



HAL
open science

Characterization of focalized hypothermia effects on the central nervous system for brain pathologies treatment

Clémentine Fulbert

► **To cite this version:**

Clémentine Fulbert. Characterization of focalized hypothermia effects on the central nervous system for brain pathologies treatment. *Neurons and Cognition [q-bio.NC]*. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2021. English. NNT : 2021GRALS001 . tel-03271563

HAL Id: tel-03271563

<https://theses.hal.science/tel-03271563>

Submitted on 26 Jun 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS – Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Clémentine FULBERT

Thèse dirigée par **Stéphan CHABARDÈS**, Université Grenoble Alpes et co-encadrée par **David RATEL**, CEA LETI, Clnatec

préparée au sein du **Laboratoire CEA LETI, Clnatec**
dans l'**École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Caractérisation des effets de l'hypothermie focalisée sur le système nerveux central pour le traitement de pathologies cérébrales.

Characterization of focalized hypothermia effects on the central nervous system for brain pathologies treatment.

Thèse soutenue publiquement le **24 février 2021**,
devant le jury composé de :

Monsieur Stéphan CHABARDÈS

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

Monsieur Emmanuel GARCION

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM Délégation Grand Ouest, Rapporteur

Madame Aurélie TCHOHANDJIAN-AUPHAN

CHARGE DE RECHERCHE HDR, CNRS Délégation Provence et Corse,
Rapporteure

Madame Lucie KARAYAN-TAPON

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université de Poitiers, Examinatrice

Monsieur Gilles PERNOD

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS - PRATICIEN HOSPITALIER,
Université Grenoble Alpes, Président

Monsieur Didier WION

CHARGÉ DE RECHERCHE, INSERM Délégation Auvergne-Rhône-Alpes,
Examineur



Remerciements

Je voudrais d'abord remercier Mme Aurélie Tchoghandjian-Auphan et M. Emmanuel Garcion d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi que Mme Lucie Karayan-Tapon, M. Didier Wion et M. Gilles Pernod d'en être les examinateurs. Merci d'avoir passé du temps et de vous être investis dans ce travail, j'ai trouvé les discussions particulièrement enrichissantes et instructives après la soutenance !

Je tiens à remercier Stéphan pour m'avoir permis de réaliser cette thèse à Clinatec, et David qui a suivi mes travaux pendant ces trois dernières années, avec un regard bienveillant et des conseils tout au long de la thèse. Merci à Christophe pour les conseils pratiques et les coups de main au labo, je suis arrivée en ne connaissant rien à la culture cell et tu m'as permis de devenir une semi-pro ! Merci également à Benoit pour ton aide sur les Western et tes conseils pertinents. Je tiens à remercier particulièrement Jenny, pour tous tes conseils et ta patience, merci de m'avoir accordé du temps même quand tu avais les mains dans le cryostat, et de m'avoir aidée dans cette galère qu'a été *l'ex vivo*. Enfin, un grand merci à Claude pour ton implication sur le projet et ta persévérance malgré certains rebondissements, qui ont permis au brevet d'enfin aboutir après 2 ans de réflexion.

Merci à tous ceux de Clinatec qui ont de près ou de loin participé à mon épanouissement tant personnel que professionnel pendant ces trois dernières années : papa Sélimen, Sarah dont le rire manque terriblement dans l'open space, Maud, Alice et Aurélien qui nous ont donné un super exemple de grand thésards ;), Quentin dont je garde un prototype ballon souvenir, Félix pour ta patience à nous supporter râler dans le carré, Julie pour ta bonne humeur contagieuse et Hugo pour tes « saluuuuut » (promis un jour j'aurais la voix assez aigue), merci à tous ceux qui font partie de la « Jeunesse de Clinatec », à Matthieu, Antoine, Christelle et tous ceux du R2 ! Merci à Lucrezia de m'avoir aidée dans toutes mes galères de commandes, Ricardo et Anna pour votre bonne humeur, Bénédicte pour les démarches administratives, ainsi que Vincente sans qui Clinatec ne sera plus jamais pareil. Merci à ceux du CEA qui ont égayé nos midis et nos week-ends, Marie, Akash et Ivanie ! Merci à Coline qui a été dans la team carré dès le début, merci pour tous ces débats et ces moments à râler, tu nous maaaaanques (promis Cruella aime les animaux). Merci à tous les stagiaires qui ont permis d'égayé cette période : Maxime, Tamara, Quentin et Alex.

Guillaume, je te revois encore danser à ton bureau et nous faire mourir de rire, merci d'avoir été un soutien (et un frère capillaire) pendant plusieurs mois :P. Lucas, même si j'ai parfois râlé pour vos discussions mangas, merci beaucoup d'avoir été là et vivement les prochaines sessions ski. Tu es un des seuls à avoir pu entrer dans le carré, c'est une immense preuve d'affection de la part des deux ours :P. Thanks to Maciej for joining us among the PhD students and for showing us something else about Poland than vodka (see our first discussion ;)).

Vincent, tu es entré dans le thésard crew avec de belles chaussettes (qu'on a su compléter par la suite) et tes notes sur ta main / post-it. Merci pour ton humour sans filtre, ton soutien et m'avoir fait rire pendant ces deux dernières années. En étant planchiste tu ne pouvais qu'être quelqu'un de bien ;) . Bon courage pour la dernière ligne droite !

Gaël, on a commencé en même temps à Clinatec en se connaissant de loin, et ça aura été une excellente découverte ! Mes trajets sont bien moins rigolos depuis que je ne passe plus te chercher ☹. Merci d'être toujours prévenant et d'avoir été là, ces 3 ans n'auraient pas été les mêmes sans toi ! <3 sur les TotallySpies. Marion, il nous aura fallu un peu de temps pour nous apprécier à ce point (même si j'ai adoré tes cookies choco-banane dès le début), mais je remercie mille fois Expleo de t'avoir permis de rester davantage... Tu fais à présent partie de mes plus proches amies, et je sais que les prochaines années nous réservent pleins de belles choses, à commencer par août 2021... Merci pour ton infinie bienveillance, ta présence et tes attentions précieuses, merci pour ces nuits de discussions inépuisables (désolée Cyrille 0:)) et merci pour ta confiance. Merci d'avoir été là le jour J, et n'oublie jamais que tu es la meilleure et que ta thèse sera géniale ! Moly, 3 ans dos à dos c'était quelque chose... Je pense qu'on a épuisé le quota de râlage et de débats inutiles qui n'animent que nous. Merci d'avoir été toujours présent et de m'avoir soutenue tout au long de cette épopée qu'on a traversée ensemble, merci d'avoir attendu quand je sortais h24 en retard de manips (oupsi)! Je garde en souvenir un stock de post-it trop chous <3. Et félicitations à toi que je peux maintenant appeler DOCTEUR MOLYYYYYYYYYYYYY.

Merci également à tous ceux qui ont été là dans la vie perso pendant ces 3 ans. Mes fidèles voironnaises, Adeline, Pernelle, Mathilda, Léa, Fleur, Adèle et Déborah, vous n'avez pas directement participé à ce travail mais vous savoir dans ma vie est précieux. Merci pour vos encouragements et votre présence le jour J <3. Merci à Marinou qui fait un peu partie de la famille. Peut-être qu'un jour on se retrouvera à bosser ensemble, qui sait ?

Merci à mon Léouuuu, j'aimerais rechanter tous les jours Sean de Paul avec toi en mangeant des Baiocchi... Je t'aime fort et je sais que tu seras toujours là, merci d'avoir assisté à la soutenance entre tes gardes <3 !

Merci à la team Phelma de continuer à être là après plusieurs années. A mes compagnons de thèse de Phelma : Yanis qui est toujours présent malgré la distance et le décalage horaire (coucou les choses amples), Théo pour nos échanges pleins d'optimisme sur l'avenir de la recherche :P et Tim (on va enfin pouvoir aller se boire ce fameux verrrrre !), force à vous pour la fiiiin ! Merci à Krammer qui a été un super parrain jusque dans la thèse au CEA, tu m'as parfaitement montré la voie et nos rares midis étaient vraiment cool ! Merci également à Juliette, Manon, Ronan, Arnaud et Laurène (coucou le saucisson de la NAT) et Vincent (j'ai presque réussi à te convaincre de rejoindre l'aventure :P).

Julie, Mona, Marielle, Emma : merci pour ces week-ends aux quatre coins de la France qui m'ont permis de décompresser, rire, parler, jouer et danser ! Marie, j'aurai tant aimé te retrouver à San Diego cette année mais la covid a bousculé nos plans... Heureusement, on devrait très prochainement te rendre visite pour une excellente raison ;) . Merci à toutes pour votre soutien le jour J et jusqu'au bout <3.

Merci à Romain pour les week-ends partagés et ta présence (team lapinou/pandou), à défaut de faire la réouverture tant attendue de l'esclave, on pourra maintenant sortir au Vieux Manoir ;) . Merci à Pierre pour ton soutien, ta bonne humeur et pour m'avoir changé les idées sur la dernière ligne droite. J'aurais bien galéré avec Antidote mais c'est l'intention qui compte :P ! Hâte d'enfin réussir à se faire une session ski, et de réunir à nouveau la team hérisson – mouette – salamandre (cœur sur Pierrelo, j'attends toujours une raclette sans covid ;)), avec un peu plus de cocktails et moins de rando svp !

Merci à la Secte: Auré, Bastien, Gabi, Hugo, Lolo, Matou, Michou, Oks, Pierre, Romain, Théa, Théo et Tiphaine. Nos nouvel-an, nos week-ends et nos skypes sont toujours aussi précieux à l'approche des 10 ans ! Auré (Bestouille) et Loïc (le tréma pour éviter tout risque de Loake), vous avez ouvert la voie des soutenances, merci pour ce bel exemple qui a été difficile à égaler ;) . Merci à Tiphaine et Théa pour nos week-ends un peu partout, et à Matou pour ces moments et aussi pour me faire devenir une pro des word/whatsapp qui sont si précieux <3. Votre présence le jour J et les jours qui ont suivi m'a infiniment touchée, on en retiendra le ski de rando, le fenouil sur la plancha et les paris sur annonces ;) .

Merci à tous ceux qui entourent Julien et se sont intéressés à ce travail pendant 3 ans. Merci à Michèle, Jean-Louis et Claire de m'avoir accueillie à bras ouverts et de s'être inquiétés du bon déroulement de la thèse, surtout ces derniers mois ! Merci à Thérèse, Paulette et Annie pour votre douceur et vos pensées. Merci à Solène et Flo, à Greg (dont je suis un peu jalouse parfois :P), et à RATAJ <3.

Enfin, merci à ma famille d'avoir essayé de comprendre ce qu'était tout ça même si c'était flou ! Merci à ma Gwen qui est une amie très précieuse, et bien plus qu'une cousine. J'espère un jour pouvoir te battre en guilis : peut-être que la thèse m'a fait progresser, qui sait ? Merci à Papi et Mamie de vous être intéressés à ce que je faisais alors que vous n'y connaissiez pas grand-chose, je suis tellement heureuse de vous avoir rendus fiers ce jour-là, et d'être le 2^{ème} docteur de la famille Fulbert ! Merci à tous mes oncles, tantes, cousins et cousines, notamment Manon, tata Audrey, tonton Cédric et mon Nono qui m'ont accompagnée le jour J, j'ai hâte de tous vous retrouver. Merci à ceux qui veillent sur moi.

Je finirai bien sûr par les plus importants. Merci à vous quatre. Je n'ai pas de mots pour exprimer la gratitude que j'ai pour tout ce que vous avez fait. Votre soutien, votre écoute, vos conseils sont les plus précieux, cette thèse est aussi largement la vôtre. J'espère vous rendre toujours fiers. Hâte qu'on continue de passer un milliard de moments ensemble à la Semi-Croustillane (lieu privilégié de rebondissements) et chez nous.

Merci puissance dix milliards à Benou pour tes relectures et tes conseils si pertinents, tu m'impressionnes toujours un peu plus ! Je crois qu'on se ressemble de plus en plus ;) . Tu sais que mon amour est sans conditions <3. Merci à Julie et Maya de te rendre heureux, c'est le plus important.

Merci à ma Flaflou, ton soutien indéfectible a été d'une importance capitale. Si j'ai confiance en moi c'est aussi grâce à toi, merci pour le regard que tu portes sur ta grande sœur et qui ne change pas <3. Je vais profiter de ces quelques années ou je serai l'unique Docteur Fulbert avant d'être dépassée par l'élève. Je suis la plus heureuse d'habiter à côté de toi, peut-être qu'on deviendra un jour de grandes joggeuses, ou de grandes psychologues :P Coucou au Ed qui m'a toujours pas cuisiné de falafels, aime dés aire.

Merci à ma Mamoune d'être présente à chaque instant dans tous les aspects de ma vie. Je pense que tu as pris cette thèse plus à cœur que moi par moments, désolée pour les quelques montagnes russes :P. Je suis heureuse de te rendre fière et je sais que tu seras toujours là. Merci pour les jolis ballons, pour ta présence, ta bienveillance, ton inquiétude, tes attentions, tes bons petits plats... Par contre maintenant c'est le moment de profiter avant d'avoir trop de bébous à garder !

Merci à mon Papou d'être toujours là, on n'aura pas réussi à beaucoup manger ensemble à H3 mais c'était trop bien de t'y voir. J'espère re-rentre un jour au CEA pour partager ça avec toi, mais sinon je me lèverai sans trop trop râler pour le marché et les trompettes ! Si Julien te ressemble tant, c'est peut-être que je t'admire un peu <3.

Merci à tous les quatre d'avoir été là le jour J, ça m'a tellement portée... On est la Semi-Croustillane et rien ne pourra jamais nous enlever ça <3.

J'ai gardé le meilleur pour la fin, merci à mon Juju qui a entendu parler de cette thèse tous les jours depuis trois ans (et c'est peu dire !). Tu m'as toujours encouragée et soutenue, je sais que tu crois en moi et c'est précieux. Merci de m'avoir apaisée si souvent, merci pour ces discussions si intéressantes, merci de me faire rire comme personne d'autre (grosse tête de pioche), de m'apprendre à relativiser et à faire preuve de patience... J'ai hâte de passer un milliard de moments avec toi, de pouvoir à nouveau voyager, manger au resto et admirer tes pas de danse (Woop woop !). Je sais que tu seras toujours là et je n'ai plus peur des dimanches soirs. Merci d'être dans ma vie, je t'aime infiniment.

Table des matières

Remerciements	1
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	13
Abréviations	15
Avant-propos.....	17
Chapitre I	21
Tumeurs cérébrales.....	21
I.1. Rappels et définitions.....	23
I.1.a. Le cerveau.....	23
I.1.b. Le cancer.....	25
I.1.c. Les tumeurs du système nerveux central	27
I.2. Glioblastome	29
I.2.a. Généralités	29
I.2.b. Diagnostic.....	34
I.2.c. Traitement standard.....	36
I.3. Nouvelles thérapies pour le glioblastome.....	40
I.3.a. Amélioration des traitements existants	40
I.3.b. Immunothérapie	42
I.3.c. Thérapie ciblée	44
I.3.d. Thérapie physique	45
I.4. Impasse thérapeutique	47
I.4.a. Récidive tumorale.....	47
I.4.b. Facteurs de la récidive.....	47
I.4.c. Mécanismes de résistance aux traitements	49
I.4.d. Solutions thérapeutiques	51
Chapitre II	57
Hypothermie thérapeutique	57
II.1. Généralités	59
II.1.a. Définitions	59
II.1.b. Historique.....	60
II.2. Méthodes de refroidissement.....	63
II.2.a. Processus de refroidissement	63
II.2.b. Refroidissement systémique	65
II.2.c. Refroidissement sélectif	70
II.2.d. Méthodes pharmacologiques	73

II.2.e. Effets indésirables	76
II.3. Mécanismes d'action.....	78
II.3.a. Physiologie.....	78
II.3.b. Système immunitaire et inflammation	79
II.3.c. Activité neurologique	81
II.3.d. Cytoprotection	83
II.3.e. Protéines de choc froid	84
Chapitre III	89
Applications médicales de l'hypothermie	89
III.1. Généralités	91
III.2. Recommandations officielles	91
III.2.a. Arrêt cardiaque.....	91
III.2.b. Encéphalopathie néonatale	92
III.3. Applications envisagées	93
III.3.a. Lésion médullaire	93
III.3.b. Insuffisance hépatique aigüe	93
III.3.c. Accident vasculaire cérébral.....	94
III.3.d. Traumatisme crânien	94
III.3.e. Infarctus du myocarde	95
III.3.f. Méningite	96
III.4. Épilepsie.....	97
III.4.a. Généralités	97
III.4.b. Traitements actuels.....	97
III.4.c. Refroidissement localisé	97
III.4.d. Projet EpiCOOL	100
III.5. Cancer.....	101
III.5.a. Modification du développement tumoral	101
III.5.b. Altération de certains mécanismes.....	104
III.5.c. Combinaison avec d'autres thérapies	107
Chapitre IV	113
Effets de l'hypothermie sur des cellules de glioblastome.....	113
IV.1. Méthode générale.....	115
IV.1.a. Matériel biologique	115
IV.1.b. Maintien de la culture	117
IV.1.c. Analyse statistique	117
IV.2. Étude de la prolifération cellulaire.....	118

IV.2.a. Méthode générale.....	118
IV.2.b. Comparaison de différents niveaux d'hypothermie	119
IV.2.c. Évolution des effets de l'hypothermie au cours du temps	121
IV.3. Étude des mécanismes cellulaires.....	125
IV.3.a. Morphologie.....	125
IV.3.b. Cycle cellulaire	127
IV.4. Étude de la migration	131
IV.4.a. Migration non-orientée.....	131
IV.4.b. Migration orientée	137
IV.5. Étude de différents cycles d'hypothermie	139
IV.5.a. Méthode générale.....	139
IV.5.b. Température du préconditionnement hypothermique.....	141
IV.5.c. Durée du préconditionnement hypothermique.....	144
IV.5.d. Reprise de la prolifération après 30 jours d'hypothermie.....	147
IV.5.e. Différents cycles d'hypothermie intermittente	152
IV.6. Thérapie adjuvante	155
IV.6.a. Expériences préliminaires	155
IV.6.b. Comparaison avec le témozolomide.....	156
IV.6.c. Combinaison avec le témozolomide	158
Chapitre V.....	163
Effets de l'hypothermie sur des cellules saines	163
V.1. Astrocytes humains.....	165
V.1.a. Méthode générale.....	165
V.1.b. Étude de la prolifération	166
V.2. Neurones primaires de souris	173
V.2.a. Méthode générale.....	173
Chapitre VI.....	177
Preuve de concept <i>ex vivo</i>	177
VI.1. Contexte	179
VI.2. Méthode.....	180
VI.2.a. Culture de lignées tumorales murines.....	180
VI.2.b. Culture <i>ex vivo</i> de cerveaux de souris.....	182
VI.3. Résultats.....	187
VI.3.a. Preuve de concept <i>ex vivo</i>	187
VI.3.b. Influence de l'hypothermie.....	189
VI.4. Discussion.....	194

Table des matières

VI.4.a. Mise au point du protocole.....	194
VI.4.b. Pistes d'amélioration	197
Chapitre VII.....	199
Dispositif implantable de refroidissement.....	199
VII.1. Contexte	201
VII.1.a. Résultats préliminaires.....	201
VII.1.b. Recherche d'antériorité	202
VII.2. Description du dispositif	204
VII.2.a. Positionnement thérapeutique.....	204
VII.2.b. Contraintes médicales.....	204
VII.2.c. Solutions proposées	205
Conclusion générale	211
Annexes	219
Bibliographie	225
Publications et communications	257

Liste des figures

Figure 1 : Systèmes nerveux central et périphérique	23
Figure 2 : Principaux composants de l'encéphale – cerveau, cervelet et tronc cérébral	23
Figure 3 : Différents moyens de protection du cerveau	23
Figure 4 : Fente synaptique et transmission chimique d'informations.....	24
Figure 5 : Étapes de formation d'une tumeur solide	25
Figure 6 : Nouveaux cas de cancers dans le monde en 2018.....	26
Figure 7 : Nombre de décès dus à un cancer dans le monde en 2018.....	26
Figure 8 : Classification OMS des gliomes	28
Figure 9 : Incidence des tumeurs malignes du système nerveux central	29
Figure 10 : Différents sous-types histologiques de glioblastome	31
Figure 11 : Incidence du glioblastome selon l'âge des patients.....	32
Figure 12 : Évolution de l'incidence du glioblastome en France depuis 1990	33
Figure 13 : Illustrations de différents examens d'imagerie de glioblastome	35
Figure 14 : Protocole de Stupp pour le traitement d'un glioblastome	36
Figure 15 : Survie globale de patients atteints de glioblastome traités par radiochimiothérapie	36
Figure 16 : Survie globale de patients atteints de glioblastome traités par témozolomide adjuvant..	40
Figure 17 : Survie globale de patients avec un glioblastome traités avec un vaccin	42
Figure 18 : Dispositif portatif Optune® permettant la délivrance de champs électriques alternatifs..	45
Figure 19 : Survie globale de patients avec un glioblastome traités par une addition de TTFields.....	46
Figure 20 : Images IRM montrant la récurrence locale d'un glioblastome dans les berges d'exérèse.....	47
Figure 21 : Survie globale de patients avec un glioblastome selon la méthylation du promoteur	50
Figure 22 : Survie globale de patients avec un glioblastome selon le statut de mutation de <i>TP53</i>	50
Figure 23 : Survie globale en fonction de l'étendue de la résection tumorale	51
Figure 24 : Survie globale de patients avec (rouge) ou sans (bleu) pembrolizumab néoadjuvant.....	53
Figure 25 : Évolution sous IRM du glioblastome d'un patient traité par cilengitide.....	54
Figure 26 : Survie globale de patients traités par témozolomide et ABT-414	55
Figure 27 : Hyperthermie, normothermie et différents niveaux d'hypothermie	59
Figure 28 : Papyrus Edwin Smith	60
Figure 29 : Dr. Temple Fay, pionnier de l'hypothermie thérapeutique	61
Figure 30 : Premiers instruments pour l'application d'un refroidissement localisé	61
Figure 31 : Dispositif de refroidissement pour le traitement des tumeurs cérébrales.....	62
Figure 32 : Influence de réchauffements rapide et lent sur le traitement d'une lésion.....	64
Figure 33 : Dispositif de refroidissement surfacique Arctic Sun®	66
Figure 34 : Dispositif de refroidissement de la cavité péritonéale	67
Figure 35 : Dispositif de refroidissement œsophagien ECD™	68
Figure 36 : Dispositif de refroidissement surfacique Sovika®	70
Figure 37 : Dispositif de refroidissement intranasal RhinoChill™	71
Figure 38 : Dispositif de refroidissement de l'œsophage et du pharynx	71
Figure 39 : Dispositifs implantables de refroidissement intracérébral	72
Figure 40 : Influence d'une induction physique ou pharmacologique d'hypothermie.....	74
Figure 41 : Influence d'un agent pharmacologique sur le volume d'infarctus	75
Figure 42 : Influence d'une hypothermie sévère sur l'activité électrique de neurones	77
Figure 43 : Aspect histologique de sections coronales après un refroidissement	77
Figure 44 : Influence de la température sur la consommation en oxygène du cerveau	78
Figure 45 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la phosphorylation de ERK ½	79
Figure 46 : Influence de l'hypothermie sur l'expression de cytokines inflammatoires	80

Figure 47 : Influence de l'hypothermie sur l'expression de chimiokines inflammatoires	80
Figure 48 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur l'activité électrique corticale	81
Figure 49 : Influence de la température cérébrale sur la libération de glutamate.....	82
Figure 50 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la production d'oxyde nitrique	84
Figure 51 : Influence d'une hypothermie légère sur l'expression de RBM3	85
Figure 52 : Influence de la durée d'une hypothermie légère sur l'expression de RBM3.....	85
Figure 53 : Influence d'une hypothermie légère sur l'expression de CIRBP	85
Figure 54 : Influence de la durée d'une hypothermie de 30°C sur l'expression de CIRBP.....	85
Figure 55 : Influence d'un retour à 37°C après un refroidissement à 25°C sur l'expression de RBM3.	86
Figure 56 : Influence d'un retour à 37°C après un refroidissement à 25°C sur l'expression de CIRBP .	86
Figure 57 : Influence de la déficience en RBM3 sur l'apoptose cellulaire.....	86
Figure 58 : Influence de la déficience en CIRBP sur l'apoptose cellulaire.....	86
Figure 59 : Influence du refroidissement sur l'expression de RTN3	88
Figure 60 : Influence de la surexpression de RTN3 sur la survie	88
Figure 61 : Niveaux de preuve des effets thérapeutiques de l'hypothermie	91
Figure 62 : Influence de l'hypothermie sur les déficits neurologiques après un arrêt cardiaque	92
Figure 63 : Influence de l'hypothermie sur la survie de patients après un arrêt cardiaque	92
Figure 64 : Influence d'une hypothermie de 33°C sur un œdème cérébral.....	93
Figure 65 : Influence de différents types d'hypothermie sur le volume de l'infarctus.....	94
Figure 66 : Influence d'une hypothermie de 30°C sur la zone de contusion post-traumatique.....	95
Figure 67 : Taux d'insuffisance cardiaque 45 jours après un infarctus du myocarde	95
Figure 68 : Mortalité à long terme après un infarctus du myocarde	96
Figure 69 : Influence de l'hypothermie sur la survie de patients avec une méningite bactérienne.....	96
Figure 70 : Influence de la position du dispositif de refroidissement sur la durée de crises	98
Figure 71 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la durée de crises d'épilepsie	99
Figure 72 : Amplitude des décharges épileptiques en fonction d'un refroidissement localisé	100
Figure 73 : Impact de différentes températures sur la prolifération de cellules.....	101
Figure 74 : Influence d'une hypothermie légère sur la migration orientée de cellules.....	103
Figure 75 : Volume de cellules de gliome de rat en fonction du niveau d'hypothermie.....	104
Figure 76 : Influence d'une hypothermie de 28°C sur la viabilité cellulaire selon le statut p53.....	105
Figure 77 : Effets de l'hypothermie sur le pourcentage de cellules apoptotiques	106
Figure 78 : Influence du retour à 37°C après une hypothermie de 25°C sur la mort de cellules.....	106
Figure 79 : Influence de la température sur les effets d'un agent anticancéreux	107
Figure 80 : Influence de la combinaison d'hypothermie et de chimiothérapie sur la survie.....	107
Figure 81 : Influence de la combinaison d'hypothermie et de radiothérapie sur la survie	108
Figure 82 : Influence de l'hypothermie sur la survie de rats traités par thérapie photodynamique..	109
Figure 83 : Influence du dispositif d'incubation sur la croissance cellulaire	116
Figure 84 : Différentes étapes d'un comptage cellulaire automatisé	118
Figure 85 : Photographie illustrant la pénétration du bleu de trypan dans des cellules mortes.....	118
Figure 86 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la prolifération cellulaire à 3 jours...	120
Figure 87 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la viabilité cellulaire à 3 jours	120
Figure 88 : Influence de l'hypothermie modérée sur la prolifération cellulaire au cours du temps ..	122
Figure 89 : Photographies de cellules de glioblastome au bout de 14, 21 et 28 jours à 28°C	123
Figure 90 : Influence de l'hypothermie modérée sur la viabilité cellulaire au cours du temps.....	124
Figure 91 : Influence d'une hypothermie de 28°C sur la prolifération cellulaire au cours du temps .	125
Figure 92 : Influence de l'hypothermie modérée sur la morphologie cellulaire.....	126
Figure 93 : Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux.....	127
Figure 94 : Phases du cycle cellulaire	127
Figure 95 : Évolution de la quantité d'ADN dans les cellules au cours du cycle	128

Figure 96 : Influence de l'hypothermie modérée sur les phases du cycle cellulaire	129
Figure 97 : Influence de l'hypothermie modérée sur la proportion de cellules dans chaque phase..	130
Figure 98 : Schéma de principe du test de migration cellulaire non-orientée.....	131
Figure 99 : Images microscopiques permettant d'illustrer un test de cicatrisation	132
Figure 100 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la recolonisation de lésions	133
Figure 101 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la migration cellulaire	134
Figure 102 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la recolonisation de lésions	135
Figure 103 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la migration cellulaire	136
Figure 104 : Schéma de principe du test de migration cellulaire orientée	137
Figure 105 : Influence de l'hypothermie modérée sur la migration des cellules.....	137
Figure 106 : Influence de l'hypothermie modérée sur la migration cellulaire orientée	138
Figure 107 : Schéma expérimental d'un réchauffement rapide ou lent	139
Figure 108 : Influence de deux vitesses de réchauffement sur la prolifération cellulaire	140
Figure 109 : Influence de deux vitesses de réchauffement sur la viabilité cellulaire	140
Figure 110 : Schéma expérimental – Préconditionnement hypothermique sévère et modéré	141
Figure 111 : Influence de la température d'un preconditionnement hypothermique de 3 jours	142
Figure 112 : Influence de la température d'un preconditionnement hypothermique de 3 jours	142
Figure 113 : Influence de la température d'un preconditionnement hypothermique de 6 jours	143
Figure 114 : Influence de la température d'un preconditionnement hypothermique de 6 jours	144
Figure 115 : Schéma expérimental – Durée du preconditionnement hypothermique à 28°C	144
Figure 116 : Influence de la durée d'un preconditionnement hypothermique de 28°C.....	145
Figure 117 : Influence de la durée d'un preconditionnement hypothermique de 28°C.....	146
Figure 118 : Schéma expérimental – Reprise de la prolifération après 30 jours à 28°C.....	147
Figure 119 : Reprise de la prolifération cellulaire après un preconditionnement de 30 jours à 28°C	148
Figure 120 : Évolution de la viabilité cellulaire au fil des jours à 37°C après 30 jours à 28°C	149
Figure 121 : Observations en microscopie après 30 jours à 28°C.....	150
Figure 122 : Observations en microscopie après 30J à 28°C suivis de 8J à 37°C.....	150
Figure 123 : Observations en microscopie après 30J à 28°C suivis de 13J à 37°C.....	151
Figure 124 : Observations en microscopie après 30J à 28°C suivis de 20J à 37°C.....	152
Figure 125 : Schéma expérimental – Différents cycles d'intermittence	153
Figure 126 : Influence de la durée des cycles d'hypothermie intermittente sur la prolifération	153
Figure 127 : Influence de la durée des cycles d'hypothermie intermittente sur la viabilité cellulaire	154
Figure 128 : Effets du solvant DMSO et du TMZ sur la prolifération (A) et la viabilité cellulaire (B) ..	155
Figure 129 : Schéma expérimental – comparaison de l'hypothermie avec la chimiothérapie.....	156
Figure 130 : Effets de l'hypothermie modérée et de la chimiothérapie sur la prolifération	157
Figure 131 : Effets de l'hypothermie modérée et de la chimiothérapie sur la viabilité cellulaire	157
Figure 132 : Schéma expérimental – Combinaison de l'hypothermie avec la chimiothérapie.....	158
Figure 133 : Effets de la combinaison d'hypothermie avec la chimiothérapie sur la prolifération	159
Figure 134 : Influence de l'ajout de chimiothérapie à l'hypothermie sur la prolifération cellulaire ..	160
Figure 135 : Effets de la combinaison d'hypothermie avec la chimiothérapie sur la viabilité.....	160
Figure 136 : Schéma expérimental – Hypothermie modérée de 6 à 30 jours	166
Figure 137 : Influence de l'hypothermie modérée sur la prolifération astrocytaire	167
Figure 138 : Influence de l'hypothermie modérée sur la viabilité astrocytaire	167
Figure 139 : Schéma expérimental – Hypothermie continue ou intermittente de 6 jours.....	168
Figure 140 : Influence de l'hypothermie intermittente sur la prolifération astrocytaire	168
Figure 141 : Influence de l'hypothermie intermittente sur la viabilité astrocytaire	168
Figure 142 : Influence de différentes séquences d'hypothermie sur la morphologie astrocytaire....	169
Figure 143 : Influence de l'hypothermie sur la morphologie astrocytaire.....	170
Figure 144 : Influence d'une hypothermie modérée sur la recolonisation de lésions	171

Figure 145 : Influence d'une hypothermie modérée sur la migration astrocytaire.....	171
Figure 146 : Influence de la température de culture sur la croissance neuronale	175
Figure 147 : Influence de la température de culture sur la croissance neuronale	175
Figure 148 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la prolifération cellulaire à 3 jours. 181	181
Figure 149 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la prolifération cellulaire à 6 jours. 181	181
Figure 150 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la viabilité cellulaire	181
Figure 151 : Dispositif expérimental d'injection de cellules tumorales dans des cerveaux de souris 184	184
Figure 152 : Représentation schématique de l'injection intracérébrale de cellules tumorales	184
Figure 153 : Cerveau embryonnaire de souris maintenu en culture <i>ex vivo</i> à 37°C	187
Figure 154 : Cerveau de souris adulte maintenu pendant 3 jours (A) et 6 jours (B) en culture	187
Figure 155 : Coupe coronale de cerveau embryonnaire de souris après 6 jours de culture à 37°C... 187	187
Figure 156 : Cellules tumorales dans l'hémisphère gauche d'un cerveau embryonnaire de souris... 188	188
Figure 157 : Surface occupée par les cellules tumorales dans un cerveau embryonnaire de souris.. 188	188
Figure 158 : Évolution de deux masses tumorales situées en surface (A) et en profondeur (B)	188
Figure 159 : Invasion du parenchyme cérébral par des cellules tumorales.....	189
Figure 160 : Effets de l'hypothermie sur la vascularisation de cerveaux embryonnaires de souris... 189	189
Figure 161 : Effets de l'hypothermie sur la vascularisation de cerveaux de souris	189
Figure 162 : Influence de la température de culture sur la taille des cerveaux embryonnaires	190
Figure 163 : Influence de la température de culture sur le tissu cérébral d'embryons de souris	190
Figure 164 : Influence de l'hypothermie sur la progression de cellules tumorales	191
Figure 165 : Influence de la température de culture sur le volume de la masse tumorale	192
Figure 166 : Influence de l'hypothermie sur l'étendue des masses tumorales	192
Figure 167 : Cellules tumorales dans un cerveau de souris en fonction de la température	193
Figure 168 : Exemple de masse tumorale avec un grand nombre de cellules.....	197
Figure 169 : Exemple de masse tumorale difficile à dénombrer	197
Figure 170 : Exemple de masse tumorale avec un contour difficile à délimiter	197
Figure 171 : Dispositif de refroidissement uniforme du cerveau.....	202
Figure 172 : Dispositif de refroidissement ou réchauffement du liquide céphalo-rachidien	202
Figure 173 : Dispositif de traitement localisé d'une cavité d'exérèse	203
Figure 174 : Dispositif de régulation de pression dans une cavité cérébrale	203
Figure 175 : Prototype test d'un dispositif avec une circulation de fluide entre deux ballonnets	205
Figure 176 : Différents éléments constitutifs du dispositif implantable de refroidissement localisé 206	206
Figure 177 : Système de double ballonnet.....	206
Figure 178 : Paroi du ballonnet externe en vue de coupe	206
Figure 179 : Circulation du fluide dans le système de double ballonnet	206
Figure 180 : Etapes de thermoformage du ballonnet	207
Figure 181 : Dispositif de refroidissement avec un boîtier fixé sur la boîte crânienne	208
Figure 182 : Dispositif de refroidissement avec un boîtier encastré dans la boîte crânienne	209

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales altérations génétiques du glioblastome.....	30
Tableau 2 : Classification moléculaire du glioblastome	31
Tableau 3 : Méthodes de refroidissement systémique.....	69
Tableau 4 : Méthodes de refroidissement cérébral sélectif	73
Tableau 5 : Agents pharmacologiques inducteurs d'hypothermie	74
Tableau 6 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture cellulaire	115
Tableau 7 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture cellulaire	165
Tableau 8 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture primaire de neurones	173
Tableau 9 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture de cerveaux de souris	182
Tableau 10 : Contraintes médicales et solutions techniques proposées.....	209
Tableau 11 : Echelle de performance de Karnofsky.....	222
Tableau 12 : Echelle de performance de l'OMS	222
Tableau 13 : Supports et matériel utilisés pour la culture cellulaire	223

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de la variance (<i>analysis of variance</i>)
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BHE	Barrière hémato-encéphalique (<i>BBB, blood brain barrier</i>)
CAR T	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CIRBP	<i>Cold-inducible RNA-binding protein</i>
CSH	Hormone de choc froid (<i>cold-shock hormon</i>)
CSP	Protéine de choc froid (<i>cold-shock protein</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM	Milieu de Eagle modifié de Dulbecco (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EGF	Facteur de croissance épidermique (<i>epidermal growth factor</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FBS	Sérum de veau fœtal (<i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (<i>Food and Drug Administration</i>)
GBM	Glioblastome
HGF	Facteur de croissance des hépatocytes (<i>hepatocyte growth factor</i>)
HSP	Protéines de choc thermique (<i>heat shock proteins</i>)
ICD-O	Classification internationale des maladies pour l'oncologie (<i>International Classification of Diseases for Oncology</i>)
IDH	Isocitrate déshydrogénase
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
LCR	Liquide céphalo-rachidien, aussi appelé liquide cérébrospinal
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MGMT	6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NF	Neurofibromatose
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NO	Oxyde nitrique ou monoxyde d'azote (<i>nitric oxide</i>)
NOH	Non spécifié ailleurs (<i>not otherwise specified</i>)
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	Tampon phosphate salin (<i>phosphate buffered saline</i>)
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes (<i>platelet derived growth factor</i>)
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RBM3	<i>RNA-binding protein motif 3</i>
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase
RTN3	Réticulum 3
SEM	Erreur type de la moyenne (<i>standard error of the mean</i>)
SNC	Système nerveux central

Abréviations

TGF	Facteur de croissance transformant (<i>transforming growth factor</i>)
TMZ	Témozolomide
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale (<i>tumor necrosis factor</i>)
TP53	Protéine tumorale (<i>tumor protein</i>) 53
TRITC	Tétraméthylrhodamine isothiocyanate
TTFIELDS	Champs de traitement de la tumeur (<i>Tumor Treating Fields</i>)
TRPV	<i>Transient receptor potential vanilloid</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WT	Type sauvage (<i>wild type</i>)

Avant-propos

Le cancer est la deuxième cause de mortalité à travers le monde, et a entraîné 9,5 millions de décès en 2018 (International Agency for Research on Cancer, 2020). Dans ce manuscrit de thèse, nous nous intéressons aux tumeurs du système nerveux central (SNC), et plus particulièrement au glioblastome, un gliome de grade IV qui représente à lui seul 48,3% des tumeurs malignes du SNC (Ostrom et al., 2019). Ce type de tumeur particulièrement invasive est en constante augmentation, avec une incidence de 5,4 pour 100 000 habitants en France en 2018 (Pouchieu et al., 2019). La prise en charge thérapeutique des patients atteints de glioblastome est définie par le protocole de l'équipe de Stupp, et consiste en une exérèse chirurgicale suivie par l'administration de radiothérapie et de chimiothérapie concomitante et adjuvante (Stupp et al., 2005). Cependant, malgré l'ensemble des traitements, le pronostic vital des patients reste faible, avec une médiane de survie de 16 mois après le diagnostic (Stupp et al., 2017). Ce mauvais pronostic peut être expliqué par différents facteurs. D'abord, le glioblastome est une tumeur très invasive qui infiltre le tissu sain sur plusieurs centimètres, et les cellules tumorales résiduelles ainsi disséminées ne peuvent pas être retirées par la chirurgie. De plus, sa localisation intracrânienne ainsi que son hétérogénéité limitent l'efficacité des traitements. Certains mécanismes de résistance aux traitements ont également été observés, qu'ils soient liés à des caractéristiques génétiques propres à la tumeur primaire, ou qu'ils se développent à la suite des traitements de première intention. Ainsi, pour la majorité des patients, la tumeur récidive localement au niveau des berges d'exérèse dans les 9 mois suivant la chirurgie, avec une survie de 6 mois après cette progression (Stupp et al., 2012).

De nouvelles thérapies sont constamment développées, telles que l'ajout d'agents thérapeutiques supplémentaires au protocole de radiochimiothérapie standard (Herrlinger et al., 2019), l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'angiogenèse, ou encore la vaccination à base de cellules dendritiques (Batich et al., 2017; Liau et al., 2018). Une autre thérapie adjuvante prometteuse est l'utilisation de champs de traitement de la tumeur (TTFields, *tumor treating fields*), des champs électriques alternatifs entraînant l'apoptose des cellules tumorales (Stupp et al., 2017). Cependant, à ce jour, aucun protocole basé sur ces nouvelles thérapies n'a été approuvé à grande échelle pour le traitement des patients atteints de glioblastome, et il devient urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant d'améliorer la survie des patients.

L'hypothermie thérapeutique consiste à diminuer la température corporelle d'un patient en dessous de 36°C, et peut être administrée à un niveau léger (32 – 36°C), modéré (28°C – 32°C) ou sévère (<28°C) (Saigal et al., 2015). Depuis 2002, elle figure parmi les recommandations pour la prise en charge des patients après un arrêt cardiaque (Nolan et al., 2003), et a montré une amélioration de leurs résultats neurologiques ainsi que de leur survie (Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group, 2002). Elle est également recommandée pour la prise en charge des encéphalopathies hypoxiques ischémiques néonatales depuis 2010 (Richmond and Wyllie, 2010), et a permis de réduire les séquelles neurologiques de ces nouveau-nés (Gluckman et al., 2005). L'hypothermie est aussi étudiée pour ses effets neuroprotecteurs dans certaines pathologies cérébrales telles que les traumatismes crâniens (Chen et al., 2019; Dunkley and McLeod, 2017) et les accidents vasculaires cérébraux (Peng et al., 2016; Wu et al., 2018). De plus, plusieurs études *in vitro* menées sur des lignées cellulaires tumorales humaines ont montré l'intérêt thérapeutique de l'hypothermie pour le traitement de certains cancers. Ces études ont notamment démontré une inhibition de la prolifération cellulaire à 34°C (Kalamida et al., 2015) et un arrêt de celle-ci à 25°C (Neutelings et al., 2013), une diminution de la migration cellulaire à 35°C (X. Zhang et al., 2012), ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire à 28°C (Matijasevic, 2002). Ces résultats ont été obtenus à partir de lignées provenant de cancer du sein, du poumon, de la prostate ou encore de gliome et de leucémie, suggérant un effet global de l'hypothermie.

Concernant notre hypothèse de travail, nous proposons de mettre en dormance les cellules tumorales résiduelles grâce à l'hypothermie thérapeutique. L'objectif du traitement est davantage de normaliser le microenvironnement tumoral plutôt que de provoquer la mort des cellules par une approche lésionnelle, contrairement à la cryothérapie. En effet, l'état de dormance pourrait permettre de protéger les cellules tumorales de certains facteurs d'activation tels que le stress chirurgical ou l'inflammation associée (Du et al., 2013; Retsky et al., 2008; Wion et al., 2015). L'hypothermie nous paraît être une solution thérapeutique appropriée de par ses effets anti-inflammatoires, mais également parce qu'elle induit une diminution du métabolisme cellulaire, tant pour les cellules saines que les cellules cancéreuses, et qu'elle permet de réduire la prolifération de certaines cellules tumorales (Jackson and Kochanek, 2019; Wion et al., 2015).

En termes de positionnement, nous proposons un refroidissement localisé des berges d'exérèse après la résection chirurgicale de la tumeur, permettant de limiter les effets indésirables pouvant être associés à l'hypothermie généralisée. De plus, nous positionnons l'hypothermie comme une thérapie adjuvante, venant compléter les traitements actuellement mis en place dans le cadre du protocole de Stupp. Pour le refroidissement localisé, un dispositif implantable de refroidissement devra à terme être développé afin d'être implanté dans la cavité d'exérèse à la suite de la chirurgie. Plusieurs dispositifs de refroidissement intracrânien localisé ont déjà été envisagés pour arrêter les crises d'épilepsie (Fujii et al., 2010; Nomura et al., 2017, 2014), mais leur adaptation à la prise en charge du glioblastome est un véritable défi technologique, en raison de la nécessité de refroidir entièrement les berges d'une cavité. Avant d'envisager un tel traitement, il est nécessaire de définir les paramètres d'administration de l'hypothermie thérapeutique, et d'évaluer ses effets sur le tissu sain.

Ces travaux de thèse avaient pour objectif de réaliser une preuve de concept de l'effet anti-tumoral de l'hypothermie. Ce manuscrit est organisé en deux parties, une première introduisant l'utilisation de l'hypothermie pour le traitement du glioblastome, suivie par une seconde présentant les résultats obtenus.

Dans la première partie, le Chapitre I permet de préciser le contexte clinique et la problématique de la récurrence du glioblastome. Ensuite, le Chapitre II présente l'intérêt thérapeutique de l'hypothermie, notamment ses mécanismes d'actions et ses différents modes d'application. Enfin, le Chapitre III est dédié à ses applications médicales, avec une focalisation sur la cancérologie.

Dans la seconde partie, les principaux travaux effectués au cours de la thèse sont présentés suivant quatre chapitres indépendants. Au début de chaque chapitre, les différentes contributions apportées aux travaux ainsi que la valorisation scientifique des résultats sont précisées. Pour étudier le potentiel thérapeutique de l'hypothermie dans le traitement du glioblastome, les recherches ont été effectuées selon quatre axes principaux :

- la caractérisation des effets de l'hypothermie sur la croissance de cellules tumorales de glioblastome puis l'optimisation des paramètres d'administration thérapeutique (Chapitre IV),
- l'étude des effets de l'hypothermie sur des cellules saines, notamment des neurones primaires de souris et des astrocytes humains (Chapitre V),
- l'étude des effets de l'hypothermie sur la croissance de cellules tumorales dans des cerveaux embryonnaires de souris placés en culture à l'aide d'une preuve de concept *ex vivo* (Chapitre VI),
- la conception d'un dispositif implantable de refroidissement pour une application clinique (Chapitre VII).

Introduction

Chapitre I

Tumeurs cérébrales

Dans ce premier chapitre, nous allons situer le glioblastome parmi les tumeurs du système nerveux central, puis définir ses caractéristiques principales ainsi que différentes méthodes de classification. Par la suite, nous présenterons les traitements actuellement utilisés pour ce type de tumeur, ainsi que différentes perspectives thérapeutiques. Enfin, nous introduirons la problématique de la récurrence tumorale, avec une description des facteurs pouvant expliquer celle du glioblastome, ainsi que les traitements envisagés pour sa prise en charge.

I.1. Rappels et définitions

I.1.a. Le cerveau

I.1.a.i. Système nerveux

Le système nerveux d'un être vivant permet de coordonner ses actions en transmettant des signaux aux différents organes. Chez les vertébrés, on distingue le **système nerveux central** (SNC) du **système nerveux périphérique** (SNP) (Figure 1). Le système nerveux central est composé de la moelle épinière, située dans la colonne vertébrale, et de l'encéphale, qui regroupe les différentes structures situées dans la boîte crânienne : le cerveau, le cervelet et le tronc cérébral (Figure 2). Il reçoit les informations sensorielles, puis les analyse et les interprète afin de transmettre des commandes aux différents effecteurs. Le système nerveux périphérique est quant à lui composé des nerfs et des ganglions nerveux, et permet de transporter l'information entre les différents organes et le système nerveux central (Biga et al., 2020).

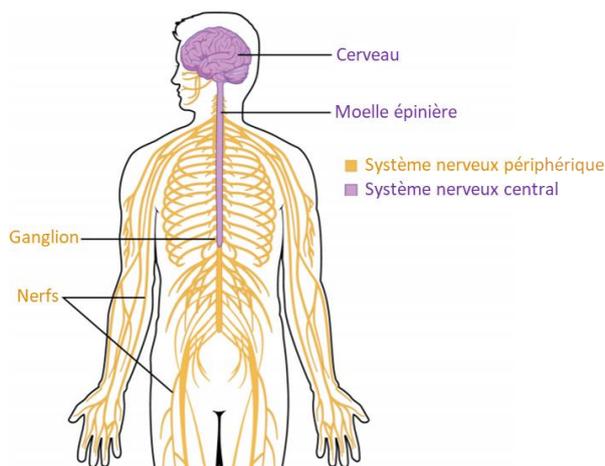


Figure 1 : Systèmes nerveux central et périphérique, adapté d'après (Biga et al., 2020)

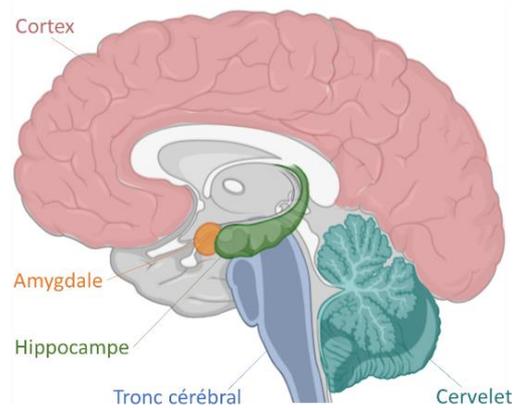


Figure 2 : Principaux composants de l'encéphale – cerveau, cervelet et tronc cérébral

I.1.a.ii. Structure

Le cerveau est un organe essentiel, protégé par différentes structures (Figure 3). D'une part, il est entouré par les méninges, entre lesquelles circule le **liquide céphalo-rachidien** (LCR, aussi appelé liquide cébrospinal) permettant de le protéger des infections, d'amortir les chocs et d'évacuer les déchets. Le LCR est produit en permanence et permet également de maintenir une pression intracrânienne constante.

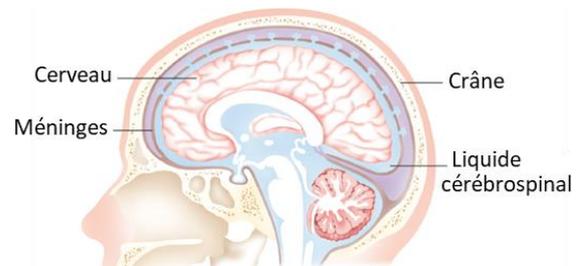


Figure 3 : Différents moyens de protection du cerveau, adapté d'après (Institut National du Cancer, 2019)

D'autre part, le cerveau est protégé par la **barrière hémato-encéphalique** (BHE), une barrière physiologique qui sépare la circulation sanguine du système nerveux central. Elle permet de protéger le cerveau des éléments toxiques pouvant circuler dans le sang, tout en permettant le passage des nutriments essentiels. Le cerveau se situe également à l'intérieur de la boîte crânienne, une coque osseuse solide le protégeant des dommages extérieurs (Institut National du Cancer, 2019). Enfin, il est séparé en deux hémisphères qui contrôlent chacun différentes fonctions de l'organisme, dont la surface est divisée en quatre **lobes cérébraux** : frontal, pariétal, temporal et occipital.

I.1.a.iii. Cellules du système nerveux

L'ensemble des fonctions du système nerveux est assuré par le biais des **neurones**, des cellules capables de transmettre des informations à travers l'organisme. A la suite d'un signal électrique appelé potentiel d'action, la libération de neurotransmetteurs au niveau d'une fente synaptique permet aux cellules neuronales de communiquer entre elles (Figure 4).

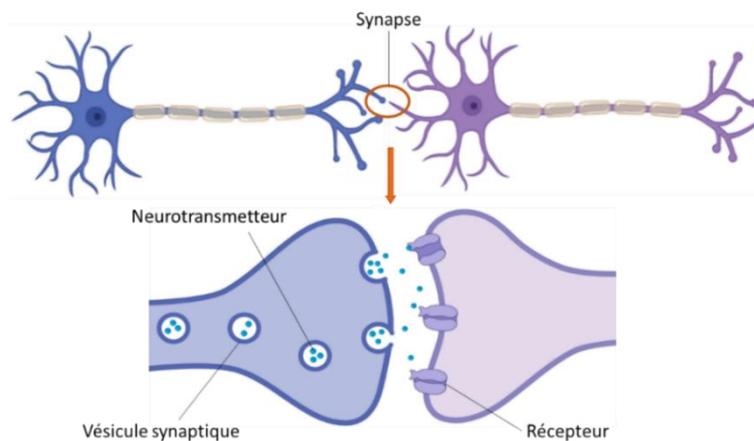


Figure 4 : Fente synaptique et transmission chimique d'informations

L'ensemble de ces neurones peut fonctionner grâce au soutien des **cellules gliales** du système nerveux. Dans le système nerveux central, les astrocytes, les oligodendrocytes, les épendymocytes et la microglie assurent la protection des neurones, participent à la barrière hémato-encéphalique et assurent la défense immunitaire du SNC. Dans le système nerveux périphérique, ce sont les cellules satellites et les cellules de Schwann qui assurent cette protection.

I.1.b. Le cancer

Dans la suite de ce document, nous aborderons uniquement les cancers « solides » et non les cancers « liquides » tels que les leucémies et les lymphomes.

I.1.b.i. Cancérogénèse

Le corps humain est composé de milliards de cellules, qui se renouvellent en permanence grâce aux processus de division et de mort cellulaire. La perturbation de cet équilibre peut provoquer une mort cellulaire excessive, associée au développement de certaines pathologies neurodégénératives, ou une prolifération cellulaire excessive, pouvant entraîner la formation d'une tumeur. Une tumeur est une augmentation volumique de tissu, résultant d'une accumulation de mutations n'ayant pas pu être détectées à temps ou réparées par l'organisme (Figure 5). Au fil des mutations, certaines de ces cellules acquièrent des capacités pro-tumorales et sont capables de former de nouveaux vaisseaux sanguins par le processus de néoangiogenèse. Peu à peu, les cellules mutées prolifèrent de manière anormale, forment une masse tumorale irriguée et alimentée par de nouveaux vaisseaux, et deviennent capables de migrer et d'envahir les tissus voisins (Institut National du Cancer, 2019; Tubiana, 2008).

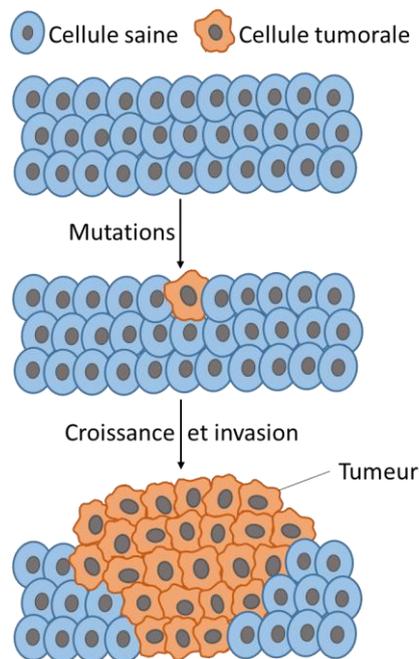


Figure 5 : Étapes de formation d'une tumeur solide

Il existe alors deux sortes de tumeurs : les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes. Une tumeur **bénigne** est un amas de cellules qui restent localisées, généralement sans gravité, bien que son évolution doive être surveillée. Au contraire, une tumeur **maligne** est un amas de cellules cancéreuses qui se développent rapidement, avec la faculté de migrer vers les tissus voisins.

Dans la suite de ce document, la notion de cellules tumorales fera référence à des cellules cancéreuses.

Une tumeur peut être caractérisée par son grade et par son stade. Le **grade** d'une tumeur correspond à son degré de malignité et caractérise son agressivité ainsi que sa vitesse de propagation. Il est quantifié par une valeur de I (bénin) à IV (malin) : plus cette valeur est élevée, plus la tumeur est agressive et de mauvais pronostic. Cette classification est basée sur l'apparence microscopique des cellules tumorales et du tissu environnant.

Le **stade** d'une tumeur correspond quant à lui à son évolution et sa propagation au sein de l'organisme. Il est basé sur l'apparence générale de la tumeur, en termes de taille, de localisation et d'invasion des tissus avoisinants. Les tumeurs peuvent être localisées et de petite taille (stade 1) ou de taille importante (stade 2), ou bien étendues jusqu'aux ganglions lymphatiques ou aux tissus avoisinants (stade 3), voire dans l'organisme en se disséminant sous forme de métastases (stade 4) (Rosen and Sapra, 2020).

I.1.b.ii. Épidémiologie

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde, après les maladies cardiovasculaires. En 2018, plus de 18 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués (Figure 6) causant plus de 9,5 millions de décès (Figure 7, (International Agency for Research on Cancer, 2020)). Les cancers les plus fréquents et les plus meurtriers sont le cancer du poumon, le cancer colorectal, le cancer de l'estomac ainsi que le cancer de la prostate chez l'homme et celui du sein chez la femme. Cette même année, en France, le nombre de nouveaux cas s'élevait à 382 000, avec un ratio homme/femme de 1,15:1, et le nombre de décès à 157 400, avec un ratio homme/femme de 1,32:1 (Institut National du Cancer, 2019).

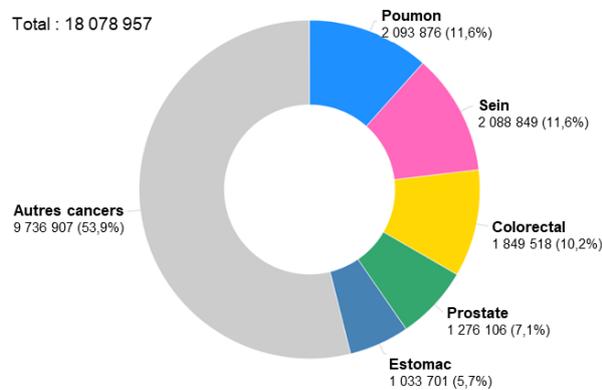


Figure 6 : Nouveaux cas de cancers dans le monde en 2018, adapté d'après (International Agency for Research on Cancer, 2020)

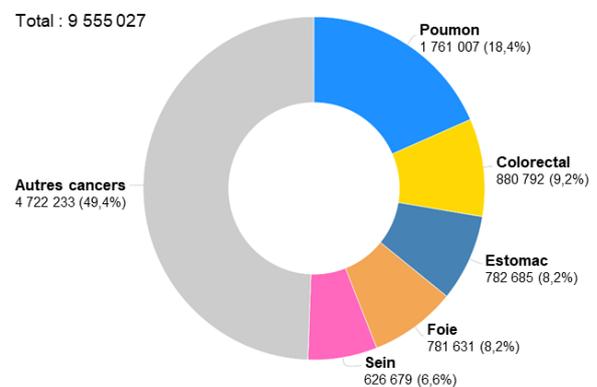


Figure 7 : Nombre de décès dus à un cancer dans le monde en 2018, adapté d'après (International Agency for Research on Cancer, 2020)

I.1.c. Les tumeurs du système nerveux central

I.1.c.i. Généralités

Les tumeurs du système nerveux central regroupent les tumeurs de l'encéphale et celles qui se développent dans la moelle épinière. Le terme de tumeur cérébrale fait référence aux tumeurs qui se développent d'emblée à l'intérieur de la boîte crânienne – les tumeurs primaires – contrairement aux métastases cérébrales, des tumeurs secondaires qui se développent après la migration de cellules tumorales à partir d'une tumeur primaire localisée dans une autre partie de l'organisme.

En 2018, les tumeurs du système nerveux ont été diagnostiquées chez 296 851 personnes, et ont été la cause de 241 037 décès à travers le monde. En France, 5 886 nouveaux cas de tumeurs du système nerveux central ont été diagnostiqués, et ces tumeurs ont engendré 4128 décès (International Agency for Research on Cancer, 2020; Pouchieu et al., 2019).

I.1.c.ii. Classification

Les tumeurs du SNC peuvent être différenciées selon différents critères, qui ont abouti à différentes classifications au fil des années. Historiquement, la classification est basée sur la morphologie, les cellules d'origine ainsi que leur niveau de différenciation. Par exemple, la classification de l'ICD-O (*International classification of diseases for oncology*) de 2013 (Fritz, 2013) définit 12 sortes de tumeurs du SNC différentes (Annexe 1). Depuis 2016, les paramètres moléculaires ont été ajoutés à cette classification afin d'affiner le diagnostic et d'adapter au mieux les traitements. Ainsi, la classification de l'OMS (Organisation mondiale de la santé) de 2007 a été complétée afin de donner celle de 2016, qui intègre à la fois les **critères moléculaires** (génotypiques) et **histologiques** (phénotypiques), dans laquelle le génotype prime sur le phénotype en cas de résultats discordants (Annexe 1, (Louis et al., 2016)). Par la suite, l'équipe de Darlix (Darlix et al., 2017) a combiné ces deux classifications et en a établi une troisième, davantage basée sur l'origine des cellules (Annexe 1). Au sein de ces classifications, le numéro à 5 chiffres est le code morphologique défini par l'ICD-O, le /3 correspondant aux tumeurs malignes et le /1 aux tumeurs avec un statut incertain.

