao, DIAO, Shuo, WANG, Chao, GONG, Hua, LIU, Teng, HONG, Guosong, SHI, Xiaoze, DAI, Hongjie et LIU, Zhuang, 2014. Tumor Metastasis Inhibition by Imaging-Guided Photothermal Therapy with Single-Walled Carbon Nanotubes. *Advanced Materials*. août 2014. Vol. 26, n° 32, pp. 5646-5652. DOI 10.1002/adma.201401825.

LIAU, Linda M., ASHKAN, Keyoumars, TRAN, David D., CAMPIAN, Jian L., EWEND, Matthew G. et KIM, Lyndon J., 2018. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *Journal of Translational Medicine*. décembre 2018. Vol. 16, n° 1, pp. 142. DOI 10.1186/s12967-018-1507-6.

LINE, Clarisse, 2019. *Evaluation of parameters influencing plant response to carbon nanotube contamination*.

LIPSITZ, D., HIGGINS, R. J., KORTZ, G. D., DICKINSON, Peter J., BOLLEN, A. W., NAYDAN, D. K. et LECOUTEUR, Richard A., 2003. Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Veterinary Pathology Online*. 2003. Vol. 40, n° 6, pp. 659–669.

LITTLE, M. P., RAJARAMAN, P., CURTIS, R. E., DEVESA, S. S., INSKIP, P. D., CHECK, D. P. et LINET, M. S., 2012. Mobile phone use and glioma risk: comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. . 8 mars 2012.

LIU, Zhuang, TABAKMAN, Scott M, CHEN, Zhuo et DAI, Hongjie, 2009. Preparation of carbon nanotube bioconjugates for biomedical applications. *Nature Protocols*. septembre 2009. Vol. 4, n° 9, pp. 1372-1381. DOI 10.1038/nprot.2009.146.

LOUIS, David N., OHGAKI, Hiroko, WIESTLER, Otmar D., CAVENEE, Webster K., BURGER, Peter C., JOUVET, Anne, SCHEITHAUER, Bernd W. et KLEIHUES, Paul, 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*. 12 juillet 2007. Vol. 114, n° 2, pp. 97-109.

LOUIS, David N., PERRY, Arie, REIFENBERGER, Guido, VON DEIMLING, Andreas, FIGARELLA-BRANGER, Dominique, CAVENEE, Webster K., OHGAKI, Hiroko, WIESTLER, Otmar D., KLEIHUES, Paul et ELLISON, David W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. juin 2016. Vol. 131, n° 6, pp. 803-820.

LU, Guan-Hua, SHANG, Wen-Ting, DENG, Han, HAN, Zi-Yu, HU, Min, LIANG, Xiao-Yuan, FANG, Chi-Hua, ZHU, Xin-Hong, FAN, Ying-Fang et TIAN, Jie, 2019. Targeting carbon nanotubes based on IGF-1R for photothermal therapy of orthotopic pancreatic cancer guided by optical imaging. *Biomaterials*. mars 2019. Vol. 195, pp. 13-22. DOI 10.1016/j.biomaterials.2018.12.025.

LU, Lu, DONG, Jiali, WANG, Lili, XIA, Qing, ZHANG, Dan, KIM, Hyejin, YIN, Tao, FAN, Saijun et SHEN, Qiang, 2018. Activation of STAT3 and Bcl-2 and reduction of reactive oxygen species (ROS) promote radioresistance in breast cancer and overcome of radioresistance with niclosamide. *Oncogene*. septembre 2018. Vol. 37, n° 39, pp. 5292-5304. DOI 10.1038/s41388-018-0340-y.

MACARTHUR, Kelly M., KAO, Gary D., CHANDRASEKARAN, Sanjay, ALONSO-BASANTA, Michelle, CHAPMAN, Christina, LUSTIG, Robert A., WILEYTO, E. Paul, HAHN, Stephen M. et DORSEY, Jay F., 2014. Detection of Brain Tumor Cells in the Peripheral Blood by a Telomerase Promoter-Based Assay. *Cancer Research*. 15 avril 2014. Vol. 74, n° 8, pp. 2152-2159. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-13-0813.

MAH, L-J, EL-OSTA, A et KARAGIANNIS, T C, 2010. γH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. avril 2010. Vol. 24, n° 4, pp. 679-686. DOI 10.1038/leu.2010.6.

MAMON, Harvey J., WEN, Patrick Y., BURNS, Anne C. et LOEFFLER, Jay S., 1999. Allergic skin reactions to anticonvulsant medications in patients receiving cranial radiation therapy. *Epilepsia*. 1999. Vol. 40, n° 3, pp. 341–344.

MANNINO, Mariella et CHALMERS, Anthony J., 2011. Radioresistance of glioma stem cells: Intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Molecular Oncology*. août 2011. Vol. 5, n° 4, pp. 374-386. DOI 10.1016/j.molonc.2011.05.001.

MARCONNET, Amy M., PANZER, Matthew A. et GOODSON, Kenneth E., 2013. Thermal conduction phenomena in carbon nanotubes and related nanostructured materials. *Reviews of Modern Physics*. 16 août 2013. Vol. 85, n° 3, pp. 1295-1326. DOI 10.1103/RevModPhys.85.1295.

MARRAS, L. Connie, GEERTS, William H. et PERRY, James R., 2000. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma. *Cancer*. 2000. Vol. 89, n° 3, pp. 640–646.

MARTIN-VAQUERO, Paula, DA COSTA, Ronaldo C., ECHANDI, Rita L., SAMMET, Christina L., KNOPP, Michael V. et SAMMET, Steffen, 2012. Magnetic resonance spectroscopy of the canine brain at 3.0T and 7.0T. *Research in Veterinary Science*. août 2012. Vol. 93, n° 1, pp. 427-429. DOI 10.1016/j.rvsc.2011.07.025.