En prenant en compte ces différentes classifications, il existe actuellement huit catégories de tumeurs du SNC. Premièrement, les **tumeurs du tissu neuroépithélial** regroupent les gliomes, les tumeurs du plexus choroïde, les tumeurs neuronales et mixtes glio-neuronales, les tumeurs de la région pinéale, les tumeurs embryonnaires ainsi que d'autres tumeurs du tissu neuroépithélial. Les **gliomes** sont des tumeurs se développant à partir des cellules gliales, et cette sous-catégorie regroupe les tumeurs astrocytaires, oligodendrogliales, épendymaires et oligoastrocytaires en fonction de la cellule d'origine (Figure 8, (Louis et al., 2016)). C'est le type de tumeur cérébrale le plus fréquent car il représente plus de 40% des tumeurs cérébrales. Ensuite, il existe des tumeurs des nerfs crâniens et spinaux, des tumeurs germinales, pituitaires, histiocytaires et de la région sellaire. Enfin, certaines tumeurs sont des lymphomes ou néoplasmes hématopoïétiques, et d'autres proviennent des méninges, avec des tumeurs des cellules méningothéliales, des tumeurs mésenchymateuses et mélanocytaires (Darlix et al., 2017; Fritz, 2013; Louis et al., 2016; Zouaoui et al., 2012).

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*
Glioblastoma, NOS	9440/3
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3
Other astrocytic tumours	
Pilocytic astrocytoma	9421/1
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Ependymal tumours	
Subependymoma	9383/1
Myxopapillary ependymoma	9394/1
Ependymoma	9391/3
Papillary ependymoma	9393/3
Clear cell ependymoma	9391/3
Tanycytic ependymoma	9391/3
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	9396/3*
Anaplastic ependymoma	9392/3
Other gliomas	
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1
Angiocentric glioma	9431/1
Astroblastoma	9430/3

Figure 8 : Classification OMS des gliomes (Louis et al., 2016)

I.2. Glioblastome

I.2.a. Généralités

I.2.a.i. Définition

Le glioblastome (GBM) est une tumeur astrocytaire – ou astrocytome – de haut grade (grade IV), caractérisé par de grandes **capacités d'invasion et d'infiltration** des tissus sains environnants. Cette tumeur maligne représente environ 15% des tumeurs du SNC, près de la moitié des tumeurs malignes du cerveau (48,3%) et plus de la moitié des tumeurs gliales (57,3%), ce qui en fait la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente (Figure 9, (Darlix et al., 2017; De Vleeschouwer, 2017; Ostrom et al., 2019)).

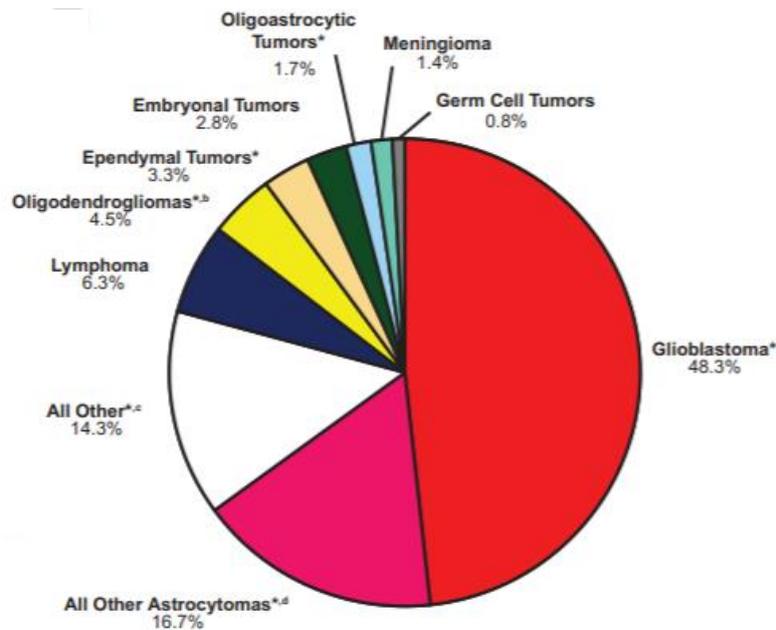


Figure 9 : Incidence des tumeurs malignes du système nerveux central aux Etats-Unis de 2012 à 2016 (Ostrom et al., 2019)

En termes de localisation, le glioblastome se trouve préférentiellement dans la région supratentorielle, notamment le **lobe frontal**, le lobe temporal et le corps calleux. Ce type de tumeur peut également se situer dans le lobe pariétal, le cervelet et éventuellement la moelle épinière (Alexander and Cloughesy, 2017; Ohgaki and Kleihues, 2013; Tamimi and Juweid, 2017).

Le glioblastome est une tumeur très infiltrante, dont la moitié envahit plus d'un lobe chez l'adulte. Certaines tumeurs peuvent être multifocales (5%), diffuses ou encore distantes. Enfin, dans de très rares cas, des métastases provenant d'un glioblastome ont été observées dans les poumons, la plèvre, les ganglions lymphatiques, les os et le foie (Davis, 2016; Wirsching et al., 2016).

I.2.a.ii. Classification

◆ Critère clinique

Selon l'origine de son développement, le glioblastome se divise en deux catégories distinctes, qui ne se distinguent pas histologiquement. D'une part, le **glioblastome primaire** ou *de novo* correspond aux tumeurs qui se développent d'emblée, sans lésion antérieure identifiable. Il correspond à une histoire clinique courte et représente la majeure partie des cas de glioblastome, avec 90% des patients. Il est associé à un âge moyen de 62 ans au moment du diagnostic et une médiane de survie de 15 mois après ce dernier avec le traitement complet standard (Louis et al., 2016). Ce type de tumeur proviendrait de la transformation maligne d'une cellule souche neurale adulte.

D'autre part, le **glioblastome secondaire** se développe après l'évolution d'un précédent gliome de grade II ou III. Il représente quant à lui 10% des cas de glioblastome et les patients concernés sont plus jeunes, avec un âge moyen de 44 ans lors du diagnostic. Les patients avec un glioblastome secondaire ont un meilleur pronostic que ceux avec un glioblastome primaire, avec une médiane de survie de 31 mois avec le traitement complet standard. Son origine serait due à la transformation d'un précurseur glial commun aux astrocytes et aux oligodendrocytes en raison d'une mutation du gène isocitrate déshydrogénase 1 (*IDH1*) (Agnihotri et al., 2014; Figarella-Branger et al., 2010b; Louis et al., 2016; Ohgaki and Kleihues, 2013). Plusieurs études basées sur cette différenciation clinique ont montré que ces deux types de glioblastome ne sont pas associés aux mêmes altérations génétiques (Tableau 1).

Altérations	Glioblastome primaire	Glioblastome secondaire
Mutation d' <i>IDH1</i>	5%	80%
Mutation de <i>TP53</i>	30%	65%
Mutation de <i>PTEN</i>	25%	4%
Mutation de <i>ATRX</i>	5%	65%
Mutation du promoteur de <i>TERT</i>	70%	25%
Amplification de <i>EGFR</i>	40%	8%
Perte de <i>CDKN2A</i>	40%	20%
Perte d'hétérozygotie de chr10p	50%	8%
Perte d'hétérozygotie de chr10q	70%	60%
Perte d'hétérozygotie de chr19q	6%	54%
Méthylation du promoteur de <i>MGMT</i>	36%	75%

IDH1 : isocitrate dehydrogenase 1 ; *TP53* : tumor protein 53 ; *PTEN* : phosphatase and tensin homolog ; *ATRX* : α -thalassemia mental retardation syndrome X-linked ; *TERT* : telomerase reverse transcriptase ; *EGFR* : epidermal growth factor receptor (récepteur du facteur de croissance épidermique) ; *CDKN2A* : cyclin dependent kinase inhibitor 2A ; *chr* : chromosome ; *MGMT* : O6-méthylguanine ADN méthyltransférase

Tableau 1 : Principales altérations génétiques du glioblastome en fonction de la classification clinique, adapté d'après (Figarella-Branger et al., 2010b; Louis et al., 2016; Ohgaki and Kleihues, 2007, 2013)

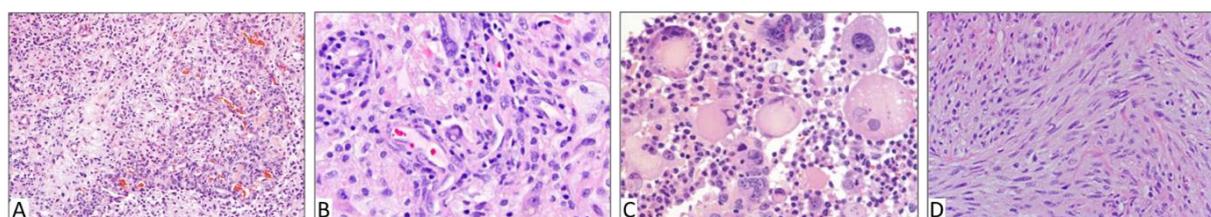
En résumé, les altérations génétiques caractéristiques du glioblastome primaire sont la mutation du gène *PTEN*, l'amplification du récepteur de l'EGF (*epidermal growth factor*) et la perte totale du chromosome 10. Le glioblastome secondaire est quant à lui caractérisé par les mutations des gènes *IDH1* et *TP53*, la perte d'hétérozygotie du chromosome 19q et la méthylation du promoteur du gène *MGMT* (Figarella-Branger et al., 2010b; Ohgaki and Kleihues, 2007, 2013).

◆ Critère histologique

Le glioblastome est un type histologique à part entière, appartenant au large groupe des tumeurs neuroépithéliales, et au sous-groupe des tumeurs astrocytaires. Le tissu tumoral solide est principalement composé d'astrocytes néoplasiques faiblement différenciés et caractérisé par la prolifération microvasculaire et la nécrose, qui le différencie des gliomes de bas-grade. De plus, ce type de tumeur présente une forte densité cellulaire, des atypies se traduisant par un polymorphisme cellulaire et nucléaire, une activité mitotique intense, peu d'apoptose et de la néoangiogenèse. Le glioblastome est également caractérisé par des cellules tumorales isolées qui infiltrent le parenchyme sain, se traduisant par des œdèmes localisés (Adamson et al., 2009; Figarella-Branger et al., 2010a; Wirsching et al., 2016).

Au-delà des spécificités morphologiques du glioblastome, le diagnostic histopathologique repose sur l'étude des mutations du gène *IDH*, en particulier *IDH1*. En fonction du statut de mutation de ce gène, trois sous-types de glioblastome ont été définis : **IDH muté** (9445/3), **IDH non muté** (9440/3) et NOS (*not otherwise specified*, 9440/3), lorsque le statut de mutation n'est pas spécifié.

Le glioblastome avec un gène *IDH* non muté comprend trois sous-types morphologiques : le glioblastome épithélioïde (9440/3), le glioblastome à cellules géantes (9441/3) et le gliosarcome (9442/3) (Figure 10, (Bienkowski et al., 2018; Fritz, 2013; Joseph et al., 2013; Louis et al., 2016)). Les mutations du gène *IDH* étant principalement associées au glioblastome secondaire (Critère clinique), les classifications clinique et histologique sont fréquemment confondues, bien que leur origine diffère (Agnihotri et al., 2014).



Glioblastome *IDH* muté (A) et *IDH* non-muté : épithélioïde (B), à cellules géantes (C) et gliosarcome (D)

Figure 10 : Différents sous-types histologiques de glioblastome, adapté d'après (Bienkowski et al., 2018; Joseph et al., 2013; Louis et al., 2016)

◆ Critère moléculaire

Au-delà des classifications clinique et histologique, les analyses moléculaires permettent de préciser la classification de ce type de tumeurs et d'adapter au mieux les traitements. Des études menées sur plusieurs centaines d'échantillons ont montré que le glioblastome était associé à l'activation de trois voies métaboliques distinctes : la voie p53, la voie du rétinoblastome et la voie RTK/Ras/PI3K (récepteur à activité tyrosine kinase/Ras/phosphoinositide 3-kinase). La voie p53 est principalement impliquée dans les processus de sénescence et d'apoptose, la voie du rétinoblastome dans la progression des cellules à travers les phases du cycle cellulaire, notamment la transition G1/S, et la voie RTK/Ras/PI3K dans la prolifération et la survie cellulaire. Le glioblastome résulte également d'une régulation anormale des voies métaboliques des facteurs de croissance, notamment celui de l'endothélium vasculaire (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), épidermique (EGF, *epidermal growth factor*), dérivé des plaquettes (PDGF, *platelet derived growth factor*) et des hépatocytes (HGF, *hepatocyte growth factor*). Ainsi, l'ensemble de ces altérations liées au cycle cellulaire et aux voies de transmission du signal entraîne une augmentation de la prolifération et de l'invasion cellulaire, une inhibition de l'apoptose ainsi que le développement de l'angiogenèse (Alifieris and Trafalis, 2015; Cancer Genome Atlas Research Network, 2008; Davis, 2016; de Tayrac and Mosser, 2010; Figarella-Branger et al., 2010b).

En 2010, l'équipe de Verhaak (Verhaak et al., 2010) a établi une classification moléculaire du glioblastome selon quatre catégories : **classique**, **mésenchymateux**, **neural** et **proneural** (Tableau 2).

Classe moléculaire	Mutations	Amplifications	Délétions
Classique	EGFRvIII, pas TP53	EGFR, chr7	PTEN, chr10, CDKN2A
Mésenchymateux	NF1 , PTEN		TP53
Proneural	IDH1 , TP53 , PDGFRA	PDGFRA, CDK6, CDK4, MET	
Neural	ERBB2	EGFR	PTEN

NF1 : neurofibromatose de type 1 ; *PDGFRA* : platelet-derived growth factor receptor A ; *CDK* : cyclin-dependent kinase

Tableau 2 : Classification moléculaire du glioblastome et principales altérations génétiques associées, adapté d'après (Agnihotri et al., 2014; Alifieris and Trafalis, 2015; de Tayrac and Mosser, 2010; Verhaak et al., 2010)

La catégorie classique est associée au type cellulaire astrocytaire et à une survie plus faible, et est principalement définie par l'amplification du récepteur de l'EGF et aucune mutation de *TP53*. Le type mésoenchymateux est associé aux cellules astrogliales et caractérisé par des mutations de *NF1* ainsi qu'une forte proportion de nécrose. Le type proneural correspond à des patients plus jeunes et au type cellulaire oligodendrocytaire, et est défini par des mutations de *TP53* et *IDH1*, ainsi que par la concomitance d'amplification et de mutations de *PDGFRA*. Enfin, le type neural est défini par des mutations de *ERBB2* et correspond principalement à un mélange de cellules astrocytaires et neurales, avec la présence du type oligodendrocytaire.

I.2.a.iii. Épidémiologie

En 2018, 3 481 nouveaux cas de glioblastome ont été recensés en France métropolitaine, dont 58 % chez l'homme (Figure 11). Ce diagnostic correspond à une incidence moyenne de 5,4 pour 100 000 personnes, alors qu'elle était de 3,3 entre 2006 et 2011. L'incidence du glioblastome augmente à partir de 50 ans puis diminue fortement au-delà de 80 ans, avec un âge médian au moment du diagnostic de 65 ans chez l'homme et de 67 ans chez la femme. Sur le plan national, des relevés réguliers sont effectués dans le département de la Gironde, avec un nombre de cas rapportés souvent supérieur à la moyenne nationale (Pouchieu et al., 2019).

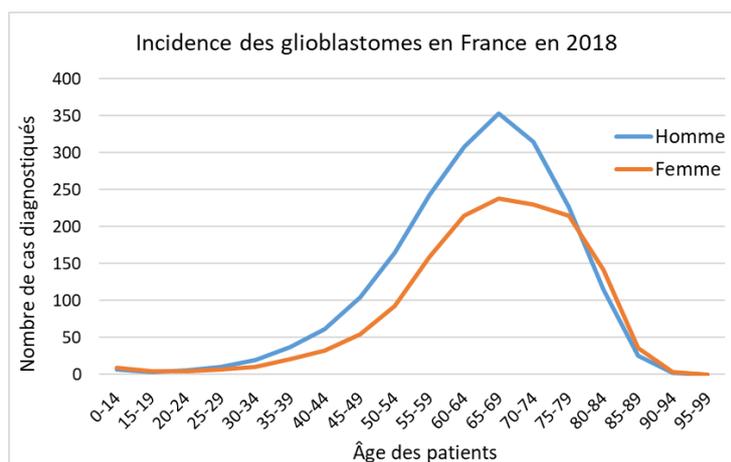


Figure 11 : Incidence du glioblastome selon l'âge des patients en France, en 2018, adapté d'après (Pouchieu et al., 2019)

Entre 1990 et 2018, le nombre de nouveaux cas de glioblastome diagnostiqués n'a cessé d'augmenter et a été multiplié par quatre en France (Figure 12). Cette évolution est principalement liée à une augmentation du risque de cancer lui-même, au vieillissement de la population, mais également à l'amélioration des outils diagnostiques, tels que l'imagerie et les biopsies, qui permettent de confirmer des cas de glioblastome qui n'auraient pas été décelés auparavant (Pouchieu et al., 2019).

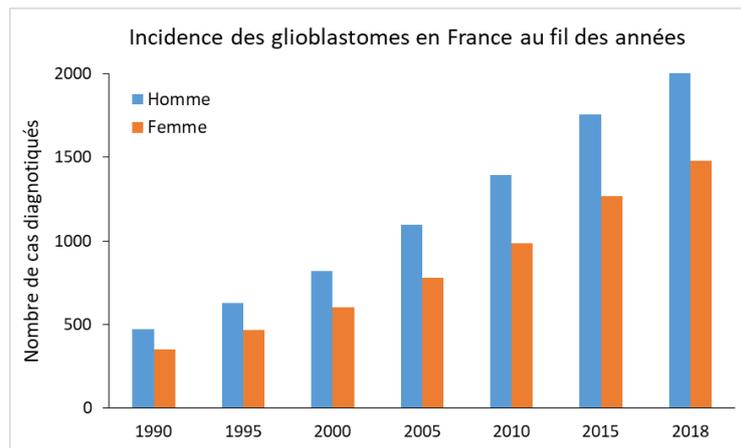


Figure 12 : Évolution de l'incidence du glioblastome en France depuis 1990, adapté d'après (Pouchieu et al., 2019)

Sur le plan mondial, environ 250 000 nouveaux cas de glioblastome sont diagnostiqués chaque année, correspondant à une incidence moyenne de 3,0 pour 100 000 personnes, alors qu'elle était de 2,1 il y a 10 ans. De fortes disparités géographiques ont été observées à travers les pays, avec une incidence et une mortalité plus élevées dans les pays développés. Ces inégalités peuvent être expliquées par de forts écarts entre les méthodes diagnostiques, mais également par une augmentation des facteurs de risque dans les pays développés (Darlix et al., 2017; Pouchieu et al., 2019).

I.2.a.iv. Étiologie

A ce jour, certains facteurs de risque intrinsèques et extrinsèques ont été identifiés pour le glioblastome. Les facteurs intrinsèques identifiés sont l'âge, le sexe et l'origine ethnique. En effet, le risque est plus élevé entre 50 et 80 ans, pour les hommes (1,6:1) et pour les populations caucasiennes (2:1) (Ostrom et al., 2019; Wirsching et al., 2016). Concernant les facteurs héréditaires, plusieurs prédispositions génétiques ont été identifiées comme facteurs de risque du glioblastome, mais n'ont été observées que pour 1% de ces tumeurs. Ces prédispositions sont principalement la neurofibromatose de type 1 et 2, les syndromes de Li-Fraumeni, de Lynch et de Turcot, ainsi que la sclérose tubéreuse de Bourneville. De plus, la survenue d'un rétinoblastome serait également un facteur de risque du glioblastome. A contrario, certains terrains allergiques tels que l'asthme, le rhume des foins, l'eczéma et les allergies alimentaires ainsi que certaines maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque seraient associés à une forte diminution du risque de glioblastome (Alifieris and Trafalis, 2015; Baldi et al., 2010).

Les facteurs extrinsèques sont plus difficiles à identifier en raison de la complexité de l'analyse de l'exposition. A ce jour, les radiations ionisantes sont le seul facteur de risque environnemental avéré comme augmentant réellement le risque de glioblastome. Cependant, certaines substances chimiques telles que les solvants chlorés et les pesticides ont été identifiées comme potentiel facteur de risque, notamment lors d'une exposition à des doses élevées pendant une durée prolongée, pour certains professionnels de l'industrie ou de l'agriculture par exemple (Alifieris and Trafalis, 2015). D'autres industries telles que le raffinage du pétrole et la fabrication de caoutchouc synthétique sont également suspectées, ainsi que l'exposition au tabagisme passif. Enfin, l'exposition aux champs électromagnétiques, notamment les ondes émises par les téléphones portables, est un autre facteur de risque environnemental supposé, bien qu'à ce jour aucune étude n'ait clairement établi de relation de causalité avec l'incidence du glioblastome (Adamson et al., 2009; Davis, 2016).

1.2.b. Diagnostic

Après une suspicion de tumeur cérébrale, le diagnostic complet comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, le patient est soumis à des examens **clinique et neurologique** complets afin d'évaluer son état de santé global ainsi que les potentielles atteintes neurologiques. Des examens **d'imagerie** sont ensuite réalisés afin de confirmer le diagnostic, d'obtenir une image précise du cerveau et de localiser puis dimensionner la tumeur. Ces examens sont fréquemment complétés par une **analyse sanguine** afin de rechercher une inflammation, un trouble organique ou une anomalie sanguine. Enfin, la dernière étape du diagnostic est l'examen **d'anatomopathologie**, qui consiste à analyser les caractéristiques d'un échantillon de tumeur.

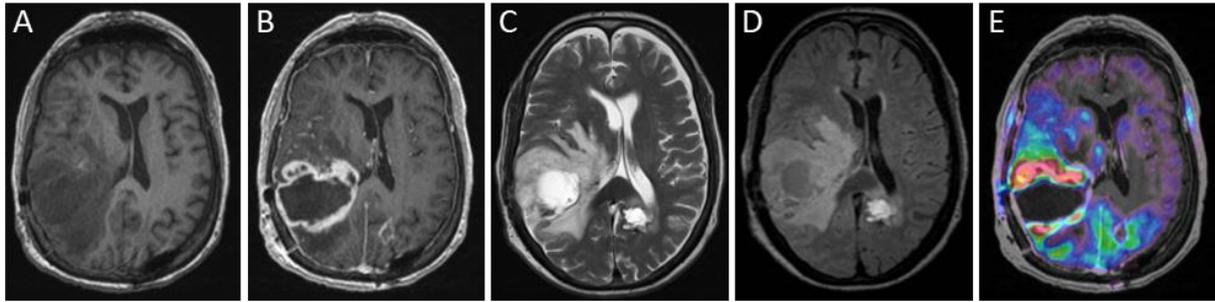
1.2.b.i. Examens clinique et neurologique

Le diagnostic clinique d'un glioblastome est complexe, puisque les symptômes ne sont ni spécifiques, ni uniques. De plus, ils varient considérablement d'un patient à l'autre, puisqu'ils dépendent de la taille et de la localisation de la tumeur. Le diagnostic résulte donc de la concomitance de plusieurs symptômes, et doit être confirmé par une imagerie cérébrale.

Les symptômes les plus fréquents sont les céphalées, souvent accompagnées de nausées voire de vomissements, qui résultent d'une hypertension intracrânienne. En effet, une augmentation de la pression intracrânienne peut être provoquée par un œdème autour de la tumeur, par la compression du cerveau par la tumeur dans la boîte crânienne, ou encore par une mauvaise circulation du liquide céphalo-rachidien. Un autre symptôme du glioblastome est la crise d'épilepsie, qui résulte d'une perturbation de l'activité neuronale par la tumeur et peut se manifester par des absences, des mouvements involontaires ou encore une perte de connaissance en fonction de la gravité de la crise. En fonction de la localisation de la tumeur, les patients peuvent également présenter différentes atteintes qui touchent la motricité (coordination, faiblesse musculaire), les sens (vision, audition, odorat), la communication (parole, écriture), et la cognition (mémoire, comportement), voire présenter des déficits neurologiques minimes. Ainsi, lors du diagnostic, on associe aux signes cliniques une évaluation du **score neurologique** afin de mesurer l'étendue des atteintes et établir un point de référence. Ce score peut être évalué grâce à des échelles de performance, qui attribuent un nombre à une description de l'état de santé d'un patient et de ses capacités. Les échelles de référence sont l'échelle de Karnofsky, qui va de 0 (décès) à 100 (pleine santé) et l'échelle de l'OMS (Annexe 2), définie par l'ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), qui va de 0 (pleine santé) à 5 (décès) (Oken et al., 1982; Péus et al., 2013; *Référentiel de l'ANOCEF pour les glioblastomes (grade IV OMS)*, 2018).

1.2.b.ii. Imagerie

L'examen de référence en neuro-oncologie est l'**imagerie par résonance magnétique (IRM)**, basée sur les propriétés magnétiques des atomes d'hydrogène contenus dans les tissus humains. Une fois stimulés, ces atomes restituent l'énergie accumulée sous forme de signal IRM, permettant de reconstituer des images tissulaires en 2D et 3D (Figure 13, (Wirsching et al., 2016)). Le signal dépend de certaines caractéristiques des atomes d'hydrogène, notamment leur quantité et leur temps de relaxation longitudinale (T1) et transversale (T2), propres à chaque tissu. Les deux séquences T1 et T2 ainsi définies vont permettre d'observer différents aspects des tumeurs et des cellules résiduelles. En général, la séquence T1 est accompagnée d'un agent de contraste tel que le gadolinium, et la séquence T2 est associée au FLAIR (*fluid attenuated inversion recovery*), une technique qui permet d'éliminer le signal provenant du liquide céphalo-rachidien.



Imagerie par résonance magnétique : séquence T1 (A), séquence T1 et gadolinium (B), séquence T2 (C), séquence T2 et FLAIR (D) ; Tomographie par émission de positons (E)

Figure 13 : Illustrations de différents examens d'imagerie de glioblastome, adapté d'après (Wirsching et al., 2016)

L'IRM permet d'établir un diagnostic de tumeur cérébrale, qui sera ensuite précisé par les analyses d'anatomopathologie, puis de suivre l'évolution de la tumeur ainsi que l'efficacité des traitements. Cet examen peut parfois être remplacé ou complété par d'autres techniques d'imagerie telles que le scanner ou la tomographie par émission de positons.

1.2.b.iii. Anatomopathologie

L'examen d'anatomopathologie repose sur l'étude d'un ou plusieurs échantillons de la tumeur, obtenus à partir de l'ablation chirurgicale de celle-ci ou bien d'une biopsie. La **biopsie** est une méthode de diagnostic qui consiste à prélever un fragment réduit de la tumeur afin de l'analyser en laboratoire. Lorsque l'état du patient et la localisation de la tumeur le permettent, plusieurs prélèvements sont réalisés afin d'avoir un aperçu représentatif de ce type de tumeur très hétérogène.

I.2.c. Traitement standard

I.2.c.i. Protocole de Stupp

Le choix des traitements pour un glioblastome dépend de ses caractéristiques biologiques, mais également de l'âge du patient et de son état de santé, notamment ses fonctions hématologiques, rénales et hépatiques. La prise en charge thérapeutique est discutée lors d'une **réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP)**, qui réunit des praticiens de différentes spécialités, précisément un neurochirurgien, un (neuro)-oncologue, un oncologue-radiothérapeute, et si possible un radiologue et un anatomopathologiste. Cette équipe définit un programme de soins personnalisé pour chaque patient, qui est administré une fois que le consentement du patient a été recueilli.

Actuellement, le traitement standard administré aux patients atteints de glioblastome a été défini par l'équipe de Stupp (Stupp et al., 2005). Il comprend une exérèse chirurgicale visant à enlever la masse tumorale, puis une association de radiothérapie et de chimiothérapie à base de témozolomide (TMZ) visant à éliminer les cellules cancéreuses résiduelles, suivie par l'administration de chimiothérapie adjuvante par témozolomide (Figure 14). Ce protocole de traitement est administré aux patients entre 18 et 70 ans ayant un score OMS ≤ 2 et des fonctions hématologiques, rénales et hépatiques dans les normes.

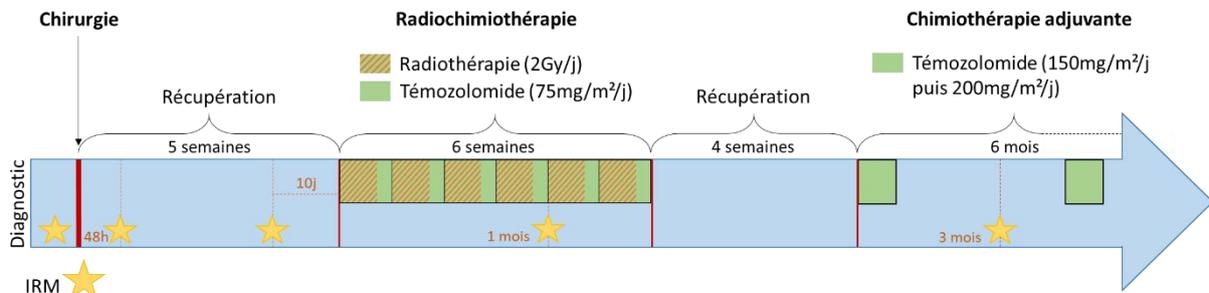


Figure 14 : Protocole de Stupp pour le traitement d'un glioblastome

L'équipe de Stupp a montré que l'ajout de chimiothérapie concomitante et adjuvante au protocole de radiothérapie seule permettait une nette amélioration de la survie des patients atteints de glioblastome. Elle a notamment montré une augmentation de la médiane de survie, passant de 12,1 à 14,6 mois (Figure 15), et du taux de survie à 5 ans allant de 1,9 à 9,8% (Stupp et al., 2009). A ce jour, ce protocole est le plus couramment utilisé pour traiter les patients atteints de glioblastome, mais leur survie reste faible et de nouveaux traitements sont constamment évalués dans divers essais cliniques.

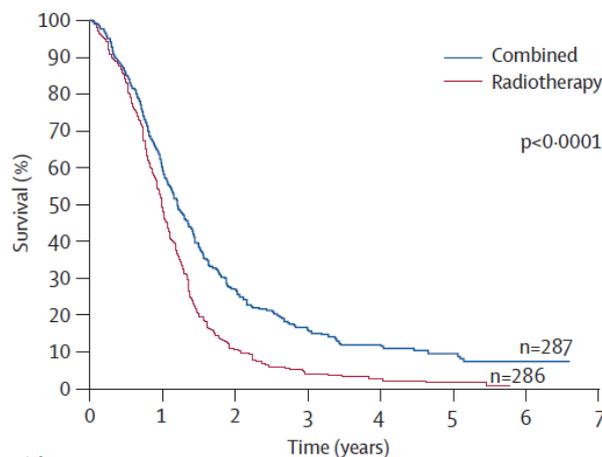


Figure 15 : Survie globale de patients atteints de glioblastome traités par radiochimiothérapie ou par radiothérapie seule (Stupp et al., 2009)

Certains traitements peuvent également être administrés aux patients afin de traiter directement les symptômes liés à la présence de la tumeur ou bien les aider à mieux supporter les effets secondaires des traitements conventionnels. Ainsi, la prise d'antalgiques permet de diminuer certaines douleurs, la prise d'antiémétiques évite les nausées et les vomissements et les antibiotiques permettent de prévenir les infections. Certains patients prennent également des corticoïdes afin de réduire les œdèmes cérébraux, ou bien des antiépileptiques pour traiter les crises d'épilepsie.

1.2.c.ii. Chirurgie

◆ Protocole

Le traitement de première intention du glioblastome consiste en une résection chirurgicale – ou exérèse, qui vise à enlever la masse tumorale. L'exérèse doit être la plus large possible afin de retirer l'ensemble des cellules cancéreuses, sans léser de zone fonctionnelle, ce qui pourrait altérer certaines fonctions neurologiques du patient. L'étendue et la qualité de la chirurgie sont primordiales et ont une incidence directe sur la survie des patients et leur qualité de vie post opératoire (Grabowski et al., 2014). Avant la chirurgie d'exérèse, une IRM préopératoire a pour objectif de visualiser l'ensemble de la tumeur et de la dimensionner. Ensuite, pendant la chirurgie, une IRM peropératoire permet de guider le neurochirurgien en délimitant précisément l'emplacement de la tumeur. Le guidage par fluorochromes, notamment l'acide δ -aminolévulinique (5-ALA), peut également permettre de visualiser la tumeur tout au long de l'exérèse et de la distinguer du tissu sain. Cet agent a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2017 pour l'exérèse des gliomes (Hadjipanayis and Stummer, 2019), en se basant sur un essai randomisé de phase III démontrant les effets bénéfiques du 5-ALA sur la qualité des exérèses et la survie sans progression des patients (Stummer et al., 2006).

◆ Effets secondaires

Les effets secondaires de la chirurgie sont d'abord ceux liés à l'anesthésie générale, tels qu'une forte fatigue, des difficultés d'expression, des pertes de mémoire ou encore des nausées et des vomissements. D'autres effets sont liés à l'opération elle-même, comme de fortes douleurs, des difficultés de cicatrisation, un hématome ou une infection. De plus, la résection chirurgicale peut entraîner un gonflement provisoire du cerveau, ou bien une hémorragie suite à la rupture de vaisseaux sanguins. Enfin, dans de rares cas, elle peut provoquer des lésions neurologiques provisoires ou définitives si une zone fonctionnelle est atteinte lors de l'opération.

◆ Suivi post-traitement

Dans les 48 heures suivant l'ablation chirurgicale, une IRM postopératoire est réalisée afin d'évaluer le volume et l'étendue du résidu tumoral. En fonction de la proportion de tumeur observée lors de cet examen grâce à une prise de contraste, l'exérèse est qualifiée de totale, subtotale (entre 90% et 98% de résection) ou partielle (< 90% de résection). En raison de la nature infiltrante du glioblastome, la résection n'est jamais totale car des cellules tumorales résiduelles sont toujours présentes après l'ablation. Après cette lourde opération, les patients ont une phase de récupération de plusieurs semaines, qui permet également aux médecins de préparer la suite des traitements grâce à différents examens d'imagerie.

I.2.c.iii. Radiothérapie

◆ Protocole

La radiothérapie consiste à envoyer des rayons à haute énergie de manière localisée afin de détruire les cellules cancéreuses résiduelles après la chirurgie. Elle est débutée entre 2 et 6 semaines après l'ablation chirurgicale en fonction de l'état général du patient et de sa cicatrisation. Une IRM a lieu dans les 10 jours précédant le démarrage de la radiothérapie, afin de permettre au radiothérapeute de délimiter les organes sains et les volumes ciblés par les rayons.

Le volume réellement irradié est plus large que le volume tumoral, afin de prendre en compte les propriétés infiltrantes de la tumeur ainsi que les variations liées au repositionnement du patient entre les sessions de radiothérapie. De plus, il doit définir les doses à administrer aux volumes cibles tout en ne dépassant pas les doses limites aux organes sains, ainsi qu'éviter les zones fonctionnelles. Dans le protocole Stupp, la dose recommandée est de 60 grays (Gy), administrés en 30 fractions de 2Gy par jour, 5 jours sur 7 (uniquement la semaine), pendant une période de 6 semaines (Stupp et al., 2005).

◆ Effets secondaires

La radiothérapie peut induire une forte fatigue, des céphalées, des nausées et des vomissements, ou bien des œdèmes cérébraux. Elle peut également entraîner des effets secondaires localisés directement liés aux rayons tels qu'une irritation cutanée, une chute des cheveux (alopécie), voire des cils et des sourcils, ou encore des déficits neurologiques dans les cas les plus graves.

I.2.c.iv. Chimiothérapie

◆ Protocole

La chimiothérapie a pour but de détruire les cellules cancéreuses en ciblant les cellules en forte réplication grâce à des agents médicamenteux, administrés par perfusion ou éventuellement par voie orale. Dans le protocole de Stupp, le traitement se compose d'une chimiothérapie concomitante à la radiothérapie, suivie d'une chimiothérapie adjuvante (Stupp et al., 2005). Cette chimiothérapie est basée sur une administration de témozolomide (Témodal®), un agent alkylant appartenant à la catégorie des triazènes, notamment utilisé pour sa capacité à passer la barrière hémato-encéphalique. La chimiothérapie concomitante débute et se termine en même temps que la radiothérapie, pour une durée de 6 semaines, sous réserve de bonne tolérance du patient. Elle consiste en une prise orale quotidienne de témozolomide (7 jours sur 7), à la dose de 75mg/m²/jour, à jeun ou à 2h des repas minimum (avant et après), une heure avant la radiothérapie. La chimiothérapie adjuvante débute quant à elle 4 semaines après la fin de la radiochimiothérapie. Le témozolomide est administré pendant des périodes de 5 jours, tous les 28 jours et durant 6 cycles, en commençant à la dose de 150mg/m²/jour, puis à 200mg/m²/jour si les bilans hématologiques et hépatiques le permettent.

◆ Effets secondaires

La chimiothérapie est associée à un grand nombre d'effets indésirables en raison de la non-sélectivité des médicaments. Les effets indésirables les plus fréquents sont une chute des cheveux et des poils, une augmentation du stress ainsi que de fortes douleurs, mais elle peut aussi provoquer des nausées et des vomissements, de la constipation ou encore des diarrhées, pouvant aller jusqu'à une déshydratation. Elle entraîne aussi des anémies entraînant une forte fatigue, des thrombopénies associées à un risque hémorragique ainsi que des leucopénies – notamment des neutropénies et lymphopénies. Les médicaments peuvent parfois engendrer des éruptions cutanées, entraînant un arrêt du traitement et une reprise éventuelle sous antihistaminiques et corticoïdes, ainsi qu'une toxicité hépatique.

De ce fait, des bilans hépatiques et hématologiques sont réalisés de façon hebdomadaire afin de vérifier la tolérance médicamenteuse et limiter le risque infectieux. Dans les mois suivant la radiochimiothérapie, il est recommandé que les patients soient traités par corticothérapie concomitante afin de prévenir les infections à pneumocoque. Enfin, la plupart des médicaments détériore les organes reproducteurs et provoque l'arrêt des menstruations (Institut National du Cancer, 2010).

◆ Suivi post-traitement

Pour la plupart des patients, une première IRM de contrôle est réalisée un mois après le démarrage de la radiochimiothérapie, puis une seconde a lieu deux mois plus tard. L'IRM de surveillance à 3 mois a pour but de suivre l'efficacité des traitements et une éventuelle progression de la maladie, en comparant les images avec celles de la première IRM (*Référentiel de l'ANOCEF pour les glioblastomes (grade IV OMS)*, 2018).

1.2.c.v. Alternatives thérapeutiques

◆ Patients de plus de 65 – 70 ans

Pour les patients de plus de 65 ou 70 ans – limite définie en fonction des centres – le protocole de Stupp est adapté au cas par cas. Lorsque l'état de santé global est bon, les recommandations sont une résection maximale de la tumeur suivie d'une radiothérapie hypofractionnée (40Gy en 15 fractions) et d'une administration concomitante et adjuvante de témozolomide (Nam and de Groot, 2017). La chirurgie est proposée si les évaluations cliniques le permettent, notamment la taille et la localisation de la tumeur, et permet d'augmenter la survie des patients (Muacevic and Kreth, 2003). Un essai clinique randomisé de phase III a montré une bonne tolérance du traitement concomitant et une amélioration de la survie des patients par rapport à l'administration de radiothérapie seule (Perry et al., 2017). Lorsque le traitement concomitant ne peut être toléré par les patients en raison de leur état de santé, il est remplacé par la chimiothérapie seule lorsque le promoteur de *MGMT* est méthylé, et par la radiothérapie seule dans le cas contraire (Alexander and Cloughesy, 2017). Enfin, un essai clinique randomisé de phase III a montré une amélioration significative de la survie de patients de plus de 65 ans traités avec des champs de traitement de la tumeur, des champs électriques alternatifs de faible intensité (1.3.d.i Champs de traitement de la tumeur, (Stupp et al., 2017)).

◆ Mauvais état de santé général

A ce jour, très peu d'études cliniques ont évalué la réponse aux traitements de patients jeunes présentant un mauvais état de santé général. Les traitements envisagés sont semblables à ceux des patients âgés : une chirurgie ablative suivie par radiothérapie et chimiothérapie concomitantes si leur état le permet. Le bénéfice du traitement concomitant par rapport à la radiothérapie seule est encore incertain, puisque certaines études ont montré une amélioration de la survie des patients (Malakhov et al., 2018; Pérez-Larraya and Ducray, 2014), tandis que d'autres n'ont pas montré de bénéfice (Parr et al., 2020).

Les patients ne recevant pas le traitement concomitant sont traités par une radiothérapie hypofractionnée (40Gy en 15 fractions ou 34Gy en 10 fractions) lorsque le promoteur de *MGMT* n'est pas méthylé, et par une administration de témozolomide lorsqu'il l'est. Enfin, l'administration adjuvante de bévacicumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF (1.3.c.i Angiogenèse) est recommandée pour ces patients, bien qu'elle n'ait pas montré d'amélioration significative de la survie globale à ce jour (Pérez-Larraya and Ducray, 2014). Lorsqu'un patient ne peut pas subir de résection chirurgicale, une radiothérapie peut être démarrée deux semaines après la biopsie diagnostique afin de détruire la masse tumorale.

I.3. Nouvelles thérapies pour le glioblastome

En raison du mauvais pronostic des patients atteints de glioblastome, malgré une ablation chirurgicale suivie de radiothérapie et de chimiothérapie concomitante et adjuvante, de nombreuses thérapies alternatives ont été étudiées.

I.3.a. Amélioration des traitements existants

I.3.a.i. Protocole de chimiothérapie

◆ Témzolomide

Certaines études se sont intéressées à la durée d'administration du témozolomide adjuvant, et ont exploré jusqu'à 12 cycles de chimiothérapie, la référence étant établie à 6 cycles. Les résultats sont contrastés, avec certaines études démontrant une amélioration de la survie sans progression après 9 cycles de TMZ (Darlix et al., 2013), et de la survie globale après 9 (Darlix et al., 2013) et 12 cycles de TMZ (Quan et al., 2020). D'autres études ont cependant montré que l'administration de témozolomide jusqu'à 12 cycles permettait d'augmenter la survie sans progression des patients mais pas leur survie globale (Figure 16, (Blumenthal et al., 2017; Skardelly et al., 2017)). Ainsi, l'augmentation du nombre de cycles de TMZ n'a pas été retenue dans le traitement standard.

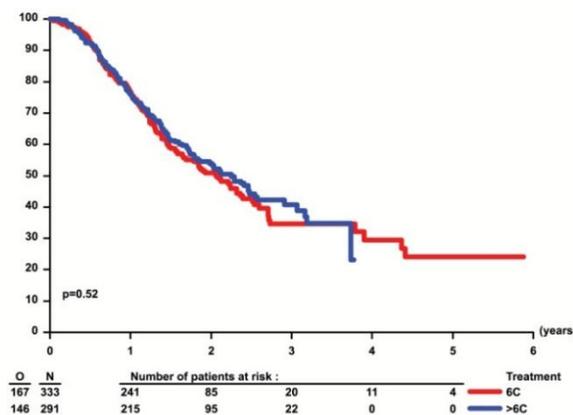


Figure 16 : Survie globale de patients atteints de glioblastome traités par témozolomide adjuvant en fonction du nombre de cycles (Blumenthal et al., 2017)

◆ Autres médicaments

D'autres agents médicamenteux peuvent être envisagés dans le traitement du glioblastome : les agents alkylants, notamment les nitrosourées telles que la carmustine (BICNU®), la lomustine (Belustine®) et la fotémustine (Muphoran®), ou les organoplatines tels que la cisplatine (Cisplatyl®) et la carboplatine (Paraplatine®), les modificateurs de l'ADN (acide désoxyribonucléique) tels que l'irinotécan (Camptosar®) et l'étoposide (Toposar™), les inducteurs d'apoptose tels que le thalidomide (Thalomid®) et les poisons du fuseau mitotique tels que la vincristine (Oncovin®) et le paclitaxel (Taxol®) (Alifieris and Trafalis, 2015; Davis, 2016; Nam and de Groot, 2017; Zanders et al., 2019).

A ce jour, aucun autre médicament que le témozolomide n'a été validé sur une population à grande échelle pour le traitement du glioblastome nouvellement diagnostiqué (Nam and de Groot, 2017). Plusieurs essais ont évalué certains médicaments de chimiothérapie en combinaison avec le bévacicumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, décrit dans la suite du document (I.3.c.i Angiogenèse). Un essai clinique randomisé de phase II a comparé la combinaison d'irinotécan et de bévacicumab à la combinaison de témozolomide et de bévacicumab et a montré qu'elle permettait d'améliorer la survie sans progression des patients avec un promoteur de *MGMT* non méthylé, moins sensibles à l'action du témozolomide, mais pas leur survie globale (Herrlinger et al., 2016).

Un autre essai randomisé de phase II a étudié cette même combinaison indépendamment du statut de méthylation du promoteur de *MGMT*, et n'a pas démontré d'effet bénéfique sur la survie des patients par rapport à une combinaison de bévaccizumab et de témozolomide (Hofland et al., 2014). Par ailleurs, un essai de phase II a montré que l'utilisation de thalidomide était sûre mais qu'elle ne permettait pas d'améliorer la survie de patients atteints de glioblastome (Alexander et al., 2013). Un essai clinique randomisé de phase III a été arrêté en raison d'une trop grande toxicité d'une chimiothérapie néo-adjuvante à base de nimustine et cisplatine (Kim et al., 2011). Enfin, un essai randomisé de phase III a démontré une amélioration de la survie globale (48,1 vs 31,4 mois) des patients avec un promoteur de *MGMT* méthylé grâce à l'ajout de lomustine au protocole standard de radiochimiothérapie (Herrlinger et al., 2019).

◆ Délivrance localisée

Des dispositifs de délivrance médicamenteuse localisée et contrôlée ont également été développés. Le dispositif GLIADEL® consiste en plusieurs implants réalisés en un polymère biodégradable et imprégnés de carmustine, un composé nitrosourée. Ces implants visent à être implantés dans la cavité d'exérèse, au contact des berges, juste après l'ablation tumorale. Plusieurs études de cohorte ont montré que ces implants permettaient d'améliorer la survie de ces patients de manière significative (Dixit et al., 2011; Xing et al., 2015).

Un essai clinique non randomisé incluant 787 patients a étudié l'apport des implants de carmustine par rapport au protocole standard de radiochimiothérapie et a montré une augmentation significative de la survie sans progression, sans pour autant améliorer la survie globale (Pallud et al., 2015). En termes d'effets indésirables, les implants de carmustine ont été principalement associés à une augmentation des infections post-opératoires (Pallud et al., 2015; Xing et al., 2015), et à une légère augmentation de l'hypertension intracrânienne dans une des études (Xing et al., 2015).

I.3.a.ii. Détournement de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) étant une des limitations principales à la délivrance de molécules thérapeutiques, certaines équipes se sont intéressées à une stratégie permettant de la contourner. Une première solution consiste à ouvrir localement les jonctions serrées de cette barrière en utilisant des agents chimiques, biologiques ou physiques (Balça-Silva et al., 2019; Chen and Liu, 2012). Par exemple, les ultrasons focalisés génèrent à la fois un stress thermique et mécanique, permettant une ouverture localisée efficace de la BHE (Lemée et al., 2015; Noch et al., 2018).

D'autre part, la formulation pharmacologique de médicaments capable d'outrepasser la BHE tels que la lomustine et le témozolomide permet une délivrance efficace (Lemée et al., 2015). Ce type de médicaments peut être administré par voie orale et nécessite des doses moins importantes que les injections en intraveineuse.

Certains médicaments peuvent également être acheminés grâce à des nanopORTEURS capables de traverser la BHE tels que les liposomes, les micelles polymères, ou encore les nanoparticules lipidiques et polymères (Balça-Silva et al., 2019; Béduneau et al., 2007). Ce type de vecteurs a déjà fait ses preuves dans plusieurs études expérimentales (Wohlfart et al., 2012), mais n'a pas permis d'améliorer le pronostic des patients à ce jour (Beier et al., 2009).

I.3.a.iii. Potentialisation de thérapies existantes

Certains agents thérapeutiques sont utilisés pour potentialiser les effets des thérapies existantes, notamment sensibiliser ou amplifier la radiothérapie et améliorer l'administration de chimiothérapie (Zanders et al., 2019).

Plusieurs études *in vitro* ont démontré les effets synergiques du fumarate de diméthyle avec le témozolomide et la radiothérapie sur des lignées de glioblastome, et un essai clinique de phase I a validé la sûreté du composé sur des patients avec un glioblastome (Shafer et al., 2020). Un essai clinique de phase I/II a évalué le potentiel thérapeutique du trans-crocétinate de sodium, qui améliore l'apport d'oxygène aux tissus en hypoxie, et a montré la tolérance et la non-toxicité du médicament, avec une amélioration prometteuse des indicateurs de survie des patients (Gainer et al., 2017). D'autres agents sont également étudiés dans le but de supprimer l'activité de MGMT, afin d'améliorer la réponse au témozolomide (Balça-Silva et al., 2019).

I.3.b. Immunothérapie

I.3.b.i. Vaccins peptidiques

Différents types de vaccins ont été évalués dans le traitement du glioblastome afin de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale, se basant notamment sur l'utilisation de peptides (I.3.c.ii Récepteurs à activité tyrosine kinase). Un essai clinique de phase I a rapporté des résultats favorables pour un vaccin peptidique basé sur la protéine de choc thermique HSP96, et d'autres essais sont actuellement en cours pour valider ces résultats préliminaires à grande échelle (Ji et al., 2018).

I.3.b.ii. Vaccins basés sur les cellules dendritiques

Un essai randomisé de phase II a évalué l'intérêt thérapeutique du vaccin ICT-107 basé sur l'injection de cellules dendritiques autologues pulsées avec des peptides (Wen et al., 2019a). Les résultats de cette étude ont montré un maintien de la qualité de vie des patients et une augmentation significative de leur survie sans progression (11,2 mois vs 9 mois).

Un autre type de vaccin utilisant des cellules dendritiques autologues chargées avec des antigènes provenant de lysats tumoraux (DCVax®-L) a été évalué dans plusieurs essais de phases I et II, avec des résultats bénéfiques et pas d'effets indésirables (Ardon et al., 2012). Les premiers résultats d'un essai randomisé de phase III encore en cours à ce jour ont montré une sûreté du vaccin et une augmentation des indicateurs de survie des patients (Liau et al., 2018).

Plusieurs études cliniques ont montré l'intérêt thérapeutique d'un autre type de vaccin basé sur des cellules dendritiques autologues et ciblant l'antigène pp65 du cytomégalovirus (Prins et al., 2008; Reap et al., 2018). Un autre essai clinique de phase I a montré une amélioration significative de la survie sans progression (25,3 vs 8 mois) et de la survie globale des patients (41,1 vs 19,2 mois, Figure 17, (Batich et al., 2017)).

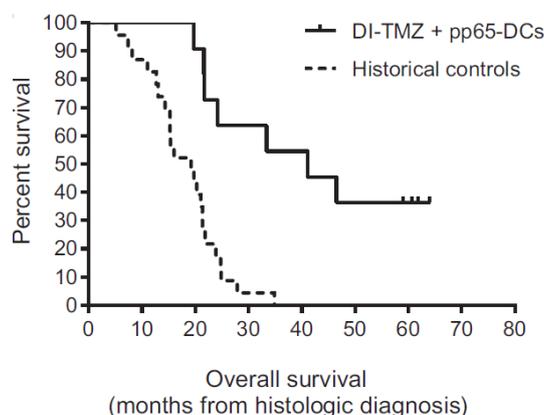


Figure 17 : Survie globale de patients avec un glioblastome traités avec un vaccin ciblant l'antigène pp65 du cytomégalovirus (Batich et al., 2017)

Enfin, un vaccin basé sur l'utilisation de cellules dendritiques autologues ciblant les cellules souches du glioblastome a permis d'augmenter la survie sans progression des patients dans un essai de phase I, sans induire d'effet indésirable (Vik-Mo et al., 2013).

I.3.b.iii. Cellules CAR

Certaines avancées thérapeutiques consistent à prélever certaines cellules du système immunitaire, à les modifier génétiquement afin de les préparer à lutter contre la tumeur puis à les réinjecter dans l'organisme des patients. L'utilisation de cellules CAR T (récepteur antigénique chimérique, *chimeric antigen receptor*) est une voie prometteuse pour le traitement du glioblastome (Bielamowicz et al., 2018; Weiss et al., 2018; Zanders et al., 2019). Un essai clinique de phase I est actuellement en cours, et les premiers résultats publiés sont prometteurs pour ce type de traitement (C. E. Brown et al., 2016). La modification de cellules CAR NK (*natural killer*) est également une stratégie étudiée (Zanders et al., 2019). Enfin, d'autres thérapies ciblant la microglie et les macrophages appartenant au microenvironnement tumoral ont également un fort potentiel thérapeutique (Poon et al., 2017).

I.3.b.iv. Vaccination personnalisée

La vaccination personnalisée basée sur des antigènes tumoraux propres à chaque tumeur a été évaluée dans un essai clinique de phase I et a montré une amélioration significative de la survie globale des patients (29 mois) et de leur survie sans progression (14,2 mois) (Hilf et al., 2019). Un autre essai clinique de phase Ib a montré que ce type de vaccination permettait d'augmenter la réponse immunitaire des patients (Keskin et al., 2019).

I.3.b.v. Immunomodulateurs

Les immunomodulateurs ont pour but de rétablir les actions du système immunitaire. Parmi eux, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire sont particulièrement étudiés dans le traitement du glioblastome, et ont pour cibles principales PD-1 (*programmed cell death 1*), PD-L1 (*PD ligand 1*) et CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*) (Nam and de Groot, 2017; Reardon et al., 2014). Un essai clinique de phase II a montré des résultats prometteurs sur l'activation du système immunitaire grâce au nivolumab, un anticorps monoclonal anti-PD-1, bien qu'il n'ait pas permis d'améliorer la survie des patients (Schalper et al., 2019).

I.3.b.vi. Thérapie génique

La thérapie génique basée sur l'utilisation de certains virus oncolytiques est également une voie thérapeutique prometteuse pour traiter les patients atteints de glioblastome. Différents types de virus tels que le parvovirus, les adénovirus, et ceux de l'herpès, de la rougeole, et de la poliomyélite ont été envisagés (Nam and de Groot, 2017; Zanders et al., 2019). Un essai randomisé de phase III a étudié un traitement basé sur un adénovirus et n'a pas montré d'amélioration de la survie des patients (Westphal et al., 2013). Les praticiens ont rapporté une légère augmentation de certains effets indésirables, principalement l'hémiplégie et l'aphasie, mais confirment l'intérêt thérapeutique d'un tel traitement, notamment pour les patients chimiorésistants.

I.3.c. Thérapie ciblée

I.3.c.i. Angiogenèse

L'angiogenèse est une cible préférentielle dans le traitement du glioblastome puisque c'est l'un des mécanismes clés du développement et de la croissance tumorale. A ce jour, plusieurs essais cliniques ont évalué les effets d'agents anti-angiogéniques, notamment le cilengitide qui cible certaines intégrines et le bévaccizumab (Avastin®), un anticorps monoclonal qui cible le VEGF.

Les résultats d'un essai clinique randomisé de phase III ont montré que l'ajout de cilengitide n'améliorait pas la survie des patients atteints de glioblastome (Stupp et al., 2014). L'étude a conclu que cet agent ne serait plus étudié après 2014, bien que les intégrines soient une cible thérapeutique intéressante. Deux autres essais cliniques randomisés de phase III ont montré que l'addition de bévaccizumab à la radiochimiothérapie améliorait la survie sans progression des patients mais pas leur survie globale (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). Les résultats de ces études ont également mis en évidence une augmentation des effets indésirables pour les patients traités avec le bévaccizumab, tels que les événements thromboemboliques, la perforation gastro-intestinale, l'hypertension, la neutropénie, les déficits neurocognitifs et l'insuffisance cardiaque. Ainsi, malgré les nombreux essais cliniques de différentes phases explorant les effets thérapeutiques du bévaccizumab dans le traitement du glioblastome nouvellement diagnostiqué, aucun n'est parvenu à montrer de réel bénéfice sur la survie des patients à ce jour (Ahir et al., 2020; Zanders et al., 2019).

I.3.c.ii. Récepteurs à activité tyrosine kinase

Les récepteurs des facteurs de croissance EGF, VEGF, PDGF et HGF sont des cibles thérapeutiques envisagées pour le traitement du glioblastome (Alifieris and Trafalis, 2015; Le Rhun et al., 2019). Un essai randomisé de phase III a été réalisé avec l'anticorps monoclonal nimotuzumab, qui cible l'EGFR, et a montré une bonne tolérance de l'agent mais pas d'amélioration de la survie des patients (Westphal et al., 2015). Des inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase tels que le vandétanib, le géfitinib et l'erlotinib ont également été évalués dans des essais de phase II, mais n'ont démontré aucune efficacité (Chakravarti et al., 2013; E. Q. Lee et al., 2015; Peereboom et al., 2010). Un essai de phase I a démontré la sûreté de l'ABT-414, un traitement prometteur qui combine un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR (dépatuxizumab) et un inhibiteur de tubuline (mafodotine), actuellement étudié dans un essai de phase II/III (Reardon et al., 2017). Enfin, le vaccin Rindopepimut (Rintega®) basé sur des peptides ciblant la variante III de l'EGFR a montré des résultats positifs dans plusieurs essais de phase II (Cuoco et al., 2018) mais s'est soldé par un échec dans un essai randomisé de phase III, ne permettant pas d'améliorer les indicateurs de survie des patients (Weller et al., 2017).

I.3.c.iii. Voies de signalisation intracellulaires

Certaines voies de signalisation fréquemment altérées dans le glioblastome telles que RAS/RAF/MEK/MAPK et PI3K/AKT/mTOR sont d'autres cibles thérapeutiques potentielles (Balça-Silva et al., 2019). Certains inhibiteurs de mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) – le temsirolimus et l'évérolimus – ont été évalués dans plusieurs essais de phases I et II mais n'ont pas permis d'améliorer la survie des patients, et ont été associés à une augmentation de certains effets indésirables (Chinnaiyan et al., 2018; Ma et al., 2015; Sarkaria et al., 2010). Des inhibiteurs de la voie MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ont également été évalués dans des essais de phases I et II, sans effet cliniquement bénéfique à ce jour (Touat et al., 2017). Ainsi, ce type de cibles devra être utilisé en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques pour permettre une amélioration clinique significative (Le Rhun et al., 2019).

I.3.c.iv. Autres cibles moléculaires

De nombreuses autres cibles moléculaires ont été envisagées pour le traitement du glioblastome (Balça-Silva et al., 2019; Le Rhun et al., 2019). L'enzastaurine, un inhibiteur de protéine kinase C, a été évaluée dans un essai de phase II sur des patients dont le promoteur de *MGMT* n'était pas méthylé, et n'a pas montré d'effet thérapeutique (Wick et al., 2013). Le vemurafenib, inhibiteur de la protéine kinase BRAF, a été évalué sur des patients porteurs de gliomes, dont quelques glioblastomes, mais l'étendue de cette étude n'a pas permis de tirer de conclusion sur une efficacité à grande échelle (Kaley et al., 2018). Certaines cytokines telles que les interférons, GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) et l'interleukine IL-2 suscitent également l'intérêt des chercheurs (Zanders et al., 2019). Enfin, plusieurs essais sont en cours afin d'évaluer le ciblage des voies du rétinoblastome et p53 (Le Rhun et al., 2019).

I.3.d. Thérapie physique

I.3.d.i. Champs de traitement de la tumeur

Les champs de traitement de la tumeur (TTFields, *Tumor Treating Fields*) sont des champs électriques alternatifs de faible intensité et de fréquence intermédiaire (200kHz) qui provoquent l'arrêt de la mitose puis l'apoptose des cellules se divisant rapidement, principalement les cellules cancéreuses. Un essai clinique randomisé de phase III a étudié l'addition des TTFields au témozolomide adjuvant sur 695 patients atteints de glioblastome (Stupp et al., 2017). Le traitement a débuté entre 4 et 7 semaines après la fin de la radiothérapie, avec une stimulation durant au minimum 18 heures par jour à l'aide du dispositif portatif Optune® (Novocure, Figure 18).

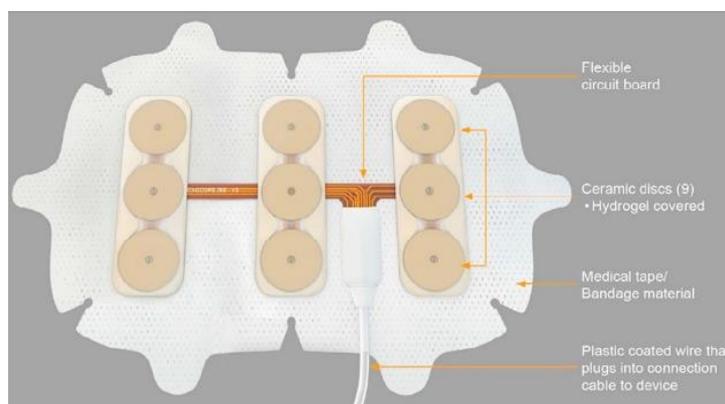


Figure 18 : Dispositif portatif Optune® permettant la délivrance de champs électriques alternatifs (Lacouture et al., 2014)

Les résultats de l'essai ont montré une amélioration significative de la survie globale des patients (20,9 vs 16 mois, Figure 19) et de leur survie sans progression (6,7 vs 4 mois). De plus, le dispositif a été bien toléré par les patients, et n'a pas induit d'augmentation des effets secondaires, si ce n'est quelques réactions cutanées locales.

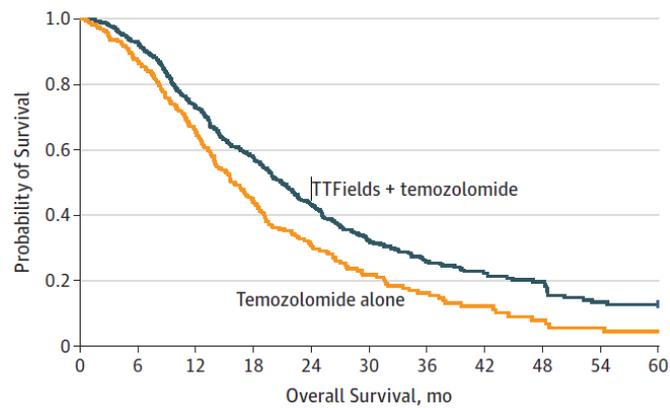


Figure 19 : Survie globale de patients avec un glioblastome traités par une addition de TTFIELDS au témozolomide adjuvant (Stupp et al., 2017)

Malgré des résultats prometteurs déjà pressentis par les premiers résultats de cet essai clinique (Stupp et al., 2015) et une approbation par la FDA en 2015, les TTFIELDS ne figurent pas encore dans le traitement standard des patients atteints de glioblastome. Ce décalage peut être expliqué par un délai nécessaire à sa mise en place à grande échelle, avec de fortes disparités entre les centres, certaines difficultés d'acceptation du dispositif et un mauvais remboursement dans certains pays (Nam and de Groot, 2017; Weller et al., 2019).

1.3.d.ii. Hyperthermie localisée

L'hyperthermie localisée est étudiée dans le traitement de certains cancers, notamment le glioblastome, puisqu'elle permet d'impacter négativement la croissance des cellules tumorales entre 40 et 44°C, et peut également sensibiliser les cellules à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Elle peut être induite localement par radiofréquence, par ultrasons, par micro-ondes, par laser et par des nanoparticules magnétiques. La sensibilisation des cellules tumorales aux traitements se fait probablement par une rupture transitoire de la barrière hémato-encéphalique, une augmentation du flux sanguin, une interférence avec certains mécanismes de réparation de l'ADN, certains changements métaboliques et une diminution des facultés de résistance à l'apoptose (Mahmoudi et al., 2018). Ses mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés, mais impliquent certaines protéines de choc thermique (HSP, *heat shock proteins*). Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'hyperthermie inhibait la croissance de cellules de glioblastome humain et augmentait leur apoptose (Kalamida et al., 2015; Mahmoudi et al., 2018). Les études *in vitro* menées sur l'hyperthermie magnétique ont montré une nécrose et une apoptose des cellules de glioblastome humain entre 40 et 46°C, et les études *in vivo* ont démontré la régression et la mort de tumeurs sur des rongeurs entre 42 et 45°C (Mahmoudi et al., 2018). Un essai clinique de phase I a montré que l'ajout d'hyperthermie magnétique à la radiothérapie n'induisait pas d'effet indésirable majeur, et permettait d'atteindre une température intratumorale de 44,6°C (Maier-Hauff et al., 2007).

Ce type de thérapie est prometteur mais présente des inconvénients notables, tels que les interférences avec tout champ électromagnétique nécessitant le retrait de tout matériel métallique dans les 40cm autour de la zone de traitement, et une contre-indication aux pacemakers et défibrillateurs. De plus, les artefacts liés à la présence des nanoparticules entraînent une impossibilité de suivre l'évolution de la tumeur par IRM, qui doit être remplacée par d'autres examens d'imagerie. Enfin, les dispositifs existants doivent être améliorés afin de garantir une température intratumorale homogène et contrôlée. En effet, le contrôle précis de la température permettrait d'optimiser les effets thérapeutiques du traitement et de réduire les effets indésirables, en évitant les dommages aux tissus sains.

I.4. Impasse thérapeutique

I.4.a. Récidive tumorale

Le glioblastome est une tumeur très invasive, caractérisée par l'infiltration du tissu sain par les cellules tumorales sur plusieurs centimètres (Wion, 2017). Ces cellules infiltrantes ne peuvent pas être retirées lors de l'exérèse chirurgicale et résistent parfois à l'ensemble des traitements, étant alors à l'origine d'une récurrence de la tumeur. Pour la majorité des patients, le glioblastome récidive dans les 9 mois suivant le début des traitements, avec une survie médiane après la progression de 3 à 5 mois en l'absence de traitement et de 7 mois pour les patients activement traités (Stupp et al., 2012). Dans 90% des cas, cette récurrence est locale et a lieu dans la zone péri-tumorale, plus précisément dans les berges d'exérèse, en raison de la forte concentration de cellules tumorales résiduelles (Figure 20, (Hamard et al., 2016; Lemée et al., 2015)).



Tumeur lors du diagnostic (a), résection totale 48h postopératoire (b), récurrence locale dans les berges d'exérèse 6 mois plus tard (c)
Figure 20 : Images IRM montrant la récurrence locale d'un glioblastome dans les berges d'exérèse (Hamard et al., 2016)

La récurrence correspond à une progression tumorale survenant après ou pendant l'ensemble des traitements administrés. Elle doit être distinguée de la pseudo-progression, un phénomène provisoire correspondant à la réponse inflammatoire déclenchée par le système immunitaire, ne présageant pas de l'efficacité des traitements (Thust et al., 2018). Ainsi, les IRM réalisées au fur et à mesure des traitements ont un rôle essentiel puisqu'elles permettent de différencier la pseudo-progression de la récurrence, et d'orienter les patients vers les traitements adéquats.

I.4.b. Facteurs de la récurrence

I.4.b.i. Difficulté d'administration des traitements

La récurrence du glioblastome peut d'abord être expliquée par une difficulté à détruire la totalité des cellules tumorales provenant de la tumeur primaire, alors susceptibles de récidiver. En effet, la localisation intracérébrale de ce type de tumeur restreint le dépistage de routine et limite l'utilisation de traitements trop agressifs (Wion, 2017). De plus, la chirurgie est parfois inenvisageable de par l'accès restreint à la tumeur, située trop en profondeur ou à proximité de zones fonctionnelles. Les agents thérapeutiques doivent également être acheminés jusqu'au cerveau, protégé par la barrière hémato-encéphalique qui empêche la pénétration des molécules thérapeutiques. Cette barrière biologique limite fréquemment l'adaptation de certaines thérapies expérimentales vers le stade clinique (Balça-Silva et al., 2019; Noch et al., 2018).

I.4.b.ii. Vascularisation excessive

Le glioblastome est également caractérisé par une densité vasculaire élevée, en raison d'une forte néovascularisation grâce aux mécanismes d'angiogenèse et de vasculogenèse (Hardee and Zagzag, 2012; Lemée et al., 2015). Cependant, cette vascularisation est particulièrement désordonnée et hétérogène, ce qui permet aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire et d'infiltrer le tissu sain (Ahir et al., 2020). De plus, elle compromet l'acheminement d'agents thérapeutiques et d'oxygène vers la tumeur (Stadlbauer et al., 2018). La formation de zones d'hypoxie favorise à son tour l'angiogenèse, en stimulant l'expression de certains facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF, l'HGF, le PDGF, TGF- β (*transforming growth factor*), les MMPs (*métalloprotéinases matricielles*) et les angiopoïétines (Ahir et al., 2020; Hardee and Zagzag, 2012).

I.4.b.iii. Traitements lésionnels

Les traitements actuellement utilisés pour le glioblastome sont particulièrement lésionnels et pourraient participer à l'accélération de la récurrence tumorale. Il convient de préciser que ces considérations ne remettent aucunement en cause l'intérêt thérapeutique de la chirurgie, de la chimiothérapie et de la radiothérapie dans la prise en charge du glioblastome. D'une part, la radiothérapie et la chimiothérapie peuvent induire la reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches cancéreuses, impliquées dans la progression et la récurrence du glioblastome. La lésion créée par la radiothérapie peut également entraîner une réaction inflammatoire ainsi que l'infiltration des cellules de glioblastome (Wion, 2017).

D'autre part, plusieurs études ont montré que l'acte chirurgical en lui-même induisait un stress et une inflammation favorables à la croissance tumorale (Coffey et al., 2006; Lee et al., 2009). En effet, la chirurgie se traduit par un stress oxydatif et par l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires – notamment IL-6, IL-1 β et TNF- α (*tumor necrosis factor*) – qui promeuvent la prolifération et la migration des cellules tumorales (Hamard et al., 2016; O'Leary et al., 2016). Une étude expérimentale basée sur un modèle murin de récurrence de gliome a montré que la lésion chirurgicale induisait diverses altérations des astrocytes réactionnels présents dans le microenvironnement péri-tumoral, pouvant modifier certains processus tumoraux (Okolie et al., 2016). De plus, cette équipe a également étudié les effets du stress chirurgical sur la croissance cellulaire *in vitro*, et a montré qu'il promouvait à la fois la prolifération et la migration de cellules tumorales murines (GL261) et humaines (U251 et U87) (Okolie et al., 2016). D'autres études expérimentales et cliniques ont démontré que l'exérèse chirurgicale était suivie par une accélération de la croissance tumorale par rapport à celle des tumeurs primaires (Coffey et al., 2006). Certaines études ont également montré que le stress chirurgical induisait une augmentation du nombre de cellules tumorales circulantes, alors capables de se disséminer dans l'organisme pour former des métastases (Demicheli et al., 2008; O'Leary et al., 2016; Retsky et al., 2008). De plus, il semblerait que le stress chirurgical agisse comme un déclencheur sur les cellules tumorales en dormance, tant pour les cellules souches cancéreuses résiduelles que les micrométastases (Baum et al., 2005; O'Leary et al., 2016; Wion, 2017). Enfin, le processus de cicatrisation provoqué par la chirurgie participe à la récurrence, notamment par la néovascularisation (Hamard et al., 2016). En effet, le stress chirurgical est associé à une surexpression de certains facteurs de croissance tels que le VEGF et l'EGF, et favorise l'angiogenèse (Lee et al., 2009; O'Leary et al., 2016; Retsky et al., 2008).

I.4.c. Mécanismes de résistance aux traitements

La récurrence du glioblastome peut également être expliquée par des mécanismes de résistance aux traitements, tels que l'expulsion des agents de chimiothérapie par les pompes d'efflux, la diminution de l'absorption cellulaire des médicaments ou encore la réparation de leur action cytotoxique (J. Zhang et al., 2012).

I.4.c.i. Hétérogénéité intratumorale

Le glioblastome est une tumeur caractérisée par son hétérogénéité, dans laquelle coexistent des cellules tumorales appartenant à différents sous-groupes génétiques. Par exemple, les deux statuts de méthylation du promoteur de *MGMT* ont été retrouvés dans une même masse tumorale, impliquant différents niveaux de réponse aux traitements (Qazi et al., 2017). Ainsi, un agent thérapeutique ne ciblera pas les populations tumorales d'une même masse de manière identique, limitant l'efficacité des monothérapies et favorisant les mécanismes d'échappement (Noch et al., 2018). De plus, la vascularisation anormale et la présence de zones de nécrose entraînent une distribution hétérogène des médicaments dans les tumeurs (Alexander and Cloughesy, 2017).

L'hétérogénéité du glioblastome se traduit également par l'existence d'une zone péritumorale de plusieurs centimètres, présentant un aspect macroscopique semblable au cerveau sain (Lemée et al., 2015). Cette zone est associée à de nombreuses altérations génétiques et à l'expression de certains marqueurs de néovascularisation, et se traduit par la présence de cellules tumorales résiduelles. Ces cellules prolifèrent plus rapidement que celles situées au centre de la tumeur, sont plus invasives et répondent différemment aux traitements. De plus, cette zone est caractérisée par des astrocytes réactionnels, qui promeuvent la croissance et l'invasion tumorale en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et certains facteurs de croissance tels que TGF- α (Lemée et al., 2015).

Enfin, il semblerait qu'il existe différents types de tumeurs récidivantes, certaines provenant d'une récurrence linéaire et partageant de fortes similarités génétiques avec la tumeur primaire, et d'autres provenant d'une évolution conduisant à la formation de populations cellulaires divergentes (Osuka and Meir, 2017). En effet, certaines analyses réalisées sur des échantillons de tumeurs récidivantes ont montré qu'elles ne partageaient qu'une partie des mutations génétiques de la tumeur primaire. De plus, certains traitements – notamment le TMZ – peuvent faire évoluer ces signatures génétiques, entraînant alors la création de sous-clones résistants aux traitements (Noch et al., 2018; Qazi et al., 2017).

I.4.c.ii. Cellules souches cancéreuses

Le glioblastome est également composé de cellules souches tumorales, caractérisées par leur capacité de renouvellement et de clonogénie (O'Leary et al., 2016). Ces cellules constituent un facteur majeur de résistance aux traitements puisqu'elles confèrent au glioblastome une résistance à la chimiothérapie, à la radiothérapie, ainsi qu'à l'immunothérapie. De plus, elles peuvent participer à la formation d'une masse tumorale secondaire malgré la résection de la tumeur primaire (Noch et al., 2018).

I.4.c.iii. Altérations génétiques

◆ Méthylation du promoteur de *MGMT*

La résistance des patients à certains agents alkylants, notamment le témozolomide, peut être expliquée par certaines caractéristiques génétiques. L'action cytotoxique du TMZ se fait par une alkylation de la guanine en position O⁶ et N⁷, entraînant des processus d'apoptose cellulaire et de sénescence, et pouvant être réparée par l'enzyme *MGMT* (Perazzoli et al., 2015; Tiek et al., 2018).

Lorsque le promoteur du gène *MGMT* est méthylé, l'activité de l'enzyme associée est amoindrie et ne permet plus de réparer les lésions induites par le TMZ (J. Zhang et al., 2012). De ce fait, la méthylation du promoteur de *MGMT* est associée à de meilleures réponses au témozolomide chez les patients, et à une augmentation de leur survie globale (Figure 21, (Hegi et al., 2005)) et de leur survie sans progression. L'inhibition du fonctionnement de *MGMT* est l'une des stratégies thérapeutiques prometteuses pour le traitement du glioblastome (J. Zhang et al., 2012).

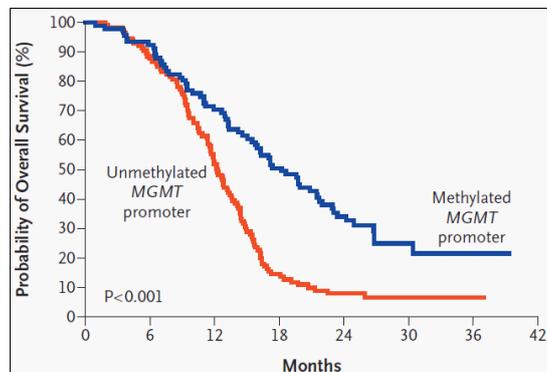


Figure 21 : Survie globale de patients avec un glioblastome selon la méthylation du promoteur de *MGMT* (Hegi et al., 2005)

◆ Mutations de *TP53*

D'autres altérations génétiques telles que les mutations de *TP53* pourraient être impliquées dans cette résistance. Le facteur de transcription p53 associé régule certains gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. L'inactivation de ce facteur entraîne une incapacité à maintenir l'intégrité du génome et favorise la croissance tumorale (Hientz et al., 2017; Kim et al., 2005). De manière générale, les mutations de *TP53* sont considérées comme un facteur de mauvais pronostic, puisqu'elles sont associées à une aggravation des métastases et une augmentation de la résistance aux traitements (Hientz et al., 2017). Plusieurs études ont notamment démontré que les cellules de glioblastome comportant des mutations de *TP53* étaient associées à une plus grande résistance au TMZ. Ce résultat pourrait notamment être expliqué par une corrélation entre ces mutations et la surexpression de *MGMT*, sans lien avec la méthylation dudit promoteur (Hermisson et al., 2006; Wang et al., 2014, 2013). Une autre étude a montré que des cellules de glioblastome déficientes en p53 étaient plus sensibles au TMZ que les cellules avec un gène de type sauvage, mais est en désaccord avec le reste de la littérature scientifique (Blough et al., 2011). En clinique, les mutations de *TP53* sont un facteur de mauvais pronostic, car elles sont associées à une diminution de la survie globale des patients (Figure 22, (Wang et al., 2014)).

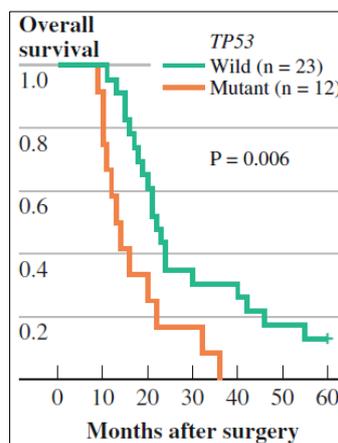


Figure 22 : Survie globale de patients avec un glioblastome selon le statut de mutation de *TP53* (Wang et al., 2014)

◆ Autres

Une forte corrélation a été établie entre la résistance au témozolomide et la surexpression de MGMT ainsi qu'une déficience en p53, mais il existe d'autres mécanismes de résistance indépendants de ces deux voies (Blough et al., 2011; Lee, 2016). Par exemple, plusieurs études ont démontré une corrélation entre la résistance au TMZ et le dysfonctionnement du système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR, *mismatch repair*) (Perazzoli et al., 2015; J. Zhang et al., 2012).

I.4.d. Solutions thérapeutiques

A ce jour, aucun protocole standard n'a été validé pour le traitement de la récurrence du glioblastome et l'inclusion des patients dans de nouveaux essais thérapeutiques est fortement recommandée. Lorsque l'état de santé des patients ne leur permet pas de recevoir des traitements lourds, des soins de support sont administrés afin de les soulager au maximum (Nam and de Groot, 2017). Lorsque les patients ont un bon état de santé global, ils peuvent être traités par différentes thérapies, seules ou en concomitance. La médiane de survie des patients avec un glioblastome est de 7 mois après la récurrence avec des traitements actifs (Stupp et al., 2012).

I.4.d.i. Nouvelle chirurgie

Une nouvelle opération chirurgicale peut être proposée aux patients si leur état de santé le permet (KPS \geq 70, Annexe 2), et doit avoir lieu au moins 6 mois après la première exérèse (Weller et al., 2019). Il faut également que la tumeur soit opérable, c'est-à-dire qu'elle soit localisée, avec un volume tumoral faible et sans envahissement des zones fonctionnelles (Nam and de Groot, 2017). La chirurgie permet de soulager certains effets dus à la masse tels que les crises d'épilepsie, les déficits moteurs et ceux de la parole. Elle permet également d'obtenir un échantillon de tissu tumoral afin de réaliser certains tests moléculaires et d'adapter les traitements en conséquence (Davis, 2016).

Un essai clinique de phase II a montré que lors de la première récurrence, la survie des patients opérés était comparable à celle des patients non opérés. Cependant, cette étude a également montré que pour les patients opérés, une résection totale de la tumeur avec prise de contraste (CRET, *complete resection of enhancing tumor*) permettait d'améliorer leur survie de manière significative, passant de 6,5 à 12,9 mois (Figure 23, (Suchorska et al., 2016)).

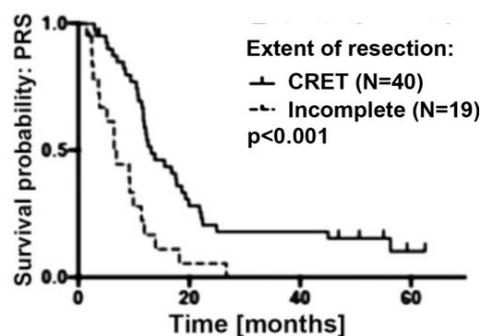


Figure 23 : Survie globale en fonction de l'étendue de la résection tumorale, adapté de (Suchorska et al., 2016)

I.4.d.ii. Nouvelle irradiation

Les patients peuvent également être irradiés à nouveau, à condition que la tumeur récidivante ait un volume réduit et soit bien délimitée, excluant les tumeurs diffuses (Nam and de Groot, 2017; Weller et al., 2019). De préférence, elle doit être localisée en dehors de la zone de traitements de première intention, puisque les doses administrables sur une même zone sont limitées. En effet, les irradiations répétées augmentent le risque de nécrose du tissu sain (Davis, 2016).

Toutefois, une nouvelle irradiation dans la même zone est envisageable lorsque la réponse à la radiothérapie était durable lors de la première administration (Nam and de Groot, 2017).

I.4.d.iii. Chimiothérapie de seconde ligne

La majorité des patients est traitée avec de nouvelles cures de chimiothérapie, dont le protocole d'administration et le type de médicaments utilisés sont adaptés à chaque cas.

◆ Témozolomide

Une première option est de reprendre la prise de témozolomide, notamment lorsque le patient a montré une réponse prolongée au témozolomide lors de la prise initiale, en veillant à avoir une interruption des traitements entre les deux sessions (Nam and de Groot, 2017; Weller et al., 2019).

◆ Autres médicaments

D'autres médicaments peuvent également être administrés, principalement pour les patients montrant des signes de progression sous témozolomide lors de la prise initiale (Nam and de Groot, 2017). Les nitrosourées telles que la lomustine, la carmustine et la fotémustine, et les organoplatines tels que la carboplatine sont des agents alkylants qui peuvent être utilisés en tant qu'agent unique ou bien en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques (Davis, 2016; Weller et al., 2019). Une combinaison de procarbazine, lomustine et vincristine, appelée PCV, est également étudiée (Alifieris and Trafalis, 2015). Enfin, des modificateurs de l'ADN tels que l'étoposide et l'irinotécan sont également envisageables (Davis, 2016).

La plupart des agents de chimiothérapie envisagés pour un traitement de seconde ligne ont été évalués en comparaison ou en combinaison avec le bévacizumab. Un essai randomisé de phase II a évalué les effets thérapeutiques du bévacizumab en combinaison avec l'irinotécan ou le témozolomide à forte dose, et les deux traitements combinés ont montré une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale des patients, étant de 7,7 mois pour l'irinotécan et de 9,4 mois pour le témozolomide (Gilbert et al., 2017). Un essai randomisé de phase II a montré que la fotémustine avait des effets thérapeutiques comparables à ceux du bévacizumab, avec une médiane de survie de 8,7 mois par rapport à 7,3 mois, mais des toxicités différentes, avec un choix préférentiel de la fotémustine pour les patients avec des problèmes cardiovasculaires (Brandes et al., 2016b). Un autre essai randomisé de phase II a comparé une combinaison de bévacizumab à faible dose et de lomustine au bévacizumab seul, et a montré une amélioration des indicateurs de survie pour le traitement combiné pour les patients étant à leur première récurrence, devant être confirmée à grande échelle (Weathers et al., 2016). Enfin, un essai randomisé de phase II a évalué la carboplatine en combinaison avec le bévacizumab et a montré une augmentation de la toxicité du traitement, sans bénéfice clinique pour les patients (Field et al., 2015).

◆ Implants de carmustine

Si l'exérèse peut avoir lieu, la mise en place d'implants de carmustine (GLIADEL®) par le neurochirurgien peut être discutée. Un essai randomisé a montré une nette amélioration de la survie globale des patients avec des implants de carmustine par rapport au placebo, passant de 5,3 à 7,1 mois, sans effets indésirables notables (Brem et al., 1995). Un essai randomisé de phase III a confirmé les effets thérapeutiques des implants de carmustine par la suite, avec une survie médiane de 8,8 mois (Kunwar et al., 2010).

I.4.d.iv. Immunothérapie

◆ Thérapie cellulaire

Dans un essai de phase I, des cellules CAR T autologues dirigées contre l'EGFRvIII ont été injectées dans l'organisme de patients avec un glioblastome récidivant et ont montré des résultats prometteurs, devant être confirmés par des études à grande échelle (O'Rourke et al., 2017).

Un essai de phase I a évalué le vaccin Gliovac™, basé sur l'injection de cellules et de lysats tumoraux provenant des patients, et a montré une bonne tolérance et une amélioration de leur survie globale (Schijns et al., 2015). Un autre essai randomisé de phase II a évalué ce vaccin en combinaison avec le bévacicumab, et a montré une bonne tolérance du traitement ainsi qu'une amélioration significative de la survie globale des patients, passant de 7,5 mois avec le placebo à 12 mois avec le traitement combiné (Bota et al., 2018).

◆ Immunomodulateurs

Un essai randomisé a évalué le pembrolizumab, un anticorps monoclonal anti PD-1, en tant que traitement néo-adjuvant du glioblastome récidivant. Les résultats de cette étude ont montré qu'une administration précoce de pembrolizumab avant la chirurgie était bien tolérée par les patients et permettait d'améliorer significativement leur survie globale, passant de 7,5 à 13,7 mois (Figure 24, (Cloughesy et al., 2019)).

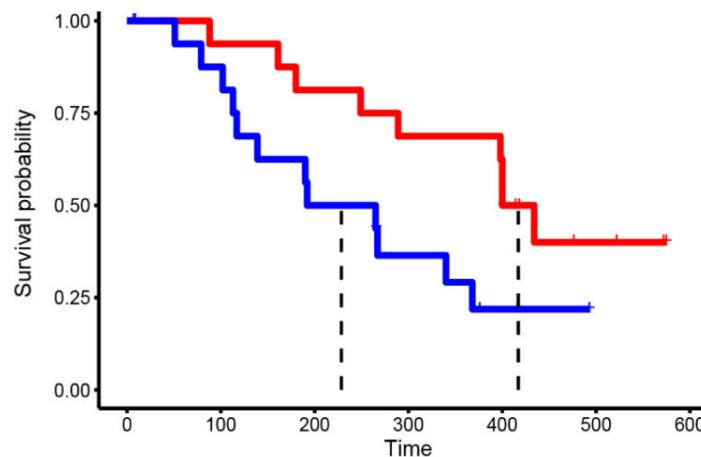


Figure 24 : Survie globale de patients avec (rouge) ou sans (bleu) pembrolizumab néoadjuvant (Cloughesy et al., 2019)

Un essai clinique randomisé de phase III a comparé les effets thérapeutiques du bévacicumab au nivolumab, un autre anticorps monoclonal dirigé contre PD-1, et n'a pas rapporté de différence significative entre les deux traitements en termes de survie globale ou d'effets indésirables (Reardon et al., 2020).

◆ Thérapie génique

Enfin, un essai de phase I a évalué un traitement basé sur l'injection intratumorale de poliovirus recombinant, et a montré une bonne tolérance des patients, avec une amélioration de leur survie globale (Desjardins et al., 2018).

I.4.d.v. Thérapie ciblée

De nouveaux essais cliniques ont exploré la thérapie moléculaire ciblant des récepteurs de facteurs de croissance (EGFR, VEGFR, PDGFR) ou bien certaines voies de transduction du signal impliquées dans la prolifération telles que RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT/mTOR (Nam and de Groot, 2017).

◆ Angiogenèse

Une autre voie thérapeutique pour le traitement du glioblastome récidivant est l'utilisation du bévaccizumab, mais son utilisation n'a pas encore été validée en Europe en raison du manque de preuves tangibles (Stupp et al., 2012). A ce jour, les essais cliniques ont montré une amélioration de la survie sans progression mais pas de la survie globale des patients. Un essai randomisé de phase II a étudié les effets du bévaccizumab seul ou en combinaison avec l'irinotécan et a montré que les deux traitements étaient bien tolérés et actifs pour le glioblastome récidivant (Friedman et al., 2009). Le bévaccizumab a alors été approuvé par la FDA aux États-Unis en 2009 pour le traitement du glioblastome récidivant (Davis, 2016). Ensuite, un essai randomisé de phase II a étudié le bévaccizumab en combinaison avec la lomustine, et a montré que le traitement combiné était plus efficace que la monothérapie, recommandant une association du bévaccizumab avec d'autres thérapies (Taal et al., 2014). Enfin, un essai randomisé de phase III a comparé la combinaison de bévaccizumab et de lomustine à la lomustine seule, et a montré que le traitement combiné permettait d'améliorer la survie sans progression des patients mais pas leur survie globale (Wick et al., 2017). Ainsi, bien qu'il ne permette pas d'améliorer la survie globale des patients, cet anticorps permet de réduire l'œdème péri-tumoral, d'améliorer l'oxygénation des tissus et de réduire la nécrose due aux radiations. Les effets indésirables qui lui ont été associés sont l'hypertension, le risque hémorragique et de coagulation, la mauvaise cicatrisation et la perforation intestinale (Davis, 2016; Nam and de Groot, 2017). Le cilengitide, un autre inhibiteur de l'angiogenèse qui cible les intégrines, a été évalué dans un essai randomisé de phase II. Cette étude a montré des résultats prometteurs avec une bonne tolérance des patients et une amélioration des indicateurs de survie, devant être confirmés par un essai de phase III (Figure 25, (Reardon et al., 2008)).

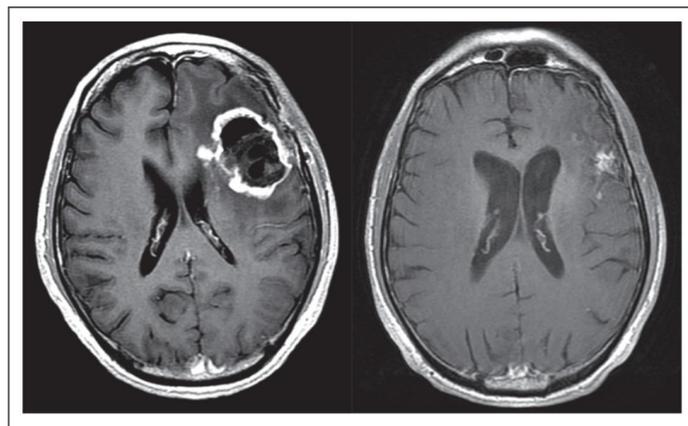


Fig 2. T1-weighted magnetic resonance imaging after gadolinium administration of a representative radiographic response to cilengitide in a patient with recurrent glioblastoma multiforme who achieved a partial response.

Figure 25 : Évolution sous IRM du glioblastome d'un patient traité par cilengitide (Reardon et al., 2008)

◆ Récepteurs à activité tyrosine kinase

De nombreux essais se sont intéressés à l'inhibition de récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'EGFR. L'erlotinib, un inhibiteur de tyrosine kinase ciblant l'EGFR, n'a pas montré de bénéfice thérapeutique pour les patients dans un essai randomisé de phase II (van den Bent et al., 2009).

Un essai randomisé de phase II a étudié l'afatinib, un autre inhibiteur de tyrosine kinase ciblant l'EGFR, et a montré que cet agent ne permettait pas d'améliorer la survie des patients, qu'il soit utilisé en combinaison avec le témozolomide ou en monothérapie (Reardon et al., 2015).

Par la suite, un essai de phase I a investigué les effets de l'ABT-414, qui combine le dépatuxizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR, et la mafodentine, un inhibiteur de tubuline. Les résultats ont montré que ce traitement permettait d'améliorer les indicateurs de survie des patients mais induisait une toxicité oculaire, et devront être confirmés par des essais à plus grande échelle (Lassman et al., 2019; van den Bent et al., 2017). Un essai de phase II a montré que l'ABT-414 utilisé en combinaison avec le témozolomide pouvait être envisagé pour les patients avec un glioblastome récidivant et une amplification de l'EGFR, permettant une amélioration de la survie sans progression et de la survie globale des patients (Figure 26, (Van Den Bent et al., 2020)).

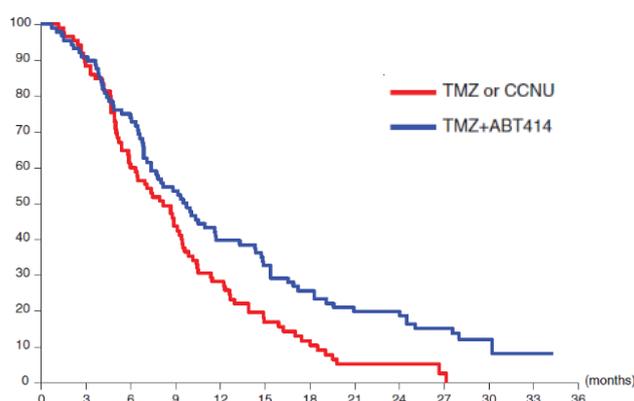


Figure 26 : Survie globale de patients traités par témozolomide et ABT-414 (Van Den Bent et al., 2020)

Le cediranib, un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase pour le VEGF, a été étudié dans un essai randomisé de phase III en monothérapie et en combinaison avec la lomustine, et n'a pas montré d'amélioration des indicateurs de survie des patients par rapport à la lomustine seule (Batchelor et al., 2013). Par la suite, un essai randomisé de phase II a évalué le cediranib en combinaison avec le gefitinib, un inhibiteur de l'EGFR, et a montré des résultats prometteurs concernant les indicateurs de survie des patients, devant être confirmés par des essais à grande échelle (N. Brown et al., 2016). Un essai randomisé de phase II a montré qu'un autre inhibiteur de récepteurs à activité tyrosine kinase, le régorafénib, permettait d'améliorer la survie sans progression des patient ainsi que leur survie globale par rapport à la lomustine seule (7,4 mois vs 5,6 mois, (Lombardi et al., 2019)). Enfin, le cabozantinib, un inhibiteur de récepteurs à activité tyrosine kinase, a été évalué dans un essai de phase II et n'a pas permis d'améliorer la survie des patients (Cloughesy et al., 2018; Wen et al., 2018).

◆ Voies de signalisation intracellulaires

Une autre stratégie de ciblage moléculaire est l'inhibition de certaines voies de signalisation intracellulaires. Un essai de phase II a montré que le TLN-4601, un inhibiteur de la voie de signalisation RAF/RAF/MAPK, était bien toléré par les patients mais ne permettait pas d'améliorer leur survie en monothérapie (Mason et al., 2012). Des inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR ont également été étudiés, notamment le temsirolimus, un inhibiteur de mTOR, qui a été bien toléré par les patients d'un essai de phase II, sans induire d'effet thérapeutique bénéfique à leur survie (Chang et al., 2005).

Par la suite, plusieurs essais de phases I et II ont combiné le temsirolimus avec d'autres agents thérapeutiques tels que l'erlotinib (Wen et al., 2014), le sorafénib (Lee et al., 2012) et le bévaccizumab (Lassen et al., 2013), mais n'ont pas permis de mettre en évidence un effet bénéfique sur la survie des patients.

Un inhibiteur de PI3K, le buparlisib, a également été évalué dans un essai de phase II et n'a pas démontré d'amélioration clinique, probablement en raison d'un blocage incomplet de la voie PI3K dans le tissu tumoral, suggérant la nécessité de développer des inhibiteurs de PI3K plus efficaces pour de futures études (Wen et al., 2019b).

◆ Autres cibles moléculaires

L'enzastaurine, un inhibiteur de protéine kinase C, a été comparé à la lomustine dans un essai randomisé de phase III, et les patients ont montré une bonne tolérance et moins de toxicité hématologique, bien que le traitement n'ait pas permis d'améliorer leur survie (Wick et al., 2010). Enfin, la combinaison de galunisertib, un inhibiteur du TGF- β , et de lomustine n'a pas permis d'améliorer la survie des patients dans un essai randomisé de phase II (Brandes et al., 2016a).

I.4.d.vi. Thérapie physique

◆ Champs de traitement de la tumeur

Les champs de traitement de la tumeur ont été approuvés par la FDA en 2011 pour les patients atteints de glioblastome récidivant (Davis, 2016). Cependant, un essai randomisé de phase III a démontré que les TFields ne permettaient pas d'améliorer significativement la survie des patients par rapport à l'administration de chimiothérapie (Stupp et al., 2012). En réalité, les conclusions de cette étude rapportent une diminution des effets indésirables, avec une irritation mineure du cuir chevelu, ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie des patients favorables à l'utilisation des TFields.

◆ Ultrasons

Un essai clinique de phase I/IIa a montré que l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique à l'aide d'un système à ultrasons était bien toléré par les patients et pouvait permettre d'optimiser la délivrance de chimiothérapie dans le cerveau (Carpentier et al., 2016).

◆ Hyperthermie magnétique

Un essai clinique de phase II mené sur des patients avec un glioblastome récidivant a montré que l'utilisation d'hyperthermie magnétique lors de la radiothérapie pouvait permettre d'améliorer la survie des patients de manière sûre, en atteignant une température intratumorale de 51,2°C (Maier-Hauff et al., 2011).

Dans ce premier chapitre, nous avons introduit le glioblastome et la problématique de sa récurrence, avec une survie médiane des patients de seulement 15 mois après le diagnostic avec l'ensemble des traitements. De ce fait, il existe un besoin urgent de développer des solutions thérapeutiques efficaces permettant d'améliorer la survie des patients. Nous avons expliqué qu'un des facteurs clés de la récurrence était l'activation de cellules tumorales résiduelles disséminées au-delà de la cavité d'exérèse, passant alors d'un état de dormance à un état prolifératif. Les cellules résiduelles étant capable d'infiltrer le parenchyme sain sur plusieurs centimètres, les traitements destructeurs n'ont pas montré de réel bénéfice clinique à ce jour. Ainsi, des stratégies thérapeutiques permettant de maintenir les cellules en dormance pendant une durée prolongée sont à envisager.

Chapitre II

Hypothermie thérapeutique

Dans ce second chapitre, nous allons présenter l’hypothermie thérapeutique, notamment ses mécanismes d’actions ainsi que différentes méthodes de refroidissement. Principalement utilisée pour ses effets neuroprotecteurs, elle permet également de diminuer le métabolisme cellulaire. Ainsi, l’hypothermie pourrait être envisagée comme une stratégie thérapeutique permettant de maintenir les cellules tumorales en dormance. En effet, contrairement à la cryogénie utilisée pour détruire certaines tumeurs avec des températures très basses, l’hypothermie thérapeutique est principalement utilisée à des niveaux légers et modérés.

II.1. Généralités

II.1.a. Définitions

II.1.a.i. Thermorégulation

L’Homme est un être vivant **homéotherme** : il maintient une température corporelle constante indépendamment de la température environnante, grâce à un métabolisme rapide. La température corporelle de référence – ou **normothermie** – est de **37°C**, avec un état d’hyperthermie au-delà de 38°C et d’hypothermie en dessous de 36°C (Figure 27). Pour maintenir cette thermorégulation, un certain nombre de processus physiologiques sont mis en place. En cas d’hyperthermie, l’organisme peut évacuer la chaleur par transpiration, alors qu’en situation d’hypothermie, il peut en produire par contraction musculaire, tout en minimisant les pertes thermiques par vasoconstriction et piloérection (Biga et al., 2020; Romanovsky, 2018).

II.1.a.ii. Hypothermie thérapeutique

L’hypothermie thérapeutique se définit par la réduction intentionnelle et contrôlée de la température d’un organisme homéotherme en dessous de 36°C. Son **niveau** est défini en fonction de la plage de température atteinte : elle est dite **légère** (32°C – 36°C), **modérée** (28°C – 32°C), **sévère** (20°C – 28°C), voire profonde (< 20°C) (Hildebrand et al., 2004; Kurisu et al., 2019; Saigal et al., 2015).

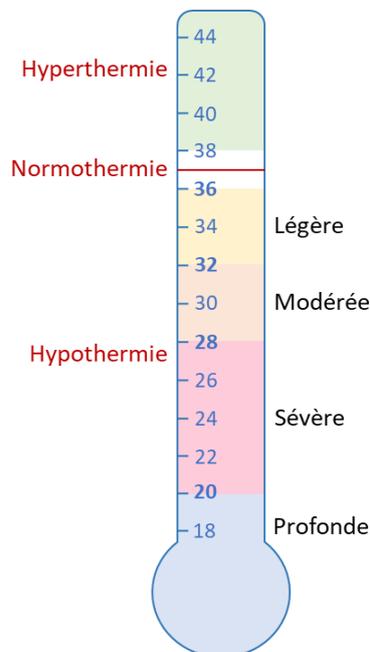


Figure 27 : Hyperthermie, normothermie et différents niveaux d'hypothermie

II.1.b. Historique

II.1.b.i. De l'Antiquité au XIX^{ème} siècle

L'utilisation d'hypothermie à des fins thérapeutiques débute dès l'Antiquité, comme le témoigne le papyrus Edwin Smith (1600 av. J.C., Figure 28), le plus vieux document médical retrouvé à ce jour. En Grèce Antique, Hippocrate enseigne l'hypothermie comme une thérapie locale permettant de soigner les patients souffrant du tétanos, réduire les hémorragies ainsi que les douleurs. Il se base notamment sur le fait qu'une exposition au froid réduit les sensations lors d'un engourdissement. Au Moyen Âge, quelques écrits attestent de son utilisation pour traiter les fortes fièvres, avec une immersion des malades dans de l'eau froide.

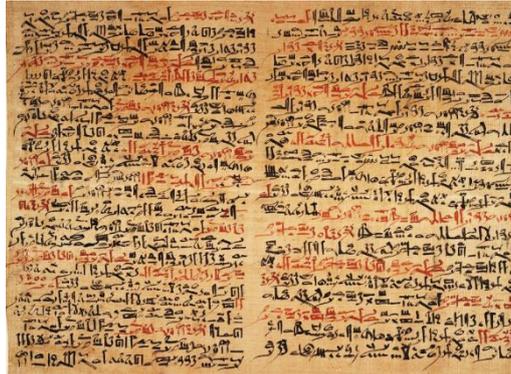


Figure 28 : Papyrus Edwin Smith, adapté de <https://ceb.nlm.nih.gov>

L'idée d'immerger un corps dans de l'eau glacée est reprise pendant la Renaissance pour traiter diverses pathologies telles que les coliques néphrétiques à répétition (Bohl et al., 2018). Au XVIII^{ème} siècle, les scientifiques commencent à étudier les effets de l'hypothermie sur différentes fonctions physiologiques et développent les premiers dispositifs de refroidissement. Le chirurgien John Hunter réalise une série de tests sur des animaux et découvre notamment que les êtres vivants produisent de la chaleur.

Par la suite, le médecin James Currie étudie l'hypothermie à des fins thérapeutiques sur des sujets humains, notamment le traitement de la fièvre. Il effectue les premiers relevés réguliers de température sur des patients, introduit la notion de température dans le processus de diagnostic et consigne l'ensemble de ses travaux dans un rapport médical publié en 1797 (Forrester, 2000; Wang et al., 2006). Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas clairement identifiés, les maladies sont perçues comme un excès de chaleur qui peut être réduit grâce à l'hypothermie, alors appliquée en disposant des blocs de glace sur les patients ou en les immergeant dans des bains glacés (Bohl et al., 2018). Au XIX^{ème} siècle, l'hypothermie est utilisée en chirurgie, comme lors de la campagne militaire de 1812 où le Dr Larrey, chirurgien en chef de l'armée de Napoléon, place les membres destinés à une amputation dans de la glace afin de rendre l'opération moins douloureuse. En 1892, William Osler parvient à diviser par plus de trois la mortalité due à la fièvre typhoïde en appliquant une hypothermie généralisée aux patients (Karnatovskaia et al., 2014; Wang et al., 2006).

II.1.b.ii. XX^{ème} siècle

A partir de 1938, le neurochirurgien Temple Fay (Figure 29) étudie les effets de l'hypothermie sur différents processus cellulaires, démontrant d'abord que l'hypothermie parvient à inhiber le développement d'embryons de poulet, puis qu'elle parvient à réduire la croissance de cellules tumorales (Bohl et al., 2018). Il entreprend ensuite de traiter les douleurs de patients atteints de cancers métastatiques en maintenant leur organisme à 32°C pendant plusieurs heures, et parvient à les soulager dans plus de 95% des cas, tout en maintenant une faible mortalité.

Il parvient ensuite à réduire la taille des tumeurs et à faire régresser les métastases de certains patients en appliquant une hypothermie localisée. Temple Fay découvre également que l'hypothermie diminue l'inflammation, améliore la cicatrisation, réduit les œdèmes et inhibe la prolifération bactérienne.

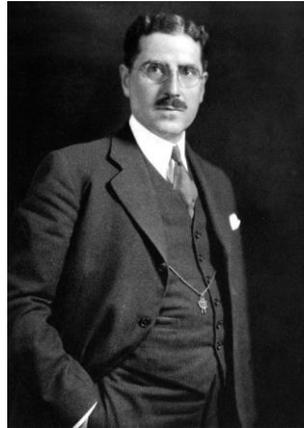


Figure 29 : Dr. Temple Fay, pionnier de l'hypothermie thérapeutique(Bohl et al., 2018)

Suite à des plaintes du personnel soignant quant à la difficulté de suivre les constantes vitales des patients, Temple Fay conçoit de nouveaux instruments capables de mesurer des températures bien plus faibles. Il développe également la première couverture refroidissante, qui fonctionne grâce à la circulation de fluides refroidis, un casque refroidissant visant à traiter diverses pathologies cérébrales, ainsi que de nouveaux instruments implantables permettant d'administrer une hypothermie localisée. Il met notamment au point une capsule métallique irriguée par des solutions froides, qu'il plante dans la cavité tumorale après l'ablation d'une tumeur cérébrale, parvenant à améliorer l'état de santé des patients (Figure 30B, Figure 31, (Bohl et al., 2018; Karnatovskaia et al., 2014; Rothman et al., 2005; Wang et al., 2006)).

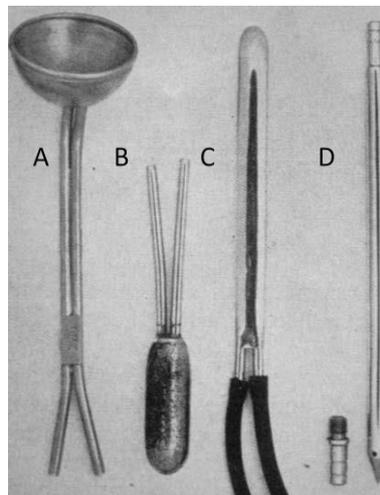


Figure 30 : Premiers instruments pour l'application d'un refroidissement localisé (Wang et al., 2006)



Figure 31 : Dispositif de refroidissement pour le traitement des tumeurs cérébrales comprenant une capsule implantable (Rothman et al., 2005)

Après la présentation des résultats de Temple Fay à un congrès international, son manuscrit est intercepté et détourné par certains scientifiques. Entre 1942 et 1943, il sert de support à plus de 400 expériences menées à Dachau, consistant à immerger certains prisonniers de ce camp de concentration dans des bains d'eau glacée pendant plusieurs heures. Le non-respect des droits humains lors de ces expérimentations fera partie des éléments à charge lors du procès de Nuremberg, mettant un frein inéluctable à toute recherche concernant l'hypothermie pendant plusieurs années (Bohl et al., 2018; Wang et al., 2006).

Peu à peu, l'hypothermie est de nouveau utilisée pour traiter différentes pathologies psychiques telles que la démence et la schizophrénie, avec une nette amélioration de l'état des patients. Dans les années 1950, elle est utilisée lors de diverses pratiques chirurgicales telles que la mise en place de pontages cardiaques et la transplantation d'organes, ainsi que le traitement des anévrismes cérébraux (Groysman et al., 2011). En 1958, le premier essai clinique concernant l'utilisation d'hypothermie est publié, montrant une amélioration de la survie des patients placés à 33°C après un arrêt cardiaque. Dans les années 1970, certaines études mettent en évidence les difficultés de gestion du processus de refroidissement ainsi que les effets secondaires associés, tels que les infections, l'arythmie ou encore la coagulopathie. A la fin des années 1980, certains chercheurs parviennent à montrer qu'un niveau léger d'hypothermie est suffisant pour avoir des effets neuroprotecteurs, permettant de limiter les effets secondaires. Depuis, les recherches aux niveaux cellulaire, expérimental et clinique n'ont cessé de se multiplier pour comprendre et utiliser au mieux cette nouvelle thérapie.

II.2. Méthodes de refroidissement

II.2.a. Processus de refroidissement

II.2.a.i. Mesure de température

Différentes méthodes de mesure de température peuvent être utilisées en fonction de l'application souhaitée et de la précision requise. La mesure la plus précise de la température corporelle centrale est celle de l'hypothalamus, centre de thermorégulation de l'organisme, mais cette dernière est risquée et difficile à mettre en place en raison de sa localisation dans une zone profonde du cerveau. Elle peut être remplacée par une mesure de la température du sang artériel, qui irrigue constamment le cerveau et donne une bonne indication de la température corporelle. La prise de température de l'œsophage est également recommandée, car c'est une méthode précise et fiable de la température interne. Si ces mesures ne sont pas accessibles, la prise de température peut être effectuée au niveau du rectum, de l'artère pulmonaire, voire de la vessie, bien que cette dernière présente un léger retard lors de changements brusques. Enfin, une mesure au niveau de la cavité orale, du tympan ou bien de la peau recouvrant l'artère temporale peut également être utilisée. Cette mesure présente l'avantage d'être non invasive et rapide, mais donne une approximation moins précise de la température centrale de l'organisme (Childs, 2018; Saigal et al., 2015).

Pour certaines applications, il est important d'évaluer les variations de la température du cerveau, organe essentiel de l'organisme. Pour ce faire, la méthode la plus fiable est de placer une sonde de température directement dans la zone d'intérêt, mais elle requiert une intervention chirurgicale (Abou-Chebl et al., 2011; Nomura et al., 2014; Poli et al., 2013). Des méthodes de substitution peuvent alors être utilisées, comme la prise de température au niveau du bulbe de la veine jugulaire (Choi et al., 2010; Seyedsaadat et al., 2020), des tympons (Castrén Maaret et al., 2010), ou encore la mesure par imagerie spectroscopique par résonance magnétique (Covaciu et al., 2011).

II.2.a.ii. Choix des paramètres

◆ Contrôle cible de la température

L'hypothermie est de plus en plus utilisée dans un but thérapeutique, mais c'est un processus complexe. Il nécessite une prise en charge complète et se compose de trois étapes principales : l'induction, le maintien et le réchauffement. Chacune d'entre elles est définie par un certain nombre de paramètres qui influencent directement l'efficacité du traitement (Saigal et al., 2015; Sonder et al., 2018; Taccone et al., 2020). Depuis 2011, le terme de « contrôle cible de la température » (TTM, *targeted temperature management*) est préférentiellement utilisé, car il prend en compte les phases d'induction et de réchauffement (Karnatovskaia et al., 2014). De plus, le choix des paramètres doit s'accompagner de la **prévention des effets secondaires** qui peuvent survenir au fil des phases.

◆ Phase d'induction

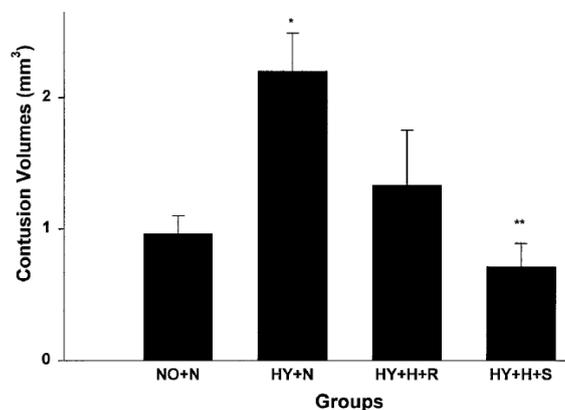
La phase **d'induction** consiste à refroidir une partie de l'organisme jusqu'à atteindre la **température cible**, définie en fonction du type de refroidissement et de l'application thérapeutique. Une température trop élevée n'induit pas les effets neuroprotecteurs escomptés, et une température trop basse pourra provoquer des effets secondaires délétères pour le patient. L'induction doit être initiée le plus tôt possible après le dommage, avec une **vitesse de refroidissement** élevée, afin d'exercer ses effets neuroprotecteurs avant l'apparition de lésions irréversibles.

◆ Phase de maintien

Une fois la température cible atteinte, la phase de **maintien** a pour but de minimiser les variations de température autour de cette valeur, qui peuvent atténuer les effets protecteurs de l'hypothermie et se révéler néfastes pour le patient. La **durée** du refroidissement peut quant à elle varier de quelques secondes à plusieurs jours en fonction des applications médicales et du niveau d'hypothermie utilisé.

◆ Phase de réchauffement

Une fois le refroidissement terminé, la température du patient peut être ramenée à 37°C par un processus actif de **réchauffement**, qui doit être effectué de manière lente (<0,25°C/h) et contrôlée. En effet, différentes études expérimentales ont montré qu'une **vitesse de réchauffement** trop élevée pouvait induire une hypertension intracrânienne, des dommages neuronaux, endothéliaux et musculaires ou encore une vasodilatation excessive (Dunkley and McLeod, 2017; Povlishock and Wei, 2009). De plus, une étude comparant les effets de réchauffements rapide et lent sur une lésion post-hypoxique chez le rat a démontré que les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie étaient fortement réduits après un réchauffement rapide (Figure 32, (Matsushita et al., 2001)).



NO : contrôle, N : normothermie, HY : hypoxie, H : hypothermie, réchauffements rapide (R) et lent (S)

Figure 32 : Influence de réchauffements rapide et lent sur le traitement d'une lésion post-hypoxique chez le rat (Matsushita et al., 2001)

L'équipe de Suehiro (Suehiro et al., 2003) a également montré qu'une hypothermie suivie d'un réchauffement lent et contrôlé permettait de revenir à des réponses vasculaires normales après un traumatisme crânien chez le rat, contrairement à un réchauffement rapide. Afin d'expliquer une telle influence de la vitesse du réchauffement, une des hypothèses envisagées est qu'un réchauffement rapide induirait une forte augmentation du métabolisme cérébral, disproportionnée par rapport au flux sanguin cérébral, créant alors une ischémie (Nakamura et al., 1999).

II.2.a.iii. Type de refroidissement

Il existe deux types de refroidissement : le **refroidissement systémique** – ou hypothermie généralisée – qui consiste à refroidir l'ensemble de l'organisme, et le **refroidissement sélectif** – ou hypothermie localisée – qui consiste à refroidir uniquement la zone d'intérêt thérapeutique (Assis et al., 2019; Choi and Pile-Spellman, 2018; Holzer, 2008; Taccone et al., 2020).

Dans la suite de ce manuscrit, le terme de refroidissement sélectif fera référence à un refroidissement sélectif du cerveau.

Le refroidissement peut être administré de plusieurs manières, à l'aide de méthodes surfaciques, intracorporelles, ou extracorporelles. Les méthodes **surfaciques** sont utilisées car leur mise en place est facile, rapide, peu onéreuse, et ne nécessite pas de personnel médical qualifié. De plus, ce type de méthode non-invasive induit peu d'effets indésirables pour les patients. Cependant, une fois mise en place, elle requiert des soins constants et est plus fréquemment associée à des tremblements, qui diminuent l'efficacité du refroidissement et nécessitent une sédation. Enfin, ce type de dispositif met généralement plusieurs heures pour atteindre la température cible, avec une précision limitée.

Le refroidissement peut également être administré à l'aide de méthodes **intracorporelles**, qui peuvent être endoluminales ou endovasculaires. Le refroidissement endoluminal s'effectue à travers un canal, qui peut être l'œsophage (systémique) ou le nez (sélectif), alors que le refroidissement endovasculaire est réalisé grâce à un cathéter placé dans une veine (systémique) ou dans l'artère carotide (sélectif), dans lequel circule une solution physiologique refroidie. Les méthodes intracorporelles sont relativement complexes à mettre en place et nécessitent l'intervention de personnel médical qualifié, ce qui peut parfois retarder l'initiation du refroidissement. De plus, les dispositifs sont invasifs et présentent des risques de complication liés aux cathéters. Cependant, ils permettent un refroidissement rapide et un contrôle précis de la température.

Enfin, le refroidissement peut être administré par une méthode **extracorporelle**, une technique très rapide mais invasive. Ce type de méthode consiste à extraire le sang de la circulation artérielle ou veineuse, à le refroidir grâce à un système extracorporel, puis à le réinjecter dans la circulation sanguine. Si la réinjection est faite dans une veine ou une artère qui traverse l'ensemble du corps, le refroidissement sera systémique, alors qu'une réinjection dans l'artère carotide assurera un refroidissement sélectif du cerveau.

II.2.b. Refroidissement systémique

Le refroidissement systémique consiste à diminuer la température corporelle d'un patient sans cibler de localisation spécifique. Il est généralement restreint aux niveaux légers ($>32^{\circ}\text{C}$) puisque l'ensemble du métabolisme est altéré en dessous de 35°C , et des complications peuvent apparaître au niveau vasculaire, cardiaque ou hématologique. En effet, les effets secondaires des refroidissements de niveaux modéré et sévère ont été un frein à de nombreuses études cliniques menées sur des dispositifs de refroidissement systémique.

II.2.b.i. Méthodes surfaciques

◆ Méthodes classiques

Le refroidissement systémique peut être mis en place en disposant des blocs réfrigérants sur le corps des patients. Cette méthode est relativement simple à mettre en place, mais elle requiert beaucoup d'entretien par le personnel soignant tout au long de la procédure. Elle est peu onéreuse et est souvent complétée par d'autres méthodes telles que l'injection de fluides refroidis ou l'utilisation de ventilateurs, afin d'en accroître l'efficacité. Ce type de refroidissement est lent (moins de $1^{\circ}\text{C}/\text{h}$), présente une stabilité limitée autour de la température cible, mais n'induit pas d'effets secondaires majeurs (Bernard et al., 1997; Deye et al., 2015).

La méthode de refroidissement surfacique la plus efficace est l'immersion des patients dans un bain d'eau froide, mais elle requiert une grande logistique. Son efficacité dépend de la température du bain, et les études menées sur des patients après une insolation ont rapporté des vitesses de refroidissement très élevées (6 à $11^{\circ}\text{C}/\text{h}$) pour des températures de 8 à 20°C (Proulx et al., 2003; Weiner and Khogali, 1980), et extrêmement élevées ($21^{\circ}\text{C}/\text{h}$) pour un bain d'eau glacée à 2°C (Proulx et al., 2003).

Cependant, l'immersion dans un bain d'eau froide ne peut être réalisée qu'avec des patients en bonne santé, puisqu'ils subissent un choc thermique violent, sont déplacés rapidement à l'entrée et la sortie du bain, et doivent rester conscients tout au long du protocole. De plus, ce type de méthode a parfois engendré des tremblements, une vasoconstriction des extrémités, et se révèle souvent inconfortable pour les patients (Gaudio and Grissom, 2016; Proulx et al., 2003).

◆ Couvertures refroidissantes

Le refroidissement surfacique peut également être induit à l'aide de couvertures refroidissantes, qui permettent de réduire la température corporelle des patients après une mise en place relativement simple, en utilisant une circulation d'eau ou d'air. Le dispositif Blanketrol® est constitué de couvertures jetables ou réutilisables disposées au-dessus ou en dessous du patient et remplies par une circulation d'eau qui régule la température grâce à un système de contrôle automatique externe. Ce dispositif permet un refroidissement rapide (1,22°C/h) et un maintien stable de la température. Il peut provoquer de l'hypotension mineure et des infections, mais n'a été à l'origine d'aucun effet indésirable majeur (Hoedemaekers et al., 2007; Islam et al., 2015; Sonder et al., 2018).

Le dispositif Medi-Therm® est également constitué de couvertures jetables remplies par une circulation d'eau, mais les études ont démontré une faible vitesse de refroidissement (0,61°C/h), et une précision limitée dans le maintien de la température cible. Les effets néfastes notés sont des infections et de l'hypotension mineures, sans complication majeure (Sonder et al., 2018).

Le dispositif Caircooler™ est une couverture dotée d'un système de circulation d'air pulsé refroidi par effet Peltier, avec un contrôle manuel de la température. Il est peu onéreux et simple à mettre en place, mais sa vitesse de refroidissement est très faible (0,18°C/h). De plus, le maintien autour de la température cible est difficile, et il est souvent complété par d'autres techniques de refroidissement pour accroître son efficacité (Hoedemaekers et al., 2007; Lher, 2005).

◆ Améliorations technologiques

Au fil des années, ces dispositifs ont été améliorés en ajoutant différentes fonctionnalités. Par exemple, le dispositif Arctic Sun® (Figure 33) est un dispositif de refroidissement surfacique constitué de coussinets adhésifs recouverts d'un hydrogel biocompatible, qui permet d'améliorer les transferts thermiques.