MENARD-MOYON, Cécilia et BIANCO, Alberto, 2014. Atténuation de la toxicité des nanotubes de carbone grâce à la fonctionnalisation chimique. . 2014. pp. 18.

MEUNIER, Etienne, COSTE, Agnès, OLAGNIER, David, AUTHIER, Hélène, LEFÈVRE, Lise, DARDENNE, Christophe, BERNAD, José, BÉRAUD, Maryse, FLAHAUT, Emmanuel et PIPY, Bernard, 2012. Double-walled carbon nanotubes trigger IL-1β release in human monocytes through Nlrp3 inflammasome activation. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. août 2012. Vol. 8, n° 6, pp. 987-995. DOI 10.1016/j.nano.2011.11.004.

MEYER, Fredric B., BATES, Lisa M., GOERSS, Stephan J., FRIEDMAN, Jonathan A., WINDSCHITL, Wanda L., DUFFY, Joseph R., PERKINS, William J. et O'NEILL, Brian P., 2001. Awake craniotomy for aggressive resection of primary gliomas located in eloquent brain. In : *Mayo clinic proceedings*. Elsevier. 2001. pp. 677–687.

MICKELSON, E.T., HUFFMAN, C.B., RINZLER, A.G., SMALLEY, R.E., HAUGE, R.H. et MARGRAVE, J.L., 1998. Fluorination of single-wall carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*. octobre 1998. Vol. 296, n° 1-2, pp. 188-194. DOI 10.1016/S0009-2614(98)01026-4.

MILLER, Andrew D., MILLER, C. Ryan et ROSSMEISL, John H., 2019. Canine Primary Intracranial Cancer: A Clinicopathologic and Comparative Review of Glioma, Meningioma, and Choroid Plexus Tumors. *Frontiers in Oncology*. 8 novembre 2019. Vol. 9, pp. 1151. DOI 10.3389/fonc.2019.01151.

MILLER, Anthony B., SEARS, Margaret E., MORGAN, L. Lloyd, DAVIS, Devra L., HARDELL, Lennart, OREMUS, Mark et SOSKOLNE, Colin L., 2019. Risks to Health and Well-Being From Radio-Frequency Radiation Emitted by Cell Phones and Other Wireless Devices. *Frontiers in Public Health*. 13 août 2019. Vol. 7, pp. 223. DOI 10.3389/fpubh.2019.00223.

MOLINARO, Annette M., TAYLOR, Jennie W., WIENCKE, John K. et WRENSCH, Margaret R., 2019. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nature Reviews Neurology*. juillet 2019. Vol. 15, n° 7, pp. 405-417. DOI 10.1038/s41582-019-0220-2.

MONTHIOUX, M., SMITH, B.W., BURTEAUX, B., CLAYE, A., FISCHER, J.E. et LUZZI, D.E., 2001. Sensitivity of single-wall carbon nanotubes to chemical processing: an electron microscopy investigation. *Carbon*. juillet 2001. Vol. 39, n° 8, pp. 1251-1272. DOI 10.1016/S0008-6223(00)00249-9.

MURUGANANDHAM, Manickam, CLERKIN, Patrick P., SMITH, Brian J., ANDERSON, Carryn M., MORRIS, Ann, CAPIZZANO, Aristides A., MAGNOTTA, Vincent, MCGUIRE, Sarah M., SMITH, Mark C., BAYOUTH, John E. et BUATTI, John M., 2014. 3-Dimensional Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging at 3 Tesla for Early Response Assessment of Glioblastoma Patients During External Beam Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. septembre 2014. Vol. 90, n° 1, pp. 181-189.

NEGRI, Viviana, PACHECO-TORRES, Jesús, CALLE, Daniel et LÓPEZ-LARRUBIA, Pilar, 2020. Carbon Nanotubes in Biomedicine. *Topics in Current Chemistry*. février 2020. Vol. 378, n° 1, pp. 15. DOI 10.1007/s41061-019-0278-8.

NERL, Hannah C, CHENG, Crystal, GOODE, Angela E, BERGIN, Shane D, LICH, Ben, GASS, Mhairi et PORTER, Alexandra E, 2011. Imaging methods for determining uptake and toxicity of carbon nanotubes *in vitro* and *in vivo*. *Nanomedicine*. juillet 2011. Vol. 6, n° 5, pp. 849-865. DOI 10.2217/nnm.11.87.

NEVES, Vera, GERONDOPOULOS, Andreas, HEISTER, Elena, TÎLMACIU, Carmen, FLAHAUT, Emmanuel, SOULA, B, SILVA, S Ravi P, MCFADDEN, Johnjoe et COLEY, Helen M, 2012. Cellular Localization, Accumulation and Trafficking of Double- Walled Carbon Nanotubes in Human Prostate Cancer Cells. *Nano Res.* 2012. pp. 12.

NIKIFOROVA, Marina N. et HAMILTON, Ronald L., 2011. Molecular diagnostics of gliomas. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011. Vol. 135, n° 5, pp. 558–568.

OHGAKI, Hiroko et KLEIHUES, Paul, 2012. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2012. pp. 10.

OKPALUGO, T.I.T., PAPAKONSTANTINOU, P., MURPHY, H., MCLAUGHLIN, J. et BROWN, N.M.D., 2005. High resolution XPS characterization of chemical functionalised MWCNTs and SWCNTs. *Carbon*. 2005. Vol. 43, n° 1, pp. 153-161. DOI 10.1016/j.carbon.2004.08.033.

ÖNER, Deniz, GHOSH, Manosij, BOVÉ, Hannelore, MOISSE, Matthieu, BOECKX, Bram, DUCA, Radu C., POELS, Katrien, LUYTS, Katrien, PUTZEYS, Eveline, VAN LANDUYDT, Kirsten, VANOIRBEEK, Jeroen AJ, AMELOOT, Marcel, LAMBRECHTS, Diether, GODDERIS, Lode et HOET, Peter HM, 2018. Differences in MWCNT- and SWCNT-induced DNA methylation alterations in association with the nuclear deposition. *Particle and Fibre Toxicology*. décembre 2018. Vol. 15, n° 1, pp. 11. DOI 10.1186/s12989-018-0244-6.