Figure 33 : Dispositif de refroidissement surfacique Arctic Sun®, Medivance

Il est relié à une unité de thermorégulation afin d'ajuster le refroidissement des patients en fonction de leurs données, et à un système de circulation d'eau. Ce dispositif permet un refroidissement plus rapide que les méthodes surfaciques classiques (1,4°C/h), un contrôle continu et un maintien stable de la température corporelle, ainsi qu'un processus de réchauffement contrôlé. Cependant, il est relativement long et complexe à mettre en place et requiert des soins réguliers. Enfin, il peut provoquer des érythèmes minimes et quelques infections, mais aucun événement indésirable majeur n'a été observé (Haugk et al., 2007; Sonder et al., 2018).

D'autres améliorations ont été apportées aux méthodes surfaciques avec le dispositif Emcoolspad®, constitué de douze blocs réfrigérants remplis par un mélange de graphite et d'eau et recouverts d'un hydrogel biocompatible permettant d'améliorer les échanges thermiques. Le dispositif est placé au congélateur avant utilisation et permet de refroidir les patients très rapidement (3,3°C/h), puis de maintenir leur température corporelle de manière stable, en étant relié à une sonde de température. Sa mise en place est très rapide, et peut être effectuée sur le lieu du traumatisme ou dans l'ambulance transportant le patient à l'hôpital, ce qui avance considérablement l'initiation du refroidissement. Enfin, son utilisation a pu engendrer des érythèmes minimes et une pneumonie, mais aucun effet indésirable majeur n'a été rapporté (Uray and Malzer, 2008).

II.2.b.ii. Méthodes intracorporelles

◆ Injection de fluides refroidis

Parmi les méthodes intracorporelles, l'injection de grands volumes de fluides refroidis est rapide et peu onéreuse, mais ne permet pas de contrôler précisément la température. De plus, le système n'est généralement pas suffisant pour maintenir les patients en hypothermie légère, et doit être complété par des blocs réfrigérants ou des ventilateurs. Le principe repose sur l'injection intraveineuse de solutions physiologiques (saline ou Ringer) à 4°C, dont le volume est adapté à chaque patient (usuellement 30mL/kg), en utilisant un cathéter ou une canule périphérique. Les études cliniques ont montré que l'injection de fluides à 4°C pendant 30 minutes permettait un refroidissement rapide de la température corporelle (2°C/h, (Kliegel et al., 2007)), pouvant être augmenté par l'ajout de blocs réfrigérants (3,2°C/h, (Bernard et al., 2003)). Aucun effet secondaire lié au dispositif de refroidissement n'a été reporté (Bernard et al., 2003; Kliegel et al., 2007).

◆ Refroidissement de cavités

D'autres méthodes de refroidissement intracorporel ont également été testées, comme le lavage de la cavité péritonéale ou le refroidissement œsophagien. Le lavage de la cavité péritonéale peut être effectué grâce à un système de circulation de solution physiologique refroidie à l'intérieur de la cavité (Figure 34). Il a montré une très grande vitesse de refroidissement, allant de 5,65°C/h (Nichol et al., 2015) à 14°C/h (Polderman et al., 2015), avec peu d'effets secondaires, excepté quelques cas de thrombose sur endoprothèse (Nichol et al., 2015).

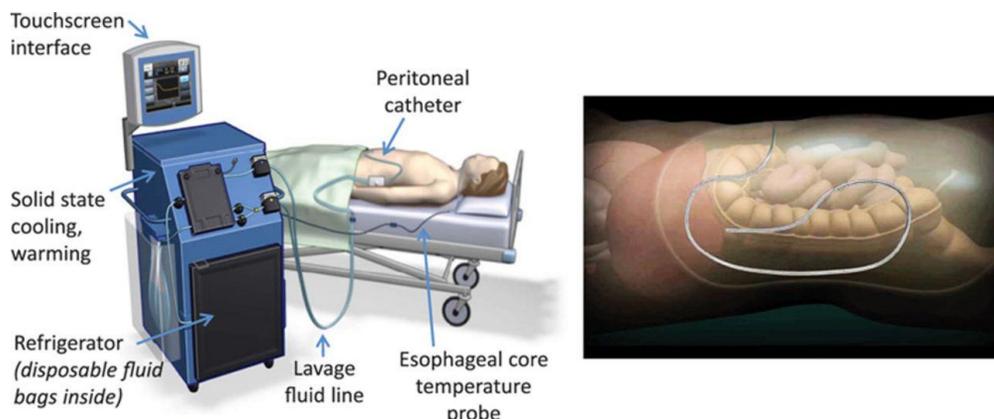


Figure 34 : Dispositif de refroidissement de la cavité péritonéale (Nichol et al., 2015)

Le refroidissement œsophagien a quant à lui été évalué avec le dispositif ECD™ (*Esophageal Cooling Device*, Figure 35), qui fonctionne grâce à un système de circulation d'eau entre un échangeur thermique placé dans l'œsophage, et un échangeur externe relié à une unité de contrôle.

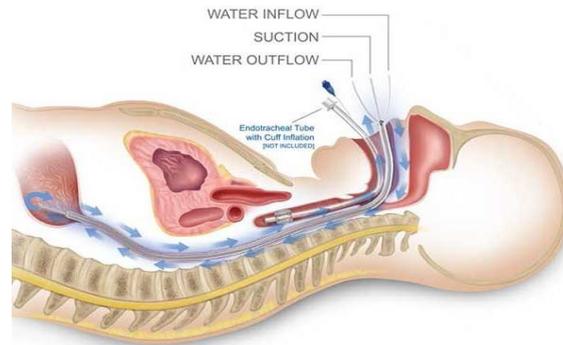


Figure 35 : Dispositif de refroidissement œsophagien ECD™ (Goury et al., 2017)

Cette méthode permet de contrôler très précisément les processus d'induction, de maintien et de réchauffement, mais le refroidissement est très lent ($0,26^{\circ}\text{C/h}$). Ce dispositif semi-invasif nécessite l'intubation des patients pour être mis en place, et n'a pas induit d'effets indésirables majeurs, bien que l'étude clinique ait montré un choc réfractaire et des pneumonies, potentiellement liées au refroidissement (Goury et al., 2017).

◆ Refroidissement endovasculaire

Enfin, le refroidissement intracorporel peut être effectué grâce à un dispositif endovasculaire, qui permet d'abaisser la température des patients de manière contrôlée, mais qui reste plus invasif que la méthode surfacique. Les dispositifs Thermogard XP® et CoolGard™ sont les plus utilisés, et sont composés d'un cathéter dans lequel circule une solution physiologique refroidie grâce à une pompe, d'un échangeur thermique et d'un système de contrôle de la température. Pour les deux systèmes, les cathéters sont insérés de manière percutanée dans la veine fémorale jusqu'à la veine cave inférieure, et fonctionnent en boucle fermée, puisque le liquide refroidi ne passe pas dans le sang du patient. Les études cliniques réalisées avec le dispositif CoolGard™ ont montré que le dispositif permettait un refroidissement lent ($<1^{\circ}\text{C/h}$), mais un maintien stable de la température ainsi qu'un réchauffement contrôlé. Certains effets secondaires mineurs tels qu'une colonisation microbiologique du cathéter, de légers saignements et une septicémie ont été observés, sans complication majeure. Enfin, le dispositif est relativement rapide à mettre en place et nécessite peu d'intervention du personnel médical lors du traitement (Al-Senani et al., 2004; Deye et al., 2015).

Le dispositif Thermogard XP® comporte quant à lui deux à quatre ballonnets en plus du cathéter, parcourus par la circulation d'une solution physiologique froide. Une étude clinique a montré qu'il permettait un abaissement rapide de la température corporelle ($2,06^{\circ}\text{C/h}$), une grande stabilité dans le maintien de la température et un réchauffement contrôlé. Le refroidissement a provoqué quelques infections et de l'hypotension mais aucun effet indésirable majeur n'a été reporté (Sonder et al., 2018).

II.2.b.iii. Méthode extracorporelle

Il existe également une méthode de refroidissement extracorporel, qui consiste à extraire le sang de la circulation corporelle, à le refroidir grâce à un système externe puis à le réinjecter dans l'organisme du patient. Cette méthode est invasive et risquée pour les patients mais elle permet de diminuer efficacement leur température. Le refroidissement extracorporel veino-veineux du sang a été réalisé grâce à l'introduction d'un cathéter dans la veine fémorale, suivie de la mise en place d'un circuit de transport relié à une pompe et un échangeur thermique externes. Ce type de méthode a permis de diminuer la température corporelle des patients extrêmement rapidement ($12,2^{\circ}\text{C/h}$), et n'a pas induit d'effets secondaires (Testori et al., 2013).

II.2.b.iv. Bilan

Les dispositifs de refroidissement systémique décrits ci-dessus sont regroupés dans le Tableau 3, qui compare à la fois les performances du refroidissement et les risques pour les patients. Une notation qualitative a été attribuée à chaque dispositif, basée sur les différents essais cliniques, en raison des grandes variations de données chiffrées entre les centres. La **logistique** concerne à la fois la mise en place du dispositif et son entretien par le personnel médical tout au long du processus de refroidissement. Les dispositifs ont été classés dans les catégories suivantes : « complexe » (-), « simple mais nécessitant du temps ou du personnel médical qualifié » (+), « simple » (++) , « simple et rapide à mettre en place » (+++). Pour la **rapidité**, les dispositifs ont été classés en fonction de leur vitesse (v_r) de refroidissement, qui peut être $v_r < 0,5^\circ\text{C/h}$ (--); $0,5^\circ\text{C/h} < v_r < 1^\circ\text{C/h}$ (-); $1^\circ\text{C/h} < v_r < 2^\circ\text{C/h}$ (+); $2^\circ\text{C/h} < v_r < 5^\circ\text{C/h}$ (++) ou $v_r > 5^\circ\text{C/h}$ (+++). La **précision** fait référence aux capacités de contrôle de la température par le dispositif, qui peut ne pas avoir d'unité de contrôle (-), contrôler la température (+), ou encore contrôler la température et le réchauffement (++) . Enfin, la **sûreté** qualifie l'ampleur des risques pour un patient traité avec ce type de dispositif. Les dispositifs sont catégorisés en « très invasifs ou à risque pour le patient » (--), « invasifs » (-) ou « non-invasifs » (+).

Pour information, la méthode de refroidissement surfacique de type « couverture + eau » fait référence au dispositif Blanketrol® et l'abréviation KT fait référence à un cathéter.

Méthode	Dispositif	Logistique	Rapidité	Précision	Sûreté
Surfacique	Blocs réfrigérants ^{1,2}	+	-	-	+
	Bain d'eau glacée ^{3,4}	-	+++	-	--
	Couverture + eau ^{5,6,7}	++	+	++	+
	Couverture + air ^{5,8}	++	--	-	+
	Coussins adhésifs + gel ^{7,9}	-	+	++	+
	Blocs + {graphite + eau} ¹⁰	+++	++	+	+
Intracorporelle	Injection de fluides ^{11,12}	+	++	-	-
	Lavage cavité péritonéale ^{13,14}	+	+++	++	-
	Refroidissement oesophagien ¹⁵	+	--	++	-
	Intravasculaire (KT) ^{2,16}	+	-	++	-
	Intravasculaire (KT + ballonnet) ⁷	+	++	++	-
Extracorporelle	Refroidissement du sang ¹⁷	-	+++	+	--

1 : (Bernard et al., 1997), 2 : (Deye et al., 2015), 3 : (Weiner and Khogali, 1980), 4 : (Proulx et al., 2003), 5 : (Hoedemaekers et al., 2007), 6 : (Islam et al., 2015), 7 : (Sonder et al., 2018), 8 : (Lher, 2005), 9 : (Haugk et al., 2007), 10 : (Uray and Malzer, 2008), 11 : (Bernard et al., 2003), 12 : (Kliegel et al., 2007), 13 : (Nichol et al., 2015), 14 : (Polderman et al., 2015), 15 : (Goury et al., 2017), 16 : (Al-Senani et al., 2004) et 17 : (Testori et al., 2013)

Tableau 3 : Méthodes de refroidissement systémique

II.2.c. Refroidissement sélectif

Le refroidissement cérébral sélectif (SBC, *selective brain cooling*) a pour but de réduire la température du cerveau en dessous de celle de l'organisme, en conservant une différence de température tout au long du traitement. Les développements technologiques ont permis de mettre au point des dispositifs induisant un refroidissement rapide et précis, tout en limitant les effets indésirables.

II.2.c.i. Méthodes surfaciques

Parmi les différentes méthodes de refroidissement sélectif, les méthodes surfaciques consistent à refroidir le cerveau en diminuant la température de la surface du crâne. La mise en place de blocs réfrigérants autour de la tête des patients s'est soldée par un échec, puisqu'elle n'a pas permis de réduire la température du cerveau (cortex ou thalamus) malgré une forte diminution de celle de la surface du crâne ($<16^{\circ}\text{C}$) (Corbett and Laptook, 1998). Le dispositif de refroidissement passif Sovika[®], constitué d'une enveloppe souple remplie de gel froid, a été disposé sur la nuque et la tête de patients après un accident vasculaire cérébral (AVC) (Figure 36). Son efficacité s'est révélée limitée dans le refroidissement cérébral ($0,32^{\circ}\text{C/h}$), et le dispositif a provoqué une augmentation des pressions sanguine et intracrânienne pouvant se révéler délétère pour les patients (Poli et al., 2013).



Figure 36 : Dispositif de refroidissement surfacique Sovika[®](Poli et al., 2013)

Par ailleurs, l'utilisation d'un casque de refroidissement a été évaluée sur des patients après diverses lésions cérébrales et s'est révélée efficace, avec une diminution rapide ($1,84^{\circ}\text{C/h}$) de la température du cerveau, sans affecter la température corporelle dans les premières heures. De plus, son utilisation n'a pas engendré d'effets secondaires majeurs, excepté un épisode de bradycardie asymptomatique qui a limité l'efficacité du dispositif (Wang et al., 2004). L'utilisation d'un chapeau de refroidissement a également fait ses preuves lors d'une étude clinique réalisée dans les six premières heures de vie de nouveau-nés souffrant d'encéphalopathie. La circulation d'eau froide à travers le chapeau a permis de placer le cerveau en hypothermie tout en maintenant une température rectale au-dessus de 34°C , en assurant un réchauffement contrôlé (en dessous de $0,5^{\circ}\text{C/h}$) (Gluckman et al., 2005).

II.2.c.ii. Méthodes intracorporelles

◆ Refroidissement de cavités

Le refroidissement sélectif du cerveau peut également être effectué à l'aide de dispositifs intranasaux, qui utilisent des composés perfluorocarbure (PFC), de l'air à haut débit ou encore la circulation de solutions refroidies. Le dispositif RhinoChill[™] fonctionne grâce à la ventilation liquide et permet de refroidir le cerveau suite à la vaporisation d'un composé perfluorocarbure dans la cavité nasale, qui va alors s'évaporer en absorbant la chaleur des tissus (Figure 37).

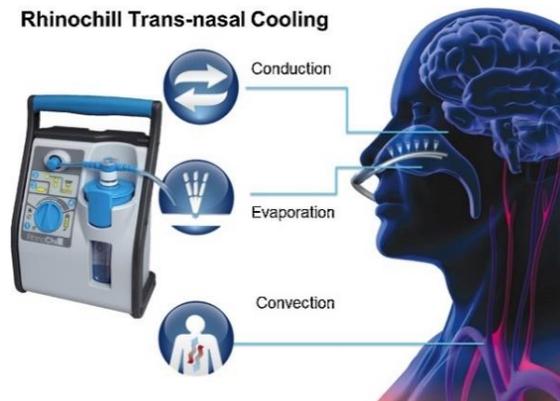


Figure 37 : Dispositif de refroidissement intranasal RhinoChill™ (Islam et al., 2015)

Les études cliniques réalisées après diverses lésions cérébrales (Abou-Chebl et al., 2011) et des arrêts cardiaques (Castrén Maaret et al., 2010) ont montré une diminution rapide et préférentielle de la température cérébrale, bien que la différence avec la température corporelle reste légère. Le dispositif est simple d'utilisation pour les équipes médicales et n'a pas engendré de complications majeures, mais quelques effets délétères tels que des érythèmes légers et une hypertension transitoire (Abou-Chebl et al., 2011) ainsi qu'une épistaxis (Castrén Maaret et al., 2010). Un autre type de dispositif de refroidissement intranasal constitué de deux cathéters à ballonnets connectés entre eux et parcourus par une solution physiologique refroidie (20°C) a été testé pendant une heure. L'étude clinique a montré un refroidissement relativement rapide (1,7°C/h), une bonne homogénéité de la température cérébrale et une légère diminution de la température corporelle (0,5°C). Le dispositif a été bien toléré par les patients, mais a induit de légers maux de tête le jour de l'intervention et une augmentation des sécrétions nasales (Covaciu et al., 2011).

Le dispositif NeuroSave™ repose quant à lui sur la circulation de solution physiologique refroidie dans le pharynx et l'œsophage (Figure 38). Ce dispositif a été évalué chez des patients pendant le remplacement d'une valve aortique, et a permis de diminuer rapidement la température du cerveau mesurée dans la veine jugulaire (3°C en 15 minutes, 12°C/h), tout en maintenant une différence importante avec la température corporelle ($\Delta T > 3,5^\circ\text{C}$). Certains effets délétères sérieux tels que des pneumothorax ont été reportés mais ont été attribués à la chirurgie cardiaque et non au dispositif (Seyedsaadat et al., 2020).

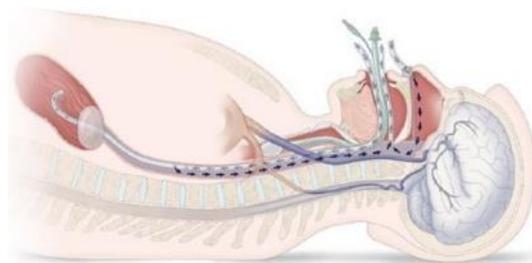


Figure 38 : Dispositif de refroidissement de l'œsophage et du pharynx (Seyedsaadat et al., 2020)

◆ Refroidissement endovasculaire

Le refroidissement cérébral peut également être induit de manière sélective grâce à des dispositifs intravasculaires. Ces dispositifs se basent sur l'injection d'une solution physiologique refroidie à travers un microcathéter placé dans l'artère carotide, et ont été testés sur des patients souffrant de malformations (Choi et al., 2010) ou d'occlusions vasculaires (Peng et al., 2016). Les études cliniques ont montré que ce type de dispositif permettait un refroidissement rapide et sélectif, sans effets indésirables majeurs, mais avec l'apparition de quelques tremblements (Choi et al., 2010).

◆ Refroidissement intracérébral

Enfin, des dispositifs de refroidissement intracérébral ont été mis au point pour traiter les crises d'épilepsie. Ces dispositifs doivent à la fois refroidir localement une partie du cerveau et dissiper la chaleur vers l'extérieur, tout en respectant des contraintes de miniaturisation. Le refroidissement s'effectue à l'aide d'un module thermoélectrique de type Peltier, au contact du cerveau par le biais d'une plaque conductrice en argent (Figure 39). Ce module est relié à une unité de contrôle externe qui régule la température, et à un dissipateur de chaleur en cuivre, composé d'un réservoir rempli de solution physiologique à 15°C, d'un ventilateur et d'une pompe. Les résultats de l'étude clinique ont montré que ce type de dispositif permettait un refroidissement localisé quasi-immédiat, sans induire de dommages histologiques chez les patients (Nomura et al., 2014).

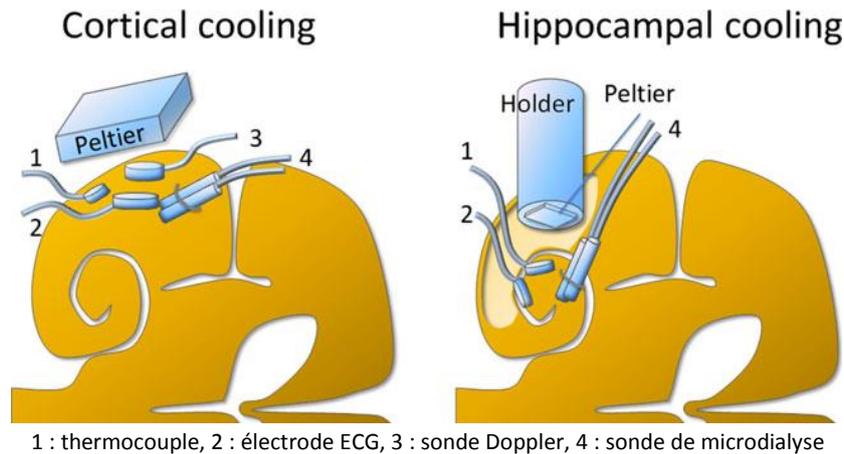


Figure 39 : Dispositifs implantables de refroidissement intracérébral (Nomura et al., 2014)

II.2.c.iii. Méthode extracorporelle

La méthode de refroidissement extracorporel décrite précédemment (II.2.b.iii. Méthode extracorporelle) peut également s'appliquer de manière spécifique au cerveau. Le refroidissement extracorporel veino-artériel du sang a été réalisé grâce à l'introduction d'un cathéter dans la veine fémorale, suivi d'un refroidissement externe et d'une réinjection dans l'artère carotide. Ainsi, le sang refroidi circule dans le cerveau sans passer par l'ensemble de l'organisme. La méthode s'est révélée extrêmement rapide avec une température cérébrale de 22°C atteinte en 20 minutes, et sélective avec une température corporelle maintenue au-dessus de 35°C (Lownie et al., 2004).

II.2.c.iv. Bilan

Les dispositifs de refroidissement sélectif précédemment détaillés sont rassemblés dans le Tableau 4, qui compare leurs performances de refroidissement, leur sélectivité et leur sûreté. La **logistique** concerne la facilité d'utilisation du dispositif, de sa mise en place à son retrait par le personnel médical. Les dispositifs ont été classés dans les catégories suivantes : « complexe » (-), « simple mais nécessitant du temps ou du personnel médical qualifié » (+) et « simple sans précautions particulières » (++) . Pour la **rapidité**, chaque dispositif a été classé en fonction de sa vitesse (v_r) de refroidissement, en dispositif « très lent » ($v_r < 0,5^\circ\text{C/h}$: --), « rapide » ($1^\circ\text{C/h} < v_r < 2^\circ\text{C/h}$: +), « très rapide » ($2^\circ\text{C/h} < v_r < 5^\circ\text{C/h}$: ++), « extrêmement rapide » ($v_r > 5^\circ\text{C/h}$: +++) et « quasi-immédiat » ($v_r > 20^\circ\text{C/h}$: ++++). Pour la **sélectivité**, la diminution stricte de la température de l'organisme ainsi que le gradient de température entre le cerveau et le corps ont été pris en compte. Les dispositifs sont alors répartis en « peu sélectifs » (-) notamment lorsque la température corporelle est diminuée de plus de $0,6^\circ\text{C/h}$, « sélectifs » (+) et « très sélectifs » (++) .

Enfin, la **sûreté** traduit les risques pour un patient d'être refroidi par un tel dispositif. Les dispositifs sont catégorisés suivant le risque pour le patient, en étant « particulièrement invasifs ou induisant de sévères complications » (--), « invasifs » (-) et « non-invasifs » (+). La précision n'a pas été évaluée ici, puisque les dispositifs de refroidissement sélectif sont tous relativement précis, avec un contrôle de la température tout au long du processus de refroidissement dans la majorité des cas. De plus, elle dépend fortement des méthodes de mesure de température, qui varient d'une étude à l'autre.

Les informations concernant le chapeau refroidissant n'ont pas permis d'évaluer précisément sa sélectivité. En fonction des études, les dispositifs de refroidissement intranasaux avec des composés PFC se sont révélés sélectifs (Castrén Maaret et al., 2010), ou peu sélectifs (Abou-Chebl et al., 2011).

Méthode	Dispositif	Logistique	Rapidité	Sélectivité	Sûreté
Surfacique	Enveloppe + gel ¹	++	--	+	--
	Casque refroidissant ²	++	+	+	+
	Chapeau refroidissant ³	++	+	/	+
Intracorporelle	Intranasale (PFC) ^{4,5}	+	++	-/+	-
	Intranasale (ballonnet) ⁶	+	+	+	-
	Pharynx + oesophage ⁷	+	+++	++	-
	Intravasculaire (carotide) ⁸	+	+++	-	-
Extracorporelle	Intracérébrale (Peltier) ⁹	-	++++	++	--
	Refroidissement du sang ¹⁰	+	++++	++	--

1 : (Poli et al., 2013), 2 : (Wang et al., 2004), 3 : (Gluckman et al., 2005), 4 : (Abou-Chebl et al., 2011), 5 : (Castrén Maaret et al., 2010), 6 : (Covaciu et al., 2011), 7 : (Seyedsaadat et al., 2020), 8 : (Choi et al., 2010), 9 : (Nomura et al., 2014) et 10 : (Lownie et al., 2004).

Tableau 4 : Méthodes de refroidissement cérébral sélectif

II.2.d. Méthodes pharmacologiques

Les techniques physiques de refroidissement ont fait leurs preuves dans diverses applications médicales, mais le grand nombre de paramètres à optimiser limite encore leur efficacité clinique. En effet, les dispositifs sont généralement lents ou invasifs, et certains effets secondaires tels que les tremblements sont fréquemment observés et nécessitent une sédation voire une anesthésie.

L'induction pharmacologique d'hypothermie est une alternative qui permet de cibler certains mécanismes de thermorégulation, en réduisant la valeur seuil associée. Ainsi, en plus de réduire la température corporelle, elle retarde les réactions physiologiques de compensation et permet de maintenir les patients éveillés sans besoin de sédation (Lee et al., 2017).

A ce jour, huit classes d'agents pharmacologiques ont été identifiées : les agonistes des récepteurs cannabinoïdes, les activateurs des récepteurs opioïdes (δ , κ et μ -opioïde), les agonistes des récepteurs de la vanilloïde 1 (TRPV1, *transient receptor potential vanilloid 1*), les agonistes de la neurotensine, les dérivés de la thyroxine, les agonistes des récepteurs dopaminergiques, les gaz tels que l'hélium, le xénon et le sulfure d'hydrogène (H₂S) et enfin les dérivés de l'adénosine (Tableau 5, (Lee et al., 2017; M. Zhang et al., 2013)). Plusieurs études expérimentales ont démontré les effets neuroprotecteurs de ces agents pharmacologiques, qui ont permis de réduire la température corporelle de rongeurs. Elles ont également montré que différents niveaux d'hypothermie pouvaient être atteints en fonction de l'agent utilisé, avec une réduction limitée de 1 à 2°C avec les opioïdes, les récepteurs de la dopamine et le Xénon, une hypothermie légère de 33°C avec les cannabinoïdes, les récepteurs de la vanilloïde, les dérivés de l'adénosine et la neurotensine, une hypothermie modérée de 31°C avec les dérivés de la thyroxine et le sulfure d'hydrogène, voire une hypothermie sévère de 25°C avec l'Hélium.

Agents pharmacologiques	Exemples	Effets secondaires et limitations
Cannabinoïdes	WIN55,212-2 ; HU-210 ; Δ -9-THC	Hypotension, bradycardie, hypokinésie
Opioides	U50 488H ; morphine ; Deltorphin II ; DADLE	Vasodilatation, hypotension, arythmie
Récepteurs de la vanilloïde 1	Capsaïcine ; DHC ; Rinvanil	Hypertension, tachycardie
Système neurotensine	ABS-201 ; NT69L ; HPI-201 ; HPI-363 ; KK1-19 ; JMV-449	Hyperglycémie, hypoinsulinémie, hyperglucagonémie
Dérivés de la thyroxine	T ₀ AM ; T ₁ AM	Bradycardie, hyperglycémie, détresse respiratoire
Récepteurs de la dopamine	MK-801 ; B-HT 920 ; 7-OH-DAPT ; LY171555	Hypokaliémie
Gazeux	Hélium, Xénon, H ₂ S	Disponibilité limitée, prix élevé
Dérivés de l'adénosine	AMP ; ADP ; ATP	Hypotension, acidose métabolique, hyperglycémie, hypocalcémie

Tableau 5 : Agents pharmacologiques inducteurs d'hypothermie, adapté d'après (Lee et al., 2017; M. Zhang et al., 2013)

A ce jour, de nombreuses études expérimentales menées sur des rongeurs ont montré qu'une hypothermie induite par des agents pharmacologiques avait des effets neuroprotecteurs après un traumatisme crânien ou un accident vasculaire cérébral, en améliorant la récupération fonctionnelle des animaux (Cao et al., 2014; Choi et al., 2012; Lee et al., 2014, 2016a). De plus, elles ont montré que ce type d'hypothermie n'induisait pas de tremblements, contrairement à certaines méthodes physiques de refroidissement systémique (Figure 40, (Choi et al., 2012; Lee et al., 2014, 2016a)).

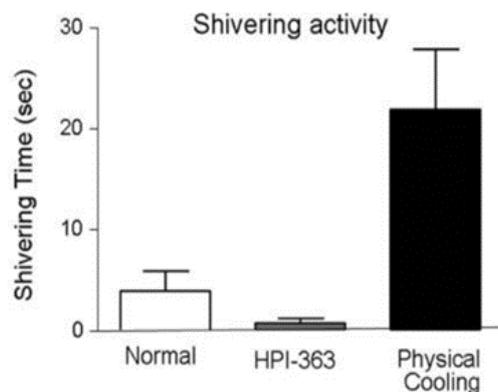


Figure 40 : Influence d'une induction physique ou pharmacologique d'hypothermie sur les tremblements de souris (Lee et al., 2014)

Un des inconvénients de l'utilisation d'agents pharmacologiques est la difficulté à déterminer si les effets neuroprotecteurs sont liés à l'agent lui-même ou à l'hypothermie qu'il induit. Une étude a alors montré que les effets neuroprotecteurs observés étaient bien liés à l'hypothermie elle-même, en plaçant les animaux traités avec un agent pharmacologique (agoniste de TRPV1) dans une cage chauffante, afin d'éviter toute descente en température (Figure 41, (Cao et al., 2014)). En effet, l'agent pharmacologique n'a pas eu d'effet neuroprotecteur sur les souris placées en normothermie.

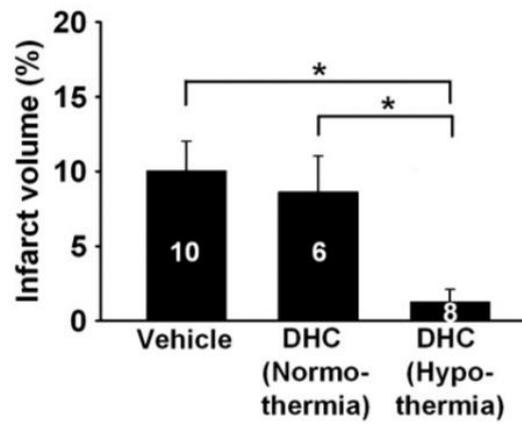


Figure 41 : Influence d'un agent pharmacologique sur le volume d'infarctus de souris (Cao et al., 2014)

Ainsi, l'induction pharmacologique d'hypothermie est prometteuse et permet d'éviter certains effets secondaires liés aux méthodes physiques de refroidissement. De ce fait, une utilisation combinée des deux techniques d'induction pourrait permettre d'éviter les tremblements tout en induisant un refroidissement rapide et précis. Cette combinaison a déjà été testée sur des rats et les résultats ont montré une potentialisation des effets neuroprotecteurs, tant sur la réduction des lésions que sur l'amélioration de la guérison (Lee et al., 2016a). Des études cliniques sont maintenant nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sûreté de telles méthodes d'induction sur l'Homme.

II.2.e. Effets indésirables

II.2.e.i. Nécessité d'un processus contrôlé

L'hypothermie thérapeutique doit être administrée de manière contrôlée tout au long du processus, notamment lors de la phase de réchauffement, pour ne pas induire de dommages supplémentaires (Phase de réchauffement). Cependant, malgré une induction contrôlée, elle est associée à certains risques et peut induire des effets délétères pour le patient en fonction de son niveau, notamment dans le cas d'un refroidissement systémique. Dans le cas d'une hypothermie généralisée, des tremblements apparaissent fréquemment entre 33,5°C et 30°C. Ils sont indésirables pour les patients et diminuent l'efficacité du refroidissement, nécessitant alors la prise de sédatifs et d'analgésiques (Karnatovskaia et al., 2014; Polderman, 2009; Sonder et al., 2018; Taccone et al., 2020). La littérature scientifique ne fournit pas de données sur les conséquences d'une hypothermie modérée ou sévère d'une durée supérieure à une heure.

II.2.e.ii. Troubles cardiovasculaires

L'hypothermie est associée à de l'hypotension (Allers et al., 2006) ainsi qu'à une diminution du rythme cardiaque, pouvant mener à des arythmies en dessous de 30°C (Jackson and Kochanek, 2019; Polderman, 2009; Saigal et al., 2015). Elle entraîne également une vasoconstriction périphérique, et peut provoquer une hypocapnie – une diminution de la concentration en CO₂ dans le sang, ou encore une hypovolémie – un déficit de sang dans le système circulatoire (Polderman, 2009; Saigal et al., 2015; Schmitt et al., 2014).

II.2.e.iii. Troubles hématologiques

L'hypothermie altère également le fonctionnement des cellules sanguines et peut provoquer différents troubles hématologiques tels que la thrombopénie et la leucopénie, notamment la neutropénie (Gunn et al., 2017; Wood and Thoresen, 2015). Elle modifie également les capacités de coagulation en dessous de 33°C et est associée à des coagulopathies, pouvant entraîner des saignements voire des hémorragies (Jackson and Kochanek, 2019; Karnatovskaia et al., 2014; Polderman, 2009; Schmitt et al., 2014; Wood and Thoresen, 2015). De plus, elle altère un grand nombre de mécanismes inflammatoires, et est alors associée à un risque accru d'infections, telles que la pneumonie, la bactériémie et la septicémie (Assis et al., 2019; Gunn et al., 2017; Polderman, 2009; Wood and Thoresen, 2015).

II.2.e.iv. Troubles métaboliques

L'hypothermie peut induire certains déséquilibres électrolytiques, tels que l'hypokaliémie, l'hyponatrémie ou l'hypomagnésémie (Karnatovskaia et al., 2014; Saigal et al., 2015; Wood and Thoresen, 2015). Elle peut également provoquer des déséquilibres métaboliques tels que l'hyperglycémie, puisqu'elle diminue la libération d'insuline tout en augmentant la sécrétion de glucagon (Gunn et al., 2017; Jackson and Kochanek, 2019; Polderman, 2009; Saigal et al., 2015; Wood and Thoresen, 2015). De plus, elle augmente le métabolisme des graisses, ce qui peut conduire à une acidose. Enfin, elle altère le fonctionnement de nombreuses voies métaboliques, et peut de ce fait modifier la pharmacocinétique de certaines molécules thérapeutiques et aboutir à leur accumulation, renforçant la puissance et la durée de leurs effets (Polderman, 2009; Wood and Thoresen, 2015).

II.2.e.v. Dommages histologiques

De nombreuses études expérimentales se sont intéressées aux conséquences d'une hypothermie sur l'état du tissu cérébral, et s'accordent à dire qu'aucun dommage histologique n'a été observé pour des températures comprises entre 15 et 30°C (D'Ambrosio et al., 2013; Diestel et al., 2010; Fujii et al., 2010; Inoue et al., 2017; Oku et al., 2009; Ren et al., 2017; Yang and Rothman, 2001). Une étude clinique a d'ailleurs confirmé ces résultats, montrant qu'aucun dommage histologique n'était apparu après un refroidissement de 30 minutes à 15°C (Nomura et al., 2014).

Cependant, pour des températures comprises entre 0 et 15°C, des dommages réversibles ont été observés (Fujii et al., 2010; Oku et al., 2009; Yang et al., 2006). Une étude expérimentale a notamment montré qu'un refroidissement intermittent à 5°C n'induisait pas de perte neuronale ou d'apoptose chez le rat, mais des expériences supplémentaires menées sur des tranches hippocampiques ont montré des altérations morphologiques et histologiques réversibles (Yang et al., 2006). Une autre étude menée sur des tranches hippocampiques de cobaye a montré un arrêt total de l'activité neuronale à 8°C, néanmoins réversible lors du retour à 37°C après 30, 60 ou 90 minutes de refroidissement, avec une préservation des fonctions neuronales (Figure 42, (Aihara et al., 2001)).

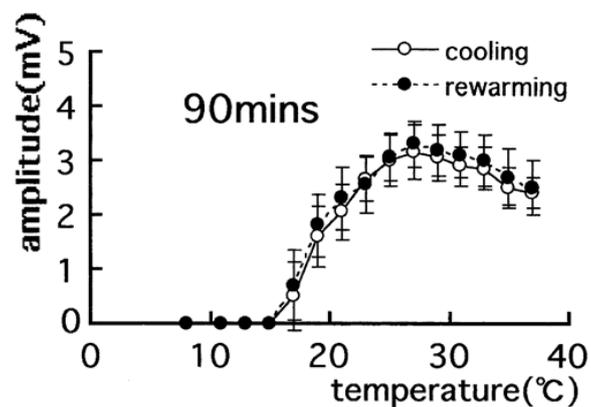
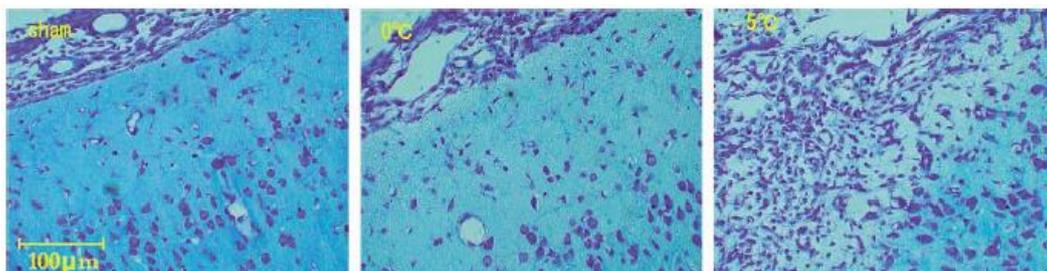


Figure 42 : Influence d'une hypothermie sévère sur l'activité électrique de neurones hippocampaux de cobaye (Aihara et al., 2001)

Enfin, pour des température plus faibles, plusieurs études expérimentales menées sur des rats ont montré l'apparition de différents dommages histologiques irréversibles tels que la nécrose, l'apoptose et la perte neuronale après un refroidissement d'une heure à -5°C, qui n'étaient pas observés au-dessus de 0°C (Figure 43, (Fujii et al., 2010; Oku et al., 2009)).



Contrôle (gauche), refroidissement cortical à 0°C (centre) et -5°C (droite)

Figure 43 : Aspect histologique de sections coronales après un refroidissement cortical chez le rat (Fujii et al., 2010)

II.2.e.vi. Dommages neurologiques

Pour des températures basses, comprises entre 10 et 15°C, une étude expérimentale a montré que l'hypothermie pouvait entraîner une altération des fonctions sensorimotrices (Fujii et al., 2012). D'après cette étude, les effets du refroidissement deviennent particulièrement néfastes en dessous de 10°C, en raison du blocage excessif de la transmission synaptique, qui détériore les fonctions neurologiques de manière significative.

II.3. Mécanismes d'action

Les mécanismes d'action de l'hypothermie dépendent directement de son niveau. En effet, certains effets sont amplifiés au fur et à mesure de la baisse en température, comme la diminution du métabolisme, tandis que d'autres sont déclenchés par la diminution d'un seul degré Celsius, tels que l'induction de certaines protéines de choc froid.

II.3.a. Physiologie

II.3.a.i. Métabolisme

L'hypothermie préserve l'organisme en modifiant différentes fonctions cellulaires. Elle diminue notamment le métabolisme cellulaire et modifie la répartition des cellules dans les phases du cycle (Fujita, 1999). A des niveaux sévères (4°C), elle peut également induire une désorganisation des filaments d'actine et de tubuline et altérer le fonctionnement ainsi que la stabilité des microtubules (Thuillier and Hauet, 2018).

Pour chaque degré perdu en dessous de 37°C, le métabolisme cérébral diminue de 6 à 7%, le flux sanguin cérébral de 5% et le rythme cardiaque de 10 battements par minute (Karnatovskaia et al., 2014; Wood and Thoresen, 2015). En fonction du niveau d'hypothermie, la consommation en oxygène diminue, et les réserves énergétiques des cellules peuvent être préservées pendant plusieurs jours (Figure 44). En effet, l'hypothermie entraîne une diminution de l'utilisation du glucose et de l'adénosine triphosphate (ATP) par les cellules, et prévient la production de différents déchets métaboliques tels que le lactate tout en évitant les déséquilibres physiologiques tels que l'acidose (González-Ibarra et al., 2011; Jackson and Kochanek, 2019; Karnatovskaia et al., 2014).

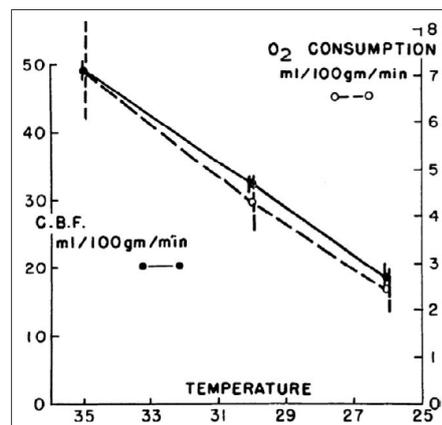


Figure 44 : Influence de la température sur la consommation en oxygène du cerveau et le flux sanguin cérébral chez le chien (Karnatovskaia et al., 2014)

II.3.a.ii. Voies de signalisation

L'hypothermie modifie également certaines voies de signalisation. Elle renforce notamment la voie PI3K/AKT/mTOR (González-Ibarra et al., 2011; Wu et al., 2017) et inhibe les voies JAK (*Janus kinase*) et STAT (*signal transducers and activators of transcription*) (Kim et al., 2013; Lee et al., 2017). De plus, elle inhibe la voie MAPK/ERK activée par le stress en réduisant la phosphorylation des kinases ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*, Figure 45) et MEK1/2 (MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) *ERK kinase*), impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et dans certains mécanismes de l'inflammation (Diestel et al., 2008; González-Ibarra et al., 2011; Schmitt et al., 2007). L'hypothermie inhibe également l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*), impliqué dans différents processus de l'inflammation (Diestel et al., 2008; Kim et al., 2013; Lee et al., 2017; Shintani et al., 2010; Zhao et al., 2018).

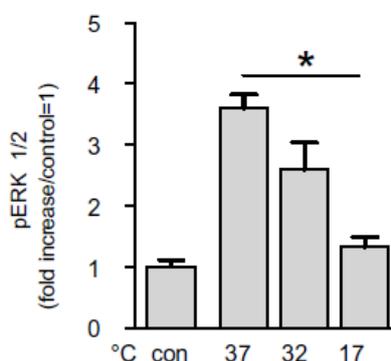


Figure 45 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la phosphorylation de ERK 1/2 en présence de TNF- α dans des cellules endothéliales humaines, *p < 0,05 (Diestel et al., 2008)

II.3.b. Système immunitaire et inflammation

II.3.b.i. Cytokines

L'hypothermie agit sur le système immunitaire en modifiant plusieurs voies de l'inflammation. Elle diminue la production de certaines cytokines pro-inflammatoires, notamment le facteur de nécrose tumorale TNF- α (Figure 46A, (Frink et al., 2012; Lee et al., 2016b; Schmitt et al., 2007; Seo et al., 2012; Tong et al., 2017; Zhang et al., 2018; Zhao et al., 2018)) et les interleukines IL-1 β (Figure 46B, (Frink et al., 2012; Lee et al., 2016b; Seo et al., 2012; Zhang et al., 2018)) et IL-8 (Diestel et al., 2008; Frink et al., 2012). Son action sur la cytokine pro-inflammatoire IL-6 est plus contrastée : une majorité d'études démontre une réduction de son expression (Frink et al., 2012; Schmitt et al., 2007; Seo et al., 2012; Tong et al., 2017), mais certaines observent toutefois son augmentation (Figure 46C, (Diestel et al., 2008; Horst et al., 2016; Lee et al., 2016b)). Bien qu'il s'agisse d'une cytokine pro-inflammatoire, celle-ci aurait également des effets anti-inflammatoires et protecteurs, entraînant notamment une diminution des expressions de TNF- α et IL-1 β (Frink et al., 2012). De plus, l'hypothermie favorise la production de cytokines anti-inflammatoires telles qu'IL-10 (Figure 46D, (Frink et al., 2012; Lee et al., 2016b)), bien que certaines études démontrent une réduction de son expression (Karnatovskaia et al., 2014; Tong et al., 2017; Wood and Thoresen, 2015).

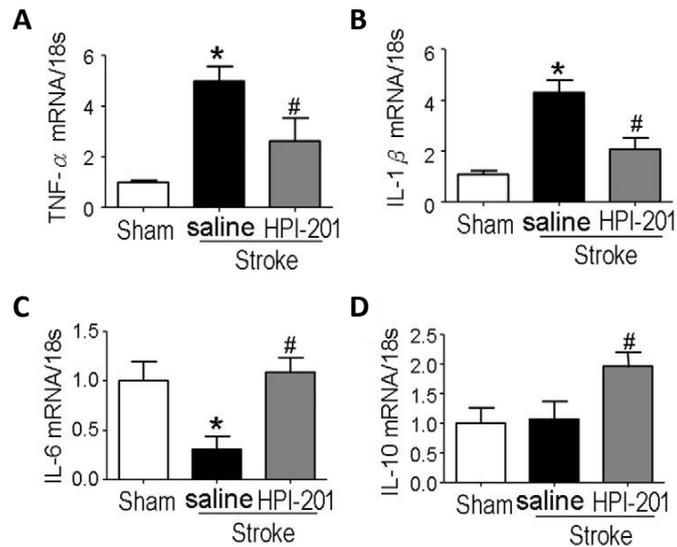


Figure 46 : Influence de l'hypothermie sur l'expression de cytokines inflammatoires chez la souris (Lee et al., 2016b)

II.3.b.ii. Chimiokines

L'hypothermie diminue également le niveau d'expression des chimiokines IP-10 (*interferon gamma-induced protein 10*, aussi appelée CXCL10 (*C-X-C motif chemokine ligand 10*), (Matsui and Yoshida, 2016)), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein*, Figure 47A, (Lee et al., 2016b)), MIP-2 (aussi appelée CXCL2, (Matsui and Yoshida, 2016)) ainsi que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*, aussi appelée CCL-2 (*chemokine ligand 2*), Figure 47B, (Diestel et al., 2008; Frink et al., 2012; Lee et al., 2016b; Matsui and Yoshida, 2016; Tong et al., 2017; Truettner et al., 2017; Wood and Thoresen, 2015)). Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement de cellules immunitaires telles que les macrophages et la microglie après un traumatisme, et participent aux mécanismes de l'inflammation.

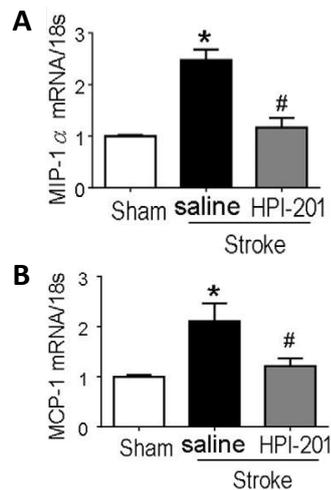


Figure 47 : Influence de l'hypothermie sur l'expression de chimiokines inflammatoires chez la souris (Lee et al., 2016b)

II.3.b.iii. Cellules de l'immunité

L'hypothermie altère le fonctionnement de certaines cellules du système immunitaire, notamment les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Du et al., 2013). Elle réduit également la production de certains lipides pro-inflammatoires comme les leucotriènes, et de certaines cellules inflammatoires telles que les monocytes, les macrophages et les neutrophiles, dont elle réduit l'infiltration tissulaire (Deng et al., 2003; Frink et al., 2012; González-Ibarra et al., 2011; Karnatovskaia et al., 2014; Matsui and Yoshida, 2016; Shintani et al., 2010; Wood and Thoresen, 2015). De plus, elle régule la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire de type M2 (Lee et al., 2016b; Liu et al., 2018; Truettner et al., 2017) et diminue l'activation des astrocytes (Karnatovskaia et al., 2014; Wang and Pearse, 2015). Elle inhibe notamment la prolifération, la migration, la transformation ainsi que l'activation de cellules astrogliales (Hachimi-Idrissi et al., 2004). Enfin, elle diminue l'activation de la microglie, comme en témoigne une diminution de l'expression du facteur iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1) (Gunn et al., 2017; Karnatovskaia et al., 2014; Kim et al., 2012; Lee et al., 2016b; Seo et al., 2012; Zhang et al., 2018), ainsi que sa migration (Seo et al., 2012; Tong et al., 2017).

II.3.b.iv. Molécules d'adhésion

Concernant ses effets sur les molécules d'adhésion, l'hypothermie diminue l'expression de CD-11a, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), ELAM-1 (*endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*), et surtout ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (Deng et al., 2003; Frink et al., 2012; Kim et al., 2012; Matsui and Yoshida, 2016; Schmitt et al., 2007).

II.3.c. Activité neurologique

II.3.c.i. Mécanismes neuronaux

L'hypothermie agit sur les mécanismes neuronaux en réduisant la transmission synaptique en dessous de 20°C (Aihara et al., 2001; Fujii et al., 2010; Motamedi et al., 2006; Nomura et al., 2014; Smyth and Rothman, 2011) et en altérant le fonctionnement des canaux ioniques voltage-dépendant (Fujii et al., 2010; Motamedi et al., 2013; Rothman and Yang, 2003). A 15°C, l'hypothermie induit un déplacement réversible du potentiel de repos dans une direction dépolarisante, signe d'une altération membranaire (Aihara et al., 2001). A 23°C, elle arrête l'activité électrique corticale, qui revient rapidement à la normale lorsque le réchauffement atteint 31°C (Figure 48, (Woodhall et al., 1959)).

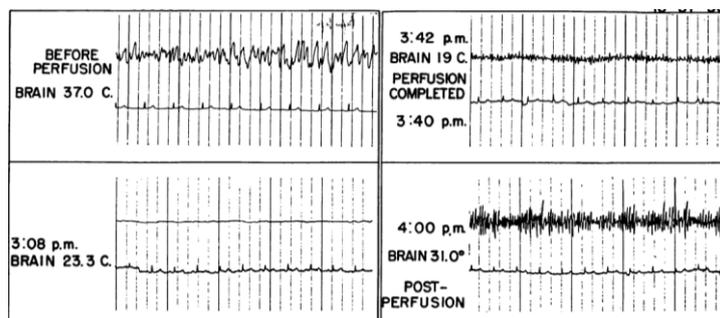


Figure 48 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur l'activité électrique corticale humaine (Woodhall et al., 1959)

De plus, elle joue un rôle clé dans la régénération des cellules neuronales et la réparation des circuits neuronaux (Karnatovskaia et al., 2014; Wang and Zhang, 2015; Yenari and Han, 2013). Elle préserve notamment le caractère souche des cellules souches neurales (Lee et al., 2017; Saito et al., 2010) et promeut la neurogenèse (Lee et al., 2017).

II.3.c.ii. Facteurs de croissance

Les effets de l'hypothermie sur l'angiogenèse sont contrastés. D'une part, elle augmente l'expression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), impliqué dans la survie neuronale (González-Ibarra et al., 2011; Lee et al., 2017; Xie et al., 2007). D'autre part, elle diminue l'expression du VEGF (Fischer et al., 1999; Lee et al., 2017) et du facteur de croissance nerveuse (NGF, *nerve growth factor*) (Lee et al., 2017).

II.3.c.iii. Neurotransmetteurs

L'hypothermie diminue la libération de certains neurotransmetteurs excitateurs, notamment l'acétylcholine (Motamedi et al., 2013; Rothman, 2009; Smyth and Rothman, 2011), la dopamine (Busto et al., 1989; González-Ibarra et al., 2011) et le glutamate (Figure 49, (Busto et al., 1989; Fujii et al., 2011, 2010; González-Ibarra et al., 2011; Kim et al., 2013; Lee et al., 2017; Motamedi et al., 2013; Nomura et al., 2014)), même à des niveaux légers. Elle atténue également l'excitotoxicité, caractérisée par une entrée d'ions calcium dans les cellules et notamment déclenchée par une activation des récepteurs du glutamate (Gao et al., 2016; Jackson and Kochanek, 2019; Schmitt et al., 2014; Wang et al., 2006). En effet, elle inhibe le déclenchement de ce processus neurotoxique en réduisant le niveau extracellulaire de glutamate et en diminuant le niveau de glycine dans le cerveau après un traumatisme (González-Ibarra et al., 2011; Karnatovskaia et al., 2014; Lee et al., 2017).

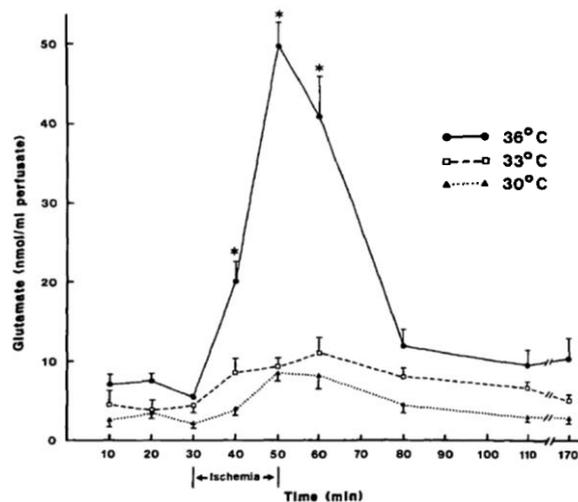


Figure 49 : Influence de la température cérébrale sur la libération de glutamate après une ischémie chez le rat, * $p < 0,01$ (Busto et al., 1989)

II.3.c.iv. Barrière hématoencéphalique

L'hypothermie préserve la barrière hémato-encéphalique grâce à différents mécanismes. En effet, elle protège ses protéines structurales et inhibe l'activation des métalloprotéinases dégradant la matrice extracellulaire (Jackson and Kochanek, 2019; Karnatovskaia et al., 2014; Lee et al., 2017; Schmitt et al., 2014). De plus, elle diminue la perméabilité vasculaire, ce qui réduit les risques de ruptures et préserve l'intégrité de la barrière, capable de lutter efficacement contre des molécules toxiques (Fischer et al., 1999; González-Ibarra et al., 2011; Jackson and Kochanek, 2019).

II.3.d. Cytoprotection

II.3.d.i. Mort cellulaire

Les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie se traduisent notamment par une protection de la viabilité des cellules neuronales (Lee et al., 2016b; Seo et al., 2012) et microgliales (Seo et al., 2012) en présence d'un agent cytotoxique. Elle réduit également la mort cellulaire induite par autophagie (Lee et al., 2017; Zhang et al., 2018) et par apoptose – ou mort cellulaire programmée.

Il existe deux voies de l'apoptose : une voie dite extrinsèque, impliquant les récepteurs au TNF, et une voie dite intrinsèque, mettant en jeu la mitochondrie. Plusieurs études ont démontré que l'hypothermie inhibait à la fois les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose (Frink et al., 2012; Gao et al., 2016). L'hypothermie bloque la voie apoptotique extrinsèque en inhibant différents récepteurs du TNF- α , notamment le récepteur Fas (Frink et al., 2012; Fu et al., 2004; González-Ibarra et al., 2011; Lee et al., 2017; Liu et al., 2008; Zhao et al., 2007), ainsi que les métalloprotéases matricielles qui modulent son activation (Liu et al., 2008). Elle réduit également l'activation de la caspase-8 (Frink et al., 2012; González-Ibarra et al., 2011; Liu et al., 2008; Sakurai et al., 2006).

De plus, l'hypothermie agit sur différents acteurs de la voie apoptotique mitochondriale : elle active le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (*B-cell lymphoma*) (Frink et al., 2012; González-Ibarra et al., 2011; Krech et al., 2017; Lee et al., 2017) et diminue les niveaux du facteur pro-apoptotique Bax (*Bcl-2-associated X*) (Frink et al., 2012) et du cytochrome c (Frink et al., 2012; González-Ibarra et al., 2011; Krech et al., 2017; Lee et al., 2017; Zhao et al., 2005). De plus, elle supprime l'activation des caspases-3 et -9 (Frink et al., 2012; González-Ibarra et al., 2011; Zhao et al., 2005) et diminue l'expression du facteur inducteur de l'apoptose (AIF, *apoptosis inducing factor*) (González-Ibarra et al., 2011; Krech et al., 2017; Zhao et al., 2007). Enfin, l'hypothermie prévient l'apoptose neuronale en diminuant le niveau d'expression de la protéine p53, qui active certaines protéines pro-apoptotiques (González-Ibarra et al., 2011; Lee et al., 2017).

II.3.d.ii. Stress oxydatif

L'hypothermie réduit le stress oxydatif en réduisant notamment la production de radicaux libres tels que les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote (Frink et al., 2012; Jackson and Kochanek, 2019; Lee et al., 2017). Plusieurs études ont démontré qu'elle réduisait notamment la production de l'ion superoxyde (O_2^-) (González-Ibarra et al., 2011; Si et al., 1997, p. 97; Xu et al., 2014), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Gao et al., 2016; González-Ibarra et al., 2011; Seo et al., 2012; Xu et al., 2014) et de l'oxyde nitrique (NO), mesurée par l'ion nitrite (NO_2^- , Figure 50, (Frink et al., 2012; Schmitt et al., 2007; Seo et al., 2012; Si et al., 1997; Tong et al., 2017)). Elle diminue également la production de l'enzyme iNOS (oxyde nitrique synthase inductible), qui catalyse la production d'oxyde nitrique (Frink et al., 2012; Lee et al., 2016b; Schmitt et al., 2007; Seo et al., 2012; Tong et al., 2017).

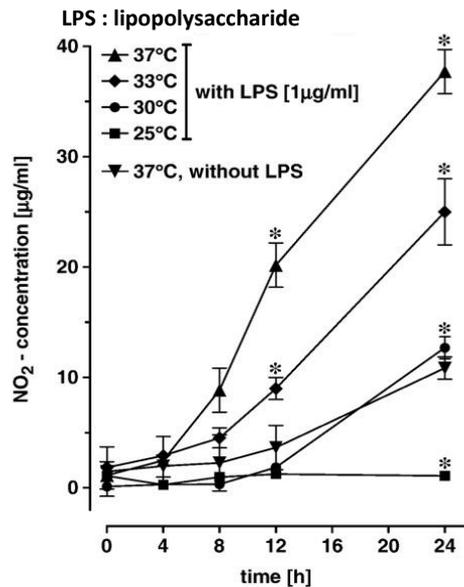


Figure 50 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la production d'oxyde nitrique par des cellules microgliales (Schmitt et al., 2007)

II.3.e. Protéines de choc froid

II.3.e.i. RBM3 et CIRBP

◆ Activité génétique

Enfin, un autre mécanisme d'action de l'hypothermie est celui des protéines de choc froid (CSP, *cold-shock proteins*), induites après une diminution de température. A ce jour, deux protéines ont été caractérisées : RBM3 (*RNA-binding motif 3*) et CIRBP (*cold-inducible RNA-binding protein*), également appelée CIRP. Ce sont des protéines de liaison à l'acide ribonucléique (ARN) riches en glycine, codant respectivement pour les gènes *RBM3* et *CIRBP* et capables de se lier à la fois à l'ADN et à l'ARN (Al-Astal et al., 2016; Jackson et al., 2015; Lujan et al., 2018). RBM3 a une masse moléculaire de 17 kDa et CIRBP de 18 kDa (Jackson et al., 2015). Ces protéines sont principalement localisées dans le noyau où elles régulent la transcription des gènes ou se lient à l'ARN messager pour la régulation post-transcriptionnelle. Sous certaines conditions physiologiques ou de stress, elles peuvent se déplacer du noyau vers le cytoplasme, et CIRBP peut être recrutée dans les granules de stress (Liao et al., 2017; Zhu et al., 2016). Enfin, elles favorisent la synthèse des protéines en améliorant la traduction génétique et en stabilisant l'ARN messager (Liao et al., 2017; Lujan et al., 2018; Peretti et al., 2015).

◆ Induction

RBM3 et CIRBP peuvent être induites par différents facteurs de stress tels que l'hypothermie (Condition hypothermique), l'hypoxie, le rayonnement ultraviolet ou encore certaines toxines (Liao et al., 2017; Zhu et al., 2016). Une étude a notamment montré que ces deux protéines pouvaient être exprimées en réponse à une hypoxie légère (8%) et sévère (1%), par un mécanisme n'impliquant ni les mitochondries, ni HIF-1 (*hypoxia inducible factor*) (Wellmann et al., 2004). Cependant, une autre étude a montré qu'une hypoxie légère (8%) ou sévère (0,2%) ne modifiait pas l'expression de RBM3 dans des neurones humains, indiquant que le mécanisme de neuroprotection de cette protéine ne passerait pas par l'hypoxie (Rosenthal et al., 2017). Enfin, en condition hyperthermique, l'expression de ces deux protéines est fortement réduite (Danno et al., 1997; Rao et al., 2019; Wong et al., 2016).

◆ Condition hypothermique

RBM3 est très sensible aux variations de température, puisqu’une diminution de seulement un degré Celsius suffit à doubler son expression après 24 heures (Figure 51, (Jackson et al., 2015)). Son expression est rapide après le choc froid, avec une apparition dès 3 heures à 32°C (Zhu et al., 2016) et une expression maximale à partir de 13 heures, maintenue jusqu’à plus de 24 heures (Figure 52, (Ushio and Eto, 2018)).

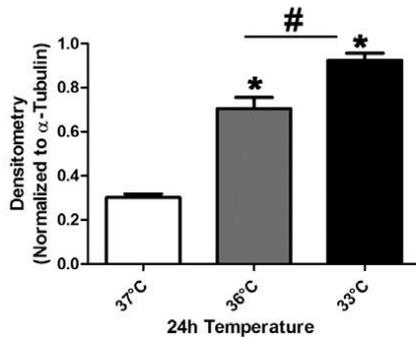


Figure 51 : Influence d’une hypothermie légère sur l’expression de RBM3 dans des neurones corticaux de rat, *p < 0,05 (Jackson et al., 2015)

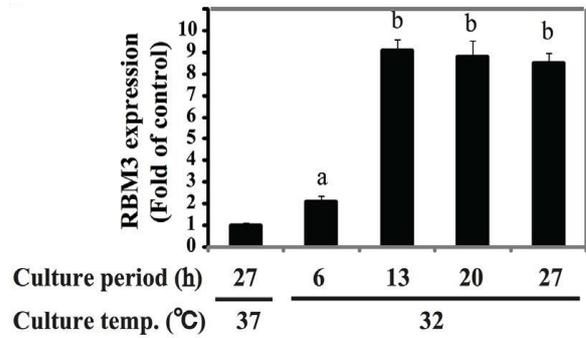


Figure 52 : Influence de la durée d’une hypothermie légère sur l’expression de RBM3 dans des cellules tumorales humaines (HeLa), a : p < 0,05 ; b : p < 0,01 vs 37°C (Ushio and Eto, 2018)

CIRBP est quant à elle surexprimée en réponse à des hypothermies légères (33,5°, Figure 53, (Tong et al., 2013)), modérées (32 et 30°C, (Liu et al., 2010; Nishiyama et al., 1997; Saito et al., 2010)) voire sévères (25°C), mais pas à des températures inférieures à 20°C (Nishiyama et al., 1997). Cette protéine est rapidement induite après un stress hypothermique, avec une légère augmentation visible dès 3 heures, qui devient significative à partir de 6 heures et augmente considérablement après 24 heures (Figure 54, (Liu et al., 2010; Nishiyama et al., 1997; Tong et al., 2013)) pouvant perdurer jusqu’à au moins 48 heures (Tong et al., 2013).

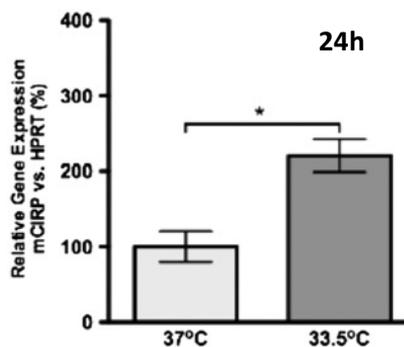


Figure 53 : Influence d’une hypothermie légère sur l’expression de CIRBP dans des tranches hippocampiques de souris, *p < 0,05 (Tong et al., 2013)

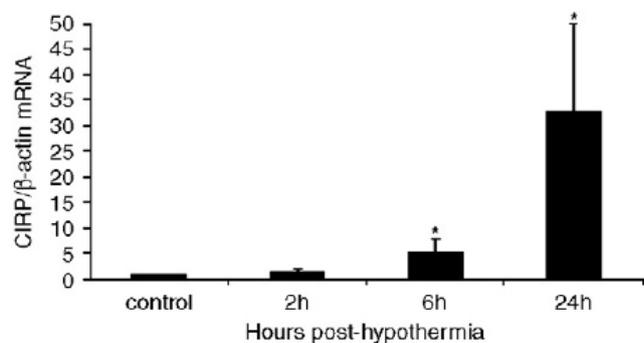


Figure 54 : Influence de la durée d’une hypothermie de 30°C sur l’expression de CIRBP dans le cortex de rat, *p < 0,05 (Liu et al., 2010)

Après leur induction en condition hypothermique, il faut attendre près de 24h à 37°C pour que l’expression de RBM3 et CIRBP revienne au niveau initial (Figure 55 et Figure 56, (Neutelings et al., 2013)).

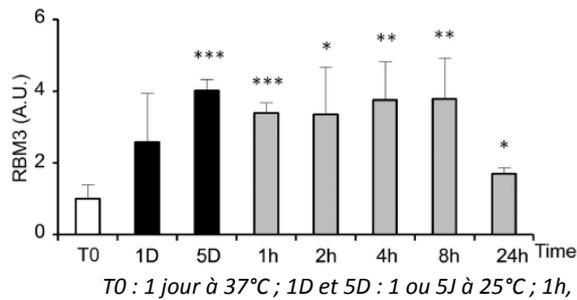


Figure 55: Influence d'un retour à 37°C après un refroidissement à 25°C sur l'expression de RBM3, *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001 versus T0 (Neutelings et al., 2013)

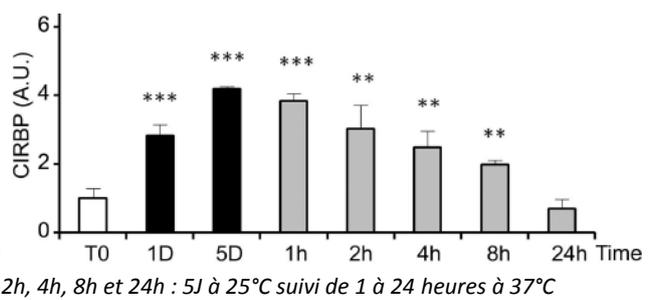


Figure 56: Influence d'un retour à 37°C après un refroidissement à 25°C sur l'expression de CIRBP, **p < 0,01 ; ***p < 0,001 versus T0 (Neutelings et al., 2013)

Enfin, RBM3 et CIRBP sont toutes les deux impliquées dans les mécanismes de neuroprotection de l'hypothermie. En effet, l'équipe de Chip (Chip et al., 2011) a montré que l'inhibition de RBM3 réduisait fortement les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie. CIRBP contribue également aux effets neuroprotecteurs de l'hypothermie, par une voie indépendante des processus métaboliques (Liu et al., 2010). De plus, cette protéine joue un rôle majeur dans l'inhibition de la prolifération cellulaire par l'hypothermie, qui n'est donc pas uniquement liée à une diminution du métabolisme cellulaire (Fujita, 1999; Nishiyama et al., 1997).

◆ Mécanismes cellulaires

Au niveau cellulaire, RBM3 est nécessaire à la prolifération des cellules et promeut leur progression à travers les différentes phases du cycle, tout comme CIRBP qui facilite leur entrée en mitose (Matsuda et al., 2011; Sureban et al., 2008; Wellmann et al., 2010; Zhu et al., 2016).

Ces deux protéines ont également des effets neuroprotecteurs et permettent de diminuer l'apoptose induite par différents facteurs de stress (Chip et al., 2011; Rosenthal et al., 2017; Wellmann et al., 2010; Yang et al., 2017). L'équipe d'Ushio (Ushio and Eto, 2018) a notamment démontré que l'extinction du gène *RBM3* augmentait considérablement la proportion de cellules apoptotiques (Figure 57). Une étude *in vivo* a également montré que l'expression de RBM3 permettait de prévenir la perte neuronale ainsi que les déficits comportementaux, de rétablir les capacités synaptiques et de prolonger la survie de souris dans des modèles de la maladie à prions ou d'Alzheimer (Peretti et al., 2015).

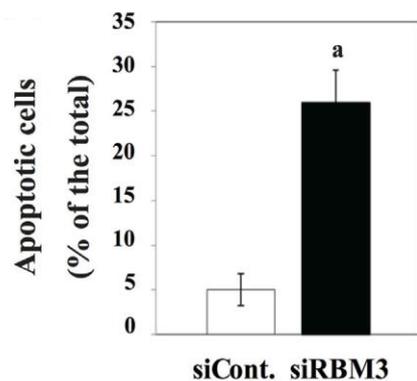


Figure 57: Influence de la déficience en RBM3 sur l'apoptose cellulaire, a : p < 0,01 (Ushio and Eto, 2018)

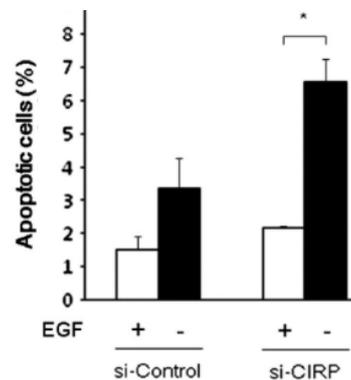


Figure 58: Influence de la déficience en CIRBP sur l'apoptose cellulaire, *p < 0,05 (Saito et al., 2010)

CIRBP a également des effets cytoprotecteurs, puisqu'elle permet de préserver la survie cellulaire lors de la mise en hypothermie (Kaneko and Kibayashi, 2012). Elle permet notamment de préserver la viabilité cellulaire en diminuant l'apoptose induite par différents facteurs de stress (Figure 58, (Saito et al., 2010; Wang et al., 2016; Q. Zhang et al., 2017)). Pour cela, elle régule certains gènes anti et pro-apoptotiques ainsi que le niveau d'expression de p53 (H. N. Lee et al., 2015; Liu et al., 2015), et est capable de bloquer la voie d'apoptose mitochondriale lors de la protection de neurones (Zhang et al., 2015). Elle est également capable d'activer les voies ERK, Akt et NF- κ B (Liu et al., 2015; Saito et al., 2010; Sakurai et al., 2006; Zhang et al., 2015). Cependant, il faut noter que ce mécanisme de cytoprotection passe également par une voie indépendante de CIRBP (Sakurai et al., 2006).

◆ Implication pathologique

RBM3 est impliquée dans l'angiogenèse (Martínez-Arribas et al., 2006) tandis que CIRBP est un médiateur de l'inflammation, qui pourrait participer à certains dommages cellulaires (Rajayer et al., 2013). En effet, elle stimule la production de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que IL-8, IL-1 β et TNF- α , en agissant notamment sur la voie NF- κ B (Brochu et al., 2013; Zhou et al., 2014). Ces protéines de choc froid sont également impliquées dans certaines pathologies. RBM3 est notamment surexprimée après une lésion cérébrale (Zhu et al., 2016) alors que CIRBP est surexprimée chez des patients après un choc hémorragique et une septicémie, et associée à une mortalité élevée (Qiang et al., 2013; Zhou et al., 2015).

De plus, elles sont aussi impliquées dans de nombreux cancers, avec des rôles très distincts. D'une part, un haut niveau d'expression de RBM3 est facteur de bon pronostic pour le cancer du sein, de l'ovaire, de la vessie, de l'œsophage et gastrique alors qu'une faible expression correspond à un échec des traitements pour le cancer des testicules et un mauvais pronostic pour le cancer de la vessie, colorectal et le mélanome malin (Kang et al., 2018; Martínez-Arribas et al., 2006; Zhu et al., 2016). Cependant, son implication dans le cancer de la prostate est plus controversée, RBM3 étant un facteur de bon pronostic associé à un ralentissement de la progression tumorale dans une première étude (Jonsson et al., 2011), et un facteur de récurrence précoce avec une surexpression de la protéine dans les tumeurs de stade avancé dans une autre (Grupp et al., 2014). Ces résultats sont principalement dus à des différences de méthode telles que les procédures expérimentales, la sélection des patients, et la taille des cohortes, et ne permettent pas de décider en faveur d'une des options. Enfin, une autre étude a montré que l'expression de RBM3 augmentait avec le grade des astrocytomes, avec une expression maximale dans les glioblastomes, de grade IV (H.-T. Zhang et al., 2013).

Le rôle de CIRBP dans la carcinogenèse est également controversé, puisqu'elle apparaît à la fois comme un suppresseur et un promoteur de tumeur. Son rôle en tant que suppresseur de tumeur a notamment été démontré en raison du fait qu'une faible expression de CIRBP est corrélée avec des carcinomes de l'endomètre ou des tumeurs ovariennes malignes, contrairement aux tissus sains (Lujan et al., 2018). Elle est également capable d'inhiber *in vitro* et *in vivo* la migration de cellules tumorales induite par un inhibiteur du VEGF, lui conférant un fort potentiel anti-tumoral (Liu et al., 2019). Cependant, CIRBP a également un rôle de promoteur de tumeur puisqu'elle est surexprimée dans le cancer de la prostate, du sein, colorectal, et dans l'adénome pituitaire (Lujan et al., 2018). Une haute expression de CIRBP est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer oral, du foie, du sein, colorectal, et dans l'adénome pituitaire (Zhu et al., 2016). De plus, son inhibition augmente la chimiosensibilité et diminue la survie de cellules tumorales de la prostate (Zeng et al., 2009). Enfin, CIRBP semblerait également avoir un rôle dans la cancérogenèse et la formation des métastases, puisqu'elle permet à certaines cellules d'outrepasser la barrière de sénescence répllicative et d'acquérir des capacités pro-tumorales (Liao et al., 2017; Lujan et al., 2018).

II.3.e.ii. RTN3

Plus récemment, l'équipe de Bastide (Bastide et al., 2017) a identifié une nouvelle protéine de choc froid appartenant à la famille des réticulons : RTN3 (réticulon-3), codée par le gène *RTN3*. Cette protéine est induite en condition hypothermique, que ce soit *in vitro* dans des neurones humains SH-SY5Y après 24h à 32°C ou *in vivo* dans des hippocampes de souris (Figure 59, (Bastide et al., 2017)).

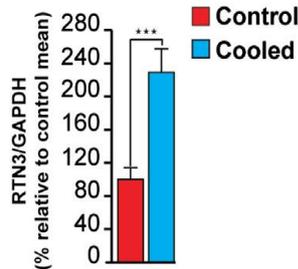


Figure 59 : Influence du refroidissement sur l'expression de RTN3 dans des hippocampes de souris, ***p < 0,001 (Bastide et al., 2017)

L'hypothermie induit l'expression de RTN3 *in vivo* par des mécanismes post-transcriptionnels, et l'expression de RTN3 est un médiateur des effets neuroprotecteurs de RBM3. Bien que les mécanismes liés à cette protéine ne soient pas encore tous élucidés, il semblerait que ses effets varient en fonction de la température, de l'âge des sujets et du type de pathologie. En effet, RTN3 présente à la fois des effets neuroprotecteurs et des effets neurotoxiques. D'abord, elle joue un rôle dans la plasticité synaptique et a des effets protecteurs dans la maladie d'Alzheimer (Jackson and Kochanek, 2019). De plus, elle a également un rôle protecteur dans la maladie à prions, où sa surexpression permet de prévenir la perte synaptique, la perte neuronale, les déficits comportementaux ainsi que d'améliorer la survie de souris (Figure 60, (Bastide et al., 2017)).

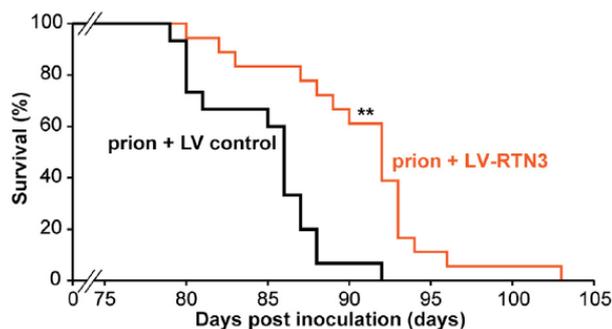


Figure 60 : Influence de la surexpression de RTN3 sur la survie de souris infectées par la maladie à prion, **p < 0,01 (Bastide et al., 2017)

Cependant, RTN3 a aussi des effets néfastes, puisqu'une surexpression de cette protéine a entraîné des anomalies neuronales chez des souris (Hu et al., 2007), et a été uniquement observée dans des cellules tumorales d'astrocytomes, contrairement aux cellules saines (Huang et al., 2004).

II.3.e.iii. Hormones de choc froid

Enfin, un autre type de protéines de choc froid a été identifié : les hormones de choc froid (CSH, *cold stress hormones*). Ces hormones peuvent être induites en condition hypothermique et participent au maintien de la température corporelle ainsi qu'à l'activation de certaines voies thermogéniques. Parmi elles, l'irisine et FGF21 (*fibroblast growth factor 21*) ont été étudiées pour leurs effets neuroprotecteurs et METRN1 (*meteorin-like*) pour ses effets anti-inflammatoires (Jackson and Kochanek, 2019).

Chapitre III

Applications médicales de l'hypothermie

Ce troisième chapitre sera dédié aux applications médicales de l’hypothermie, permettant d’aborder ses effets thérapeutiques pour différentes pathologies, tant au niveau expérimental que clinique. Une partie conséquente sera consacrée à l’utilisation du refroidissement localisé dans le traitement des crises d’épilepsie, en raison de l’implication sur un projet dédié à cette thématique au cours de la thèse (III.4. Épilepsie). Ensuite, une partie entière concernera l’utilisation d’hypothermie thérapeutique en cancérologie, en lien direct avec la problématique de travail (III.5. Cancer).

III.1. Généralités

Les effets thérapeutiques de l’hypothermie ont été démontrés au niveau cellulaire pour différents types de tumeurs et dans des études expérimentales pour différentes pathologies, notamment l’encéphalopathie néonatale, l’insuffisance hépatique aiguë, la méningite, l’épilepsie, ainsi qu’après un arrêt cardiaque, un traumatisme crânien, un accident vasculaire cérébral, une lésion médullaire ou encore un infarctus du myocarde (Figure 61). A ce jour, l’hypothermie fait partie des recommandations officielles pour la prise en charge des encéphalopathies néonatales et des arrêts cardiaques hors hôpital, notamment en cas de fibrillation ou de tachycardie ventriculaire (Karnatovskaia et al., 2014; Saigal et al., 2015).

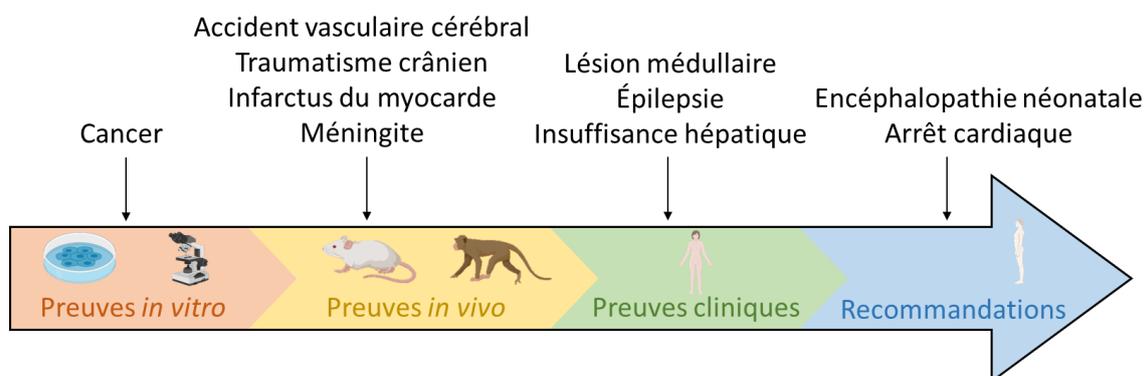


Figure 61 : Niveaux de preuve des effets thérapeutiques de l’hypothermie dans diverses applications médicales

III.2. Recommandations officielles

III.2.a. Arrêt cardiaque

L’hypothermie thérapeutique est principalement recommandée pour le traitement des patients après un arrêt cardiaque hors hôpital. Ses effets neuroprotecteurs ont été démontrés de manière expérimentale, avec une diminution des déficits neurologiques (Figure 62) et une augmentation de la survie globale des animaux (Colbourne and Corbett, 1995; Hickey et al., 2000; Hicks et al., 2000; Sterz et al., 1991). Concernant les études cliniques, elles ont permis de montrer une nette amélioration de l’état de santé des patients après 12 heures d’hypothermie à 33°C (Bernard et al., 2002), ainsi qu’une amélioration des résultats neurologiques et de la survie après 24 heures d’hypothermie à 32 – 34°C (Figure 63, (Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group, 2002)).

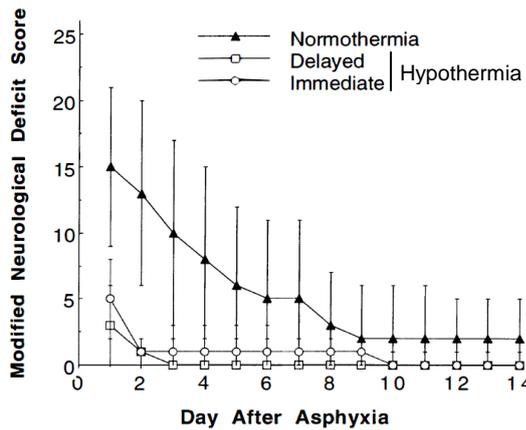


Figure 62 : Influence de l'hypothermie sur les déficits neurologiques après un arrêt cardiaque chez le rat, adapté d'après (Hicks et al., 2000)

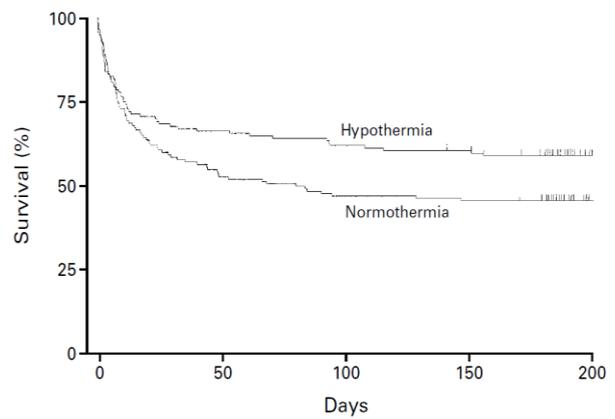


Figure 63 : Influence de l'hypothermie sur la survie de patients après un arrêt cardiaque (Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group, 2002)

Depuis 2002, les directives publiées par le Comité de liaison international sur la réanimation (ILCOR, *International Liaison Committee on Resuscitation*) indiquent que les patients ressuscités après un arrêt cardiaque doivent être placés en hypothermie légère (32°C à 34°C) le plus rapidement possible, pendant 12h à 24h (Nolan et al., 2003). En 2015, les directives de ce comité ont légèrement évolué, avec une température cible à présent comprise entre 32 et 36°C et une durée minimale de 24 heures (Silverman and Scirica, 2016). Au fil des années, de nouveaux essais cliniques continuent d'être menés afin d'optimiser les modalités de ce traitement, notamment la température cible (Lopez-de-Sa et al., 2018; Nielsen et al., 2013).

III.2.b. Encéphalopathie néonatale

L'hypothermie thérapeutique est également recommandée pour la prise en charge de l'encéphalopathie hypoxique ischémique néonatale. Les résultats expérimentaux ont d'abord mis en évidence une réduction de la mort neuronale et des lésions cérébrales, ainsi qu'une amélioration neurologique à long terme (Gunn et al., 2017). Par la suite, de nombreux essais cliniques ont démontré l'intérêt thérapeutique de l'hypothermie sur des nouveau-nés après au moins 35 semaines de grossesse. Certains essais ont notamment démontré qu'une hypothermie légère (33 à 35°C) administrée dans les 6 premières heures de vie des nouveau-nés pendant 48 à 72 heures permettait d'améliorer leur survie (Eicher et al., 2005; Gluckman et al., 2005) et de réduire les déficits moteurs (Eicher et al., 2005) ainsi que les séquelles neurologiques (Azzopardi et al., 2009; Gluckman et al., 2005). Le suivi à long terme de ces nouveau-nés a permis de confirmer les prévisions des essais, avec de meilleurs résultats neurologiques et moins d'atteintes cérébrales chez les enfants traités par hypothermie. En 2010, l'hypothermie a été introduite dans les recommandations du Conseil européen de réanimation (ERC, *European Resuscitation Council*) pour la prise en charge des encéphalopathies hypoxiques ischémiques néonatales, avec une initiation dans les 6 heures suivant la naissance, une durée de 72 heures et un réchauffement pendant au moins 4 heures (Richmond and Wyllie, 2010). Les effets secondaires de l'hypothermie doivent toutefois être pris en charge, notamment le risque de thrombopénie et d'arythmie cardiaque (W. Zhang et al., 2017).

III.3. Applications envisagées

III.3.a. Lésion médullaire

Dans le cadre du traitement des lésions médullaires (SCI, *spinal cord injury*), les effets neuroprotecteurs de l'hypothermie ont été démontrés expérimentalement chez le rat (Ha and Kim, 2008; Ok et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par une étude clinique qui a rapporté une bonne tolérance ainsi qu'une amélioration des scores neurologiques pour des patients traités avec une hypothermie légère de 33°C (Dididze et al., 2013). Cependant, aucun essai clinique à grande échelle n'a été mené à ce jour, et bien que ce traitement semble prometteur, il n'existe pas de recommandations officielles concernant l'utilisation d'hypothermie pour les lésions médullaires (Alkabie and Boileau, 2016; Dididze et al., 2013; Kim et al., 2017).

III.3.b. Insuffisance hépatique aigüe

L'insuffisance hépatique aigüe (ALF, *acute liver failure*) peut aboutir à de sévères complications telles que l'encéphalopathie hépatique, qui se traduit cliniquement par des troubles neuropsychiques légers pouvant mener jusqu'au coma. Elle induit également une élévation de la pression intracrânienne qui se révèle mortelle pour 20% des patients en attendant leur transplantation hépatique (Jalan et al., 2004). Dans ce contexte, l'hypothermie thérapeutique a été envisagée dans le but de réduire la pression intracrânienne et d'améliorer l'état de santé des patients. Les études expérimentales ont montré qu'une hypothermie de 33°C permettait de prévenir l'inflammation et les œdèmes cérébraux, et de retarder l'encéphalopathie chez le rat (Figure 64, (Jiang et al., 2009)).

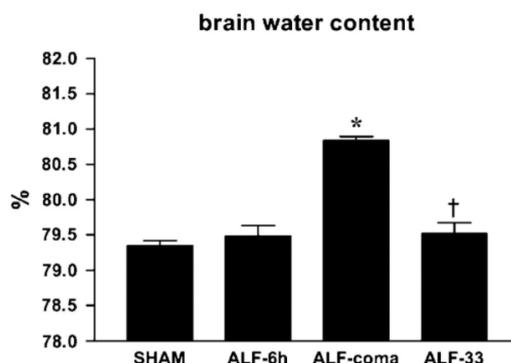


Figure 64 : Influence d'une hypothermie de 33°C sur un œdème cérébral pendant une insuffisance hépatique aigüe chez le rat, *p < 0,001 vs sham, † p < 0,001 vs ALF-coma (Jiang et al., 2009)

Néanmoins, les essais cliniques ont apporté des résultats plus contrastés. Plusieurs études ont montré qu'une hypothermie légère (32 à 33°C) permettait de diminuer la pression intracrânienne (Jalan et al., 1999) et l'inflammation (Jalan et al., 2004; Jiang et al., 2009), mais également d'améliorer l'état de santé des patients jusqu'à la transplantation (Jalan et al., 2004). Cependant, d'autres études n'ont pas observé de modification de l'état de santé des patients avec une hypothermie légère (33 à 35°C) (Karvellas et al., 2015). A ce jour, trop peu d'essais cliniques randomisés de grande ampleur ont été menés pour pouvoir tirer des conclusions claires (Luo et al., 2015), et les paramètres de refroidissement doivent encore être optimisés, notamment la température cible (Bernal et al., 2016). Toutefois, depuis 2017, l'hypothermie figure comme alternative thérapeutique dans les recommandations de l'association européenne pour l'étude du foie (EASL, *European Association for the Study of the Liver*), dans le cadre de la prise en charge des insuffisances hépatiques aiguës chez les patients présentant une pression intracrânienne élevée ("EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure," 2017).

III.3.c. Accident vasculaire cérébral

Le potentiel thérapeutique de l’hypothermie pour traiter les patients après un accident vasculaire cérébral ischémique est encore incertain. En premier lieu, les études expérimentales ont permis de démontrer qu’une hypothermie légère avait des effets neuroprotecteurs en améliorant les fonctions neurologiques et en diminuant les réponses inflammatoires (Berger et al., 2007; Deng et al., 2003). Elle permet également de diminuer le volume de l’infarctus (Figure 65, (Lee et al., 2016a; Xie et al., 2007)), d’améliorer les performances locomotrices et comportementales (Lee et al., 2016a) et de diminuer la pression intracrânienne ainsi que les œdèmes après une ischémie (Jackson and Kochanek, 2019; Karnatovskaia et al., 2014; Wang et al., 2006).

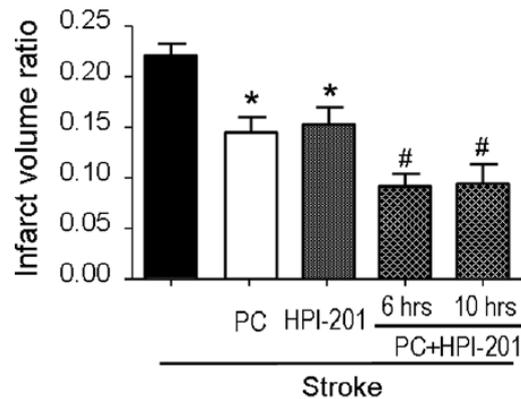


Figure 65 : Influence de différents types d’hypothermie sur le volume de l’infarctus chez le rat, * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs PC ou HPI-201 seul (Lee et al., 2016a)

Néanmoins, les résultats cliniques sont plus nuancés, en raison de la complexité du protocole d’administration et du choix des différents paramètres du refroidissement. D’une part, certaines études n’ont montré aucun effet bénéfique de l’hypothermie sur l’état de santé général des patients (De Georgia et al., 2004; Hemmen et al., 2010), voire une augmentation des effets secondaires, notamment le risque hémorragique et la pneumonie (Chen et al., 2016; Horn et al., 2014; Lyden et al., 2005). D’autre part, certains essais ont montré une réduction de l’étendue des lésions (Peng et al., 2016; Wu et al., 2018), ainsi qu’une amélioration du score neurologique des patients (Peng et al., 2016). Les recommandations officielles de 2019 pour la prise en charge des patients après un AVC ischémique mentionnent un bénéfice incertain de l’hypothermie (Powers William J. et al., 2019), mais de nombreuses équipes explorent cette voie thérapeutique afin d’optimiser les paramètres d’administration et de diminuer les effets secondaires (Huber et al., 2019; Kuczynski et al., 2019). De plus, celles-ci développent de nouveaux dispositifs permettant d’administrer un refroidissement localisé, dont la faisabilité et la sûreté ont été démontrées pour ce type de pathologie (Chen et al., 2016).

III.3.d. Traumatisme crânien

L’hypothermie thérapeutique est également étudiée pour ses effets neuroprotecteurs lors de la prise en charge des traumatismes crâniens (TBI, *traumatic brain injury*). Les études expérimentales ont démontré des effets bénéfiques à de nombreuses reprises, tels qu’une diminution de la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Jiang et al., 1992), ainsi qu’une réduction des dommages histopathologiques, notamment la zone de contusion post-traumatique (Figure 66, (Dietrich et al., 1994)). De plus, d’autres études ont montré une diminution significative de la mortalité et des déficits neurologiques et sensorimoteurs (Bramlett et al., 1995; Clifton et al., 1991).

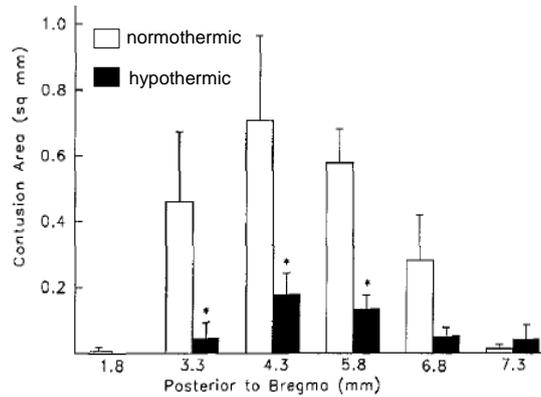


Figure 66 : Influence d’une hypothermie de 30°C sur la zone de contusion post-traumatique chez le rat, *p < 0,05, adapté d’après (Dietrich et al., 1994)

Par la suite, des essais cliniques ont été menés avec des hypothermies légères (32 à 35°C) et des durées variables, mais n’ont pas démontré d’effet bénéfique statistiquement satisfaisant à ce jour. Cependant, ils ont permis de souligner l’importance d’une initiation précoce du refroidissement (dans les heures suivant le traumatisme), d’une durée prolongée (au moins 48h) et d’un réchauffement lent (<0,25°C/h), afin d’améliorer la survie et de diminuer les atteintes neurologiques des patients (Cooper et al., 2018; Dietrich and Bramlett, 2017; Dunkley and McLeod, 2017; Olah et al., 2018; Watson et al., 2018). Enfin, le type de lésion a son importance, avec des effets bénéfiques importants pour les traumatismes de type hémorragique (Zhao et al., 2018), les hématomes (Clifton et al., 2012; Dunkley and McLeod, 2017) et les patients avec une pression intracrânienne élevée (Chen et al., 2019; Dunkley and McLeod, 2017). De nombreux essais sont en cours pour aboutir à des recommandations claires, et s’appuient sur le fait qu’un grand nombre de processus mis en jeu lors des traumatismes crâniens sont thermosensibles (Dietrich et Bramlett 2016).

III.3.e. Infarctus du myocarde

Une autre application envisagée est celle de l’infarctus du myocarde, pour laquelle l’intérêt thérapeutique de l’hypothermie a été démontré dans de nombreux modèles animaux : lapin, chien, mouton, porc et rat (Kohlhauer et al., 2016). Cependant, les résultats des essais cliniques sont plus nuancés. D’une part, certains essais démontrent une réduction de la taille de l’infarctus avec une hypothermie de 31°C (Wang et al., 2018) et une diminution du taux d’insuffisance cardiaque à 33°C (Figure 67, (Erlinge et al., 2015)), bien que l’étendue des études soit limitée.

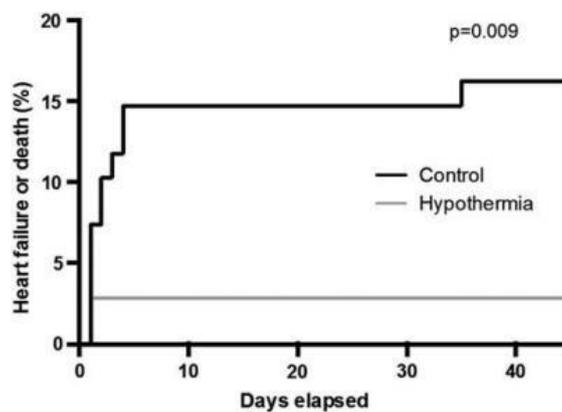
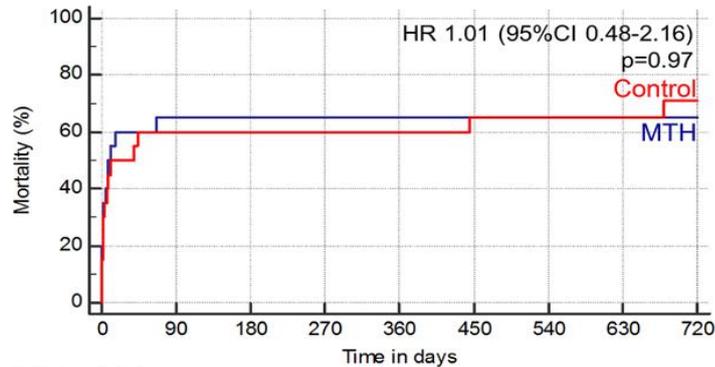


Figure 67 : Taux d’insuffisance cardiaque 45 jours après un infarctus du myocarde en fonction de la température (Erlinge et al., 2015)

D’autre part, certaines études ne démontrent aucun bénéfice pour les patients traités avec une hypothermie de 33°C (Figure 68, (Fuernau et al., 2019)), voire une augmentation des effets secondaires (Nichol et al., 2015). Ces résultats contrastés peuvent être expliqués par une induction trop tardive de l’hypothermie après l’infarctus. Par ailleurs, de nouveaux dispositifs permettant une induction rapide sont en cours de développement pour espérer aboutir à de solides preuves cliniques (Kohlhauer et al., 2016).



MTH : Hypothermie thérapeutique légère (mild therapeutic hypothermia)

Figure 68 : Mortalité à long terme après un infarctus du myocarde en fonction de la température, adapté d’après (Fuernau et al., 2019)

III.3.f. Méningite

Le potentiel thérapeutique de l’hypothermie dans le traitement des méningites bactériennes a été démontré expérimentalement, avec une réduction de l’inflammation, des lésions et des œdèmes cérébraux (Irazuzta et al., 2000; Park et al., 2001). Cependant, le seul essai clinique randomisé à ce jour a démontré une hausse de la mortalité dans le groupe de patients traités avec une hypothermie légère (32 à 34°C, Figure 69, (Mourvillier et al., 2013)), et d’autres études cliniques devront être menées avant d’envisager ce traitement à grande échelle.

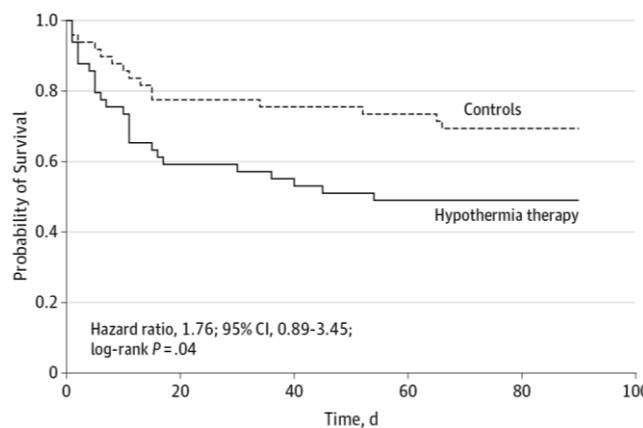


Figure 69 : Influence de l’hypothermie sur la survie de patients avec une méningite bactérienne (Mourvillier et al., 2013)

III.4. Épilepsie

III.4.a. Généralités

III.4.a.i. Présentation clinique

L'épilepsie est la deuxième pathologie neurologique la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Elle touche entre 500 000 et 600 000 personnes en France, avec près de 40 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année, et concerne 60 millions de personnes dans le monde, dont la moitié a moins de 20 ans. Ce trouble neurologique se traduit par des crises à répétitions, provoquées par une excitation synchronisée et brutale de certains neurones. Les crises se caractérisent par des convulsions, des absences, des troubles moteurs, sensoriels, du langage ou de la mémoire, voire une perte de conscience. De plus, ce trouble neurologique peut parfois se révéler mortel et entraîner le décès accidentel des malades lors d'une crise, ou provoquer une mort subite inattendue. Concernant les facteurs de risque, la génétique est impliquée dans plus de la moitié des cas, et les crises peuvent également être déclenchées par un accident vasculaire cérébral, un traumatisme crânien, une infection ou une tumeur (Baulac et al., 2018; "Epilepsy Action | Epilepsy information and advice," 2018; Esambert and Allonneau-Roubertie, n.d.).

III.4.b. Traitements actuels

Pour soigner l'épilepsie, la plupart des patients reçoivent des médicaments antiépileptiques, qui traitent les crises de manière symptomatique et permettent de les réduire voire de les arrêter totalement. En cas d'échec, d'autres types de traitements comme la stimulation électrique du nerf parasympathique ou la stimulation cérébrale profonde peuvent être mis en place. Ces méthodes donnent de bons résultats mais sont toutes deux invasives et nécessitent une anesthésie (globale et locale, respectivement) suivie d'une chirurgie pour l'implantation des dispositifs, qui comportent chacune leurs risques. Enfin, en cas de résistance aux médicaments ou de tumeur, une chirurgie partielle ou totale peut être envisagée, afin de modifier l'activité de certaines zones du cerveau. Un régime cétogène, faible en glucides et riche en lipides, peut également être recommandé pour certains enfants qui ne répondent pas aux traitements médicamenteux (Baulac et al., 2018; "Epilepsy Action | Epilepsy information and advice," 2018; "Epilepsies Pharmacorésistantes," 2015; Esambert and Allonneau-Roubertie, n.d.).

Cependant, 30% des patients épileptiques ont des crises persistantes malgré un traitement médicamenteux adapté depuis au moins deux ans, ce qui représente plus de 100 000 personnes en France (Ben Sghier, 2014; "Epilepsies Pharmacorésistantes," 2015; *Prise en charge des épilepsies partielles pharmaco-résistantes*, 2004). Dans ce contexte, les crises surviennent fréquemment et peuvent se révéler particulièrement dangereuses pour le patient, pour lequel il est impératif de mettre au point d'autres types de traitements.

III.4.c. Refroidissement localisé

III.4.c.i. Paramètres

Depuis plusieurs années, des études à la fois précliniques et cliniques ont montré un fort potentiel thérapeutique du refroidissement localisé pour le traitement des crises d'épilepsie. Afin de réduire efficacement les crises, le dispositif de refroidissement doit être en contact direct avec le foyer épileptogène. En effet, une étude a montré que le refroidissement n'avait plus d'effet sur celles-ci dès 5 millimètres de distance avec le foyer (Figure 70, (Yang and Rothman, 2001)). En fonction de la localisation de ce foyer, le refroidissement doit être appliqué en surface, notamment pour les foyers corticaux, ou bien en profondeur, pour les foyers hippocampaux.

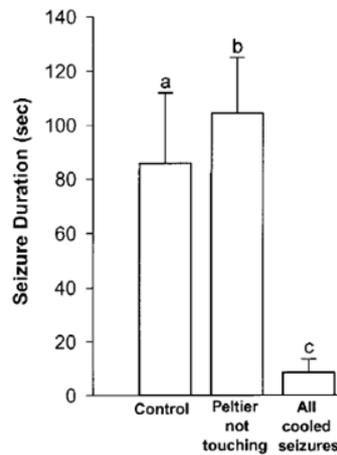


Figure 70 : Influence de la position du dispositif de refroidissement sur la durée de crises d'épilepsie, adapté d'après (Yang and Rothman, 2001)

Enfin, le choix de la température du refroidissement est primordial car il a un impact direct sur la fréquence et la durée des crises, mais également sur la sûreté du dispositif et les dommages qu'il peut induire. Concernant les cinétiques de refroidissement, l'équipe de Motamedi (Motamedi et al., 2006) a montré qu'un refroidissement rapide (plusieurs degrés par seconde) était plus efficace qu'un refroidissement lent (moins de 1°C/s), et qu'il pouvait induire des effets similaires avec des températures moins basses. Pour le retour à une température normale, un réchauffement progressif est préférable afin d'éviter les dommages neurologiques.

III.4.c.ii. Dispositifs de refroidissement

Dans les études précliniques réalisées sur des rats, le refroidissement du cortex a été réalisé grâce à un système de type Peltier (Fujii et al., 2012, 2010; Yang et al., 2002; Yang and Rothman, 2001), et le refroidissement de l'hippocampe a été effectué avec une bobine de cuivre complétée par une circulation d'eau froide (Burton et al., 2005) ou encore avec un système Peltier assorti d'une aiguille de refroidissement en cuivre (Fujii et al., 2010). Pour les études sur coupes de cerveau de rats et de souris, le refroidissement a été induit par un système Peltier (Hill et al., 2000) ou par une circulation de liquide céphalo-rachidien artificiel refroidi (Motamedi et al., 2006). Enfin, le refroidissement des gros animaux a été effectué grâce à un système de circulation d'eau couplé à un dispositif de type Peltier (Ren et al., 2017) ou à un plateau de refroidissement en titane (Inoue et al., 2017).

III.4.c.iii. Résultats expérimentaux

L'équipe de Yang (Yang and Rothman, 2001) a montré qu'un refroidissement cortical de 2 minutes entre 20 et 25°C permettait de diminuer la durée des crises chez le rat. Ensuite, cette équipe a étudié l'influence de différentes températures et a montré que le refroidissement cortical n'avait pas d'effet sur la durée des crises à 26°C, un effet réducteur modéré à 24°C et un effet significativement inhibiteur à 22 et 20°C (Figure 71, (Yang et al., 2002)).

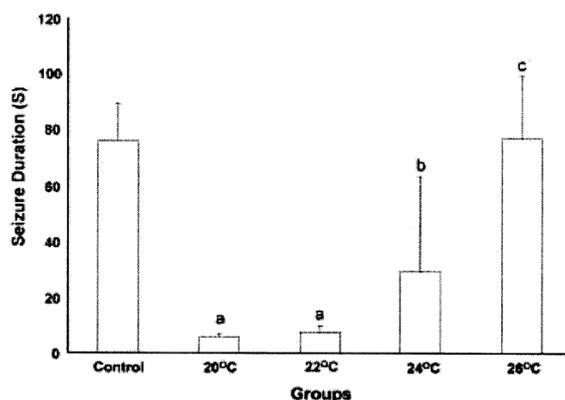


Figure 71 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la durée de crises d'épilepsie chez le rat (Yang et al., 2002)

Par la suite, l'équipe de Fujii (Fujii et al., 2010) a montré qu'un refroidissement cortical de 3 minutes à 30 et 28°C était capable de diminuer l'amplitude et la fréquence des décharges épileptiques chez le rat, voire de les arrêter à 25°C. Cette équipe a ensuite étudié l'influence de différentes températures sur les crises épileptiques et a montré qu'un refroidissement cortical de 1h par jour permettait de diminuer la fréquence des crises de manière importante à 20°C et quasi-totale à 15°C, puis de les arrêter à 10°C (Fujii et al., 2012).

Les études concernant les foyers hippocampaux ont montré qu'un refroidissement de 5 minutes permettait de diminuer la sévérité des crises à 27 et 24°C (Burton et al., 2005), et de diminuer leur amplitude ainsi que leur fréquence en dessous de 20°C (Fujii et al., 2010). Les études *ex vivo* sur coupes de cerveau de rats et de souris ont quant à elles montré un arrêt des décharges épileptiques à des températures comprises entre 22 et 25°C (Hill et al., 2000; Motamedi et al., 2006). Enfin, les études sur gros animal ont montré qu'un refroidissement de 30 minutes à 15°C induisait une diminution de l'amplitude et de la durée des décharges épileptiques chez deux chats et deux singes (Inoue et al., 2017), et qu'un refroidissement de 1 minute à 16°C provoquait une diminution de la fréquence et de la durée des crises chez cinq singes, avec un effet non significatif à 20 et 18°C (Ren et al., 2017).

III.4.c.iv. Résultats cliniques

A ce jour, aucun essai clinique de grande ampleur n'a été réalisé pour évaluer les effets du refroidissement localisé sur des patients épileptiques, mais quelques études cliniques ont été menées (Fisher, 2012). Dès 1960, des études ont montré que la circulation de solution physiologique refroidie dans des cathéters placés sur le cortex et dans les ventricules permettait de supprimer l'activité épileptique de 6 patients et d'arrêter l'état de mal épileptique (*status epilepticus*) d'un patient (Ommaya and Baldwin, 1963). Dans une autre étude, 25 patients ont reçu un refroidissement avec de l'air froid ou de la glace à travers des trous dans la boîte crânienne réalisés par trépanation, et ce dernier a permis une amélioration de l'état de santé des patients dans 60% des cas, avec une diminution de la fréquence et de l'intensité des crises, voire leur élimination totale (Šourek and Trávníček, 1970). Enfin, une étude a montré un arrêt de l'état de mal épileptique pour 4 patients grâce à un refroidissement endovasculaire compris entre 31 et 35°C. Après un réchauffement contrôlé, la moitié des patients a eu de nouvelles crises à une fréquence réduite, et l'autre moitié est restée sans crises. Les effets secondaires mineurs rapportés sont les tremblements, la coagulopathie et la thromboembolie veineuse, et l'association de l'hypothermie avec certains médicaments a probablement provoqué une septicémie mortelle pour l'un des patients (Corry et al., 2008).

Une autre étude clinique menée sur 12 patients a montré qu’une application de solution physiologique froide à 4°C directement sur le cortex pendant 30 secondes permettait de diminuer la fréquence et le nombre de crises (Ablah et al., 2009). Enfin, deux autres études cliniques ont montré qu’un refroidissement de 30 minutes à 15°C grâce à un dispositif de type Peltier permettait de diminuer l’amplitude des décharges épileptiques chez sept (Fujii et al., 2010), neuf (Nomura et al., 2014) puis dix-neuf patients (Figure 72, (Nomura et al., 2017)), sans induire de dommages tissulaires (Nomura et al., 2014).

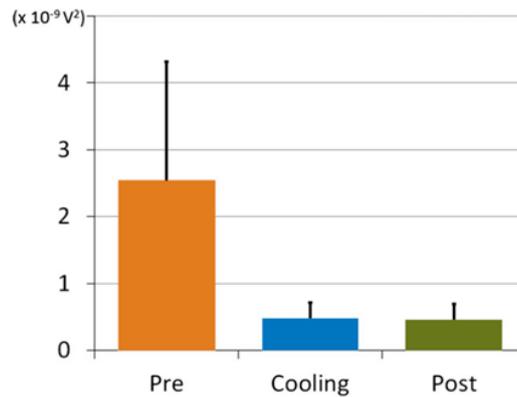


Figure 72 : Amplitude des décharges épileptiques en fonction d’un refroidissement localisé de 15°C (Nomura et al., 2017)

III.4.d. Projet EpiCOOL

Le projet EpiCOOL, développé au sein de Clinatec, a pour objectif de proposer une solution thérapeutique innovante permettant d’arrêter les crises d’épilepsie des patients pharmacorésistants. Le but du projet POC EpiCOOL est de développer un dispositif de refroidissement implantable en profondeur permettant de refroidir directement les foyers épileptogènes. L’objectif est également de réussir à détecter précocement les crises grâce à un système d’enregistrement électrophysiologique, afin de les arrêter avant l’arrivée des symptômes cliniques. Dans un premier temps, une preuve de concept préclinique sur primates-non-humains a été réalisée et a montré des résultats prometteurs avec un arrêt des crises provoquées par une injection de pénicilline au niveau de l’hippocampe. Pendant ces travaux de thèse, j’ai réalisé plusieurs études bibliographiques qui ont permis de définir les premiers paramètres de refroidissement du dispositif, notamment la température cible permettant d’arrêter les crises, la durée nécessaire du refroidissement ainsi que les vitesses de refroidissement et de réchauffement. Mes recherches ont également porté sur les effets de l’hypothermie sur les cellules saines. Par la suite, j’ai participé aux réflexions menées sur un premier dispositif de refroidissement, ainsi que sur les résultats de cytotoxicité de certains composants. Les résultats obtenus lors de l’essai préclinique n’étant pas directement dépendant de ma contribution, ils ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

III.5. Cancer

III.5.a. Modification du développement tumoral

III.5.a.i. Croissance tumorale

La croissance tumorale peut être caractérisée par différents paramètres, notamment la prolifération et la progression des cellules à travers les différentes phases du cycle cellulaire, qui mène à l'augmentation de la taille des tumeurs.

◆ Études in vitro

En premier lieu, certaines équipes ont étudié l'influence de différents niveaux d'hypothermie sur la prolifération et la division cellulaire. Temple Fay a démarré les premières expériences d'hypothermie sur des lignées cellulaires tumorales dès 1938. Il avait l'intuition que la croissance des cellules cancéreuses était altérée en dessous de 34,4°C, et a notamment montré que la division de cellules de carcinome était arrêtée en dessous de 19,7°C (Fay, 1959). Par la suite, l'équipe de Neutelings (Neutelings et al., 2013) a montré qu'une hypothermie de 25°C induisait un arrêt de la prolifération de cellules d'ostéosarcome humain (MG-63). Les cellules ont ensuite été placées à 37°C, et le cycle de refroidissement suivi d'un retour à la normothermie a affecté leur viabilité. Enfin, l'équipe de Kalamida (Kalamida et al., 2015) a montré qu'une hypothermie légère de 34°C pendant 3 jours inhibait la prolifération et réduisait la viabilité cellulaire de différentes lignées issues de glioblastome (U87MG et T98G, Figure 73) et de tumeur du poumon (A549 et H1299), du sein (MCF7), et de la prostate (DU145 et PC3). Cette équipe a également montré que l'hypothermie diminuait le niveau d'expression de HSP90, une protéine de choc thermique impliquée dans le développement tumoral.

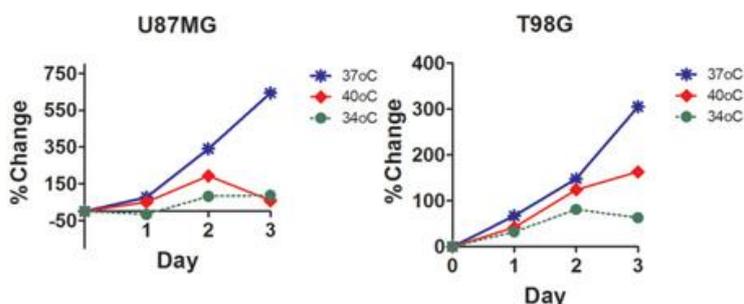


Figure 73 : Impact de différentes températures sur la prolifération de cellules de glioblastome humain (Kalamida et al., 2015)

◆ Études in vivo

Une étude expérimentale menée sur des souris injectées avec des fragments de sarcome S180 et placées dans un environnement hypothermique (9 à 10°C) a montré que l'hypothermie permettait d'inhiber la croissance des tumeurs (Austin and Glaser, 1969). Cependant, si l'hypothermie est capable de retarder le développement tumoral, elle ne parvient pas à faire totalement disparaître les tumeurs déjà existantes (Popovic and Masironi, 1966, 1965). En partant de l'hypothèse que le métabolisme des tumeurs était plus élevé que celui des tissus sains, Popovic et ses collaborateurs ont introduit le principe d'hypothermie différentielle, consistant à refroidir l'ensemble de l'organisme en maintenant la tumeur à 37°C. Une première étude expérimentale menée sur des hamsters porteurs d'adénocarcinome a montré une forte influence de la durée d'un refroidissement sévère à 4°C sur la croissance tumorale. En effet, les expériences ont montré qu'une durée de 2 heures n'avait pas d'impact sur la croissance tumorale, qu'une durée de 4 heures induisait une régression tumorale réversible et qu'une durée de 10 heures provoquait une régression suivie d'une disparition sans récurrence de la tumeur (Popovic and Masironi, 1965).

Une seconde étude expérimentale a montré qu'un refroidissement modéré de 10 à 15 heures à 30°C réduisait le développement tumoral avec une reprise de la progression lors de la remise à 37°C, et qu'après 24 heures d'hypothermie différentielle, les tumeurs disparaissaient de manière totale et durable, sans métastases (Popovic and Masironi, 1966). Ces résultats ont ensuite été confirmés par d'autres études expérimentales menées sur des hamsters placés à une température comprise entre 10 et 15°C. D'abord, la première a montré une diminution de la taille d'un tiers des tumeurs et la disparition de la moitié d'entre elles après 10 heures d'hypothermie différentielle (Yoshizu et al., 1971). Ensuite, une seconde étude a montré une prolongation significative de la survie de certains animaux ainsi qu'une atteinte histologique préférentielle du tissu tumoral par rapport au tissu sain avoisinant (Tabuchi, 1972). Ces résultats suggèrent un fort potentiel de l'hypothermie en tant que thérapie adjuvante.

◆ Études cliniques

Les premières expérimentations cliniques relatives à l'hypothermie en cancérologie ont été réalisées sur 124 patients atteints de différents types de cancers à un stade avancé, avec un mauvais pronostic vital. 66 patients ont été placés pendant plusieurs jours en hypothermie généralisée lors de 169 épisodes de 31,1 à 32,2°C, tandis que 83 ont été soumis à un refroidissement localisé de 4,4 à 10°C pendant 2807 jours au total. Les essais se sont révélés concluants avec un soulagement des douleurs provenant des tissus superficiels et profonds dans 95,7% des cas lorsque l'hypothermie généralisée durait au moins 72 heures, et une nécrose complète voire une disparition des tumeurs après 120 heures de refroidissement localisé. Certains patients sont décédés d'une insuffisance cardiaque mais le taux de mortalité de l'expérience reste relativement faible (11,2%) au regard du pronostic vital des patients avant l'essai. Les expériences ont également montré que sous surveillance, les patients pouvaient survivre à une hypothermie généralisée de 24°C, et que l'état hypothermique pouvait être maintenu pendant 10 jours à des températures de 29,4 à 32,2°C sans dommages (Fay, 1959; Zingg, 1983).

III.5.a.ii. Invasion tumorale

L'invasion tumorale se caractérise par l'adhésion des cellules tumorales au tissu sain, différents modes de migration, puis la formation de métastases, de nouvelles tumeurs à distance du site primaire.

◆ Études in vitro

L'équipe de Zhang (X. Zhang et al., 2012) s'est intéressée à l'influence de l'hypothermie sur la migration et l'adhésion de cellules tumorales. Elle a montré qu'une hypothermie légère de 35°C diminuait l'adhésion de cellules issues de tumeur du sein (MDA-MB-231 et MCF-7) aux cellules endothéliales, sans impliquer directement la voie ICAM-1. Cette étude a également démontré qu'une hypothermie légère avait un impact significatif sur la migration des cellules tumorales MDA-MB-231, avec une diminution significative de la migration orientée des cellules à travers une membrane poreuse par chimiotaxie pendant 6 heures (Figure 74).

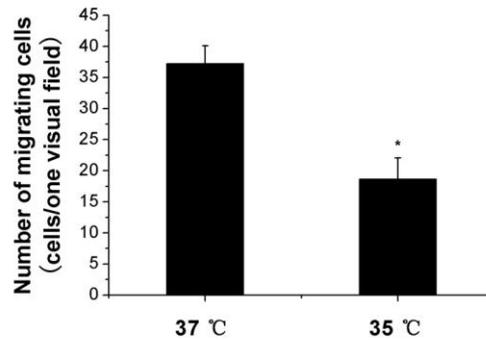


Figure 74 : Influence d'une hypothermie légère sur la migration orientée de cellules de cancer du sein (X. Zhang et al., 2012)

En revanche, les résultats concernant la migration cellulaire non-orientée, étudiée grâce à un test de cicatrisation pendant 36 heures, sont plus nuancés. En effet, l'hypothermie a réduit la migration non-orientée des cellules de manière significative uniquement en l'absence de mitomycine C, utilisée comme inhibiteur de prolifération. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la migration non-orientée par l'hypothermie est principalement due à une réduction de la prolifération.

◆ Étude *in vivo*

Les effets inhibiteurs de l'hypothermie sur l'invasion tumorale ont été démontrés dès les années 1950. Une étude expérimentale menée sur 40 lapins a étudié les effets d'une hypothermie répétée six fois après l'injection d'une tumeur épithéliale de Brown-Pearce (Mandrik, 1959). L'hypothermie a été induite par une combinaison de méthodes physique et chimique afin d'atteindre une température de 27 à 28°C, et a permis de réduire à la fois le nombre de métastases ainsi que leur taille.

III.5.b. Altération de certains mécanismes

III.5.b.i. Morphologie et métabolisme

En partant du constat qu'une hypothermie sévère (<10°C) pouvait induire un gonflement du cerveau, l'équipe de Plesnila (Plesnila et al., 2000) s'est intéressée à l'influence de différentes températures sur le volume de cellules gliales. Ils ont notamment montré que des hypothermies légère (32°C) et sévère (27°C) induisaient une augmentation immédiate du volume de cellules de gliome de rat (C6), dépendante du niveau d'hypothermie (Figure 75). La viabilité cellulaire n'a pas été affectée par l'hypothermie, et une diminution progressive du volume cellulaire a été observée après un retour à 37°C. Un gonflement similaire a été observé sur des astrocytes primaires de rat après une hypothermie de 32°C. Enfin, les résultats ont montré que ce gonflement était lié à une accumulation de l'ion sodium (Na^+) dans les cellules, notamment provoqué par une altération de la perméabilité des membranes.