OPPENLANDER, Mark E., WOLF, Andrew B., SNYDER, Laura A., BINA, Robert, WILSON, Jeffrey R., COONS, Stephen W., ASHBY, Lynn S., BRACHMAN, David, NAKAJI, Peter, PORTER, Randall W. et OTHERS, 2014. An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity: clinical article. *Journal of neurosurgery*. 2014. Vol. 120, n° 4, pp. 846–853.

OSTROM, Quinn T, CIOFFI, Gino, GITTLEMAN, Haley, PATIL, Nirav, WAITE, Kristin, KRUCHKO, Carol et BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S, 2019. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncology*. 1 novembre 2019. Vol. 21, n° Supplement_5, pp. v1-v100. DOI 10.1093/neuonc/noz150.

PANET-RAYMOND, Valerie, SOUHAMI, Luis, ROBERGE, David, KAVAN, Petr, SHAKIBNIA, Lily, MUANZA, Thierry, LAMBERT, Christine, LEBLANC, Richard, DEL MAESTRO, Rolando, GUIOT, Marie-Christine et SHENOUDA, George, 2009. Accelerated Hypofractionated Intensity-Modulated Radiotherapy With Concurrent and Adjuvant Temozolomide for Patients With Glioblastoma Multiforme: A Safety and Efficacy Analysis. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. février 2009. Vol. 73, n° 2, pp. 473-478. DOI 10.1016/j.ijrobp.2008.04.030.

PANTAROTTO, Davide, BRIAND, Jean-Paul, PRATO, Maurizio et BIANCO, Alberto, 2004. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubesElectronic supplementary information (ESI) available: details of the synthesis and characterization, cell culture, TEM, epifluorescence and confocal microscopy images of CNTs 1, 2 and fluorescein. See http://www.rsc.org/suppdata/cc/b3/b311254c/. *Chemical Communications*. 2004. N° 1, pp. 16. DOI 10.1039/b311254c.

PARK, Jiwon S., WITHERS, Sita S., MODIANO, Jaime F., KENT, Michael S., CHEN, Mingyi, LUNA, Jesus I., CULP, William T. N., SPARGER, Ellen E., REBHUN, Robert B., MONJAZEB, Arta M., MURPHY, William J. et CANTER, Robert J., 2016. Canine cancer immunotherapy studies: linking mouse and human. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. décembre 2016. Vol. 4, n° 1, pp. 97. DOI 10.1186/s40425-016-0200-7.

PAWLIK, Timothy M. et KEYOMARSI, Khandan, 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. juillet 2004. Vol. 59, n° 4, pp. 928-942.

PELLETIER, Guy, VERHOEF, Marja J., KHATRI, Nasreen et HAGEN, Neil, 2002. Quality of life in brain tumor patients: the relative contributions of depression, fatigue, emotional distress, and existential issues. *Journal of Neuro-oncology*. 2002. Vol. 57, n° 1, pp. 41–49.

PERRY, James R., 2012. Thromboembolic disease in patients with high-grade glioma. *Neuro-oncology*. 2012. Vol. 14, n° suppl 4, pp. iv73–iv80.

POPOV, V, 2004. Carbon nanotubes: properties and application. *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 15 janvier 2004. Vol. 43, n° 3, pp. 61-102. DOI 10.1016/j.mser.2003.10.001.

PRUITT, Amy A., 2011. Medical Management of Patients With Brain Tumors. *Current Treatment Options in Neurology*. août 2011. Vol. 13, n° 4, pp. 413-426.

RAFFA, Vittoria, CIOFANI, Gianni, VITTORIO, Orazio, RIGGIO, Cristina et CUSCHIERI, Alfred, 2010. Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. *Nanomedicine*. janvier 2010. Vol. 5, n° 1, pp. 89-97. DOI 10.2217/nnm.09.95.

RAINOV, N. G., KOCH, S., SENA-ESTEVES, M. et BERENS, M. E., 2000a. Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2000. Vol. 59, n° 7, pp. 607–613.

RAINOV, N. G., KOCH, S., SENA-ESTEVES, M. et BERENS, M. E., 2000b. Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2000. Vol. 59, n° 7, pp. 607–613.

REARDON, D. A., GOKHALE, P. C., KLEIN, S. R., LIGON, K. L., RODIG, S. J., RAMKISSOON, S. H., JONES, K. L., CONWAY, A. S., LIAO, X., ZHOU, J., WEN, P. Y., VAN DEN ABBEELE, A. D., HODI, F. S., QIN, L., KOHL, N. E., SHARPE, A. H., DRANOFF, G. et FREEMAN, G. J., 2016. Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer Immunology Research*. 1 février 2016. Vol. 4, n° 2, pp. 124-135. DOI 10.1158/2326-6066.CIR-15-0151.

REBETZ, Johan, TIAN, Dongping, PERSSON, Annette, WIDEGREN, Bengt, SALFORD, Leif G., ENGLUND, Elisabet, GISSELSSON, David et FAN, Xiaolong, 2008. Glial Progenitor-Like Phenotype in Low-Grade Glioma and Enhanced CD133-Expression and Neuronal Lineage Differentiation Potential in High-Grade Glioma. ABOODY, Karen S. (éd.), *PLoS ONE*. 9 avril 2008. Vol. 3, n° 4, pp. e1936. DOI 10.1371/journal.pone.0001936.