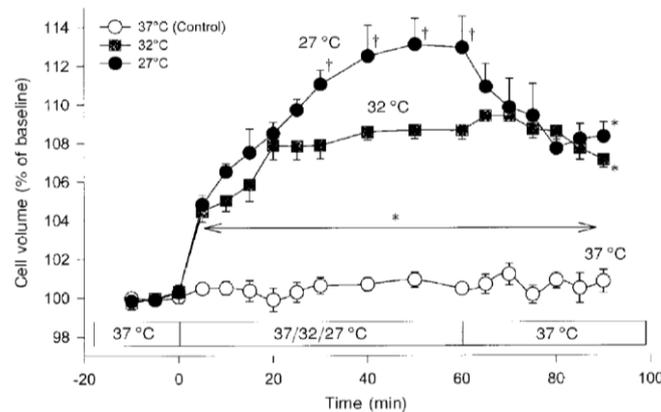
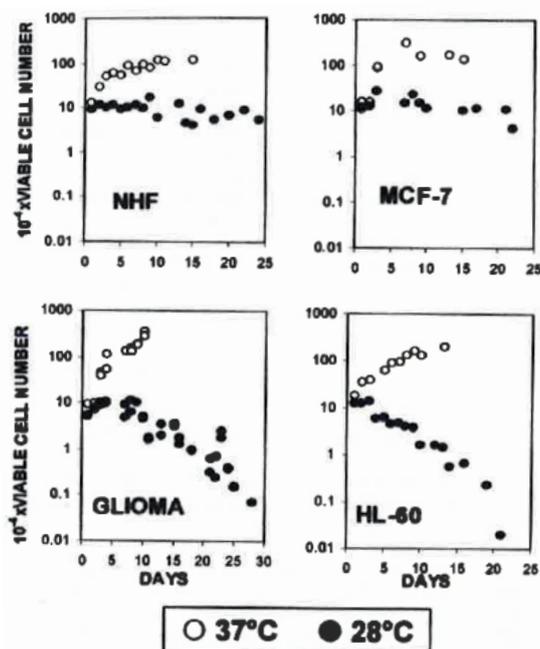


Figure 75 : Volume de cellules de gliome de rat en fonction du niveau d'hypothermie (Plesnila et al., 2000)

Plusieurs études ont également montré que l'hypothermie pouvait altérer certaines fonctions métaboliques de lignées cellulaires tumorales. En effet, une étude a montré que l'hypothermie bloquait le transport de certains glycosphingolipides tels que GD1a à 14°C et diminuait leur synthèse de manière progressive dans des cellules de neuroblastome de souris (N18) et de gliome de rat (C6) (Miller-Prodrza and Fishman, 1984). D'un point de vue bioénergétique, une autre étude a montré qu'une hypothermie légère de 32°C augmentait la capacité glycolytique de certaines lignées cellulaires colorectales humaines (SW480, HCT116, Pt. 93), en diminuant le niveau d'acidification extracellulaire sans altérer le niveau d'oxygénation (Mitov et al., 2017).

III.5.b.ii. Mutation du gène TP53

Les mutations du gène *TP53* ont été observées dans un grand nombre de cancers et l’interférence du statut de ce gène avec les mécanismes de l’hypothermie est controversée. Matijasevic (Matijasevic, 2002) a étudié l’influence d’une hypothermie de 28°C sur des cellules humaines, notamment des fibroblastes (NHF, *normal human fibroblast*) et des lignées tumorales provenant de gliome (SF-126, *TP53-mut*), de leucémie (HL-60, *TP53-mut*), et de cancer du sein (MCF-7, *TP53-wt*). Il a d’abord montré qu’une hypothermie de 28°C bloquait la progression des cellules tumorales à travers les différentes phases du cycle uniquement pour celles présentant un gène *TP53* de type sauvage. De plus, il a montré que les cellules tumorales déficientes en p53 étaient plus sensibles à l’hypothermie, avec une diminution de leur viabilité au fil des jours (Figure 76).



NHF, MCF-7 : *TP53-wt* ; GLIOMA (SF-126), HL-60 : *TP53-mut*

Figure 76 : Influence d’une hypothermie de 28°C sur la viabilité cellulaire selon le statut p53 (Matijasevic, 2002)

Ainsi, l’équipe de Matijasevic a démontré que l’hypothermie protégeait préférentiellement les cellules avec un gène *TP53* de type sauvage de certains agents cytotoxiques, et en a alors conclu que les effets protecteurs de l’hypothermie touchaient davantage les cellules saines plutôt que les cellules tumorales, fréquemment associées à des mutations de *TP53*. Par la suite, l’équipe de Neutelings (Neutelings et al., 2013) a montré que les cellules d’ostéosarcome humain (MG-63) déficientes en p53 subissaient le même arrêt de la prolifération à 25°C que d’autres cellules avec un gène *TP53* de type sauvage. Ensuite, elle a démontré que l’hypothermie diminuait la phosphorylation de la protéine p53, mais qu’un retour à 37°C l’augmentait fortement. Ainsi, contrairement à l’hypothèse de Matijasevic, l’arrêt de la prolifération induit par l’hypothermie ne serait pas lié à l’activation de p53.

III.5.b.iii. Mort cellulaire

L’intérêt thérapeutique de l’hypothermie repose principalement sur sa protection des cellules saines vis-à-vis de certains traumatismes. Certaines équipes ont alors souhaité étudier les potentiels effets neuroprotecteurs de l’hypothermie sur des lignées tumorales, afin de voir s’ils étaient similaires à ceux observés sur des cellules saines. L’équipe de Shibano (Shibano et al., 2002) a d’abord démontré les effets neuroprotecteurs de l’hypothermie sur les cellules tumorales PC12, issues d’un phéochromocytome de rat.

En effet, des hypothermies légères (33°C et 35°C) et modérées (29°C et 31°C) ont permis de réduire la cytotoxicité ainsi que la proportion de cellules apoptotiques induites par une privation de sérum de manière température dépendante (Figure 77).

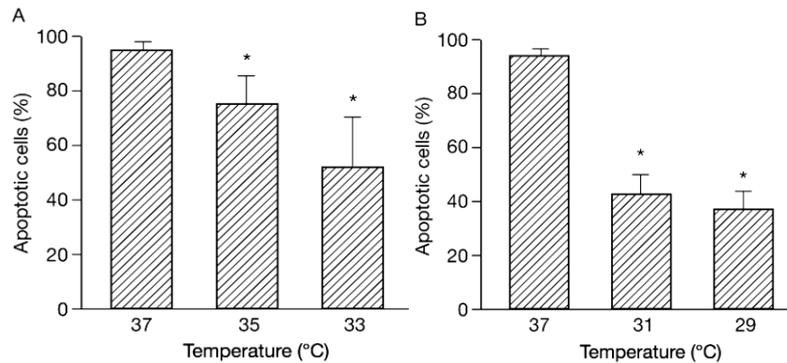
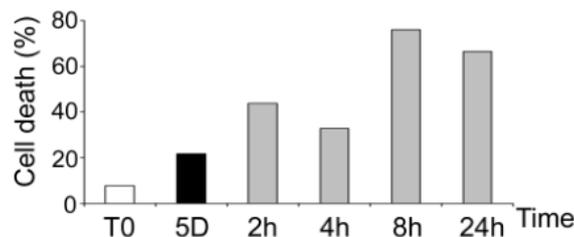


Figure 77 : Effets de l’hypothermie sur le pourcentage de cellules apoptotiques (Shibano et al., 2002)

L’équipe de Neutelings (Neutelings et al., 2013) a effectué des expériences sur une lignée tumorale provenant d’ostéosarcome humain (MG-63, *TP53-mut*) en les plaçant pendant 5 jours à 25°C puis pendant plusieurs heures à 37°C. Les résultats ont montré que le retour à 37°C exacerbait les effets de l’hypothermie au lieu de les normaliser. En effet, ils ont observé une augmentation de l’apoptose après 4 heures à 37°C, ainsi qu’une augmentation de la mort cellulaire au fil des heures passées à 37°C, avec un effet visible dès 2 heures (Figure 78). De plus, le réchauffement a induit la production d’espèces réactives de l’oxygène et a augmenté les dommages de l’ADN déjà visibles après 5 jours d’hypothermie. L’hypothèse de cette équipe est que le réchauffement des cellules à 37°C induit un pic oxydatif, qui provoque différents dommages de l’ADN ainsi que l’apoptose des cellules. Ainsi, cette étude a montré que c’était davantage le retour à 37°C que l’hypothermie en elle-même qui induisait la mort des cellules tumorales.



T0 : 37°C ; 5D : 5J à 25°C ; 2h, 4h, 8h, 24h : 5J à 25°C puis 2 à 24h à 37°C

Figure 78 : Influence du retour à 37°C après une hypothermie de 25°C sur la mort de cellules d’ostéosarcome humain (Neutelings et al., 2013)

Une autre étude a montré qu’une hypothermie modérée de 29°C provoquait une légère augmentation de la proportion de cellules apoptotiques pour la lignée tumorale PC12 (Shibano et al., 2002). Enfin, une étude a montré qu’une hypothermie modérée de 30°C induisait la mort par apoptose de cellules d’histiocytome de souris (BC-8), ainsi que la production d’espèces réactives de l’oxygène (Khar et al., 2003). Cependant, cette étude a également étudié l’influence d’une hypothermie modérée de 30°C sur la culture de cellules non transformées (CHO, F-111, COS-1), et a montré qu’elle diminuait leur croissance mais n’induisait pas davantage d’espèces réactives de l’oxygène ou de mort apoptotique. Ainsi, l’hypothermie n’aurait pas les mêmes effets sur les cellules saines et les cellules tumorales. De plus, ces études ont montré que ses effets pouvaient être néfastes ou bien protecteurs contre certains agents cytotoxiques en fonction de certains paramètres, notamment le type cellulaire, le niveau ainsi que la durée de l’hypothermie.

III.5.c. Combinaison avec d'autres thérapies

III.5.c.i. Chimiothérapie

◆ Études *in vivo*

Une des limitations principales de la chimiothérapie est sa non-sélectivité des cellules tumorales, induisant un grand nombre d'effets secondaires qui limitent les doses maximales administrées. L'hypothermie a alors été étudiée pour ses effets protecteurs afin de réduire la cytotoxicité de certains médicaments.

D'abord, certaines études ont étudié la combinaison des effets de l'hypothermie différentielle avec ceux de la chimiothérapie (fluorouracile), dans le but de cibler uniquement les cellules tumorales, avec un métabolisme plus élevé. Une hypothermie différentielle modérée de 10 heures à 28°C a été combinée avec l'action du fluorouracile et les résultats ont montré une diminution voire une disparition des tumeurs dans 70% des cas (Yoshizu et al., 1971). Une autre étude a été menée sur un faible nombre de souris et a montré une régression des tumeurs traitées avec une combinaison de chimiothérapie et d'hypothermie dans la moitié des cas, alors qu'aucune amélioration n'a été observée dans le groupe traité par chimiothérapie seule (Popovic et al., 1976).

Ensuite, d'autres études ont étudié les effets de l'hypothermie généralisée en combinaison avec des agents anticancéreux. Une première étude a été menée sur des souris injectées avec des fragments de sarcome S180 et placées dans un environnement hypothermique de 9 à 10°C. L'hypothermie a permis de potentialiser les effets anti-tumoraux de deux agents chimiques, le sulfate de protamine (Figure 79) et l'acétate d'Armeen DM16D (Austin and Glaser, 1969). Une autre étude expérimentale a montré une nette amélioration de la survie de souris avec des tumeurs ascitiques traitées par une combinaison de chimiothérapie (doxorubicine) et d'hypothermie modérée à 28°C, induite par une injection de chlorpromazine (Figure 80, (Hultborn et al., 1990)). Cette étude a également montré une diminution de la toxicité d'un autre agent de chimiothérapie (moutarde azotée), mais également un échec de la combinaison avec un autre agent (vinblastine), probablement en raison d'une interaction avec la chlorpromazine (Hultborn et al., 1990).

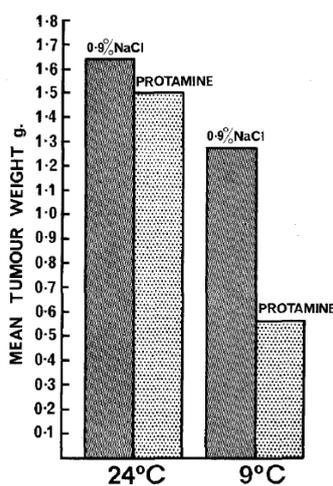
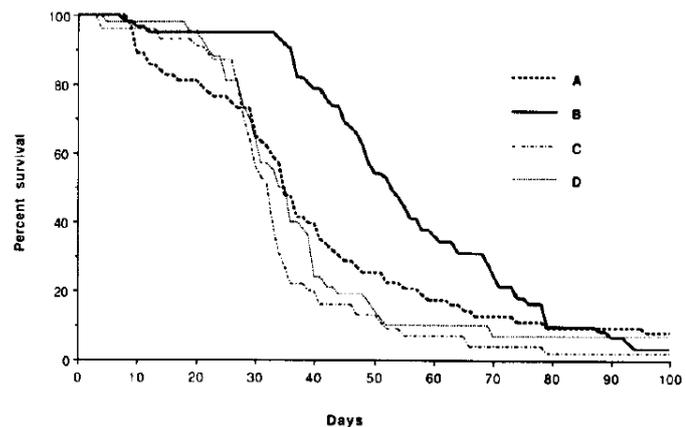


Figure 79: Influence de la température sur les effets d'un agent anticancéreux (protamine) sur le poids de tumeurs chez la souris (Austin and Glaser, 1969)



A : normothermie + doxorubicine ; B : hypothermie + doxorubicine ; C : hypothermie et D : normothermie

Figure 80: Influence de la combinaison d'hypothermie et de chimiothérapie sur la survie de souris porteuses de tumeurs (Hultborn et al., 1990)

◆ Études cliniques

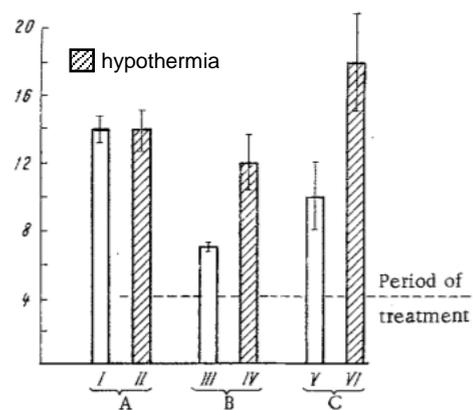
Des études cliniques se sont également intéressées à la potentialisation des effets de la chimiothérapie par l’hypothermie. Dans un premier temps, Harrison et ses collaborateurs (Harrison, 1967) se sont assurés que l’hypothermie ne modifiait pas la demi-vie métabolique des agents chimiothérapeutiques, ni ne modifiait leur efficacité cytotoxique sur les cellules tumorales. Ensuite, une étude clinique impliquant 31 patients avec des cancers de la tête et du cou a été réalisée, avec une mise en hypothermie modérée de 28 à 30°C grâce à des couvertures refroidissantes. L’étude a montré que l’hypothermie permettait de diminuer les douleurs et la leucopénie induites par la chimiothérapie, protégeant notamment la moelle osseuse des effets toxiques du traitement (Condon, 1967; Harrison, 1967). Par la suite, une étude menée sur trois patients avec une combinaison d’hypothermie différentielle et de chimiothérapie n’a pas permis de conclure quant à l’efficacité d’une telle combinaison sur la progression des tumeurs (Yoshizu et al., 1971).

III.5.c.ii. Radiothérapie

Le développement de tumeurs solides provoque fréquemment des zones d’hypoxie, dans lesquelles les cellules tumorales ont une faible tension en oxygène, ce qui diminue leur sensibilité à la radiothérapie. Dans ce contexte, l’hypothermie a été envisagée comme traitement adjuvant afin d’augmenter l’oxygénation des tumeurs et ainsi améliorer leur radiosensibilité. De plus, l’hypothermie permet de protéger le tissu cérébral en augmentant sa tolérance à l’hypoxie par une diminution du métabolisme et de sa consommation en oxygène (Harrison, 1967). Une étude expérimentale a montré qu’une hypothermie de 29°C réduisait la consommation en oxygène de tumeurs mammaires de souris et retardait significativement leur récurrence (Nias et al., 1988). Cette étude a également montré que l’hypothermie était d’autant plus efficace en combinaison avec l’oxygène hyperbare, qui permettait de maintenir constante la tension en oxygène d’une tumeur.

Une autre étude a montré qu’un refroidissement localisé de tumeurs de rats à 15 et 25°C augmentait leur teneur en oxygène (Kelleher et al., 1998). Enfin, une autre étude menée sur des fibrosarcomes de souris placées à 32°C a montré une diminution de la consommation en oxygène des tumeurs, induisant une augmentation de leur oxygénation (Neveu et al., 2017). Ces résultats présentent l’hypothermie comme un traitement adjuvant prometteur car une diminution des fractions hypoxiques des tumeurs permettrait d’améliorer leur réponse à la radiothérapie.

De plus, l’hypothermie peut également permettre de potentialiser les effets de la radiothérapie et de réduire sa toxicité sur les tissus sains. Une étude expérimentale menée sur des rats porteurs de tumeurs ascitiques des ovaires a montré qu’une hypothermie de 14°C permettait de protéger les tissus sains de la toxicité de la radiothérapie (Bernshtein et al., 1970). En effet, les résultats ont montré une nette amélioration de la survie des animaux irradiés et placés en hypothermie par rapport à ceux placés à température ambiante (Figure 81, IV vs III et VI vs V). Cependant, l’hypothermie seule n’a pas permis d’améliorer la survie des animaux (Figure 81, II vs I).



A : pas d'irradiation ; B : 850 R ; C : 700 R

Figure 81 : Influence de la combinaison d’hypothermie et de radiothérapie sur la survie moyenne (en jours) de rats porteurs d’une tumeur ascitique, adapté d’après (Bernshtein et al., 1970)

III.5.c.iii. Chirurgie ablative

Le rôle de l'hypothermie peropératoire lors de l'ablation d'une tumeur est controversé. D'abord, l'hypothermie diminue certaines réponses immunitaires et son utilisation lors de procédures chirurgicales peut augmenter le risque d'infection au niveau de la plaie. Une étude a montré que l'utilisation d'hypothermie lors d'une chirurgie du cancer des voies aérodigestives supérieures était un facteur de risque en soi, associée à une augmentation des complications post-opératoires, notamment les infections (Sumer et al., 2009). Cependant, une autre étude clinique menée sur des patients atteints de cancer colorectal a montré qu'une hypothermie peropératoire de 34,5°C n'induisait pas de différence notable au niveau des résultats cliniques des patients (Yücel et al., 2005). Deux études se sont également intéressées à l'hypothermie peropératoire lors de chirurgies cytoréductives pour traiter un cancer ovarien, et ont montré des résultats contrastés. Dans un cas, l'hypothermie a induit une augmentation des complications et une diminution de la survie des patients (Moslemi-Kebria et al., 2012), alors que l'autre étude ne rapporte aucun effet néfaste de l'hypothermie (Long et al., 2013). Cependant, l'hypothermie a également été introduite comme une aide thérapeutique dans les pratiques chirurgicales, notamment les ablations de tumeurs. Plusieurs études cliniques ont montré qu'une hypothermie généralisée permettait le retrait de tumeurs intracrâniennes dans de meilleures conditions, grâce à une diminution de la pression intracrânienne, du volume du cerveau ainsi que des saignements, en raison des propriétés vasoconstrictrices de l'hypothermie (Inglis and Turner, 1957; Mckissock and Taylor, 1960; Sedzimir and Dundee, 1958). L'hypothermie peropératoire a ainsi permis de réduire la durée des chirurgies ablatives, d'améliorer leur précision et de diminuer les lésions chirurgicales (Sedzimir and Dundee, 1958). Enfin, une autre étude a montré l'intérêt thérapeutique de l'hypothermie lors de procédures chirurgicales complexes telles que l'ablation de tumeurs de l'atrium (Krcilkova et al., 1958).

III.5.c.iv. Thérapie photodynamique

Une étude expérimentale a montré qu'une hypothermie de 32°C permettait de potentialiser les effets bénéfiques de la thérapie photodynamique (PDT, *photodynamic therapy*). En effet, elle a permis d'augmenter la survie de rats atteints de gliome et traités par thérapie photodynamique de manière significative (Figure 82, (Fisher et al., 2017)).

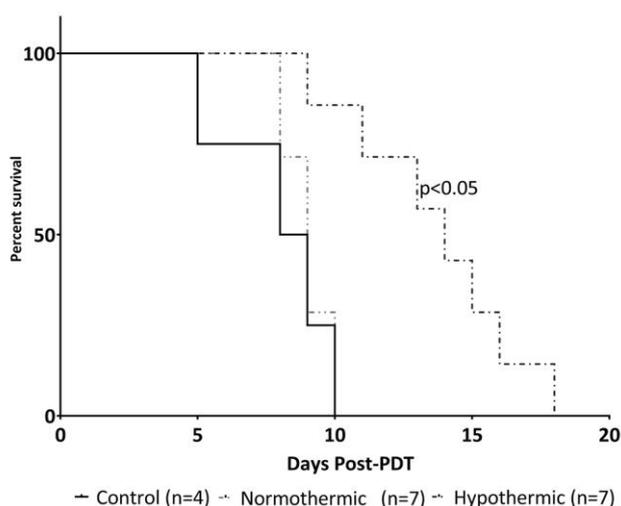


Figure 82 : Influence de l'hypothermie sur la survie de rats traités par thérapie photodynamique et porteurs de gliome (Fisher et al., 2017)

Dans ce chapitre, nous avons développé le potentiel thérapeutique de l'hypothermie pour le traitement de plusieurs pathologies cérébrales grâce à ses effets neuroprotecteurs. Nous avons aussi décrit l'état de l'art actuel des recherches menées sur le potentiel thérapeutique de l'hypothermie en cancérologie. Certaines études ont présenté des résultats prometteurs, avec des effets antiprolifératifs sur plusieurs types de cancer, et un fort potentiel adjuvant avec la potentialisation des effets de la chimiothérapie et de la radiothérapie. Cependant, ces résultats sont à considérer avec précaution car la plupart des études ont été réalisées dans les années 1950 à 1970, avec des protocoles expérimentaux parfois simplistes, et un nombre de patients ou d'animaux restreints. De plus, les agents thérapeutiques utilisés aujourd'hui en chimiothérapie diffèrent fortement de ceux utilisés il y a plus de 50 ans, avec une toxicité moindre. De ce fait, ces expériences seraient à reproduire avec les thérapies actuelles telles que le témozolomide pour confirmer le potentiel thérapeutique adjuvant de l'hypothermie.

Dans ce chapitre, nous avons pu voir que les études concernant les effets de l'hypothermie sur des cellules de glioblastome étaient très restreintes et ne prévoyaient pas d'optimisation des paramètres en vue d'une projection vers une étude préclinique puis clinique. Ainsi, il n'existe pas de véritable positionnement thérapeutique de l'hypothermie dans le traitement du glioblastome dans la littérature actuelle.

Travaux de thèse

Après avoir mis en évidence la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le glioblastome puis le potentiel thérapeutique de l'hypothermie, nous allons présenter les principaux travaux réalisés au cours de cette thèse. Les résultats seront présentés suivant quatre chapitres indépendants. Les trois premiers chapitres des résultats (Chapitre IV, Chapitre V et Chapitre VI) seront dédiés aux expériences de biologie cellulaire, et le Chapitre VII sera consacré au développement d'un dispositif implantable de refroidissement.

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient d'abord d'étudier les effets de l'hypothermie sur des cellules tumorales, dans le but d'évaluer son potentiel thérapeutique (Chapitre IV et Chapitre VI), puis sur des cellules saines, afin d'étudier sa sûreté pour une future application clinique (Chapitre V). Ensuite, ces travaux avaient pour but de participer à l'optimisation des paramètres d'administration de l'hypothermie en tant que traitement pour le glioblastome, notamment en termes de niveau de température, de durée et de séquence, avec une administration continue ou intermittente, et d'éventuelles combinaisons thérapeutiques (Chapitre IV). Enfin, l'objectif de cette thèse était de mener une réflexion autour d'un dispositif clinique permettant de refroidir localement une cavité d'exérèse, avec une définition précise des spécifications biologiques et cliniques, puis une proposition de solution technique (Chapitre VII).

Chapitre IV

Effets de l'hypothermie sur des cellules de glioblastome

Afin d’étudier le potentiel thérapeutique de l’hypothermie sur la récurrence du glioblastome, nous avons évalué ses effets sur différentes lignées de glioblastome humain. Nous avons notamment caractérisé leur prolifération ainsi que leur migration, deux processus clés impliqués dans la progression tumorale. Nous avons également étudié certains de ces mécanismes d’action, avec une étude du cycle cellulaire et de la morphologie. Ensuite, nous avons optimisé les différents paramètres d’administration, notamment la température cible, la durée du traitement ainsi que les différents cycles possibles, afin de préparer au mieux de futures études précliniques puis cliniques.

Concernant la valorisation des résultats, les parties IV.2, IV.3 et IV.4 – respectivement relatives à l’étude de la prolifération cellulaire, des mécanismes d’action et de la migration cellulaire – ont fait l’objet d’une première publication dans un journal à comité de lecture (Publications et communications, (Fulbert et al., 2019)). La partie IV.5 concernant l’étude de différents cycles d’hypothermie et la partie IV.6 consacrée à l’évaluation du potentiel adjuvant de l’hypothermie ont fait l’objet d’une deuxième publication dans un journal à comité de lecture (Publications et communications, (Fulbert et al., 2021)). Certains des résultats ont également été présentés dans plusieurs congrès internationaux (Publications et communications). L’ensemble des expériences présentées dans ce chapitre a été intégralement réalisé par la doctorante. Le Dr. Éric Sulpice (CEA Grenoble, IRIG, Biomics) a apporté une aide précieuse pour la réalisation des expériences en cytométrie en flux ainsi que leur analyse (IV.3.b Cycle cellulaire).

IV.1. Méthode générale

IV.1.a. Matériel biologique

IV.1.a.i. Matériel et réactifs

Les supports et le matériel de culture ont été obtenus chez Falcon, Eppendorf, Bio-Rad et Fisher (Annexe 3). Les solutions, milieux et réactifs ont été choisis chez Sigma-Aldrich, Gibco, Fisher Bioreagents et VWR Chemicals (Tableau 6). Les chambres de culture Lab-Tek® et les inserts utilisés pour la migration (polycarbonate, 8µm, 140629) ont été commandés chez Fisher Scientific, et les lames TC20™ chez Bio-Rad.

Fournisseur	Réactifs et solutions	Référence
Sigma-Aldrich	Bleu de trypan	T8154
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	D2650
	Formaldéhyde (<i>Formalin solution 10%</i>)	HT501128
	Triton™ X-100	T9284
	Phalloïdine – Tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC)	P1951
	4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI)	D9542
	Iodure de propidium	P4864
	Ribonucléase A (RNase A)	R4875
Gibco	<i>Dulbecco’s modified Eagle’s medium</i> (DMEM)	11960-044
	Sérum de veau fœtal (<i>Fetal bovine serum</i>)	16000-044
	GlutaMAX 100X	35050-061
	Trypsine (<i>0,25% Trypsin-EDTA</i>)	25200-056
Fisher Bioreagents	<i>Phosphate buffered saline</i> (10X) (PBS)	BP399
VWR Chemicals	Ethanol absolu	20821.296
Merck Millipore	Réactif FluorSave™	345789

Tableau 6 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture cellulaire

IV.1.a.ii. Conditions de culture

◆ Environnement stérile

L’ensemble des expériences de culture a été réalisé dans un laboratoire de niveau de confinement 2, en environnement stérile, sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). Les expériences menées sur les lignées cellulaires de glioblastome ont été menées **sans antibiotiques**, afin d’éviter tout biais potentiel par une contamination bactérienne. En effet, une contamination aurait pu modifier le comportement des cellules et donc altérer la qualité des résultats expérimentaux.

◆ Conditions thermiques

La température de référence pour les expériences de culture cellulaire est de 37°C, qui correspond à la température de l’organisme humain. Pour nos expériences, les cellules ont dû être placées en condition hypothermique à 33°C, 28°C ou 23°C. Pour cela, elles ont étéensemencées dans un support de culture placé pendant 4h30 à 37°C pour leur permettre d’adhérer à la surface, puis transféré à la température souhaitée. Le maintien des cultures cellulaires à 37°C ainsi que les conditions expérimentales de normothermie (37°C) et d’hypothermie légère (33°C) ont été réalisées dans un incubateur (SANYO, MCO-19AIC) sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Les expériences d’hypothermie sévère (23°C) ont été réalisées dans une enceinte climatique (Memmert, ICH110C) avec une atmosphère humide (80%) et 5% de CO₂. Les expériences d’hypothermie modérée (28°C) ont été réalisées dans l’incubateur ou l’enceinte décrits précédemment en fonction des disponibilités des équipements. Afin de s’assurer que le type d’équipement ne modifiait pas la croissance cellulaire, nous avons effectué plusieurs tests de vérification, qui n’ont pas montré de différence significative entre les deux conditions (Figure 83 ; $p > 0,05$).

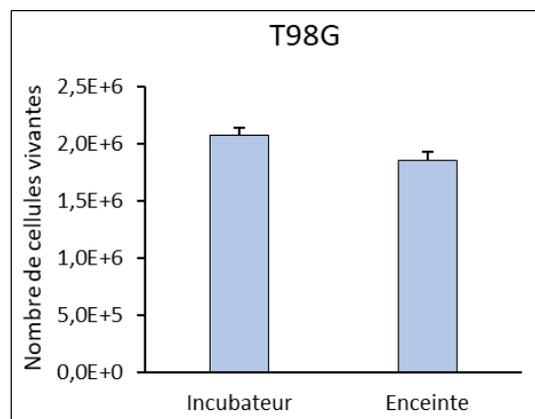


Figure 83 : Influence du dispositif d’incubation sur la croissance cellulaire

◆ Milieux de culture

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, *Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium*) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (FBS, *fetal bovine serum*) et du glutamax (GlutaMAX™ Supplement). L’appellation “milieu complet” désigne le DMEM supplémenté avec 10% de sérum et 1% de glutamax. Le DMEM contient des sels minéraux, des acides aminés, des vitamines et du glucose, nécessaires à la croissance cellulaire, et le glutamax permet d’apporter un acide aminé important, la glutamine. Le sérum de veau fœtal permet d’ajouter des facteurs de croissance et d’attachement, des hormones et des nutriments. La composition du sérum pouvant varier d’un lot à l’autre, toutes les expériences d’une même série ont été réalisées avec le même lot, et des tests comparatifs de vérification (prolifération, morphologie) ont été réalisés sur les cellules avant un changement de lot. Le sérum a également été décomplémenté afin de détruire les protéines du système de complément, puis filtré et stocké à -20°C avant son utilisation.

IV.1.a.iii. Lignées cellulaires

Cinq lignées cellulaires humaines provenant d'exérèse chirurgicale de patients avec un glioblastome ont été mises en culture :

- A-172 [A172] (ATCC® CRL-1620™)
- U-251 MG (anciennement connues sous le nom de U-373 MG, ECACC 09063001)
- U-87 MG (ATCC® HTB-14™)
- T98G [T98-G] (ATCC® CRL-1690™)
- U-138 MG (ATCC® HTB-16™)

Afin de faciliter la lecture par la suite, ces lignées seront respectivement nommées A172, U251, U87, T98G et U138. Les lignées A172, U87, T98G et U138 ont été commandées à l'ATCC (American Type Culture Collection) et la lignée U251 a été commandée chez Sigma-Aldrich et provient de l'ECACC (European Collection of Authenticated Cell Cultures).

La sélection des lignées a été faite dans le but d'avoir une représentation la plus complète possible de la réalité clinique. Nous avons également souhaité étudier l'influence de la méthylation du promoteur de *MGMT* et des mutations de *TP53* sur la réponse au traitement. Pour rappel, la méthylation du promoteur de *MGMT* est un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de glioblastome puisqu'elle diminue le niveau de l'enzyme *MGMT*, qui répare l'action cytotoxique du témozolomide. Nous avons choisi deux lignées ne comportant pas de méthylation du promoteur de *MGMT* (T98G et U138) et trois lignées comportant un promoteur méthylé (A172, U251 et U87). Le gène *TP53* est quant à lui un des gènes les plus fréquemment mutés dans le développement de cancers, également impliqué dans la régulation de *MGMT*, ce qui lui confère un rôle de bon pronostic lorsqu'il est exprimé à l'état sauvage. Nous avons sélectionné trois lignées porteuses de mutations du gène *TP53* (U251, T98G et U138) et deux lignées exprimant ce gène à l'état sauvage (A172 et U87).

IV.1.b. Maintien de la culture

Tout au long des expériences, les cellules ont été passées – ou repiquées – avant d'arriver à confluence. Bien qu'elles soient immortalisées, les lignées cellulaires peuvent être altérées au fil des passages. Ainsi, l'ensemble des expériences a été mené avec des cellules passées maximum 15 fois. Les cellules ont été décollées des supports de culture grâce à l'action enzymatique de la trypsine. Le milieu de culture a été changé tous les 3 jours en moyenne, et de nouveaux tubes de cellules ont été décongelés lorsque le nombre de passages devenait trop élevé. Les lignées cellulaires non utilisées ont été congelées avec du diméthylsulfoxyde (DMSO) à 8%, et stockées dans de l'azote liquide à -196°C.

IV.1.c. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, CA). Toutes les expériences ont été répétées au moins trois fois de manière indépendante les unes des autres, sauf mention contraire. Dans ce document, les résultats sont présentés de la manière suivante : moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM). Le seuil de significativité statistique a été fixé à une valeur-p inférieure à 0,05. Sur les graphes, le nombre d'étoiles correspond au degré de significativité statistique, directement relié à la puissance de l'effet étudié : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Pour comparer deux groupes expérimentaux, un test t de Student bilatéral et non apparié a été utilisé. Pour les comparaisons multiples (plus de deux groupes expérimentaux), des analyses de la variance (ANOVA) ont été réalisées, différentes selon le nombre de facteur de variabilité. Les analyses de groupes multiples avec un seul facteur de variabilité ont été réalisées avec une ANOVA unidirectionnelle (one-way), suivie par un test de comparaisons multiples de Tukey. Les analyses avec deux facteurs de variabilité ont quant à elles été réalisées avec une ANOVA à deux facteurs, suivie par un test de comparaisons multiples de Bonferroni.

IV.2. Étude de la prolifération cellulaire

IV.2.a. Méthode générale

IV.2.a.i. Ensemencement

Pour étudier l’influence de l’hypothermie sur la prolifération de cellules de glioblastome humain, nous les avons mises en culture dans des plaques 6-puits placées à différentes températures, puis les avons récoltées et comptées. Pour l’ensemble des expériences, une suspension cellulaire a été préparée afin d’ensemencer 60 000 cellules par puits dans 3mL de milieu complet, à une densité cellulaire de $6,25 \cdot 10^4$ cellules/cm². Chaque condition expérimentale correspond à 3 puits et donc à 180 000 cellules, qui ont été récupérées et comptées ensemble à la fin de chaque expérience.

IV.2.a.ii. Comptage cellulaire

Afin d’évaluer le nombre de cellules ayant proliféré dans les différents supports de culture, elles ont été comptées grâce à un appareil automatisé (compteur TC20™, Bio-Rad, Figure 84). Au préalable, les résultats de plusieurs comptages automatiques ont été comparés avec ceux de comptages manuels réalisés avec un hématimètre classique (cellule de Malassez), et les deux méthodes ont donné des résultats similaires. Dans nos expériences, chaque résultat (n=1) correspond à la moyenne de deux mesures pour les comptages relatifs à l’ensemencement des cellules et à leur maintien en culture, et à la moyenne de quatre mesures pour les résultats des tests de prolifération, afin de s’affranchir des incertitudes de mesure.



Figure 84 : Différentes étapes d’un comptage cellulaire automatisé (TC20™, Bio-Rad)

Pour chaque comptage, un test d’exclusion au bleu de trypan – préalablement filtré à $0,22\mu\text{m}$ – a été réalisé afin de mesurer la mort cellulaire, puisque ce colorant pénètre uniquement les cellules mortes en raison de l’altération de leur membrane (Figure 85). L’ensemble des expériences a été réalisé sur des cellules avec une viabilité d’au moins 97%.

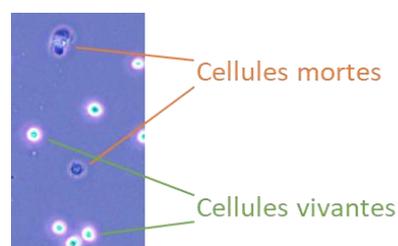


Figure 85 : Photographie illustrant la pénétration du bleu de trypan dans des cellules mortes

Les expériences ont été réalisées avec des cellules adhérentes, qui s’attachent aux supports de culture pour proliférer. Pour évaluer au mieux la mort cellulaire, les cellules « flottantes » dans le milieu de culture ont également été récupérées et comptées avec les cellules adhérentes.

IV.2.a.iii. Représentation graphique

Dans la suite de ce document, le nombre de cellules rapporté sur chaque graphe représente le nombre de cellules vivantes pour chaque condition expérimentale, permettant de suivre la prolifération des cellules. La viabilité cellulaire représente quant à elle la proportion de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules. Ces deux données sont complémentaires et permettent de différencier l’état de dormance – un état métabolique amoindri dans lequel la prolifération des cellules est arrêtée – d’un état d’équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Par exemple, si on observe un nombre identique de cellules vivantes avant et après 3 jours de culture, il peut être expliqué par un blocage de la prolifération correspondant à un état de dormance, ou par une augmentation de la mort cellulaire venant compenser la prolifération. Sur les graphes, la ligne en pointillés correspond à la référence du nombre de cellulesensemencées au début de chaque test (180 000 cellules). L’hypothermie administrée en continu sera représentée par une couleur unie, tandis que l’hypothermie intermittente sera représentée par un remplissage hachuré.

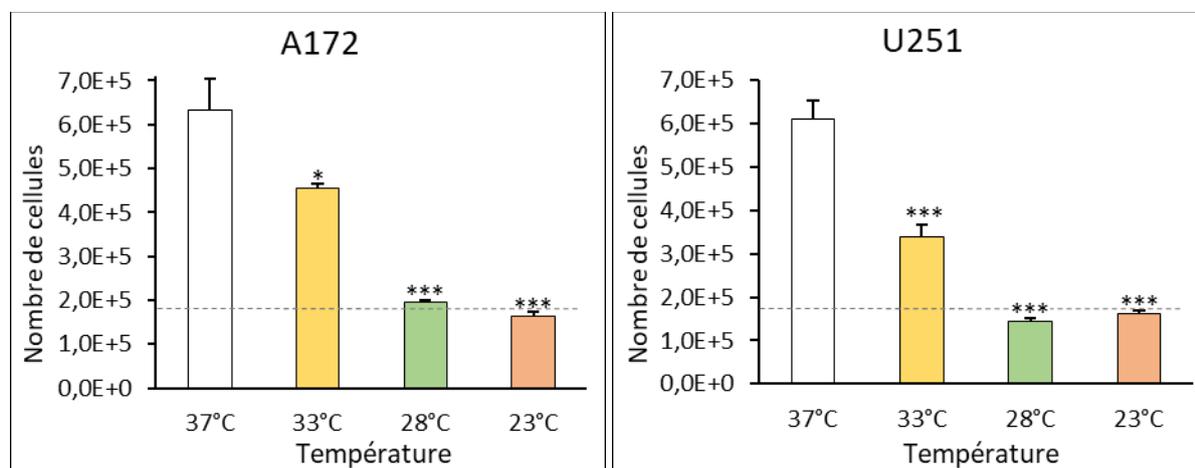
IV.2.b. Comparaison de différents niveaux d’hypothermie

IV.2.b.i. Plan d’expériences

Pour commencer, nous avons étudié l’influence de différents niveaux d’hypothermie sur la prolifération de cinq lignées de glioblastome humain (A172, U251, U87, T98G, U138) pendant trois jours. Nous les avons notamment placées en condition hypothermique légère (33°C), modérée (28°C) ou sévère (23°C), tout en conservant un contrôle normothermique (37°C).

IV.2.b.ii. Résultats

Les cinq lignées cellulaires ont répondu de manière similaire, avec une inhibition de leur prolifération dépendant directement du niveau d’hypothermie (Figure 86). Nous avons démontré qu’une hypothermie légère de 33°C inhibait fortement la prolifération cellulaire des cinq lignées de glioblastome humain, avec une inhibition de 39% pour les A172 ($p = 0,039$), 63% pour les U251 ($p < 0,001$), 71% pour les U87 ($p < 0,001$), 69% pour les T98G ($p < 0,001$) et 56% pour les U138 ($p < 0,001$). Nous avons également montré qu’une hypothermie modérée de 28°C induisait une inhibition quasi-totale des lignées A172 (97% ; $p < 0,001$) et T98G (99% ; $p < 0,001$) et totale des lignées U251, U87 et U138 ($p < 0,001$). Enfin, nous avons démontré qu’une hypothermie sévère de 23°C induisait une inhibition totale de la prolifération pour toutes les lignées ($p < 0,001$). De plus, elle a parfois entraîné la mort et le décollement de certaines cellules, pouvant expliquer le fait que le nombre de cellules adhérentes à 23°C soit inférieur à celui de l’ensemencement.



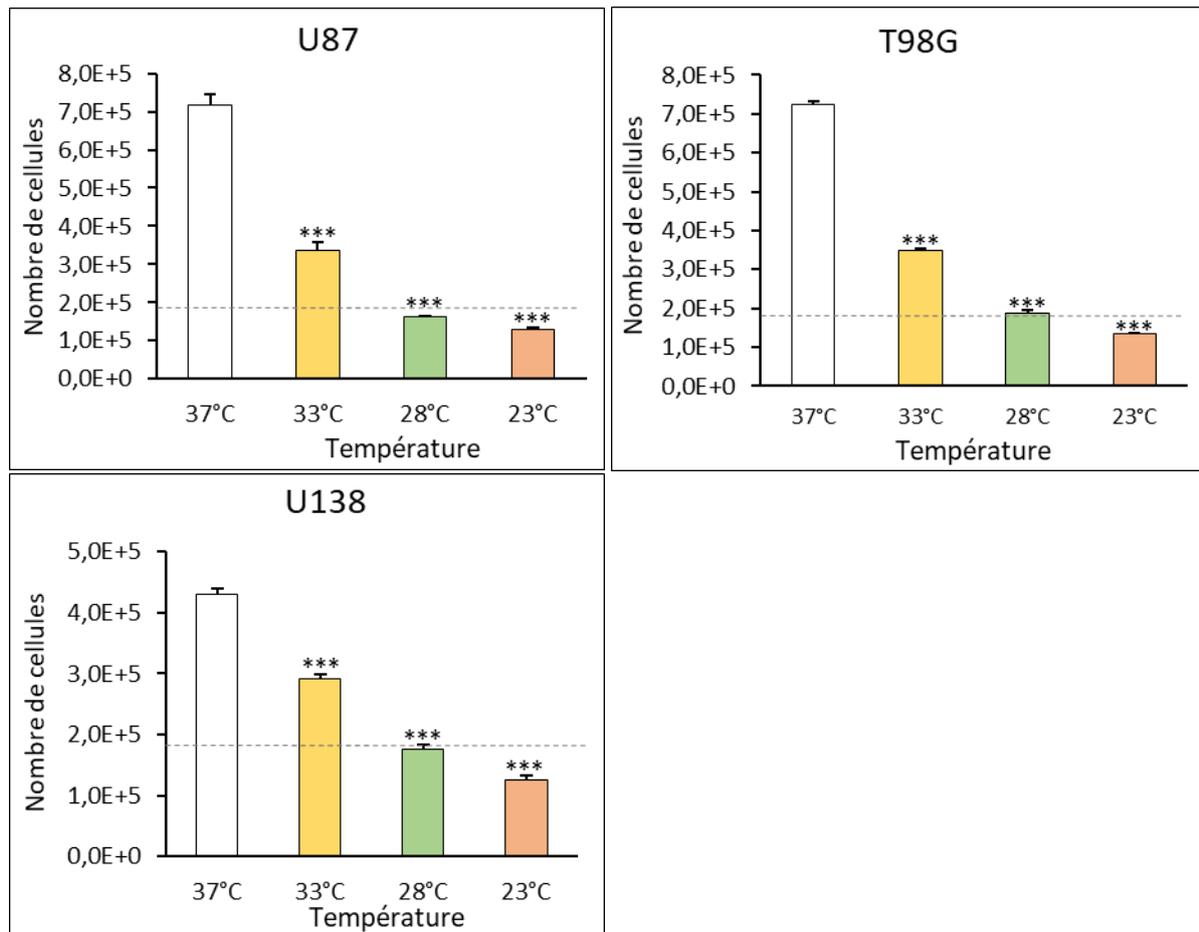


Figure 86 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la prolifération cellulaire à 3 jours

Afin de vérifier que l’arrêt de la croissance cellulaire résultait bien d’un blocage de la prolifération et non d’un nouvel équilibre entre prolifération et mort cellulaire, nous avons évalué la viabilité des cellules dans les différentes conditions de température (Figure 87). Les résultats ont montré que les cellules étaient très peu affectées par une hypothermie de 3 jours, avec une viabilité supérieure à 96% ($p > 0,05$ pour toutes les lignées). Ainsi, l’hypothermie inhibe véritablement la prolifération des cellules de glioblastome de manière température-dépendante.

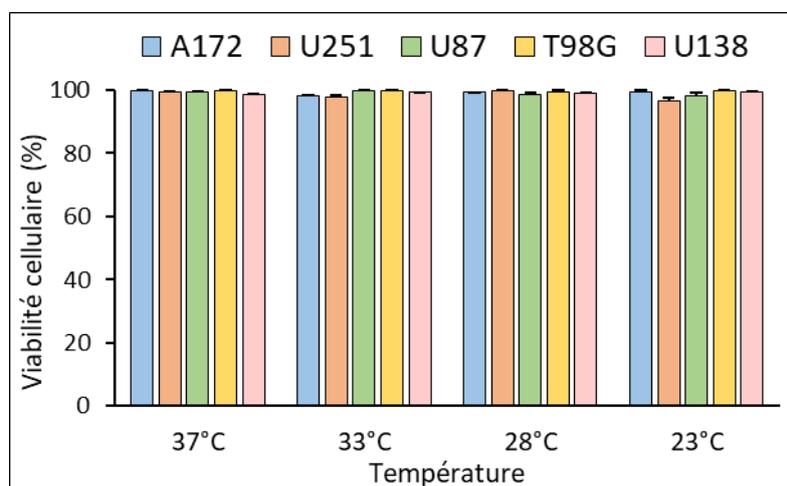


Figure 87 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la viabilité cellulaire à 3 jours

IV.2.b.iii. Discussion

Nous avons étudié la sensibilité de cinq lignées cellulaires de glioblastome humain à l'hypothermie, afin d'identifier les niveaux de température pouvant impacter leur prolifération cellulaire, un processus clé impliqué dans la croissance tumorale. L'équipe de Kalamida (Kalamida et al., 2015) a déjà montré que les lignées cellulaires T98G et U87 étaient sensibles à 3 jours d'hypothermie légère à 34°C, avec une réduction de leur prolifération par rapport à la normothermie. Les résultats obtenus ici concordent avec ces observations, avec une forte réduction de la prolifération cellulaire des lignées U87 et T98G après 3 jours d'hypothermie légère à 33°C, mais également des lignées A172, U251 et U138. Nous avons également démontré qu'une hypothermie modérée de 28°C, ou sévère de 23°C, était capable d'inhiber totalement la croissance de différentes lignées de glioblastome humain. L'équipe de Neutelings (Neutelings et al., 2013) a déjà montré qu'une hypothermie de 25°C induisait un arrêt de la prolifération de cellules d'ostéosarcome humain (MG-63), mais ce sont, à notre connaissance, les premiers résultats montrant un arrêt de la prolifération de cellules tumorales par une hypothermie modérée (28°C), notamment concernant des cellules de glioblastome humain. Ainsi, nous avons mis en évidence un effet uniforme de l'hypothermie, capable de modifier la prolifération de différentes lignées tumorales de manière similaire.

Par la suite, nous avons décidé de focaliser notre étude de prolifération sur les effets d'une hypothermie modérée de 28°C, suffisante pour bloquer la prolifération de lignées cellulaires issues de glioblastome. Pour la suite des expériences, nous avons sélectionné quatre lignées (A172, U251, U87 et T98G) parmi les cinq testées afin d'en réaliser un plus grand nombre. Ce choix a été fait indépendamment des réponses des cellules à l'hypothermie, en essayant d'avoir une représentation la plus complète possible du glioblastome. En effet, nous avons conservé des lignées comportant les deux statuts de méthylation du promoteur de *MGMT* et les deux statuts de mutation de *TP53*.

IV.2.c. Évolution des effets de l'hypothermie au cours du temps

IV.2.c.i. Plan d'expériences

Afin d'approfondir les expériences menées durant 3 jours, nous avons décidé d'étudier les effets de l'hypothermie sur la prolifération cellulaire au cours du temps. Les cellules ont alors été placées en hypothermie modérée (28°C) pendant 3, 6, 9 et 30 jours. Un suivi des cellules a été effectué par microscopie (Olympus CKX41), et des photos ont été réalisées après 14, 21 et 28 jours à 28°C à l'aide d'une caméra numérique (Olympus DP22). Un contrôle normothermique a été effectué en parallèle en plaçant les cellules à 37°C pendant 3, 6 et 9 jours. En raison de la confluence rapide à 37°C, les cellules n'ont pas pu être laissées 30 jours à 37°C, mais le contrôle se situerait à plusieurs centaines de millions de cellules pour les quatre lignées (NC, pour non calculable).

IV.2.c.ii. Résultats

Bien que leurs taux de prolifération soient différents, les quatre lignées ont montré des résultats similaires concernant leur sensibilité à l'hypothermie. Les résultats ont montré une inhibition totale de la prolifération à 28°C, quelle que soit la durée de la culture (Figure 88 ; $p < 0,001$ pour tous excepté A172 après 3 jours). Ainsi, l'hypothermie a des effets inhibiteurs durables dans le temps, et induit un blocage total de la prolifération des cellules de glioblastome à 28°C.

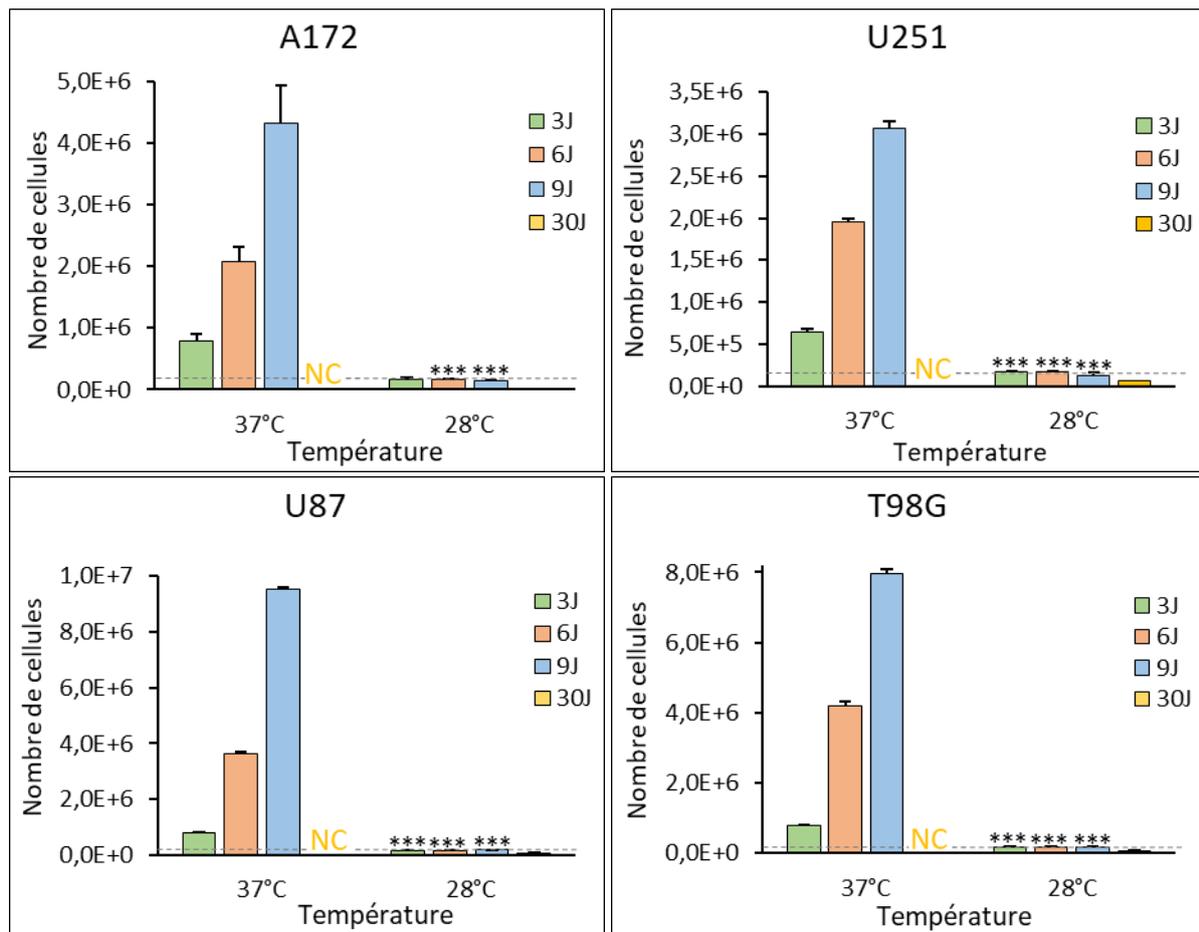


Figure 88 : Influence de l’hypothermie modérée sur la prolifération cellulaire au cours du temps

L'évolution de la croissance cellulaire à 28°C a été suivie par microscopie après 14, 21 et 28 jours de culture (Figure 89). Les photographies montrent que les cellules A172 présentent une forme arrondie et se retrouvent en suspension dans le milieu de culture, après s'être décollées de la surface des plaques. En revanche, pour les lignées U251, U87 et T98G, la plupart des cellules adhère toujours à la surface de culture au bout de 28 jours à 28°C.

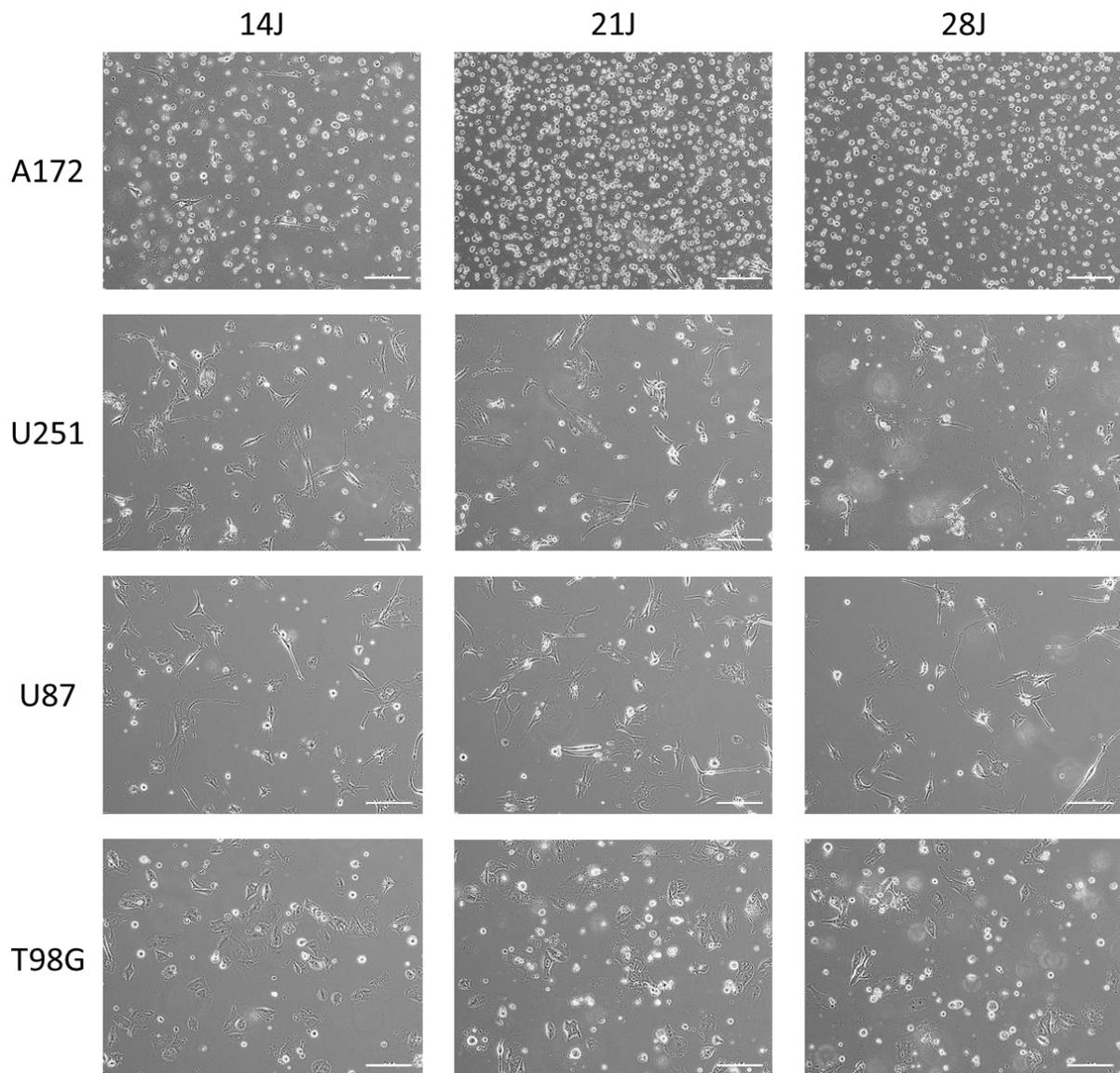


Figure 89 : Photographies de cellules de glioblastome au bout de 14, 21 et 28 jours à 28°C, barre d'échelle : 200µm

Afin de mieux comprendre les processus cellulaires pouvant expliquer le nombre constant de cellules au fil des jours à 28°C, nous avons complété ces expériences par une évaluation de la viabilité cellulaire (Figure 90). En effet, le nombre constant de cellules pouvait correspondre à un état d'équilibre en prolifération et mort cellulaire, avec une augmentation parallèle des deux processus au fil du temps, ou bien à un état de dormance se traduisant par un arrêt de la prolifération. Pour les lignées A172 et U251, la viabilité n'a été que très peu affectée après 3 et 6 jours à 28°C (respectivement > 97% et > 92% ; $p > 0,05$) et légèrement affectée après 9 jours (respectivement 82 et 59% ; $p < 0,001$ pour A172 ; $p = 0,016$ pour U251). Pour les lignées U87 et T98G, la viabilité n'a pas été affectée après 3, 6 et 9 jours (> 96% ; $p > 0,05$). Enfin, pour les quatre lignées, la viabilité cellulaire a été impactée de manière significative par 30 jours d'hypothermie à 28°C, variant entre 7% (A172), 24% (U251), 44% (U87) et 30% (T98G ; $p < 0,001$ pour toutes les lignées). Ces résultats sont cohérents avec les observations microscopiques et indiquent que les cellules sont mises en dormance par l'hypothermie.

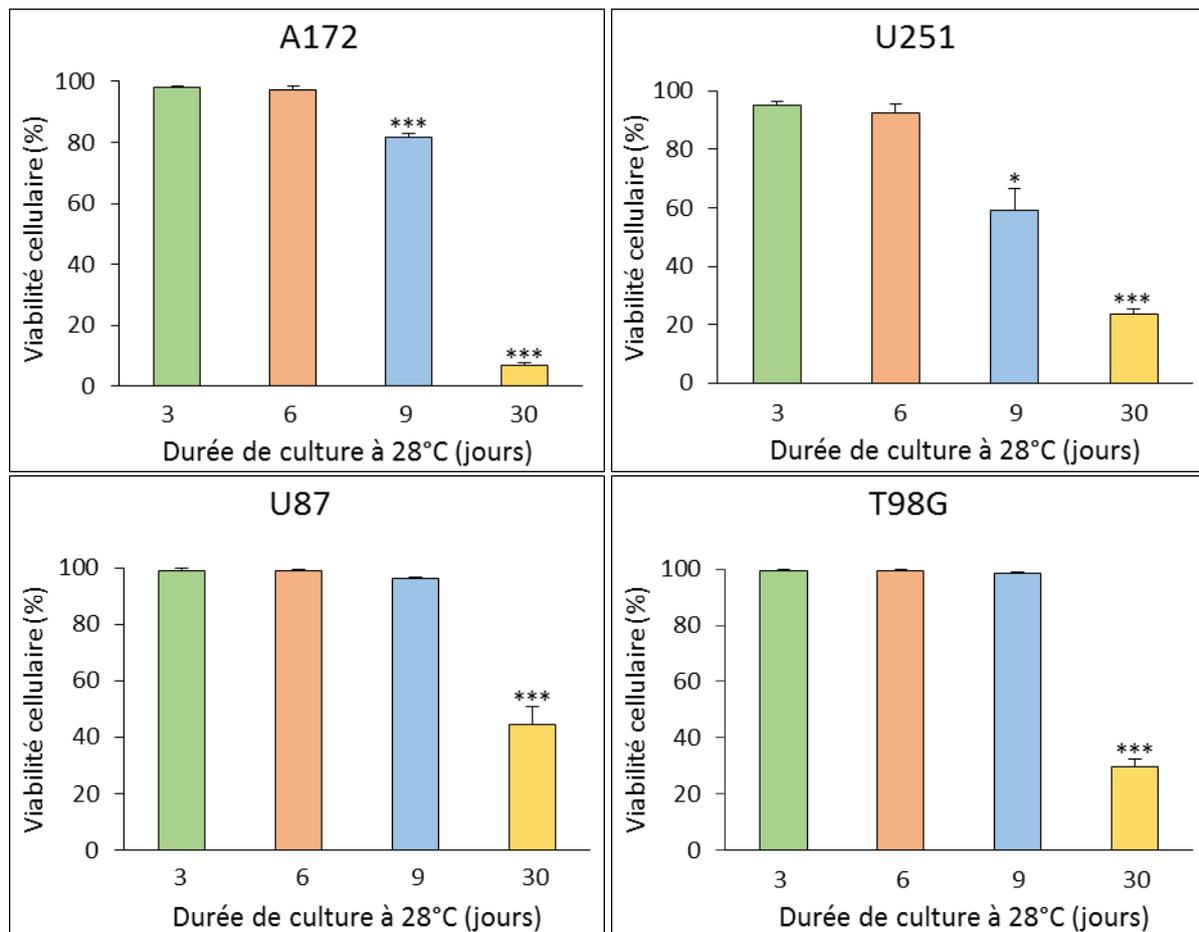


Figure 90 : Influence de l’hypothermie modérée sur la viabilité cellulaire au cours du temps

IV.2.c.iii. Discussion

Après avoir démontré qu’une hypothermie de 3 jours à 28°C bloquait la prolifération des cellules de glioblastome, nous avons étudié les effets d’une hypothermie modérée pendant des durées prolongées. Notre objectif était d’étudier l’étendue et la puissance de ces effets, et notamment de déterminer si les cellules tumorales pouvaient échapper aux effets inhibiteurs de l’hypothermie au cours du temps. Auparavant, l’équipe de Matijasevic (Matijasevic, 2002) avait étudié l’influence d’une hypothermie modérée (28°C) prolongée sur les cellules SF126 de glioblastome humain, montrant un nombre constant de cellules vivantes pendant les 5 à 10 premiers jours d’hypothermie, puis une diminution progressive de la viabilité jusqu’à 30 jours. Ici, nous avons démontré qu’une hypothermie prolongée à 28°C inhibait totalement la prolifération des cellules de glioblastome humain, avec un nombre de cellules vivantes toujours inférieur à celui de l’ensemencement initial (Figure 91, extraite de la Figure 88 avec les données à 28°C uniquement, sans faire figurer les statistiques pour plus de clarté). Nos résultats sont cohérents avec ceux de Matijasevic, puisque nous avons montré que le nombre de cellules vivantes était sensiblement constant pendant les 9 premiers jours à 28°C – excepté une légère diminution pour les U251 dès 6 jours – et qu’il diminuait fortement après 30 jours.

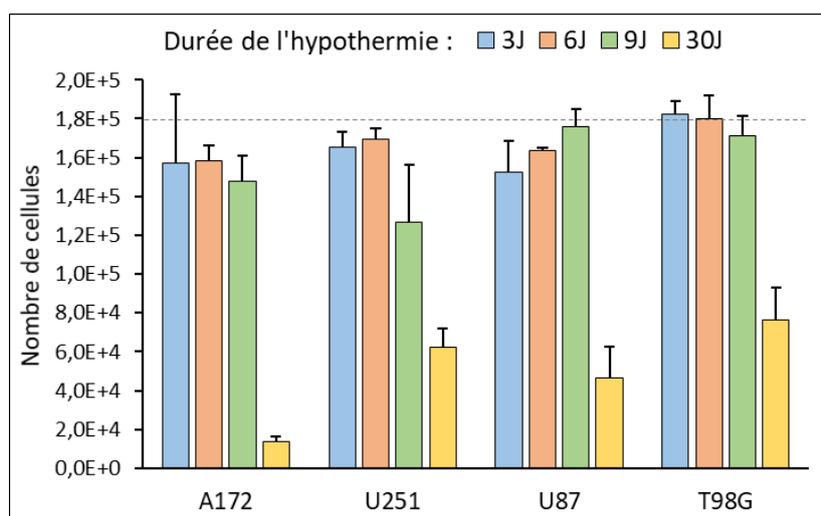


Figure 91 : Influence d'une hypothermie de 28°C sur la prolifération cellulaire au cours du temps

Cependant, nous avons rapporté un nombre de cellules vivantes jusqu'à 80 fois plus élevé dans notre étude par rapport à celle de Matijasevic, avec des viabilités après 30 jours à 28°C pouvant aller jusqu'à 44% en fonction des lignées. Ainsi, nous avons montré que l'hypothermie prolongée à 28°C induisait un arrêt de la prolifération cellulaire correspondant à un état de dormance. Contrairement à Matijasevic qui rapportait de fortes disparités entre les lignées, nous avons montré que l'hypothermie avait des effets uniformes sur quatre lignées différentes de glioblastome humain, quel que soit le statut de mutation de *TP53*.

Par la suite, nous avons cherché à comprendre certains des mécanismes cellulaires impliqués dans la mise en dormance des cellules par l'hypothermie, en étudiant leur morphologie et leur cycle cellulaire.

IV.3. Étude des mécanismes cellulaires

IV.3.a. Morphologie

IV.3.a.i. Méthode

La morphologie cellulaire a été étudiée grâce à un marquage avec deux fluorochromes : la phalloïdine, qui marque les filaments d'actine en rouge car elle est conjuguée au tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC), et le 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) qui marque l'ADN contenu dans les noyaux en bleu. Pour cela, les cellules ont d'abord été fixées pendant 5 minutes dans du formaldéhyde, entre deux rinçages au PBS (*phosphate buffered saline*). Une fois fixées, elles ont été placées pendant 5 minutes dans une solution contenant 0,3% de Triton dans du PBS afin de perméabiliser leurs membranes, pour permettre à la phalloïdine de pénétrer dans les cellules. Après un lavage au PBS, les cellules ont été placées pendant 30 minutes à l'obscurité dans une solution de marquage contenant 1µL de DAPI et 100µL de phalloïdine TRITC pour 2,4mL de PBS, puis à nouveau rincées avec du PBS. Les observations microscopiques ont été réalisées avec un microscope inversé à fluorescence (Olympus IX81) et les acquisitions faites avec le logiciel Cell Sens Dimension.

IV.3.a.ii. Résultats

Afin d'évaluer les effets de l'hypothermie sur la morphologie cellulaire, nous avons mis des cellules de glioblastome en culture pendant 6 jours à 28°C et à 37°C (contrôle). Les résultats issus des images microscopiques ont montré que l'hypothermie induisait de nombreuses altérations morphologiques (Figure 92). En effet, nous avons observé une détérioration des membranes cellulaires pour les lignées U251, U87 et T98G, une altération de l'adhésion cellulaire pour la lignée A172 ainsi qu'un regroupement de certains noyaux pour les lignées U251 et U87.

Nous avons également pu constater la formation de « blebs », des proéminences de la membrane plasmique provoquées par une augmentation de la pression intracellulaire. Ces observations microscopiques ont confirmé que l’hypothermie affectait sensiblement les cellules de glioblastome.

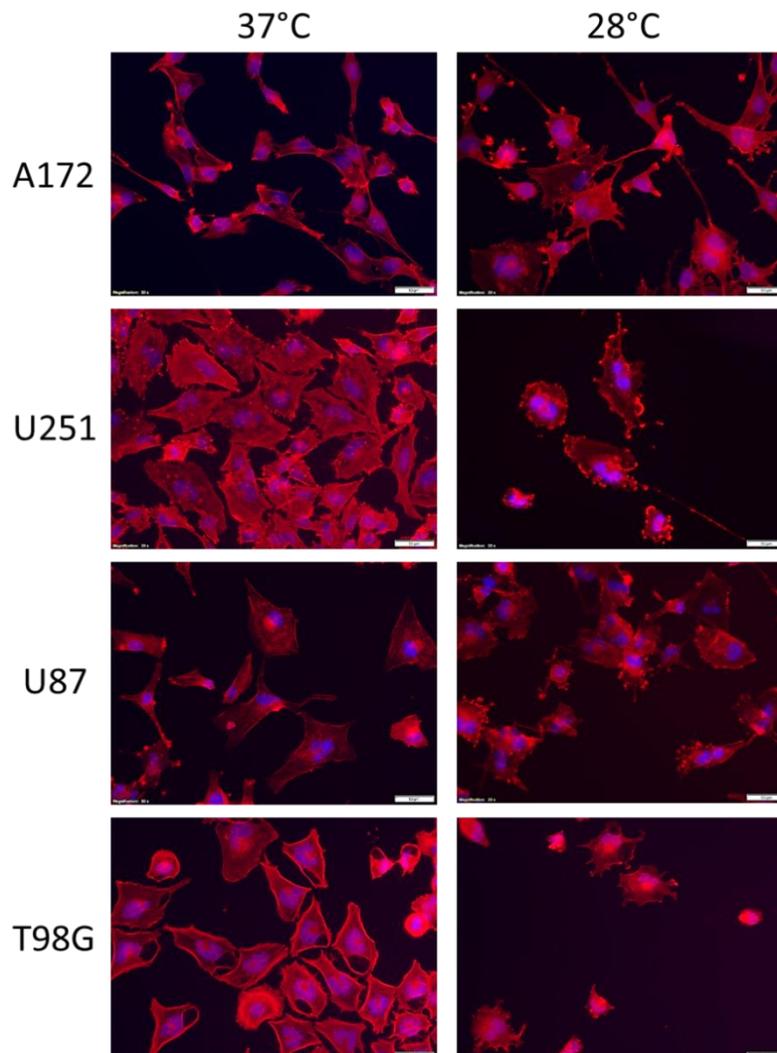


Figure 92 : Influence de l’hypothermie modérée sur la morphologie cellulaire, barre d’échelle : 50µm

IV.3.a.iii. Discussion

Nous avons démontré qu’une hypothermie modérée affectait les cellules de glioblastome en induisant diverses altérations morphologiques. L’équipe de Plesnila (Plesnila et al., 2000) s’est intéressée à l’influence de différentes températures sur la morphologie de cellules de gliome de rat (C6), et a montré que des hypothermies légère (32°C) et sévère (27°C) induisaient une augmentation réversible de leur volume, dépendant directement de la température. Elle a également montré que ce gonflement était lié à une accumulation de l’ion sodium dans les cellules provoqué par une altération de la perméabilité des membranes. Ces résultats, bien que différents de ceux observés dans notre étude, confirment une altération des membranes cellulaires, dont la dégradation est visible sur nos images, notamment sous forme de « blebs ». De plus, nos observations concernant le regroupement de certains noyaux dans une même cellule indiquent une mitose incomplète en raison d’un possible blocage des cellules dans la phase de division, qui pourrait expliquer l’arrêt de la prolifération cellulaire.

IV.3.b. Cycle cellulaire

IV.3.b.i. Méthode

◆ Présentation

Afin de mieux comprendre le blocage de la prolifération cellulaire induit par l’hypothermie modérée, nous avons étudié ses effets sur la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle. Pour cela, nous avons utilisé la technique de cytométrie en flux, qui consiste à faire passer des cellules devant un faisceau laser grâce à un système fluïdique (Figure 93). Le faisceau laser excite les cellules préalablement marquées avec un fluorochrome (l’iodure de propidium dans ce cas), qui vont alors se désexciter en émettant de la lumière. Les signaux optiques sont alors focalisés sur des photomultiplicateurs et convertis en signaux électriques pour ensuite être analysés.

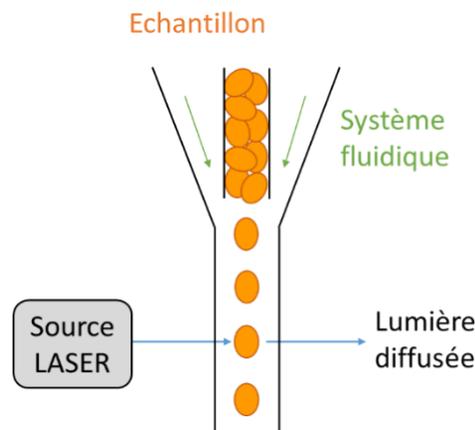


Figure 93 : Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux

L’analyse de la lumière diffusée permet d’obtenir des informations sur la taille des cellules lorsque le détecteur se trouve dans l’axe du rayon incident (FSC, *forward scatter*) et sur leur granularité ou complexité lorsqu’il est décalé de 90° (SSC, *side scatter*). La cytométrie en flux peut également permettre d’étudier la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire en analysant leur quantité d’ADN, qui évolue au cours du cycle. Pour rappel, les phases du cycle cellulaire sont les suivantes (Figure 94) :

- G0 : quiescence
- G1 : préparation de la réplication, croissance
- S : réplication de l’ADN
- G2 : préparation de la mitose
- M : mitose (division cellulaire)

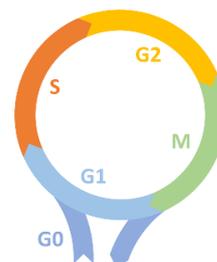


Figure 94 : Phases du cycle cellulaire

Lors de la phase S, les cellules dupliquent leur matériel génétique, avec une quantité d’ADN passant de q à $2q$. Ensuite, lors de la mitose, elles se divisent et passent de $2q$ à $2xq$, ce qui revient à une quantité d’ADN par cellule équivalente à q (Figure 95).

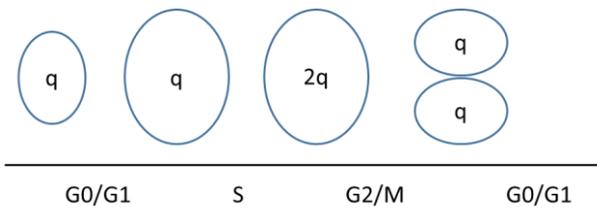


Figure 95 : Évolution de la quantité d'ADN dans les cellules au cours du cycle

◆ Matériel

Le PBS utilisé pour marquer les cellules a été obtenu chez Biowest (sans calcium ni magnésium, L0615-500). Les tubes utilisés pour le passage au cytomètre ont été obtenus chez Beckton Dickinson (352235), et sont dotés d'un bouchon avec filtre (35µm nylon). Ils ont été préalablement rincés avec du milieu afin d'éviter l'adhérence des cellules aux parois des tubes.

◆ Protocole

Nous avons choisi de ne pas synchroniser les cellules dans leur cycle afin d'avoir une situation *in vitro* proche de la réalité *in vivo*. Les cellules ont été mises en culture dans des plaques 6-puits à 28°C et à 37°C pendant 6 jours, puis elles ont été récoltées par trypsinisation et centrifugées. Ensuite, de l'éthanol absolu glacé (500µL) a été ajouté goutte à goutte au culot cellulaire, qui a été dissocié successivement par pipetage et vortex afin d'éliminer les amas, puis stocké à -20°C jusqu'à analyse.

Afin de marquer l'ADN contenu dans les noyaux cellulaires, les cellules préalablement fixées dans l'éthanol glacé ont été remises en solution puis lavées avec 3mL de PBS et centrifugées 10 minutes à 500g. Elles ont à nouveau été lavées avec 2mL de PBS et centrifugées 5 minutes à 500g. Le culot cellulaire a été repris dans 500µL de solution de travail, préalablement préparée en ajoutant de l'iodure de propidium (50µg/mL) et de la RNase (100µg/mL) dans du PBS, et incubé pendant 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante. La ribonucléase a pour but de dégrader l'ARN auquel pourrait également se lier l'iodure de propidium, induisant des faux positifs. Dans les heures suivantes, les cellules ont été filtrées puis excitées avec un laser à 488nm et analysées avec un cytomètre. Les acquisitions ont été effectuées avec un cytomètre BD LSR II et les données traitées à l'aide du logiciel FACS Diva (Version 6.1.3). Une fois les acquisitions réalisées, plusieurs étapes d'analyse ont été nécessaires pour récolter des données exploitables. D'abord, nous nous sommes affranchis des doublets, dont l'aire est deux fois plus élevée que pour une cellule seule. Ensuite, les débris ont été éliminés, et les limites des phases G0/G1, S et G2/M ajustées. Ces limites ont été fixées pour être identiques entre les différentes conditions d'une même lignée, mais pouvant varier entre les lignées, notamment lorsque la taille des cellules varie.

IV.3.b.ii. Résultats

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le blocage de la prolifération par l'hypothermie, nous avons étudié son influence sur la distribution des cellules dans les phases du cycle cellulaire. Les résultats ont montré que l'hypothermie altérait significativement la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire, avec une diminution importante du nombre de cellules dans la phase G0/G1 et une forte accumulation dans la phase G2/M (Figure 96). Les graphes représentent le nombre de cellules analysées en fonction de la fluorescence émise, représentant la quantité d'ADN présent dans les cellules.

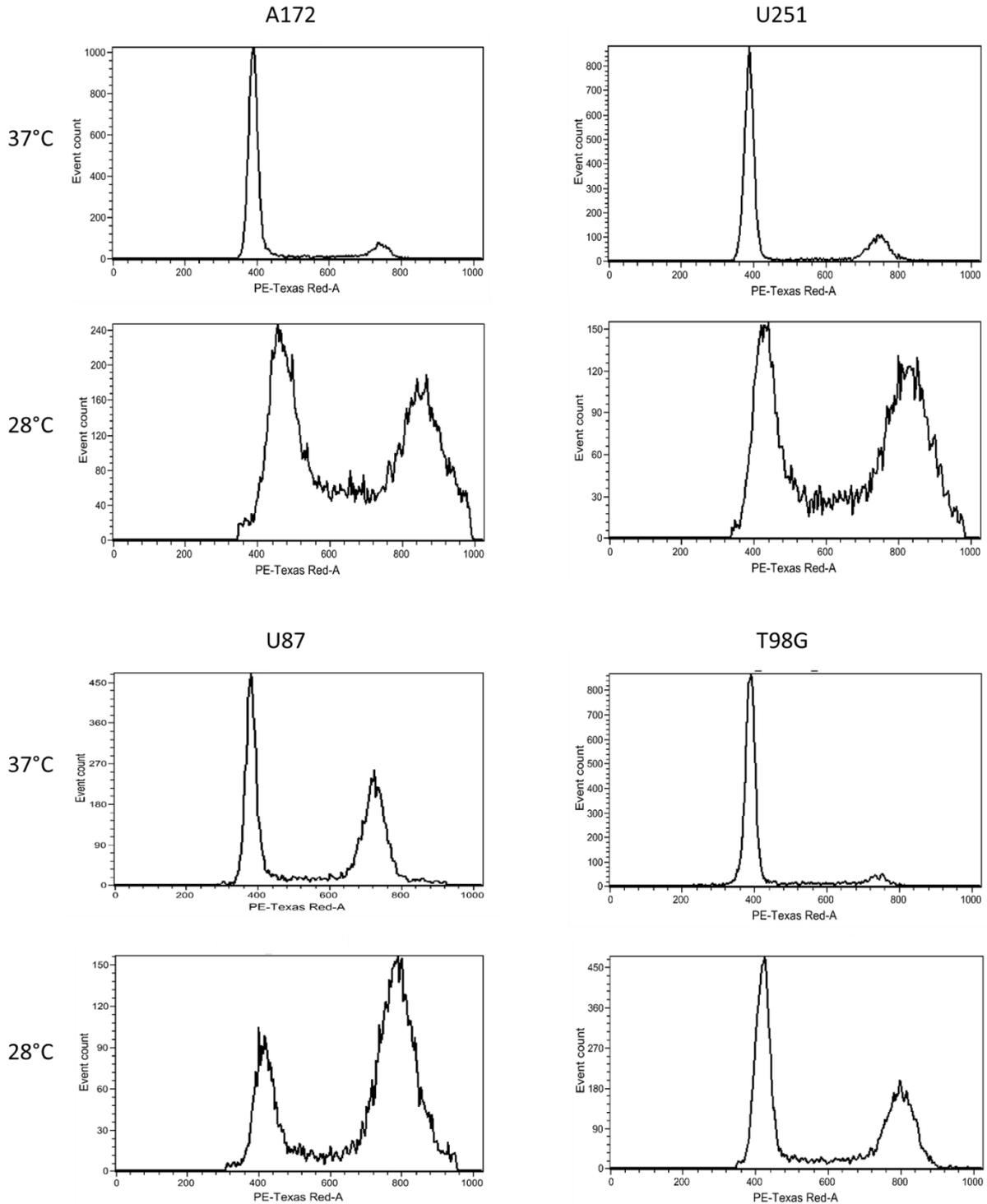


Figure 96 : Influence de l'hypothermie modérée sur les phases du cycle cellulaire

Une quantification des résultats a montré que l’hypothermie modérée induisait une diminution significative du nombre de cellules dans la phase G0/G1, qui était de 59% pour les A172, 55% pour les U251, 43% pour les U87 et 35% pour les T98G (Figure 97 ; $p < 0,001$ pour toutes les lignées). Elle a également induit une augmentation du nombre de cellules dans la phase S de 225% pour les A172 ($p < 0,001$), 307% pour les U251 ($p < 0,001$) et 51% pour les U87 et les T98G ($p > 0,05$). Enfin, elle a induit une forte augmentation du nombre de cellules dans la phase G2/M, qui était alors de 268% pour les A172, 165% pour les U251, 48% pour les U87 et 326% pour les T98G ($p < 0,001$ pour toutes les lignées). Ainsi, l’hypothermie altère la progression des cellules dans les phases du cycle cellulaire, en les bloquant notamment dans la phase G2/M où elles s’accumulent. Les cellules ne peuvent alors pas entrer en mitose ou terminer cette phase, ce qui entraîne un arrêt de la division cellulaire et pourrait donc expliquer le blocage de la prolifération cellulaire observé.

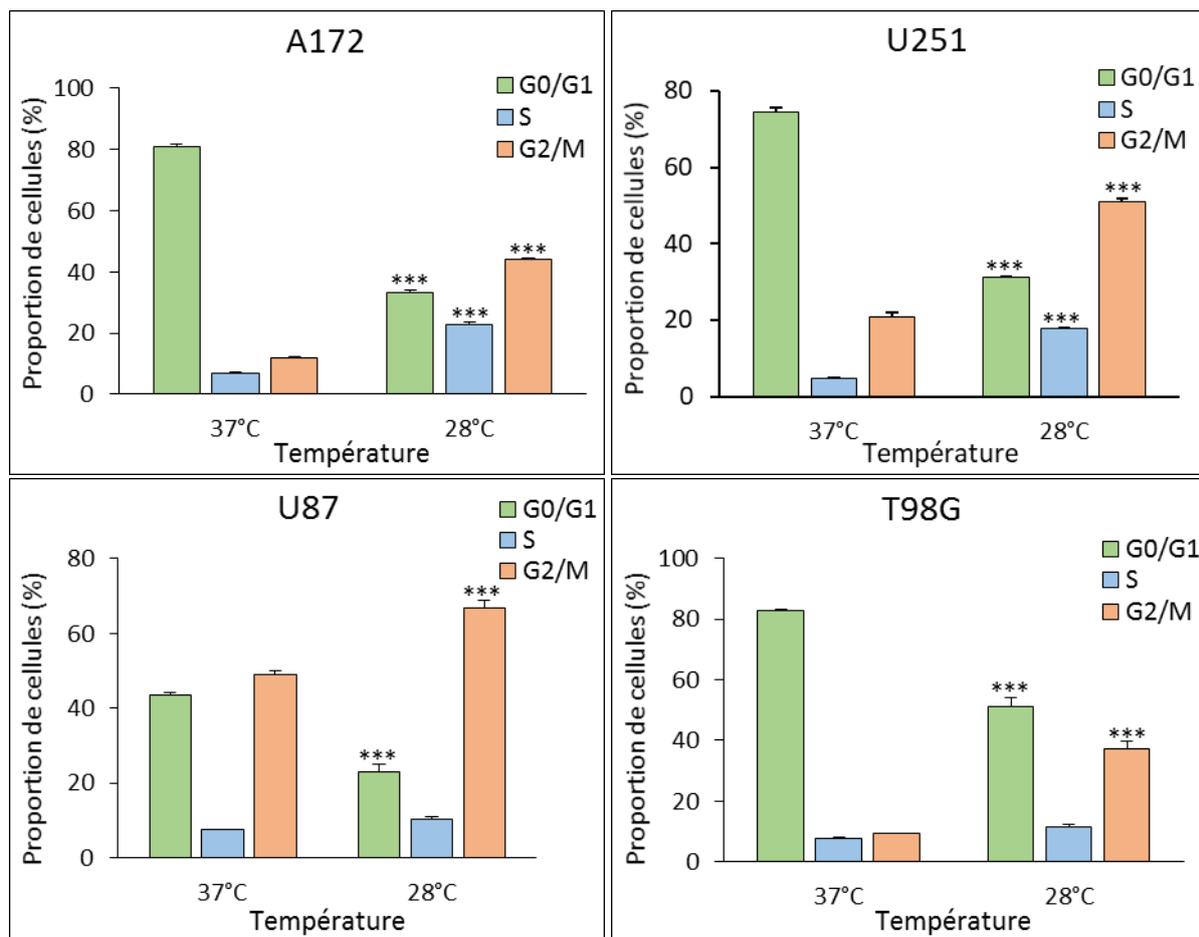


Figure 97 : Influence de l'hypothermie modérée sur la proportion de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire

IV.3.b.iii. Discussion

Afin de mieux comprendre les mécanismes biologiques à l'origine des effets inhibiteurs de l’hypothermie, nous avons utilisé la cytométrie en flux, permettant d’étudier la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle. L’équipe de Matijasevic (Matijasevic, 2002) a précédemment montré qu’une hypothermie de 28°C empêchait la progression de cellules tumorales à travers les phases du cycle, notamment en phase G2/M, uniquement pour les cellules avec un gène *TP53* de type sauvage. Selon elle, l’hypothermie compromet la liaison de la tubuline aux centrosomes et entraîne une dépolymérisation des microtubules qui pourrait déclencher l’arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M.

Nos résultats sont partiellement cohérents avec ceux de Matijasevic : comme lui, nous avons observé une accumulation des cellules – de glioblastome humain, ici – dans la phase G2/M. Cependant, nous avons démontré le même blocage du cycle et de la prolifération pour nos quatre lignées, dont deux expriment un gène *TP53* de type sauvage (A172 et U87), et deux autres présentent des mutations de ce gène (U251 et T98G), contredisant l’hypothèse de Matijasevic. Comme lors de nos précédents résultats, l’analyse du cycle cellulaire révèle un effet uniforme de l’hypothermie sur l’ensemble des lignées évaluées. Ces données permettent également d’analyser les résultats obtenus précédemment, puisque l’arrêt de la division cellulaire justifie le blocage de la prolifération cellulaire et la dormance cellulaire associée. De plus, le blocage des cellules dans la phase G2/M est intéressant pour une future utilisation de l’hypothermie en tant que thérapie adjuvante puisque les cellules sont particulièrement sensibles à la radiothérapie lorsqu’elles se trouvent dans cette phase.

Une des limitations de cette étude est le faible nombre de cellules à 28°C par rapport à 37°C, en raison de l’impact de l’hypothermie sur la prolifération cellulaire. Pour améliorer la qualité des résultats, les expériences pourront être répétées en conservant le même taux d’ensemencement mais en mettant en culture plusieurs plaques 6-puits pour la condition hypothermique, permettant d’augmenter le nombre de cellules sans altérer leur prolifération.

IV.4. Étude de la migration

Après avoir étudié l’influence de différents niveaux d’hypothermie sur la prolifération cellulaire, nous nous sommes intéressés à ses effets sur la migration cellulaire, un autre processus clé impliqué dans la récurrence tumorale. Nous étudierons à la fois la migration non-orientée et la migration orientée des cellules, qui permettent de modéliser *in vitro* la migration des cellules tumorales et leur capacité d’invasion des tissus avoisinants.

IV.4.a. Migration non-orientée

IV.4.a.i. Sans mitomycine C

◆ Protocole

La migration dite « non-orientée » des cellules a été étudiée grâce à un test de cicatrisation, permettant de suivre la recolonisation d’une lésion au cours du temps. Pour ce faire, une solution contenant 50 000 cellules et 1mL de DMEM complet par puits a été préparée. Les cellules ont été ensemencées dans des chambres de culture sur lame (Lab-Tek™ 2-puits) puis mises en culture pendant plusieurs jours jusqu’à confluence (Figure 98A). Ensuite, une lésion régulière a été réalisée dans le tapis cellulaire à l’aide de la pointe d’un cône de pipette de 1000µl (Figure 98B), la surface a été nettoyée avec du DMEM afin d’enlever les débris cellulaires, puis les cellules ont été incubées dans du milieu complet à 37°C, 33°C ou 28°C. Au fil des heures, les cellules ont migré pour recoloniser la lésion (Figure 98C). Après 48h, les cellules ont été fixées puis colorées avec du DAPI (IV.3.a.i Méthode).

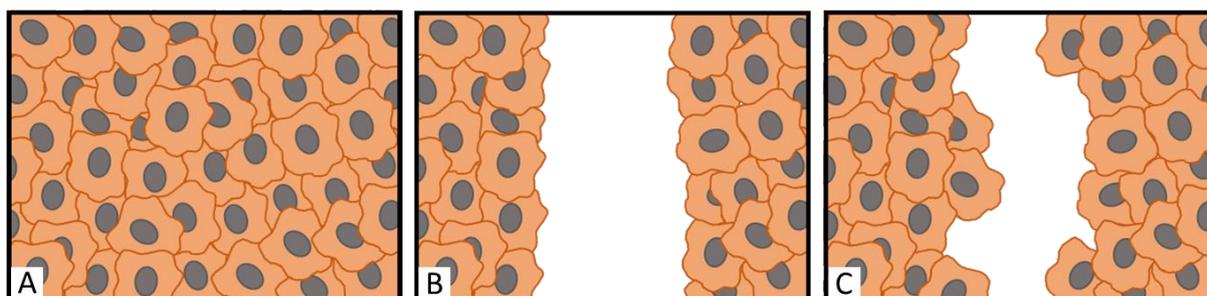
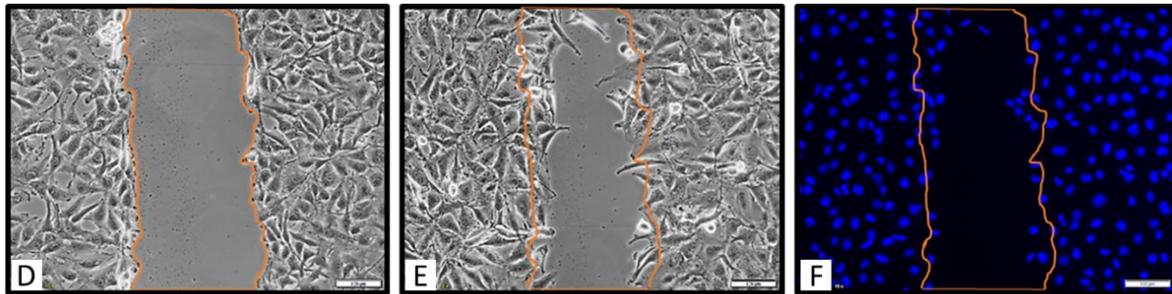


Figure 98 : Schéma de principe du test de migration cellulaire non-orientée

Pour pouvoir comparer l’impact des différentes températures de culture et quantifier les résultats, la migration a été suivie par microscopie. Une image a d’abord été prise juste après la réalisation de la lésion (Figure 99D), et la zone lésée (en orange sur l’image) a servi de référence pour la quantification. Après 48h, une nouvelle image des cellules a été prise au même endroit, afin de comparer précisément l’état de la lésion avant et après sa recolonisation (Figure 99E). Pour faciliter cette comparaison, les cellules ont été marquées avec du DAPI puis imagées à l’aide d’un microscope à fluorescence (Figure 99F).



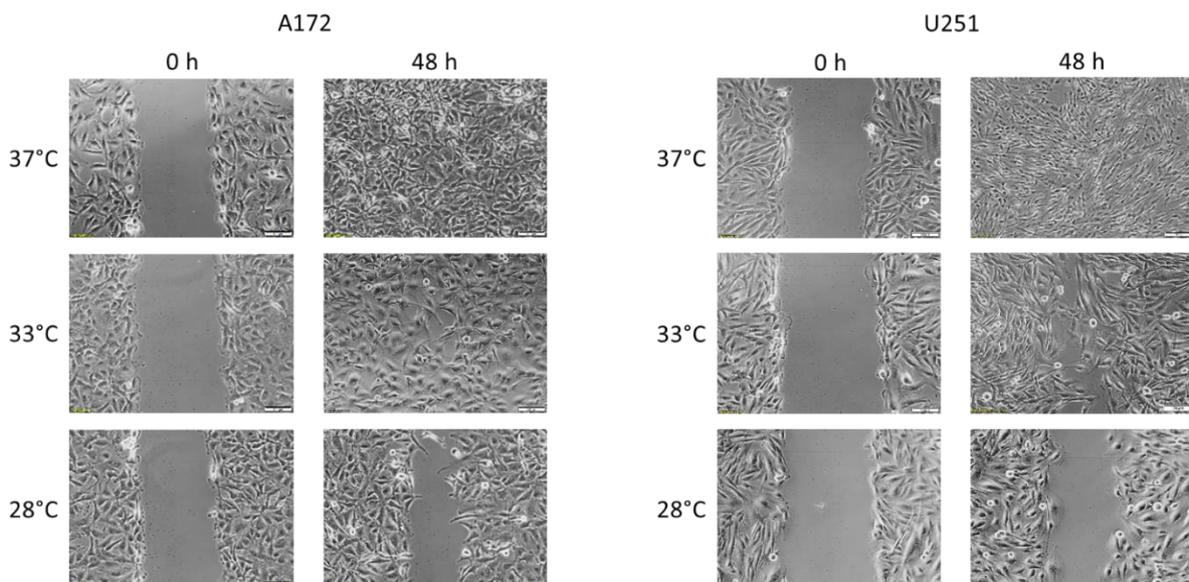
D et E : contraste de phase, F : fluorescence

Figure 99 : Images microscopiques permettant d’illustrer un test de cicatrisation, barre d’échelle : 100µm

Le DAPI permet de mettre en évidence les noyaux et de dénombrer les cellules ayant migré vers la zone lésée. L’ensemble des images de microscopie en contraste de phase et en fluorescence a été réalisé à l’aide d’un microscope Olympus IX81. Dans la suite du document, une image de microscopie représentative de la recolonisation d’une lésion sera présentée, suivi d’une quantification des résultats, avec un minimum de quatre expériences indépendantes pour chaque condition.

◆ Résultats

Nous avons suivi la recolonisation des lésions par microscopie au cours du temps, pour des cellules incubées à 28°C, 33°C et 37°C. Après 48h, les résultats ont montré une recolonisation totale à 37°C, importante à 33°C et faible à 28°C (Figure 100).



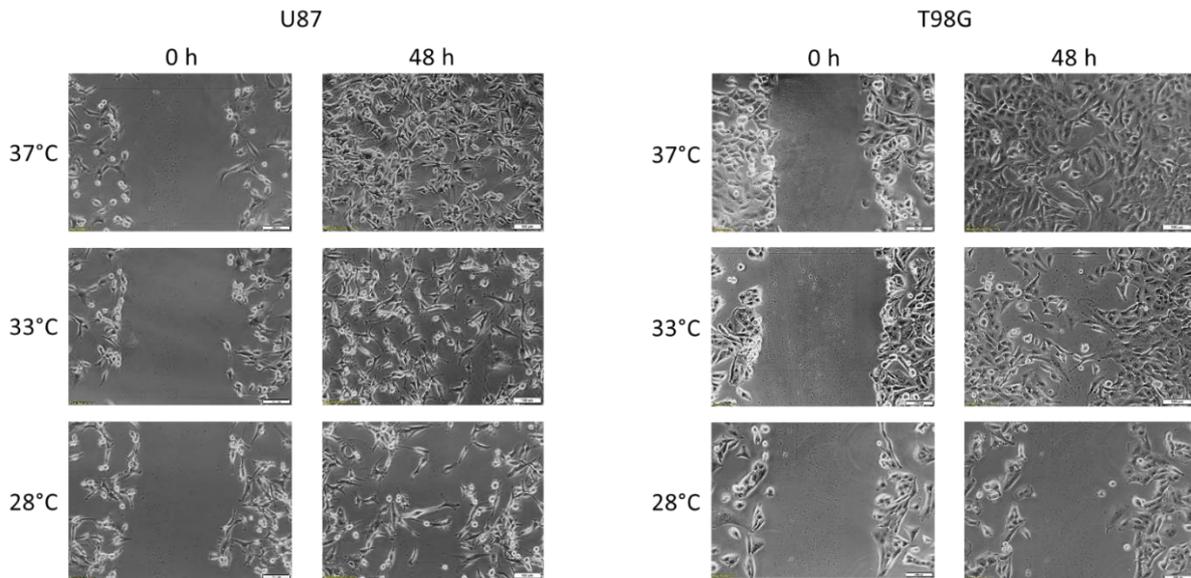
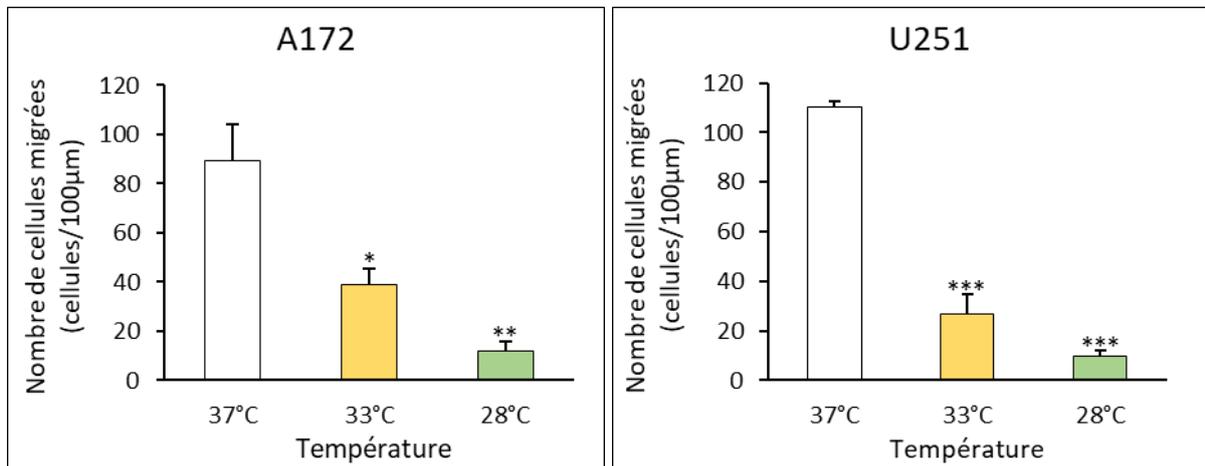


Figure 100 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la recolonisation de lésions, barre d'échelle : 100µm

La quantification des résultats a montré qu’une hypothermie légère (33°C) impactait la migration cellulaire à des degrés divers en fonction des lignées (Figure 101). En effet, elle a induit une inhibition de 56% pour les A172 ($p = 0,022$), 76% pour les U251 ($p < 0,001$), 68% pour les U87 ($p < 0,001$) et 41% pour les T98G ($p = 0,0043$).

L’hypothermie modérée (28°C), quant à elle, a eu des effets similaires sur les quatre lignées cellulaires, avec une inhibition quasi-totale comprise entre 86 et 91% ($p = 0,0029$ pour A172 ; $p < 0,001$ pour U251, U87 et T98G). Ainsi, l’hypothermie induit une inhibition de la migration non-orientée des cellules de glioblastome qui dépend de la température, avec une réduction significative à 33°C et une inhibition quasi-totale à 28°C.



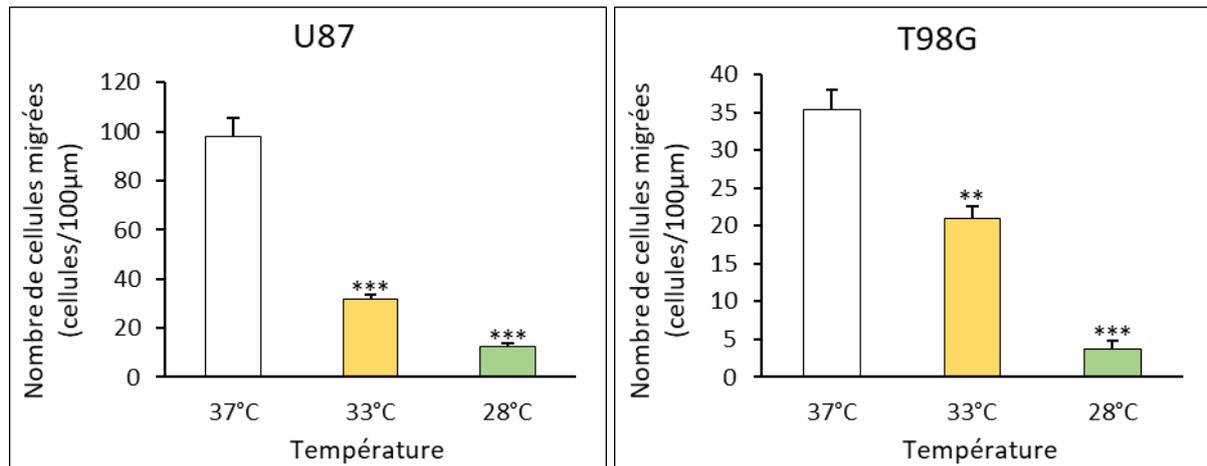


Figure 101 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la migration cellulaire non-orientée

Nous avons démontré ici que l’hypothermie avait des effets inhibiteurs significatifs sur la migration cellulaire non-orientée. Afin d’exclure un potentiel biais lié au blocage de la prolifération par l’hypothermie, nous avons ajouté un inhibiteur de prolifération, la mitomycine C. Les résultats de ces deux expériences seront discutés simultanément dans la suite du document (IV.4.a.iii Discussion).

IV.4.a.ii. Avec la mitomycine C

◆ Protocole

Dans un second temps, des expériences complémentaires ont été effectuées afin de s’affranchir du biais potentiel lié à la prolifération. En effet, nous avons montré précédemment que l’hypothermie inhibait la prolifération des cellules de glioblastome, et voulions nous assurer que les effets observés sur la recolonisation des lésions n’étaient pas uniquement liés à cette inhibition de la prolifération. Pour ce faire, nous avons utilisé un inhibiteur de prolifération, la mitomycine C (Mitomycin C from *Streptomyces Caesпитosus*, M4287, Sigma-Aldrich), comme décrit par l’équipe de Zhang (X. Zhang et al., 2012). Une fois les premières images de la zone lésée effectuées, une solution contenant 1mL de DMEM complet et 2,5µL de mitomycine C par puits a été préparée, avec une concentration finale de 1µg/mL. Le milieu a été remplacé par la solution contenant la mitomycine C, et les plaques ont été entourées d’aluminium pour éviter l’inactivation de la mitomycine C par la lumière.

◆ Résultats

En présence de mitomycine C, la migration cellulaire a fortement diminué pour l’ensemble des lignées, quelle que soit la température de culture. Ce premier résultat indique que la recolonisation d’une lésion est en partie due à la prolifération des cellules situées au voisinage de cette lésion. L’influence de la température observée précédemment a de nouveau été démontrée en présence de mitomycine C, avec un effet inhibiteur plus important à 28°C qu’à 33°C (Figure 102).

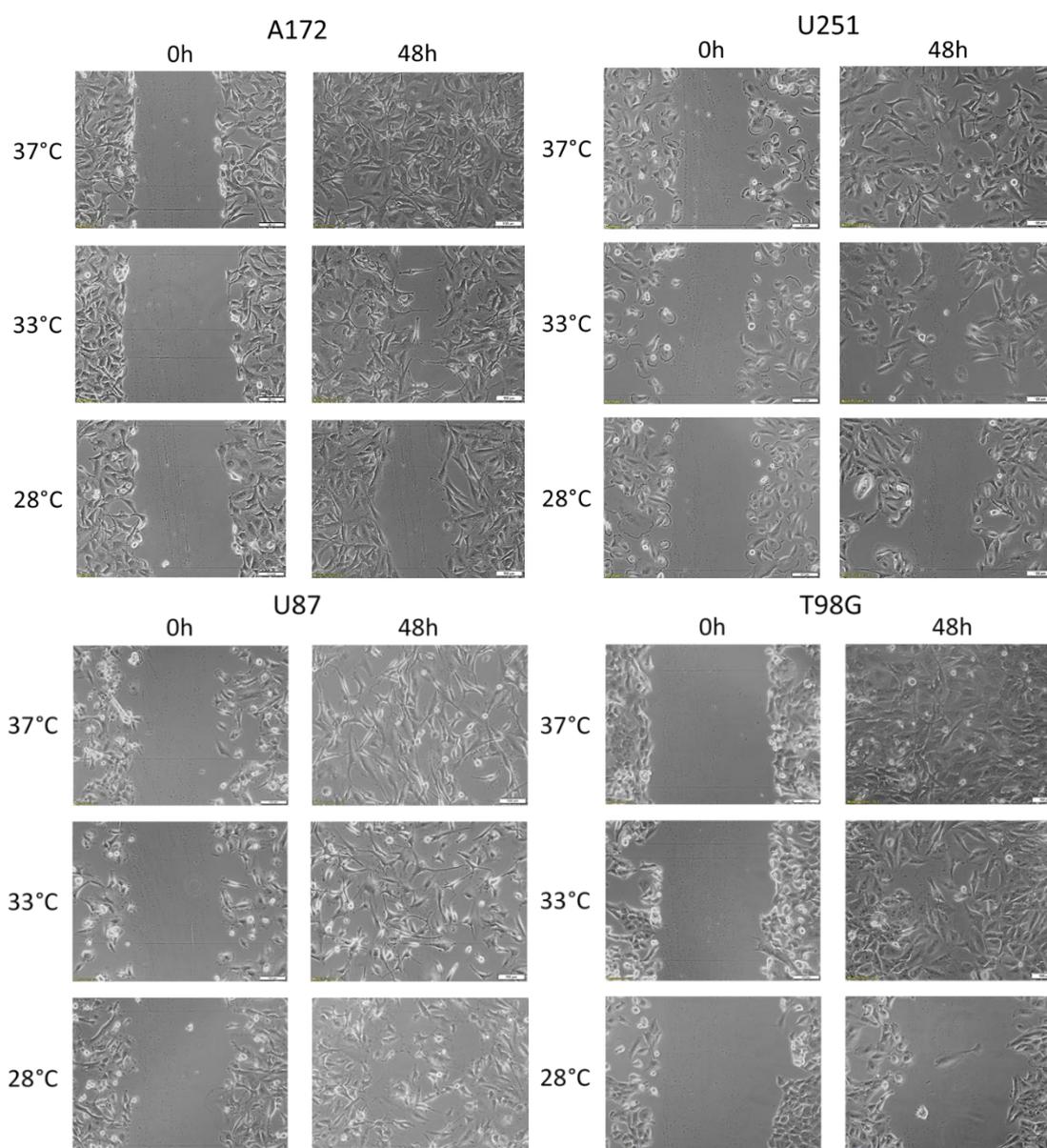


Figure 102 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la recolonisation de lésions en présence de mitomycine C, barre d'échelle : 100µm

La quantification des résultats a montré que les effets inhibiteurs de l'hypothermie sur la migration des cellules étaient amoindris mais toujours présents avec de la mitomycine C (Figure 103). La migration non-orientée des cellules A172 a été faiblement impactée par l'hypothermie, avec une diminution de 4% à 33°C ($p > 0,05$) et de 30% à 28°C ($p > 0,05$). L'hypothermie légère a modérément altéré la migration cellulaire des trois autres lignées, avec une inhibition de 44% pour les U251 ($p > 0,05$), de 29% pour les U87 ($p = 0,015$) et de 45% pour les T98G ($p > 0,05$). L'hypothermie modérée a eu un impact plus important, avec une réduction de 67% pour les U251 ($p = 0,021$), de 55% pour les U87 ($p < 0,001$) et de 79% pour les T98G ($p = 0,0032$). Ainsi, l'hypothermie parvient à inhiber la migration non-orientée des cellules de glioblastome même en présence de mitomycine C, de manière dépendante de la température.

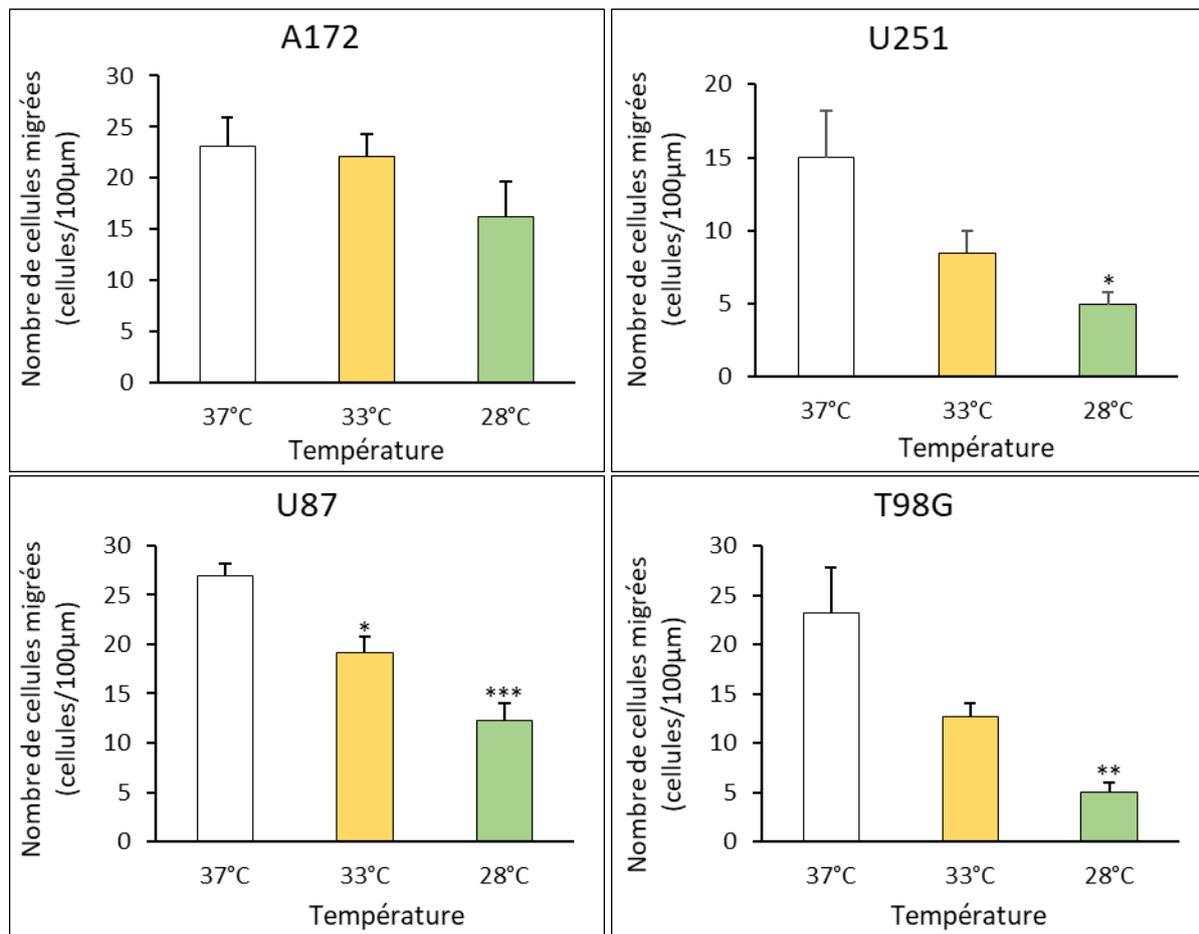


Figure 103 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la migration cellulaire non-orientée en présence de mitomycine C

IV.4.a.iii. Discussion

Nous avons étudié les effets de l'hypothermie sur la migration cellulaire, impliquée dans la progression et la récurrence tumorale, notamment dans l'évasion du contrôle du système immunitaire. L'équipe de Zhang (X. Zhang et al., 2012) a précédemment montré qu'une hypothermie légère de 35°C inhibait la migration non-orientée de cellules de cancer du sein humain (MDA-MB-231) de manière significative, uniquement en l'absence de mitomycine C, grâce à des tests de cicatrisation. En accord avec ces résultats, nous avons démontré que les effets inhibiteurs de l'hypothermie étaient amoindris par l'ajout de mitomycine C. Cependant, nous sommes parvenus à démontrer qu'une hypothermie modérée de 28°C inhibait de manière significative la migration de cellules de glioblastome humain malgré l'ajout de mitomycine C pour trois des lignées testées (U251, U87 et T98G). Pour la lignée A172, nous avons tout de même observé un effet inhibiteur de l'hypothermie, dépendant de la température, avec une réduction de 4% à 33°C et de 30% à 28°C.

Pour ce type d'expériences, la taille de la lésion, l'état de confluence du tapis cellulaire initial et l'état de prolifération des cellules influencent grandement les résultats. Nous avons réalisé des lésions aussi reproductibles que possibles et pris en compte leur largeur dans la quantification des résultats, avec la représentation d'un nombre de cellules par unité de longueur (100µm). Un nombre plus élevé d'expériences aurait probablement pu permettre d'obtenir des résultats plus nets en présence de mitomycine C. En conclusion, nos résultats montrent de réels effets inhibiteurs de l'hypothermie sur la migration non-orientée de cellules de glioblastome humain, partiellement expliqués par une réduction de la prolifération.

IV.4.b. Migration orientée

IV.4.b.i. Méthode

En utilisant des chambres de Boyden, nous avons suivi la migration des cellules de glioblastome à travers une membrane poreuse, permettant d’évaluer leur migration dite « orientée ». Pour cela, une solution contenant 10 000 cellules et 100µL de milieu faible en sérum (2% FBS, 1% glutamax) par puits a été préparée. Pour chaque puits, la suspension cellulaire a été déposée dans un insert de plaque 24-puits possédant des pores de 8µm de diamètre, préalablement humidifié avec du milieu complet afin d’homogénéiser le dépôt. Chaque insert a alors été placé au-dessus d’un puits dans lequel 600µL de milieu complet avaient préalablement été déposés (Figure 104A). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24h, à 37°C ou 28°C, avec 5% de CO₂. Le principe du test repose sur la chimiotaxie, avec une attraction des cellules par le sérum. En effet, c’est le gradient de concentration entre le milieu complet riche en sérum (10%), et la suspension cellulaire faiblement chargée en sérum (2%) qui va faire migrer les cellules à travers la membrane (Figure 104B).

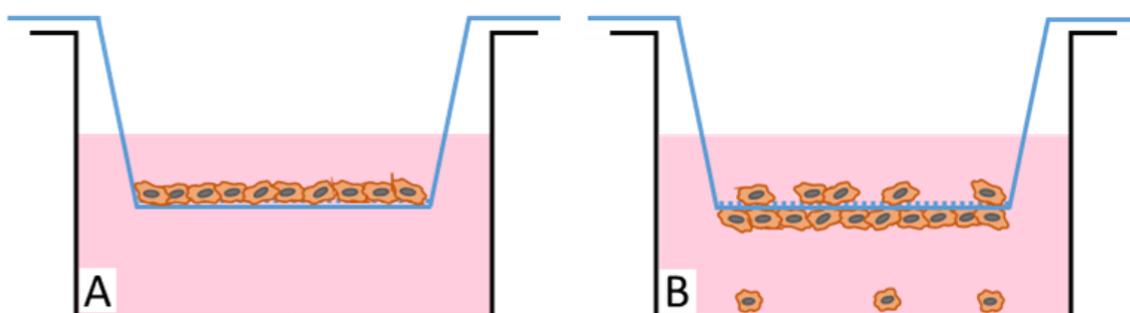


Figure 104 : Schéma de principe du test de migration cellulaire orientée

Après 24h de migration, les cellules n’ayant pas traversé la membrane ont été soigneusement retirées avec un coton-tige, et celles ayant migré ont été fixées et colorées avec de la phalloïdine et du DAPI. La quantification du test a été faite en comptant le nombre de cellules présentes dans cinq champs indépendants pour chaque membrane, grâce aux images obtenue en microscopie à fluorescence (Figure 105).

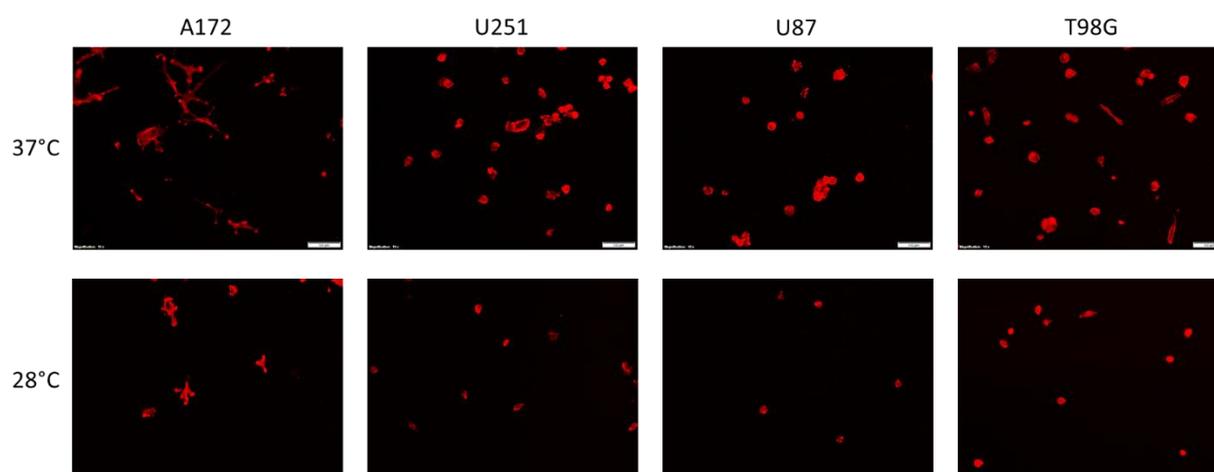


Figure 105 : Influence de l’hypothermie modérée sur la migration des cellules à travers une membrane poreuse, barre d’échelle : 100µm

IV.4.b.ii. Résultats

Les résultats de cette expérience ont montré que l’hypothermie avait un effet inhibiteur sur la migration des cellules à travers une membrane poreuse (Figure 106).

En effet, une hypothermie modérée de 28°C a induit une inhibition de 47% pour les A172 ($p = 0,0012$), de 70% pour les U251 ($p < 0,001$), de 42% pour les U87 ($p = 0,0073$) et de 45% pour les T98G ($p < 0,001$). Ainsi, nous pouvons en conclure qu’une hypothermie de 28°C inhibe la migration des cellules de glioblastome à travers une membrane poreuse.

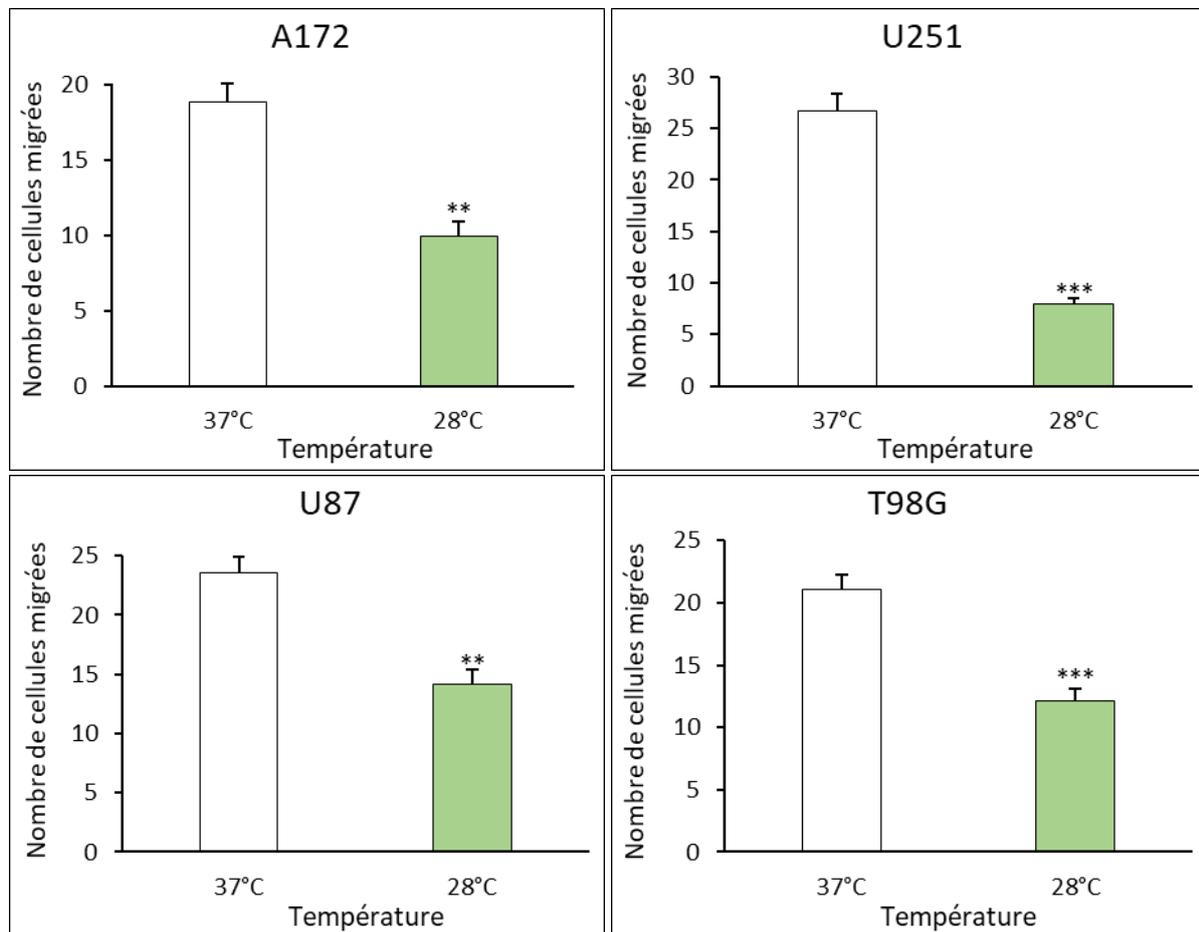


Figure 106 : Influence de l’hypothermie modérée sur la migration cellulaire orientée

IV.4.b.iii. Discussion

Nous avons démontré qu’une hypothermie modérée de 28°C inhibait la migration orientée des cellules de glioblastome à travers une membrane poreuse. Nos résultats sont en accord avec ceux de l’équipe de Zhang (X. Zhang et al., 2012), qui a précédemment rapporté qu’une hypothermie légère de 35°C diminuait de manière significative la migration orientée de cellules humaines provenant de cancer du sein (MDA-MB-231). A notre connaissance, ces données sont les premières montrant une inhibition de la migration orientée de cellules de glioblastome humain par l’hypothermie.