REITMAN, Zachary J., OLBY, Natasha J., MARIANI, Christopher L., THOMAS, Rachael, BREEN, Matthew, BIGNER, Darell D., MCLENDON, Roger E. et YAN, Hai, 2010. IDH1 and IDH2 hotspot mutations are not found in canine glioma. *International Journal of Cancer*. 1 juillet 2010. Vol. 127, n° 1, pp. 245-246. DOI 10.1002/ijc.25017.

REYA, Tannishtha, MORRISON, Sean J., CLARKE, Michael F. et WEISSMAN, Irving L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*. 2001. Vol. 414, n° 6859, pp. 105–111.

RIDOLA, Vita, BARONE, Giuseppe, LAZZARESCHI, Ilaria, RUGGIERO, Antonio, RIZZO, Daniela et RICCARDI, Riccardo, 2011. Feasibility study of 21-day-on/7-day-off temozolomide in children with brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*. mai 2011. Vol. 103, n° 1, pp. 147-153.

RODRIGUEZ, N.M., 1993. A review of catalytically grown carbon nanofibers. *Journal of Materials Research*. décembre 1993. Vol. 8, n° 12, pp. 3233-3250. DOI 10.1557/JMR.1993.3233.

RODRÍGUEZ-GALVÁN, Andrés, RIVERA, Margarita, GARCÍA-LÓPEZ, Patricia, MEDINA, Luis A. et BASIUK, Vladimir A., 2020. Gadolinium-containing carbon nanomaterials for magnetic resonance imaging: Trends and challenges. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. avril 2020. Vol. 24, n° 7, pp. 3779-3794. DOI 10.1111/jcmm.15065.

RODRÍGUEZ-MANZO, Julio A, BANHART, Florian, TERRONES, Mauricio, TERRONES, Humberto, GROBERT, Nicole, AJAYAN, Pulickel M, SUMPTER, Bobby G, MEUNIER, Vincent, WANG, Mingsheng, BANDO, Yoshio et GOLBERG, Dmitri, 2009. Heterojunctions between metals and carbon nanotubes as ultimate nanocontacts. . 2009. pp. 6.

ROMANO-FEINHOLZ, Samuel, SALAZAR-RAMIRO, Aleli, MUÑOZ-SANDOVAL, Emilio, MAGAÑA-MALDONADO, Roxana, HERNÁNDEZ PEDRO, Norma, RANGEL LÓPEZ, Edgar, GONZÁLEZ AGUILAR, Alberto, SÁNCHEZ GARCÍA, Aurora, SOTELO, Julio, PÉREZ DE LA CRUZ, Verónica et PINEDA, Benjamín, 2017. Cytotoxicity induced by carbon nanotubes in experimental malignant glioma. *International Journal of Nanomedicine*. août 2017. Vol. Volume 12, pp. 6005-6026. DOI 10.2147/IJN.S139004.

ROTH, Patrick, GRAMATZKI, Dorothee et WELLER, Michael, 2017. Management of Elderly Patients with Glioblastoma. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. avril 2017. Vol. 17, n° 4, pp. 35. DOI 10.1007/s11910-017-0740-3.

RUDA, R., BELLO, L., DUFFAU, H. et SOFFIETTI, R., 2012. Seizures in low-grade gliomas: natural history, pathogenesis, and outcome after treatments. *Neuro-Oncology*. 1 septembre 2012. Vol. 14, n° suppl 4, pp. iv55-iv64. DOI 10.1093/neuonc/nos199.

RYCAJ, Kiera et TANG, Dean G., 2014. Cancer stem cells and radioresistance. *International Journal of Radiation Biology*. août 2014. Vol. 90, n° 8, pp. 615-621. DOI 10.3109/09553002.2014.892227.

SANGINARIO, Alessandro, MICCOLI, Beatrice et DEMARCHI, Danilo, 2017. Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biosensors*. 15 février 2017. Vol. 7, n° 4, pp. 9. DOI 10.3390/bios7010009.

SCHIFF, D., LEE, E. Q., NAYAK, L., NORDEN, A. D., REARDON, D. A. et WEN, P. Y., 2015. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. *Neuro-Oncology*. 1 avril 2015. Vol. 17, n° 4, pp. 488-504.

SCHIFFMAN, Joshua D. et BREEN, Matthew, 2015. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 19 juillet 2015. Vol. 370, n° 1673, pp. 20140231. DOI 10.1098/rstb.2014.0231.

SCHINDELIN, Johannes, ARGANDA-CARRERAS, Ignacio, FRISE, Erwin, KAYNIG, Verena, LONGAIR, Mark, PIETZSCH, Tobias, PREIBISCH, Stephan, RUEDEN, Curtis, SAALFELD, Stephan, SCHMID, Benjamin, TINEVEZ, Jean-Yves, WHITE, Daniel James, HARTENSTEIN, Volker, ELICEIRI, Kevin, TOMANCAK, Pavel et CARDONA, Albert, 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. juillet 2012. Vol. 9, n° 7, pp. 676-682. DOI 10.1038/nmeth.2019.

SCHLEIN, Lisa J., FADL-ALLA, Bahaa, PONDENIS, Holly C., LEZMI, Stéphane, EBERHART, Charles G., LEBLANC, Amy K., DICKINSON, Peter J., HERGENROTHER, Paul J. et FAN, Timothy M., 2019. Immunohistochemical Characterization of Procaspase-3 Overexpression as a Druggable Target With PAC-1, a Procaspase-3 Activator, in Canine and Human Brain Cancers. *Frontiers in Oncology*. 25 février 2019. Vol. 9, pp. 96. DOI 10.3389/fonc.2019.00096.

SCHWARTZBAUM, J. A., HUANG, K., LAWLER, S., DING, B., YU, J. et CHIOCCA, E. A., 2010. Allergy and inflammatory transcriptome is predominantly negatively correlated with CD133 expression in glioblastoma. . 2010.

SENFT, Christian, BINK, Andrea, FRANZ, Kea, VATTER, Hartmut, GASSER, Thomas et SEIFERT, Volker, 2011. Intraoperative MRI guidance and extent of resection in glioma surgery: a randomised, controlled trial. *The Lancet Oncology*. octobre 2011. Vol. 12, n° 11, pp. 997-1003. DOI 10.1016/S1470-2045(11)70196-6.

SHIH, Helen A., SHERMAN, Janet C., NACHTIGALL, Lisa B., COLVIN, Mary K., FULLERTON, Barbara C., DAARTZ, Juliane, WINRICH, Barbara K., BATCHELOR, Tracy T., THORNTON, Lauren T., MANCUSO, Sarah M., SAUMS, Michele K., OH, Kevin S., CURRY, William T., LOEFFLER, Jay S. et YEAP, Beow Y., 2015. Proton therapy for low-grade gliomas: Results from a prospective trial: Proton Therapy for Low-Grade Gliomas. *Cancer*. 15 mai 2015. Vol. 121, n° 10, pp. 1712-1719. DOI 10.1002/cncr.29237.

SILANTYEV, Artemiy, FALZONE, Luca, LIBRA, Massimo, GURINA, Olga, KARDASHOVA, Karina, NIKOLOUZAKIS, Taxiarchis, NOSYREV, Alexander, SUTTON, Christopher, MITSIAS, Panayiotis et TSATSAKIS, Aristides, 2019. Current and Future Trends on Diagnosis and Prognosis of Glioblastoma: From Molecular Biology to Proteomics. *Cells*. 9 août 2019. Vol. 8, n° 8, pp. 863. DOI 10.3390/cells8080863.

SINGH, Prabhpreet, CAMPIDELLI, Stéphane, GIORDANI, Silvia, BONIFAZI, Davide, BIANCO, Alberto et PRATO, Maurizio, 2009. Organic functionalisation and characterisation of single-walled carbon nanotubes. *Chemical Society Reviews*. 2009. Vol. 38, n° 8, pp. 2214. DOI 10.1039/b518111a.

SINGH, Shree, VARDHARAJULA, Sandhya, TIWARI, Pooja, ERDAL EROĞLU, KOMAL VIG, DENNIS, Vida et ALI, 2012. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*. octobre 2012. pp. 5361. DOI 10.2147/IJN.S35832.

SINGLA, Navneet, AGGARWAL, Ashish, VYAS, Sameer, SANGHVI, Ankur, SALUNKE, Pravin et GARG, Ravi, 2016. Glioblastoma Multiforme with Hemorrhage Mimicking an Aneurysm: Lessons Learnt. *Annals of Neurosciences*. 2016. Vol. 23, n° 4, pp. 263-265. DOI 10.1159/000449488.

SMITH, E. R., ZURAKOWSKI, D., SAAD, A., SCOTT, R. M. et MOSES, M. A., 2008. Urinary Biomarkers Predict Brain Tumor Presence and Response to Therapy. *Clinical Cancer Research*. 27 mars 2008. Vol. 14, n° 8, pp. 2378-2386. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-07-1253.

SNYDER, Jessica M., SHOFER, Frances S., WINKLE, Thomas J. et MASSICOTTE, Christiane, 2006. Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006. Vol. 20, n° 3, pp. 669–675.

SONG, R.B., VITE, C.H., BRADLEY, C.W. et CROSS, J.R., 2013. Postmortem Evaluation of 435 Cases of Intracranial Neoplasia in Dogs and Relationship of Neoplasm with Breed, Age, and Body Weight. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. septembre 2013. Vol. 27, n° 5, pp. 1143-1152.

SONG, Se Jin, LAUBER, Christian, COSTELLO, Elizabeth K, LOZUPONE, Catherine A, HUMPHREY, Gregory, BERG-LYONS, Donna, CAPORASO, J Gregory, KNIGHTS, Dan, CLEMENTE, Jose C, NAKIELNY, Sara, GORDON, Jeffrey I, FIERER, Noah et KNIGHT, Rob, 2013. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife*. 16 avril 2013. Vol. 2, pp. e00458. DOI 10.7554/eLife.00458.

SPUGNINI, Enrico P., THRALL, Donald E., PRICE, G. Sylvester, SHARP, Nicholas J., MUNANA, Karen et PAGE, Rodney L., 2000. Primary irradiation of canine intracranial masses. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 2000. Vol. 41, n° 4, pp. 377–380.

STADLER, Krystina L., OBER, Christopher P., FEENEY, Daniel A. et JESSEN, Carl R., 2014. Multivoxel proton magnetic resonance spectroscopy of inflammatory and neoplastic lesions of the canine brain at 3.0 T. *American Journal of Veterinary Research*. novembre 2014. Vol. 75, n° 11, pp. 982-989. DOI 10.2460/ajvr.75.11.982.

STOICA, G., KIM, H.-T., HALL, D. G. et COATES, J. R., 2004. Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Veterinary Pathology Online*. 2004. Vol. 41, n° 1, pp. 10–19.

STOICA, G., LUNGU, G., MARTINI-STOICA, H., WAGHELA, S., LEVINE, J. et SMITH, R., 2009a. Identification of Cancer Stem Cells in Dog Glioblastoma. *Veterinary Pathology*. 1 mai 2009. Vol. 46, n° 3, pp. 391-406. DOI 10.1354/vp.08-VP-0218-S-FL.

STOICA, G., LUNGU, G., MARTINI-STOICA, H., WAGHELA, S., LEVINE, J. et SMITH, R., 2009b. Identification of Cancer Stem Cells in Dog Glioblastoma. *Veterinary Pathology*. 1 mai 2009. Vol. 46, n° 3, pp. 391-406. DOI 10.1354/vp.08-VP-0218-S-FL.

STUMMER, Walter, PICHLMEIER, Uwe, MEINEL, Thomas, WIESTLER, Otmar Dieter, ZANELLA, Friedhelm, REULEN, Hans-Jürgen, GROUP, ALA-Glioma Study et OTHERS, 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The lancet oncology*. 2006. Vol. 7, n° 5, pp. 392–401.

STUPP, R., BRADA, M., VAN DEN BENT, M. J., TONN, J.- C., PENTHEROUDAKIS, G. et ON BEHALF OF THE ESMO GUIDELINES WORKING GROUP, 2014. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 1 septembre 2014. Vol. 25, n° suppl 3, pp. iii93-iii101. DOI 10.1093/annonc/mdu050.

STUPP, Roger, MASON, Warren P., VAN DEN BENT, Martin J., WELLER, Michael, FISHER, Barbara, TAPHOORN, Martin JB, BELANGER, Karl, BRANDES, Alba A., MAROSI, Christine, BOGDAHN, Ulrich et OTHERS, 2005a. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005. Vol. 352, n° 10, pp. 987–996. Times cited: 3

STUPP, Roger, MASON, Warren P., VAN DEN BENT, Martin J., WELLER, Michael, FISHER, Barbara, TAPHOORN, Martin JB, BELANGER, Karl, BRANDES, Alba A., MAROSI, Christine, BOGDAHN, Ulrich et OTHERS, 2005b. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005. Vol. 352, n° 10, pp. 987–996.

STYLLI, Stanley S., LUWOR, Rodney B., WARE, Thomas M.B., TAN, Fiona et KAYE, Andrew H., 2015. Mouse models of glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*. avril 2015. Vol. 22, n° 4, pp. 619-626.

SULMAN, Erik P., ISMAILA, Nofisat, ARMSTRONG, Terri S., TSIEN, Christina, BATCHELOR, Tracy T., CLOUGHESY, Tim, GALANIS, Evanthia, GILBERT, Mark, GONDI, Vinai, LOVELY, Mary et OTHERS, 2016. Radiation Therapy for Glioblastoma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2016. pp. JCO–2016.

SUMMERS, H. D., REES, P., WANG, J. T-W. et AL-JAMAL, K. T., 2017. Spatially-resolved profiling of carbon nanotube uptake across cell lines. *Nanoscale*. 2017. Vol. 9, n° 20, pp. 6800-6807. DOI 10.1039/C7NR01561E.

TAGHAVI, Sahar, NIA, Azadeh Hashem, ABNOUS, Khalil et RAMEZANI, Mohammad, 2017. Polyethylenimine-functionalized carbon nanotubes tagged with AS1411 aptamer for combination gene and drug delivery into human gastric cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*. janvier 2017. Vol. 516, n° 1-2, pp. 301-312. DOI 10.1016/j.ijpharm.2016.11.027.

THOMAS, Rachael, DUKE, Shannon E., WANG, Huixia J., BREEN, Tessa E., HIGGINS, Robert J., LINDER, Keith E., ELLIS, Peter, LANGFORD, Cordelia F., DICKINSON, Peter J., OLBY, Natasha J. et BREEN, Matthew, 2009. 'Putting our heads together': insights into genomic conservation between human and canine intracranial tumors. *Journal of Neuro-Oncology*. septembre 2009. Vol. 94, n° 3, pp. 333-349. DOI 10.1007/s11060-009-9877-5.

TRIEBEL, Kristen L., MARTIN, Roy C., NABORS, Louis B. et MARSON, Daniel C., 2009. Medical decision-making capacity in patients with malignant glioma. *Neurology*. 2009. Vol. 73, n° 24, pp. 2086–2092.

TRUVÉ, Katarina, DICKINSON, Peter, XIONG, Anqi, YORK, Daniel, JAYASHANKAR, Kartika, PIELBERG, Gerli, KOLTOOKIAN, Michele, MURÉN, Eva, FUXELIUS, Hans-Henrik, WEISHAUPT, Holger, SWARTLING, Fredrik J., ANDERSSON, Göran, HEDHAMMAR, Åke, BONGCAM-RUDLOFF, Erik, FORSBERG-NILSSON, Karin, BANNASCH, Danika et LINDBLAD-TOH, Kerstin, 2016. Utilizing the Dog Genome in the Search for Novel Candidate Genes Involved in Glioma Development—Genome Wide Association Mapping followed by Targeted Massive Parallel Sequencing Identifies a Strongly Associated Locus. HUNTER, Kent W. (éd.), *PLOS Genetics*. 12 mai 2016. Vol. 12, n° 5, pp. e1006000. DOI 10.1371/journal.pgen.1006000.

VAN DIJKEN, Bart R. J., VAN LAAR, Peter Jan, HOLTMAN, Gea A. et VAN DER HOORN, Anouk, 2017. Diagnostic accuracy of magnetic resonance imaging techniques for treatment response evaluation in patients with high-grade glioma, a systematic review and meta-analysis. *European Radiology*. octobre 2017. Vol. 27, n° 10, pp. 4129-4144. DOI 10.1007/s00330-017-4789-9.

VILLANO, J. Lee, SEERY, Tara E. et BRESSLER, Linda R., 2009. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. septembre 2009. Vol. 64, n° 4, pp. 647-655.

VONHOLDT, Bridgett M., POLLINGER, John P., LOHMUELLER, Kirk E., HAN, Eunjung, PARKER, Heidi G., QUIGNON, Pascale, DEGENHARDT, Jeremiah D., BOYKO, Adam R., EARL, Dent A., AUTON, Adam, REYNOLDS, Andy, BRYC, Kasia, BRISBIN, Abra, KNOWLES, James C., MOSHER, Dana S., SPADY, Tyrone C., ELKAHLOUN, Abdel, GEFFEN, Eli, PILOT, Malgorzata, JEDRZEJEWSKI, Wlodzimierz, GRECO, Claudia, RANDI, Ettore, BANNASCH, Danika, WILTON, Alan, SHEARMAN, Jeremy, MUSIANI, Marco, CARGILL, Michelle, JONES, Paul G., QIAN, Zuwei, HUANG, Wei, DING, Zhao-Li, ZHANG, Ya-ping, BUSTAMANTE, Carlos D., OSTRANDER, Elaine A., NOVEMBRE, John et WAYNE, Robert K., 2010. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature*. avril 2010. Vol. 464, n° 7290, pp. 898-902. DOI 10.1038/nature08837.

WANG, Chung-Hao, CHIOU, Shih-Hwa, CHOU, Chen-Pin, CHEN, Yu-Chih, HUANG, Yao-Jhang et PENG, Ching-An, 2011. Photothermolysis of glioblastoma stem-like cells targeted by carbon nanotubes conjugated with CD133 monoclonal antibody. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. février 2011. Vol. 7, n° 1, pp. 69-79. DOI 10.1016/j.nano.2010.06.010.

WANG, Min Wei, WANG, Jian et QU, Jia Wei, 2011. Study on the Chemical Modification of the Walls of Carbon Nanotubes by $K_2Cr_2O_7$ and HNO_3. *Advanced Materials Research*. février 2011. Vol. 197-198, pp. 571-574. DOI 10.4028/www.scientific.net/AMR.197-198.571.

WELLER, Michael, BUTOWSKI, Nicholas, TRAN, David D., RECHT, Lawrence D., LIM, Michael, HIRTE, Hal, ASHBY, Lynn, MECHTLER, Laszlo, GOLDLUST, Samuel A., IWAMOTO, Fabio, DRAPPATZ, Jan, O'ROURKE, Donald M., WONG, Mark, HAMILTON, Mark G., FINOCCHIARO, Gaetano, PERRY, James, WICK, Wolfgang, GREEN, Jennifer, HE, Yi, TURNER, Christopher D., YELLIN, Michael J., KELER, Tibor, DAVIS, Thomas A., STUPP, Roger, SAMPSON, John H. et ACT IV TRIAL INVESTIGATORS, 2017. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. 2017. Vol. 18, n° 10, pp. 1373-1385. DOI 10.1016/S1470-2045(17)30517-X.

WEPASNICK, Kevin A., SMITH, Billy A., BITTER, Julie L. et HOWARD FAIRBROTHER, D., 2010. Chemical and structural characterization of carbon nanotube surfaces. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. février 2010. Vol. 396, n° 3, pp. 1003-1014. DOI 10.1007/s00216-009-3332-5.

WESTPHAL, Manfred, HILT, Dana C., BORTEY, Enoch, DELAVAULT, Patrick, OLIVARES, Robert, WARNKE, Peter C., WHITTLE, Ian R., JÄÄSKELÄINEN, Juha et RAM, Zvi, 2003. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology*. 2003. Vol. 5, n° 2, pp. 79–88.

WILSON, Robert J., THOMAS, Chris D., FOX, Richard, ROY, David B. et KUNIN, William E., 2004. Spatial patterns in species distributions reveal biodiversity change. *Nature*. 18 novembre 2004. Vol. 432, n° 7015, pp. 393-396. DOI 10.1038/nature03031.

WONG, Bin Sheng, YOONG, Sia Lee, JAGUSIAK, Anna, PANCZYK, Tomasz, HO, Han Kiat, ANG, Wee Han et PASTORIN, Giorgia, 2013. Carbon nanotubes for delivery of small molecule drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. décembre 2013. Vol. 65, n° 15, pp. 1964-2015. DOI 10.1016/j.addr.2013.08.005.

WRENSCH, Margaret, LEE, Marion, MIIKE, Rei, NEWMAN, Beth, BARGAR, Geoffrey, DAVIS, Richard, WIENCKE, John et NEUHAUS, John, 1997. Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma

and controls. *American Journal of Epidemiology*. 1997. Vol. 145, n° 7, pp. 581–593.

YANG, Kai et LIU, Zhuang, 2012. In Vivo Biodistribution, Pharmacokinetics, and Toxicology of Carbon Nanotubes. *Current Drug Metabolism*. 1 septembre 2012. Vol. 13, n° 8, pp. 1057-1067. DOI 10.2174/138920012802850029.

YORK, D., HIGGINS, R. J., LECOUTEUR, R. A., WOLFE, A. N., GRAHN, R., OLBY, N., CAMPBELL, M. et DICKINSON, P. J., 2012. *TP53* Mutations in Canine Brain Tumors. *Veterinary Pathology*. septembre 2012. Vol. 49, n° 5, pp. 796-801. DOI 10.1177/0300985811424734.

YORK, D., SPROUL, C. D., CHIKERE, N., DICKINSON, P. J. et ANGELASTRO, J. M., 2018. Expression and targeting of transcription factor ATF5 in dog gliomas: ATF5 glioma. *Veterinary and Comparative Oncology*. mars 2018. Vol. 16, n° 1, pp. 102-107. DOI 10.1111/vco.12317.

YOUNG, Richard M., JAMSHIDI, Aria, DAVIS, Gregory et SHERMAN, Jonathan H., 2015. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of translational medicine*. 2015. Vol. 3, n° 9.

ZANGARI, M., FINK, L. M., ELICE, F., ZHAN, F., ADCOCK, D. M. et TRICOT, G. J., 2009. Thrombotic Events in Patients With Cancer Receiving Antiangiogenesis Agents. *Journal of Clinical Oncology*. 10 octobre 2009. Vol. 27, n° 29, pp. 4865-4873.

ZHANG, H., LIU, N., GAO, S., HU, X., ZHAO, W., TAO, R., CHEN, Z., ZHENG, J., SUN, X., XU, L., LI, W., YU, J. et YUAN, S., 2016. Can an 18F-ALF-NOTA-PRGD2 PET/CT Scan Predict Treatment Sensitivity to Concurrent Chemoradiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma? *Journal of Nuclear Medicine*. 1 avril 2016. Vol. 57, n° 4, pp. 524-529. DOI 10.2967/jnumed.115.165514.

ZHANG, Leying, ALIZADEH, Darya, VAN HANDEL, Michelle, KORTYLEWSKI, Marcin, YU, Hua et BADIE, Behnam, 2009. Stat3 inhibition activates tumor macrophages and abrogates glioma growth in mice. *Glia*. octobre 2009. Vol. 57, n° 13, pp. 1458-1467. DOI 10.1002/glia.20863.

ZHANG, X. X., DENG, C. F., XU, R. et WANG, D. Z., 2007. Oxidation resistance of multi-walled carbon nanotubes purified with sulfuric and nitric acids. *Journal of Materials Science*. octobre 2007. Vol. 42, n° 19, pp. 8377-8380. DOI 10.1007/s10853-007-1941-y.

ZHANG, Zhao-yang et XU, Xue-cheng, 2015. Nondestructive covalent functionalization of carbon nanotubes by selective oxidation of the original defects with K2FeO4. *Applied Surface Science*. août 2015. Vol. 346, pp. 520-527. DOI 10.1016/j.apsusc.2015.04.026.

ZHAO, Jiuda, DU, Feng, LUO, Yang, SHEN, Guoshuang, ZHENG, Fangchao et XU, Binghe, 2015. The emerging role of hypoxia-inducible factor-2 involved in chemo/radioresistance in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*. juillet 2015. Vol. 41, n° 7, pp. 623-633. DOI 10.1016/j.ctrv.2015.05.004.

Auteur : Benjamin Cartiaux **Soutenance : 17 Décembre 2020**

Étude de l'effet radiosensibilisant de nanotubes de carbone dans le modèle de glioblastome canin spontané, en vue d'un développement chez l'Homme.

Mots clés : nanotube, glioblastome, modèle canin, radiothérapie

Les gliomes représentent les tumeurs primaires les plus fréquentes du système nerveux central avec le pronostic le plus mauvais, malgré une prise en charge précoce associée à un traitement agressif et multimodal. De nouvelles thérapies sont donc à l'étude afin d'améliorer la médiane de survie des patients. Parmi ces pistes de recherche, l'optimisation de la radiothérapie (RT) du glioblastome (GBM) est un enjeu majeur. Dans ce contexte, l'utilisation de nanotubes de carbone (NTC) est prometteuse : en plus d'être potentiellement radio-sensibilisants, les NTC contenant du gadolinium (Gd) peuvent aider à mieux délimiter le volume cible tumoral en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Contrairement au modèle d'étude actuel qu'est la souris avec un certain nombre de limites, le chien est un modèle particulièrement adapté car il peut spontanément développer un GBM d'une taille suffisante pour utiliser le même matériel de RT et d'imagerie qu'en médecine humaine, facilitant ainsi la transposition directe des méthodes.

Cette étude vise donc à valider la pertinence de modèles cellulaires de GBM canins en radio-oncologie comparée en caractérisant 5 lignées cellulaires de gliome canin et à évaluer la capacité des NTC à radio-sensibiliser des lignées de GBM canins.

L'étude de ces 5 lignées cellulaires canines a montré de nombreuses analogies entre le chien et l'homme. La morphologie des cellules est identique, de même que le temps de doublement, le test de clonalité et le caryotype. L'étude immunohistochimique des protéines de surface, sur les lignées cellulaires et après injection stéréotaxique sur des souris révèle aussi une similarité étroite. Les cellules gliales canines et humaines ont un profil de radiosensibilité similaire. La pénétration des NTC au sein des cellules tumorales a pu être mis en évidence à l'aide de la microscopie bi-photonique. Des études complémentaires sont nécessaires pour démontrer un effet radiosensibilisant des NTC. L'excitation laser des NTC lors de l'observation au microscope bi-photonique a montré un effet photothermique intéressant qui pourrait être approfondi au cours d'études ultérieures.

Le modèle canin et les nanotubes de carbone ont fourni des résultats intéressants, qui en font des éléments d'intérêt dans l'étude des gliomes.

Study of the radiosensitizing effect of carbon nanotubes in spontaneous canine glioblastoma model, with a view to development in humans.

Key words: nanotube, glioblastoma, canine model, radiation therapy

Despite several aggressive and multimodal treatments, gliomas represent the most frequent brain tumor with the worst prognostic associated. In order to enhance median survival, researchers are looking for optimization of radiotherapy (RT) for glioblastoma (GBM). In this context, the use of carbon nanotubes (CNTs) is promising: in addition to being potentially radio-sensitizing, CNTs containing gadolinium (Gd) can help to better define the tumor target volume in Magnetic Resonance Imaging (MRI). Unlike the current study model of the mouse with its number of limitations, dog is a particularly suitable model because it can spontaneously develop a GBM of sufficient size to use the same RT and imaging equipment as in human medicine, facilitating thus the direct transposition of methods.

This study therefore aims to validate the relevance of cell models of canine GBM in comparative radiation oncology by characterizing 5 cell lines of canine glioma and to assess the capacity of CNTs to radio-sensitize canine GBM lines.

Study of these 5 canine cell lines shows numerous analogies between dogs and humans. Cell morphology is identical, such as doubling time, clonality test and karyotype. Immunohistochemical study of surface proteins, directly on cell lines and after stereotaxic injection in mice also reveals close similarity. Radiosensitivity profile of glial cells between human and dog is alike. CNT penetration into tumor cells is demonstrated using two-photon microscopy. Therefore, further studies are needed to demonstrate a radiosensitizing effect of CNTs. Laser excitation of CNTs with bi-photon microscope showed an interesting photothermal effect which could be further explored in further studies.

The canine model and carbon nanotubes have provided interesting results which are elements of interest in the study of gliomas.