Ces premiers résultats attestent que l’hypothermie modérée induit une inhibition de la croissance tumorale, tant sur les aspects prolifératifs que migratoires. Par la suite, nous avons décidé d’étudier les effets d’un retour à la normothermie sur la prolifération cellulaire, en comparant différents cycles de refroidissement et de réchauffement intermittents. Ces cycles nous permettront à la fois d’explorer la réversibilité des effets de l’hypothermie après un retour à 37°C, et de définir plus précisément de potentielles séquences de traitement, dans le but de préparer de futures études précliniques *in vivo*.

IV.5. Étude de différents cycles d’hypothermie

IV.5.a. Méthode générale

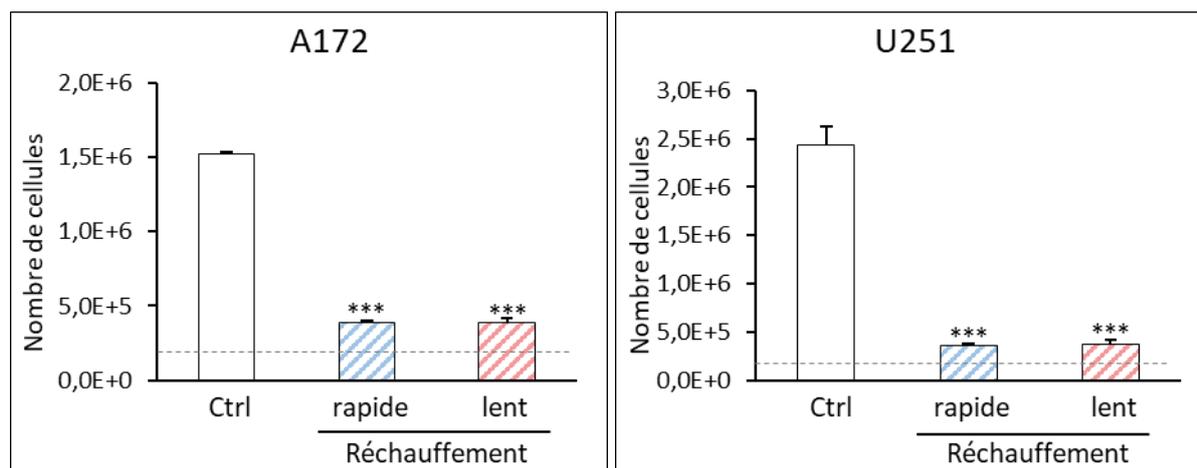
Après avoir observé un blocage total de la prolifération cellulaire à 28°C, nous avons étudié l’impact d’un retour à 37°C – ou réchauffement – après un préconditionnement hypothermique sur la prolifération cellulaire. Dans la suite de ce document, la notion de préconditionnement hypothermique fait référence à la période d’hypothermie précédant un retour à la normothermie, et la notion de réchauffement fait référence au retour à 37°C après ce préconditionnement.

Dans un premier temps, l’objectif de notre étude était de déterminer si un préconditionnement hypothermique pouvait inhiber la prolifération cellulaire malgré un retour à 37°C. Nous avons d’abord comparé deux protocoles de réchauffement : un réchauffement lent consistant à directement déplacer le support de culture d’un environnement hypothermique à un environnement normothermique, et un réchauffement rapide consistant à remplacer le milieu de culture des cellules en hypothermie par un milieu préconditionné à 37°C. Des calculs thermiques ont montré que le réchauffement lent permettait d’atteindre une température homogène du milieu de culture après 2 heures. Nous avons comparé ces deux types de réchauffement sur une séquence de 3 jours à 28°C suivis par 3 jours à 37°C, avec deux répétitions indépendantes pour chaque condition (Figure 107).



Figure 107 : Schéma expérimental d’un réchauffement rapide ou lent

Les résultats de cette expérience préliminaire ont montré que la vitesse de réchauffement n’avait pas d’impact significatif sur la prolifération cellulaire (Figure 108 ; $p > 0,05$ entre les deux vitesses), et sur la viabilité cellulaire (Figure 109 ; $p > 0,05$ pour toutes les lignées) dans nos conditions expérimentales *in vitro*.



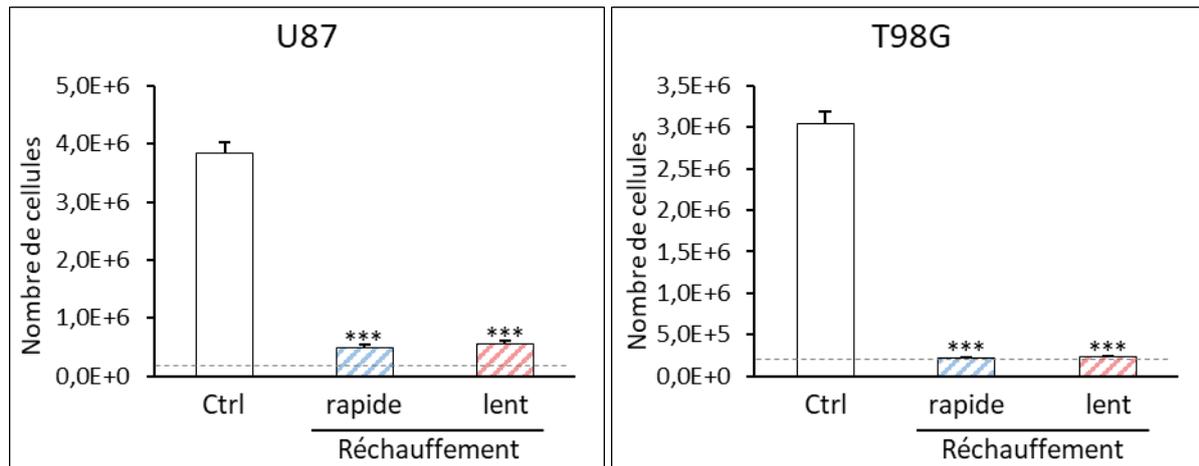


Figure 108 : Influence de deux vitesses de réchauffement sur la prolifération cellulaire

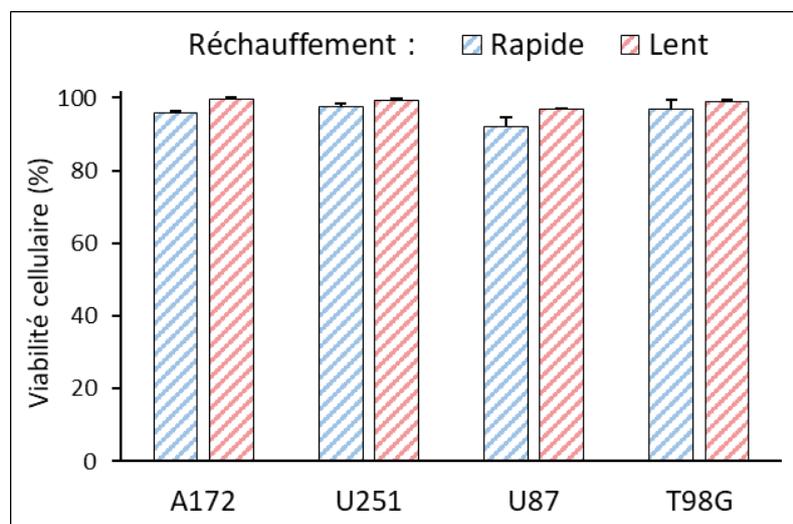


Figure 109 : Influence de deux vitesses de réchauffement sur la viabilité cellulaire

Pour la suite des expériences, nous avons choisi de conserver uniquement le réchauffement lent. Ce choix a été motivé par plusieurs études expérimentales démontrant les effets délétères d’un réchauffement rapide sur le cerveau de rats en comparaison avec un réchauffement plus lent (Matsushita et al., 2001; Suehiro et al., 2003) (Phase de réchauffement). L’objectif de nos tests *in vitro* étant également d’optimiser les paramètres d’administration thérapeutique de l’hypothermie pour une future étude *in vivo*, nous nous sommes placés dans les conditions expérimentales les plus vraisemblables.

Pour la majorité des expériences, le préconditionnement hypothermique a été suivi par une période de 6 jours à 37°C. De plus, en parallèle de chaque condition expérimentale, un contrôle de prolifération en condition normothermique a été réalisé, en laissant les cellules proliférer pendant 6 jours à 37°C (Ctrl). Ce contrôle de prolifération a pour objectif de normaliser les expériences et de pouvoir les comparer entre elles. De plus, la prolifération étant arrêtée à 28 et 23°C, le nombre de cellules présentes à la fin du préconditionnement hypothermique correspond sensiblement au nombre de cellules initialementensemencées, permettant de comparer directement le contrôle de prolifération avec la prolifération post-réchauffement.

Tout au long de cette partie, les résultats présentés correspondent au nombre de cellules comptées après l’ensemble de l’expérience, c’est-à-dire après une mise en culture en hypothermie modérée ou sévère suivie par 6 jours à 37°C. Par souci de lisibilité, la période de réchauffement à 37°C n’a pas été indiquée dans les légendes des graphes, mais elle est incluse dans la notion de préconditionnement.

Ainsi, la légende « préconditionnement de 3 jours à 28°C » correspond au nombre de cellules comptées à la fin des 9 jours : 3 jours à 28°C suivis par 6 jours à 37°C.

IV.5.b. Température du préconditionnement hypothermique

IV.5.b.i. Plan d’expériences

Nous avons précédemment démontré qu’une hypothermie de 28°C induisait un arrêt total et durable de la prolifération cellulaire lorsqu’elle était maintenue tout au long du processus (IV.2.c Évolution des effets de l’hypothermie au cours du temps). Cependant, nous n’étions pas certains qu’une hypothermie modérée serait suffisante pour impacter la croissance cellulaire après un retour à 37°C. Nous avons donc choisi d’étudier l’influence de la température du préconditionnement hypothermique sur la reprise de la prolifération à 37°C. Pour cela, nous avons comparé les effets d’un préconditionnement hypothermique modéré (28°C) avec ceux d’un préconditionnement hypothermique sévère (23°C). Nous avons alors mis des cellules de glioblastome en culture pendant 3 jours à 28 ou 23°C, puis les avons transférées à 37°C pour une durée de 6 jours (Figure 110A). Nous avons également répété les expériences avec un préconditionnement hypothermique de 6 jours (Figure 110B).

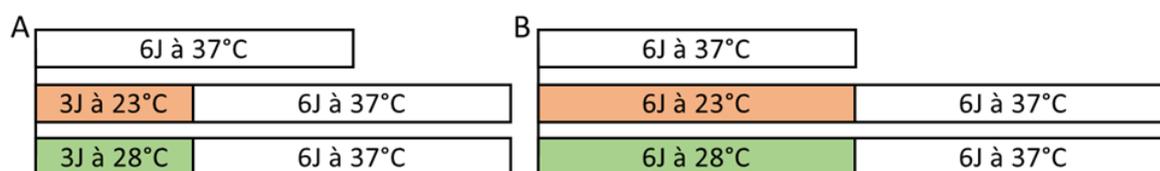


Figure 110 : Schéma expérimental – Préconditionnement hypothermique sévère et modéré de 3 jours (A) et 6 jours (B)

IV.5.b.ii. Résultats

Un préconditionnement hypothermique de 3 jours a été suffisant pour induire une inhibition significative de la prolifération des quatre lignées cellulaires après 6 jours à 37°C, qu’il soit modéré ou sévère (Figure 111). Nous avons ainsi montré que les effets de l’hypothermie ne se limitaient pas au conditionnement direct, et qu’ils n’étaient pas totalement réversibles. Après un préconditionnement hypothermique sévère de 3 jours suivi par 6 jours à 37°C, la prolifération des cellules de glioblastome a été inhibée de 56% pour les A172 ($p < 0,001$), 29% pour les U251 ($p = 0,0016$), 48% pour les U87 ($p < 0,001$) et 50% pour les T98G ($p < 0,001$). Pour un préconditionnement hypothermique modéré, l’inhibition de la prolifération a été comprise entre 42 et 48% en fonction des lignées ($p < 0,001$ pour toutes les lignées). Pour les lignées A172, U87 et T98G, la température du préconditionnement hypothermique de 3 jours n’a pas induit de différence significative sur la prolifération cellulaire ($p > 0,05$). Pour la lignée U251, le préconditionnement sévère a eu des effets inhibiteurs légèrement moins importants que ceux du préconditionnement modéré ($p = 0,030$).

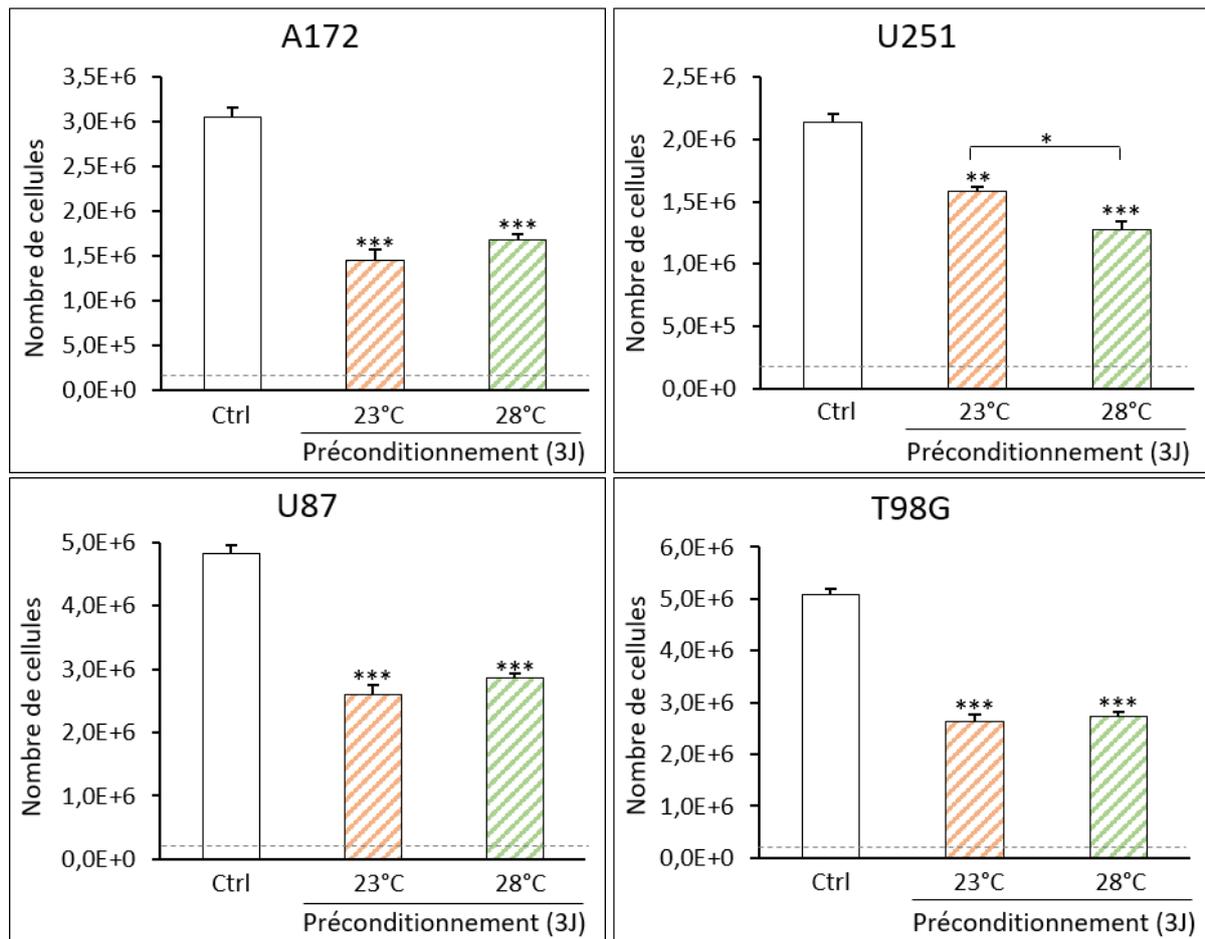


Figure 111 : Influence de la température d'un préconditionnement hypothermique de 3 jours sur la prolifération cellulaire

Pour les quatre lignées, la température du préconditionnement hypothermique de 3 jours n'a pas modifié la viabilité cellulaire (Figure 112 ; $p > 0,05$).

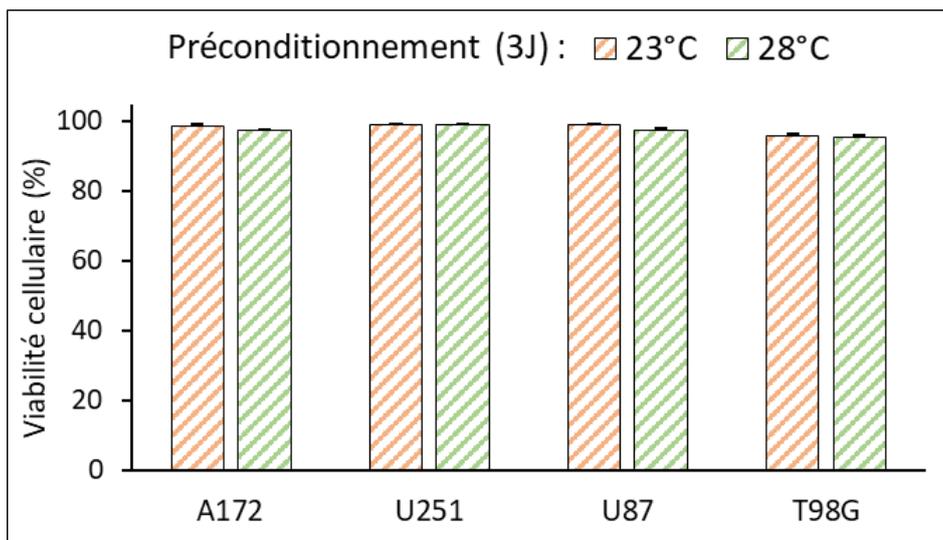


Figure 112 : Influence de la température d'un préconditionnement hypothermique de 3 jours sur la viabilité cellulaire

Après un préconditionnement de 6 jours, la prolifération des cellules de glioblastome a été inhibée de manière sensiblement plus importante qu’après 3 jours (Figure 113). En effet, le préconditionnement hypothermique sévère a réduit la prolifération cellulaire de 93% pour les A172, 62% pour les U251, 64% pour les U87 et 71% pour les T98G, tandis que le préconditionnement hypothermique modéré a induit une diminution de 81% pour les A172 et les U251, 65% pour les U87 et 71% pour les T98G ($p < 0,001$ pour toutes les lignées). Pour la lignée A172, le préconditionnement sévère a eu des effets inhibiteurs légèrement plus importants ($p = 0,015$), tandis que pour la lignée U251, le préconditionnement modéré a eu des effets inhibiteurs plus importants ($p = 0,0065$). Pour les lignées U87 et T98G, la température du préconditionnement n’a pas induit de différence significative sur la prolifération cellulaire ($p > 0,05$).

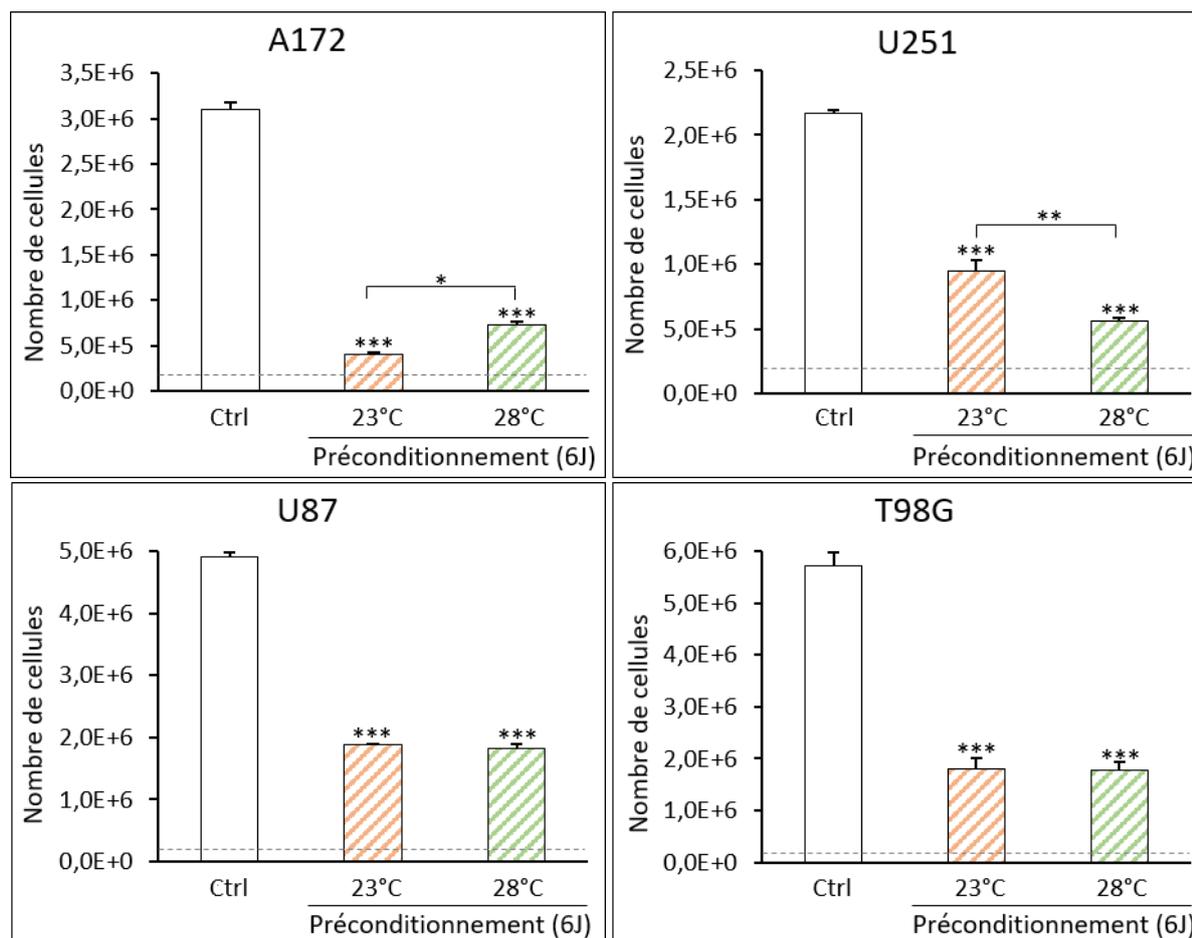


Figure 113 : Influence de la température d’un préconditionnement hypothermique de 6 jours sur la prolifération cellulaire

Concernant les effets du niveau de préconditionnement hypothermique sur la viabilité cellulaire, le préconditionnement sévère a induit une légère diminution de la viabilité pour la lignée A172 (Figure 114 ; $p = 0,019$), alors que la température n’a pas eu d’influence significative pour les lignées U251, U87 et T98G ($p > 0,05$).

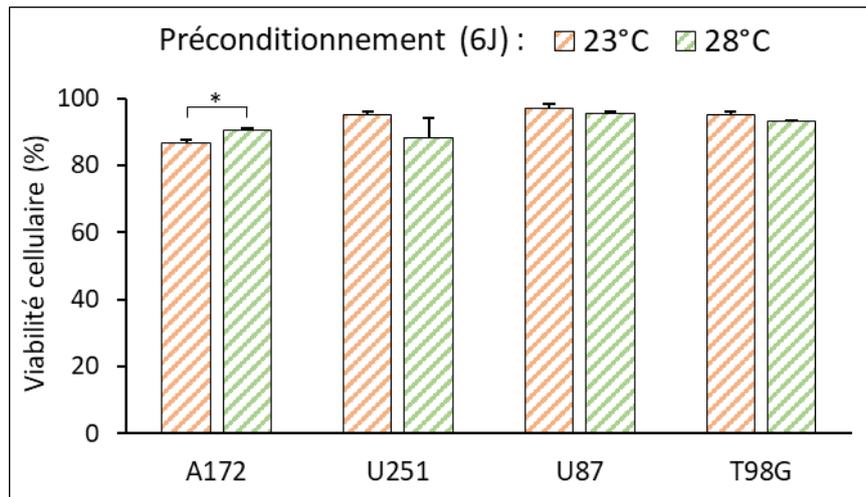


Figure 114 : Influence de la température d'un préconditionnement hypothermique de 6 jours sur la viabilité cellulaire

IV.5.b.iii. Discussion

Ainsi, nous avons montré qu'un préconditionnement hypothermique sévère (23°C) avait des effets inhibiteurs sur la prolifération cellulaire similaires au préconditionnement modéré (28°C). Ce résultat peut être expliqué par un plus grand choc thermique lors du retour à 37°C après un préconditionnement sévère, entraînant un pic oxydatif qui pourrait accélérer la prolifération cellulaire. Ces données suggèrent que l'abaissement de la température en dessous de 28°C n'est pas nécessaire pour affecter la prolifération cellulaire après le retour à la normothermie. Ce résultat est particulièrement important pour une future application *in vivo* voire clinique, puisque l'abaissement de la température augmente les contraintes techniques d'un dispositif de refroidissement ainsi que les potentiels effets indésirables. Par la suite, nous avons donc orienté le reste des expériences sur un préconditionnement hypothermique modéré de 28°C.

De plus, nous avons montré que les effets de l'hypothermie étaient prolongés au-delà du préconditionnement hypothermique, avec une inhibition persistante après 6 jours à 37°C. Les effets inhibiteurs de l'hypothermie se sont montrés plus importants après 6 jours qu'après 3 jours pour l'ensemble des lignées, suggérant une influence de la durée du préconditionnement hypothermique sur la reprise de la prolifération. Nous avons alors décidé d'approfondir ce résultat en prolongeant le préconditionnement hypothermique modéré jusqu'à 30 jours.

IV.5.c. Durée du préconditionnement hypothermique

IV.5.c.i. Plan d'expériences

Par la suite, nous avons étudié l'influence de la durée d'un préconditionnement hypothermique de 28°C sur la prolifération des cellules de glioblastome. Pour ce faire, les cellules ont été mises en culture à 28°C pendant 3, 6, 9, 12 et 30 jours, puis placées à 37°C pendant 6 jours à 37°C (Figure 115).

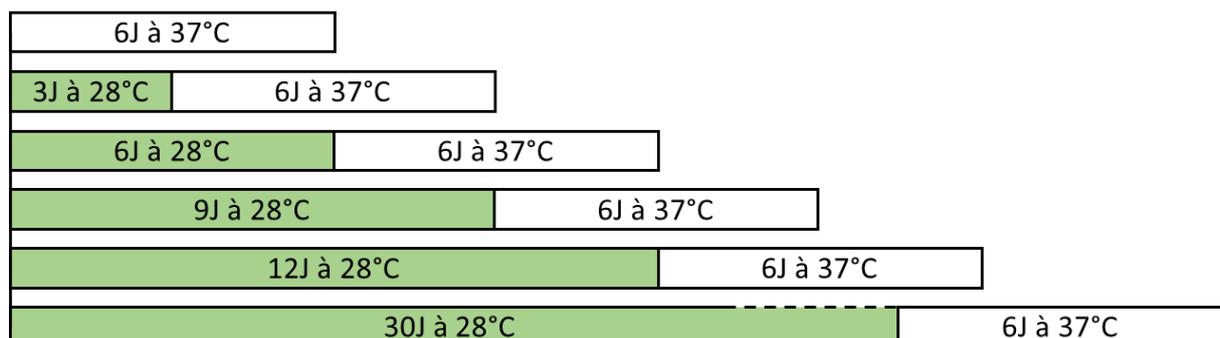


Figure 115 : Schéma expérimental – Durée du préconditionnement hypothermique à 28°C

IV.5.c.ii. Résultats

Après avoir montré qu’un préconditionnement hypothermique de 3 jours à 28°C était capable d’inhiber la prolifération des cellules de glioblastome malgré un retour à 37°C, nous avons prolongé sa durée jusqu’à 30 jours (Figure 116). Nous avons alors montré qu’un préconditionnement hypothermique modéré inhibait la prolifération des quatre lignées cellulaires de manière significative ($p < 0,001$), avec un effet dépendant de la durée. Tout d’abord, le préconditionnement hypothermique a induit une inhibition modérée après 3 jours, de 35 à 54% selon les lignées cellulaires, en accord avec l’expérience précédente (IV.5.b Température du préconditionnement hypothermique). Ensuite, pour les cellules A172, U251 et U87, le préconditionnement hypothermique a induit une inhibition de plus de 80% après 6 jours, 90% après 9 jours et 95% après 12 jours. Pour les cellules T98G, l’inhibition induite par l’hypothermie était de 69 % après 6 jours, 80 % après 9 jours et 89 % après 12 jours. Pour les quatre lignées cellulaires, un préconditionnement de 30 jours a induit une inhibition totale de la prolifération cellulaire, avec un nombre de cellules inférieur à celui de l’ensemencement initial, malgré un retour à 37°C pendant 6 jours.

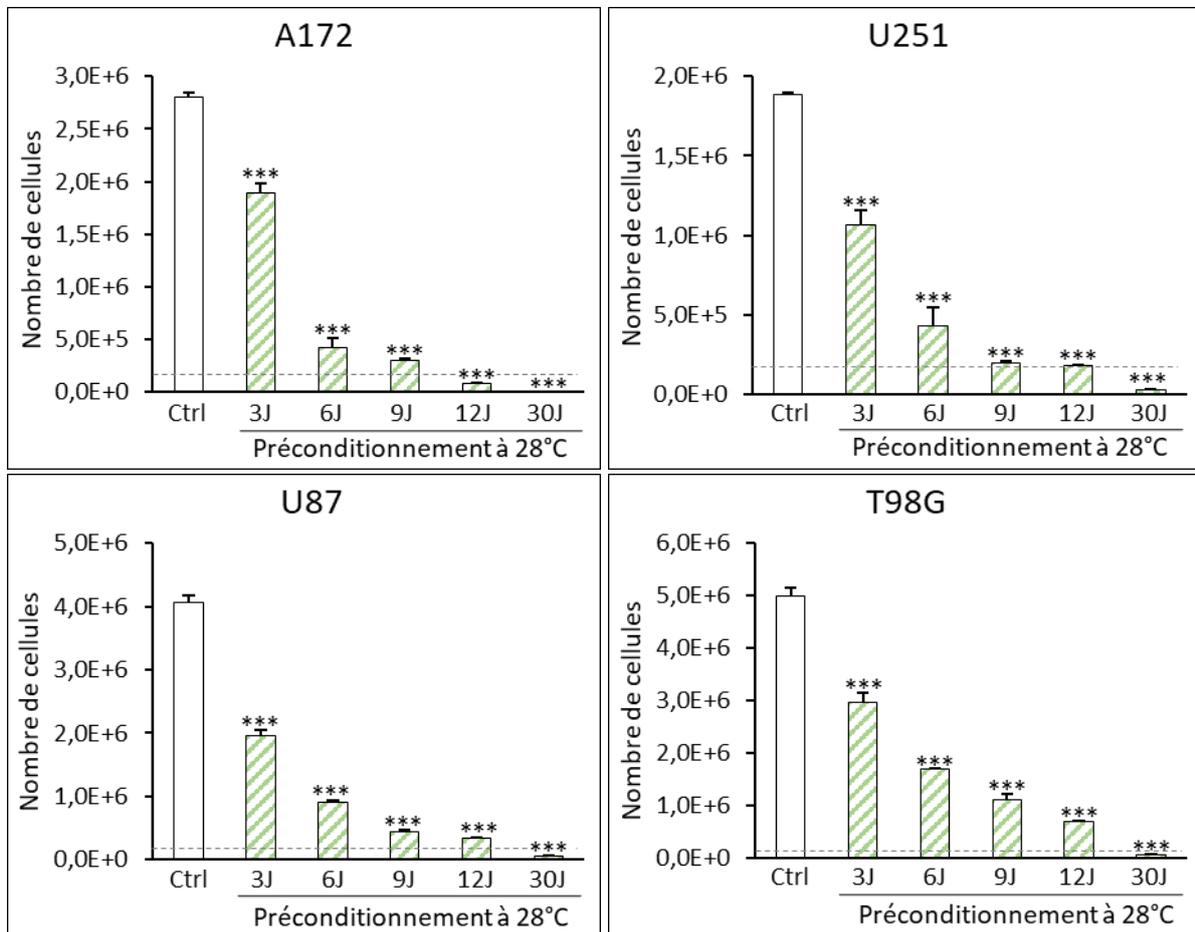


Figure 116 : Influence de la durée d’un préconditionnement hypothermique de 28°C sur la prolifération cellulaire

Nous avons également étudié l’impact d’un tel conditionnement sur la viabilité cellulaire (Figure 117). Pour la lignée A172, la viabilité cellulaire a été très fortement impactée par une hypothermie prolongée, avec une réduction de 69% après 12 jours ($p < 0,001$) et 96% après 30 jours ($p < 0,001$). Pour les lignées U251 et T98G, la viabilité cellulaire a été fortement impactée par la durée du préconditionnement hypothermique, avec une diminution de respectivement 25 et 15% après 12 jours ($p < 0,001$) et 78 et 83% après 30 jours ($p < 0,001$).

Enfin, pour la lignée U87, la viabilité cellulaire a été diminuée de 17% après 6 jours de préconditionnement ($p = 0,026$), de 18% après 9 jours ($p = 0,014$), de 14% après 12 jours ($p > 0,05$) et de 49% après 30 jours ($p < 0,001$).

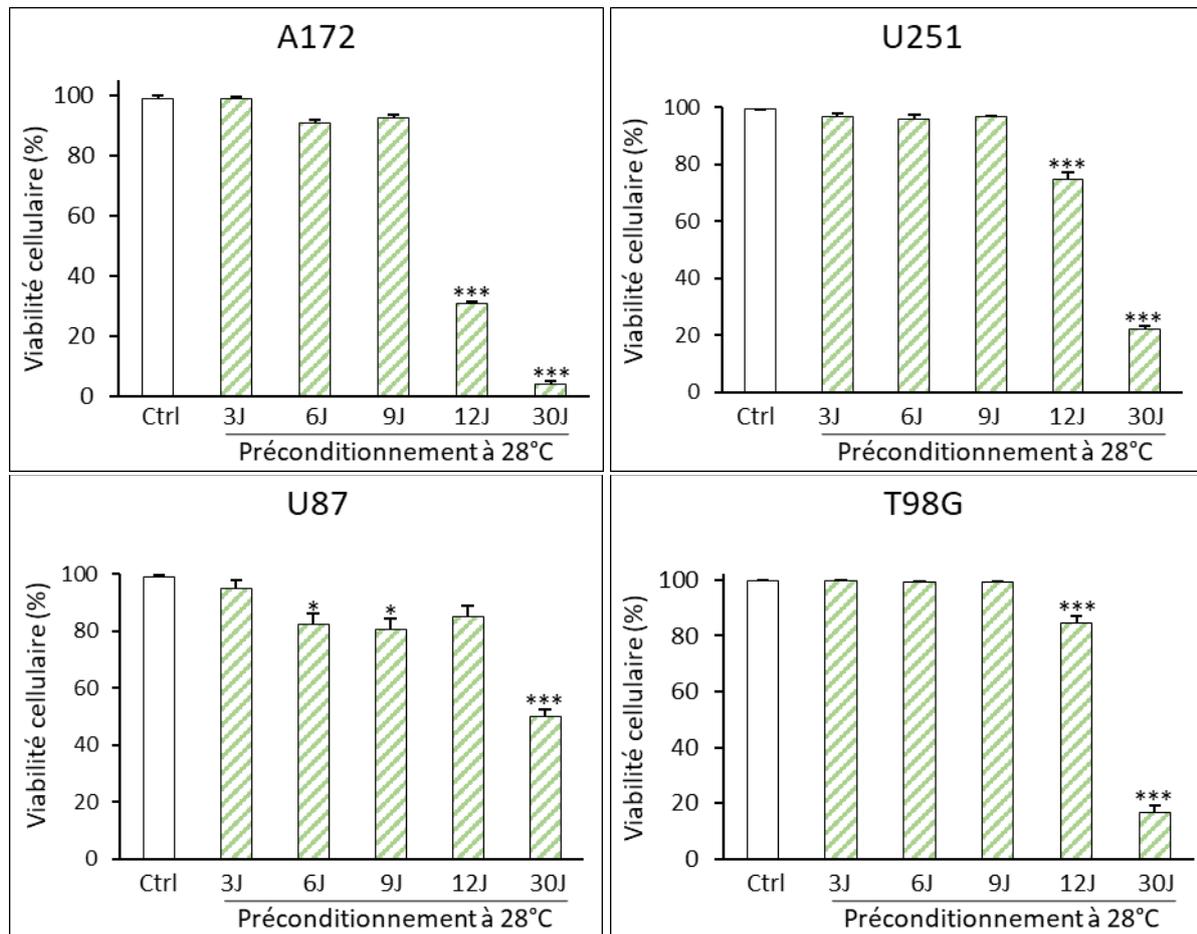


Figure 117 : Influence de la durée d'un préconditionnement hypothermique de 28°C sur la viabilité cellulaire

IV.5.c.iii. Discussion

Nous avons démontré que les effets inhibiteurs du préconditionnement hypothermique dépendaient directement de sa durée, avec un arrêt total de la prolifération ainsi qu'une diminution de la viabilité cellulaire après 30 jours à 28°C. L'équipe de Neutelings (Neutelings et al., 2013) a précédemment étudié les effets d'un préconditionnement hypothermique sévère de 5 jours à 25°C suivi de plusieurs heures à 37°C sur la prolifération de cellules d'ostéosarcome humain (MG-63). D'après leurs résultats, le réchauffement a davantage affecté les cellules que l'hypothermie elle-même, avec une augmentation progressive de l'apoptose et de la mort cellulaire après le retour à 37°C. Le réchauffement a également induit des espèces réactives de l'oxygène et des dommages de l'ADN, qui pourraient être expliqués par un pic oxydatif. Nos résultats confirment partiellement ceux de l'équipe de Neutelings, puisque nous avons effectivement observé une augmentation significative de la mort cellulaire due au réchauffement après un préconditionnement hypothermique de 12 jours, pour les quatre lignées cellulaires. Cependant, nous n'avons pas observé de différence significative entre une hypothermie de 30 jours à 28°C avec et sans réchauffement, probablement en raison d'une mort cellulaire déjà élevée après l'hypothermie prolongée.

Nous avons ensuite voulu vérifier que la prolifération cellulaire était bel et bien arrêtée par un préconditionnement hypothermique prolongé à 28°C, et avons alors prolongé la période de réchauffement.

IV.5.d. Reprise de la prolifération après 30 jours d’hypothermie

IV.5.d.i. Plan d’expériences

Pour étudier une potentielle reprise de la prolifération après une hypothermie modérée de 30 jours, différentes durées de réchauffement ont été testées, allant de 6 à 20 jours (Figure 118).

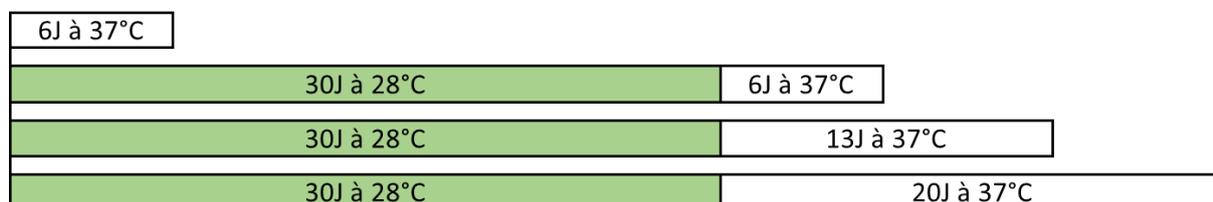
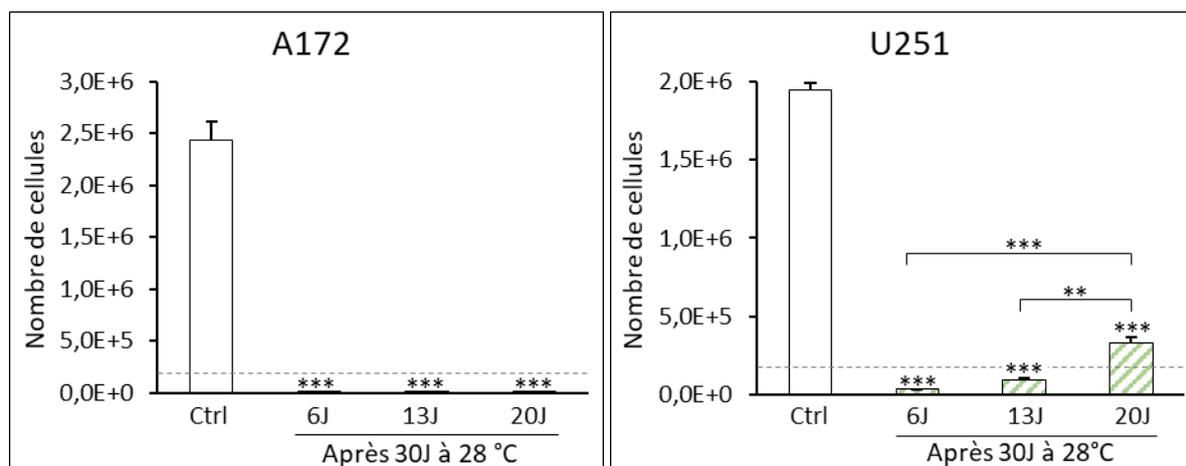


Figure 118 : Schéma expérimental – Reprise de la prolifération après 30 jours à 28°C

Un suivi des cellules a été effectué par microscopie (Olympus CKX41), et des photos ont été réalisées à l’aide d’une caméra numérique (Olympus DP22) à la fin du préconditionnement hypothermique, puis 6 et 13 jours après le retour à 37°C. De plus, les cellules ont été colorées avec de la phalloïdine TRITC et du DAPI après 30 jours à 28°C suivi de 13 et 20 jours à 37°C.

IV.5.d.ii. Résultats

Nous avons complété les résultats précédents en prolongeant la période normothermique de 6 à 20 jours après un préconditionnement hypothermique modéré de 30 jours. Nous avons démontré que les effets d’une hypothermie prolongée de 30 jours à 28°C étaient durables dans le temps, avec une prolifération toujours inhibée de manière significative au bout de 20 jours à 37°C par rapport au contrôle de pousse (Figure 119 ; $p < 0,001$ pour toutes les lignées). Les cellules A172 n’ont pas repris leur prolifération au bout des 20 jours ($p > 0,05$ vs 6 jours). Au contraire, les cellules U251, U87 et T98G ont progressivement repris leur prolifération après le retour à 37°C. Le nombre de cellules ensemencées au début de l’expérience est resté supérieur au nombre de cellules présentes après 13 jours, mais a été dépassé après 20 jours ($p < 0,001$ vs 6 jours).



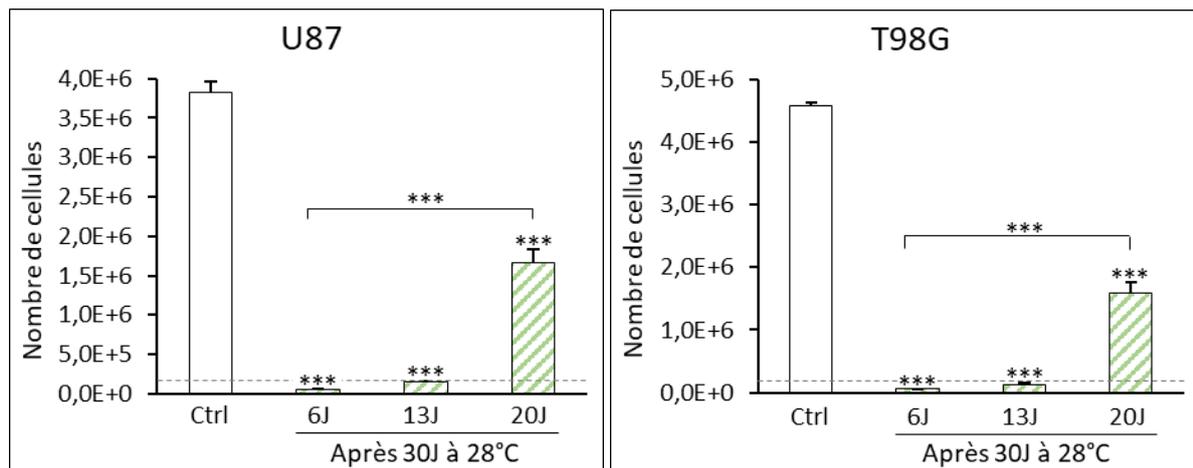
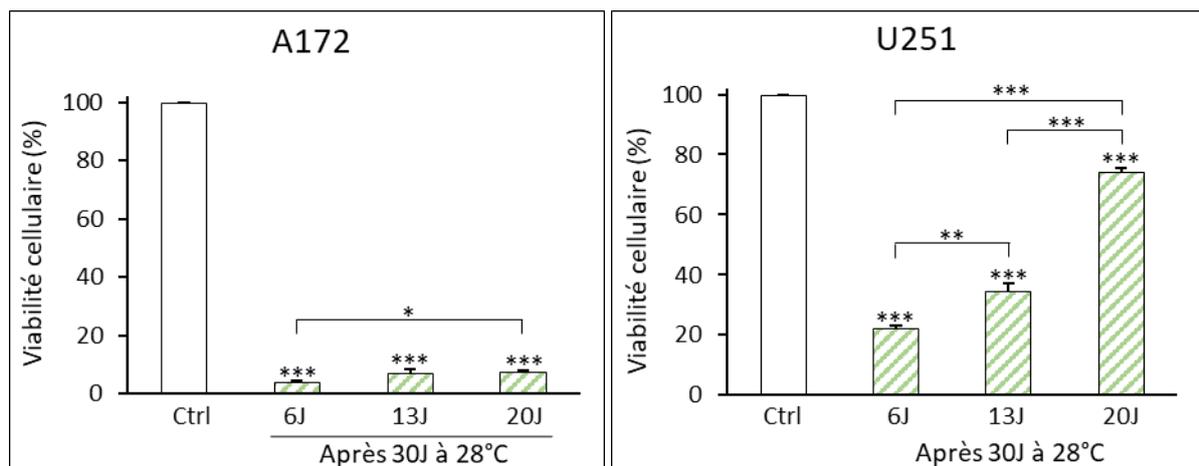


Figure 119 : Reprise de la prolifération cellulaire après un préconditionnement de 30 jours à 28°C

Nous avons également montré que la viabilité cellulaire évoluait avec la durée du réchauffement (Figure 120). Pour les lignées A172 et U251, la viabilité est restée fortement altérée par le préconditionnement hypothermique prolongé, quelle que soit la durée du réchauffement ($p < 0,001$). Cependant, elle s’est améliorée au fil des jours à 37°C, avec une augmentation significative entre 6 et 20 jours pour la lignée A172 ($p = 0,038$). Pour la lignée U251, la viabilité cellulaire est passée de 22% après 6 jours à 35% après 13 jours ($p = 0,0020$) et à 74% après 20 jours ($p < 0,001$ vs 13 et 6 jours). Pour les lignées U87 et T98G, l’altération de la viabilité a progressivement diminué après le retour à 37°C, avec une altération très forte après 6 jours ($p < 0,001$), forte après 13 jours ($p = 0,0012$ et $p < 0,001$, respectivement) et très faible au bout de 20 jours ($p > 0,05$). Pour la lignée U87, la viabilité cellulaire est passée de 50% après 6 jours à 70% après 13 jours ($p = 0,014$) et à 86% après 20 jours ($p = 0,041$ vs 13 jours et $p < 0,001$ vs 6 jours). Enfin, pour la lignée T98G, la viabilité cellulaire est passée de 17% après 6 jours à 45% après 13 jours ($p < 0,001$) et a atteint 93% après 20 jours ($p < 0,001$ vs 13 et 6 jours). Ainsi, pour ces trois lignées cellulaires, bien que la reprise de la prolifération n’ait été observable qu’à partir de 20 jours à 37°C, il semblerait que les cellules sortent de leur état de dormance et progressent à nouveau dans les phases du cycle quelques jours seulement après le réchauffement.



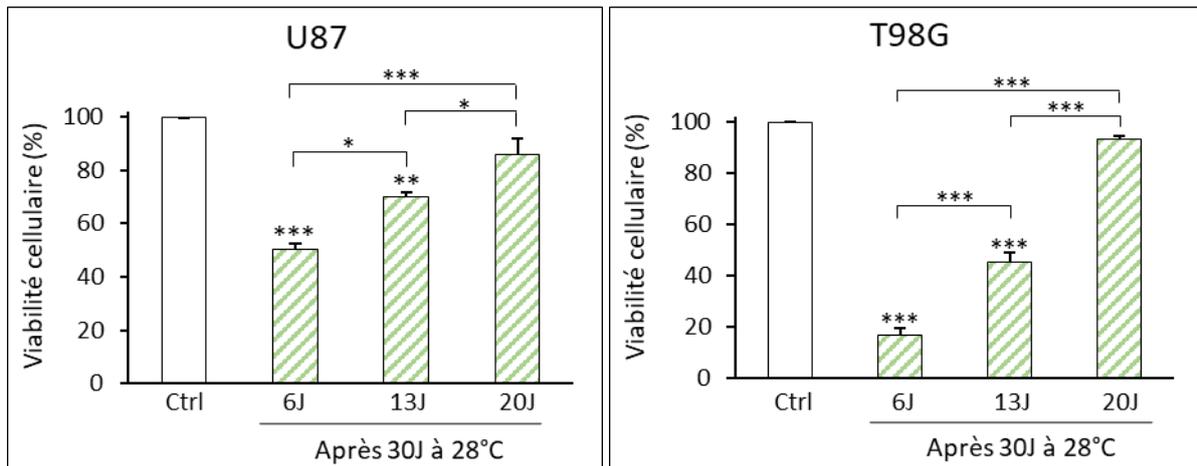


Figure 120 : Évolution de la viabilité cellulaire au fil des jours à 37°C après 30 jours à 28°C

Enfin, nous avons suivi la reprise de la prolifération par microscopie et observé de nombreuses altérations morphologiques, de plus en plus prononcées au fil du temps (Figure 121). L’observation des cellules pendant la culture a montré un grand nombre de cellules flottantes sans cellules adhérentes pour les cellules A172. Pour les cellules U251 et T98G, le nombre de cellules adhérentes a commencé à augmenter après 13 jours à 37°C, avec certains regroupements cellulaires. Enfin, l’adhérence des cellules U87 a été moins affectée par l’hypothermie, avec un grand nombre de cellules adhérentes au cours de l’expérience, parvenant à établir des connexions intercellulaires.

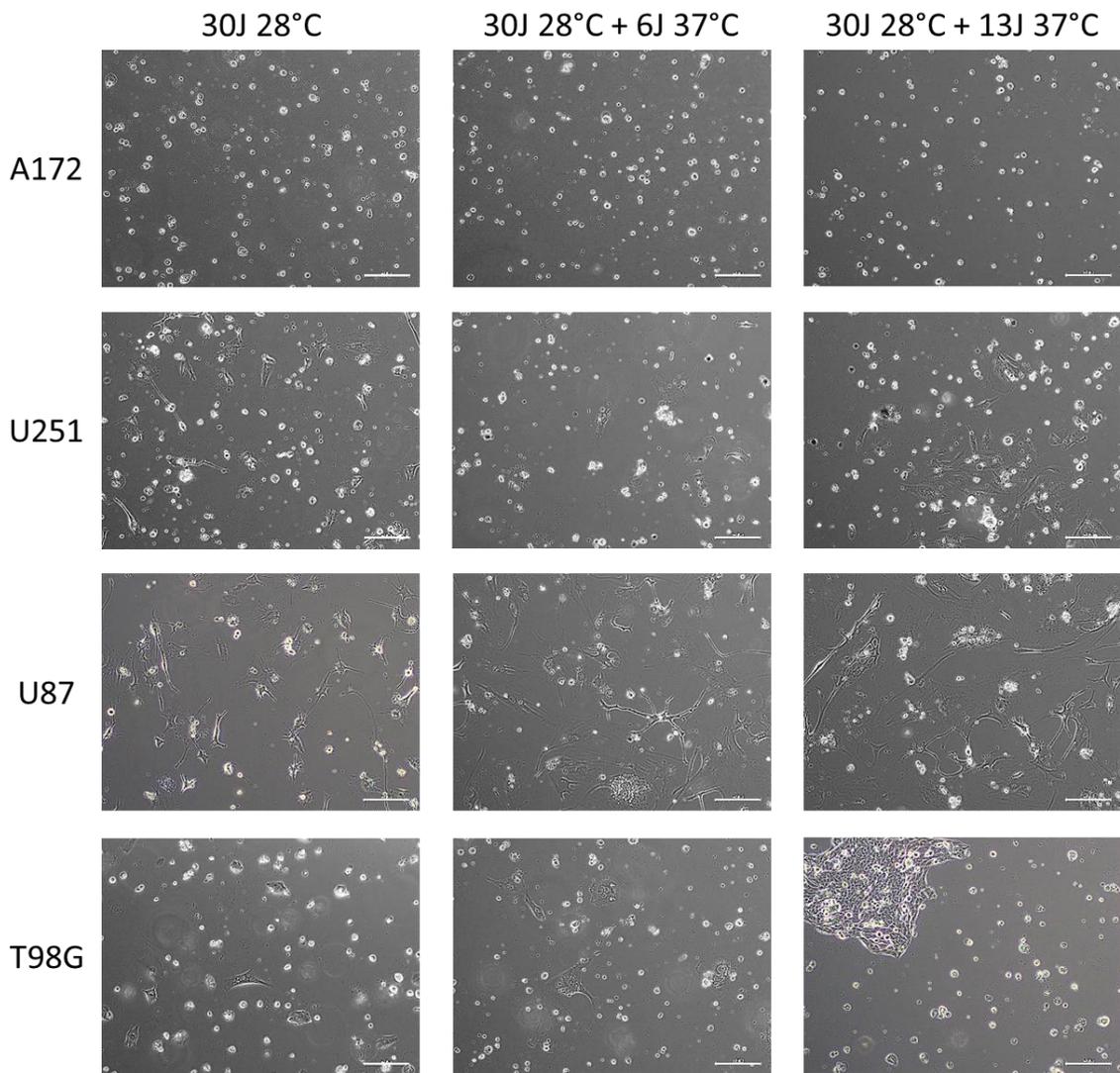


Figure 121 : Observations en microscopie après 30 jours à 28°C , barre d'échelle : 200µm

De nouvelles images de microscopie effectuées avec un grossissement plus élevé nous ont permis de mieux observer ces altérations après 8 jours à 37°C, avec une nette dégradation de l'intégrité nucléaire et membranaire (Figure 122).

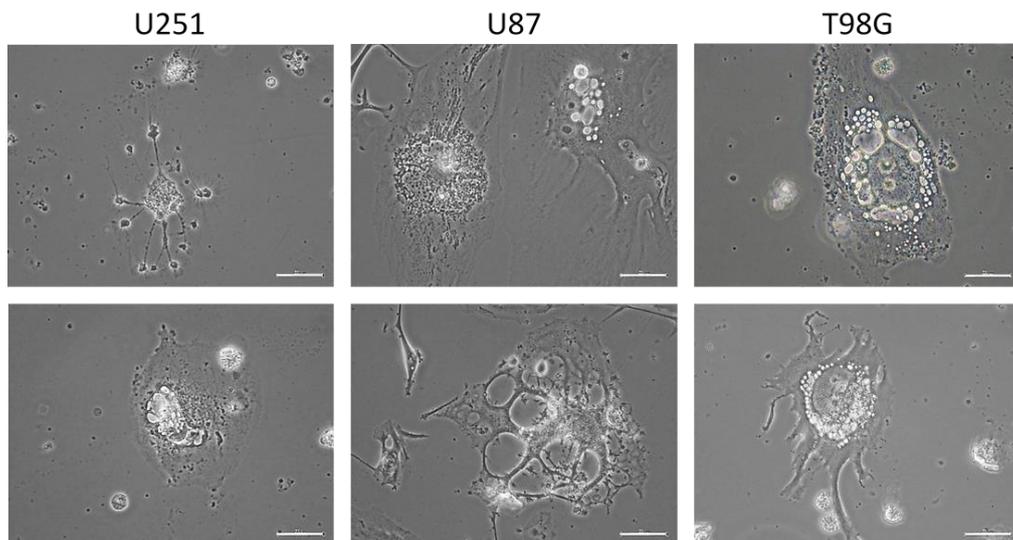
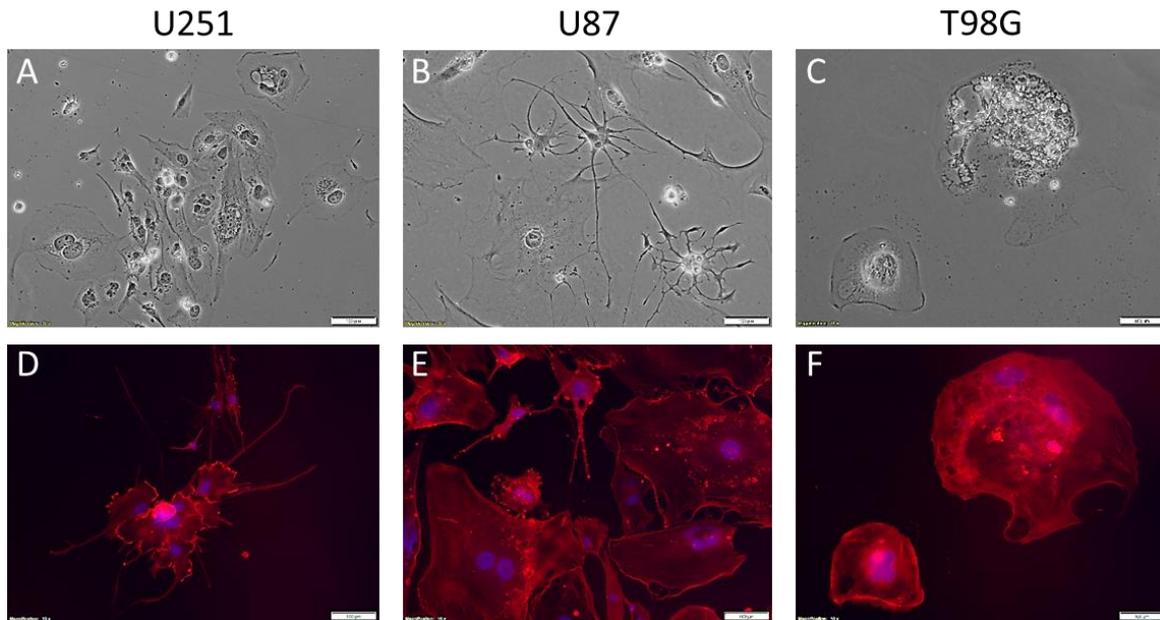


Figure 122 : Observations en microscopie après 30J à 28°C suivis de 8J à 37°C , barre d'échelle : 50µm

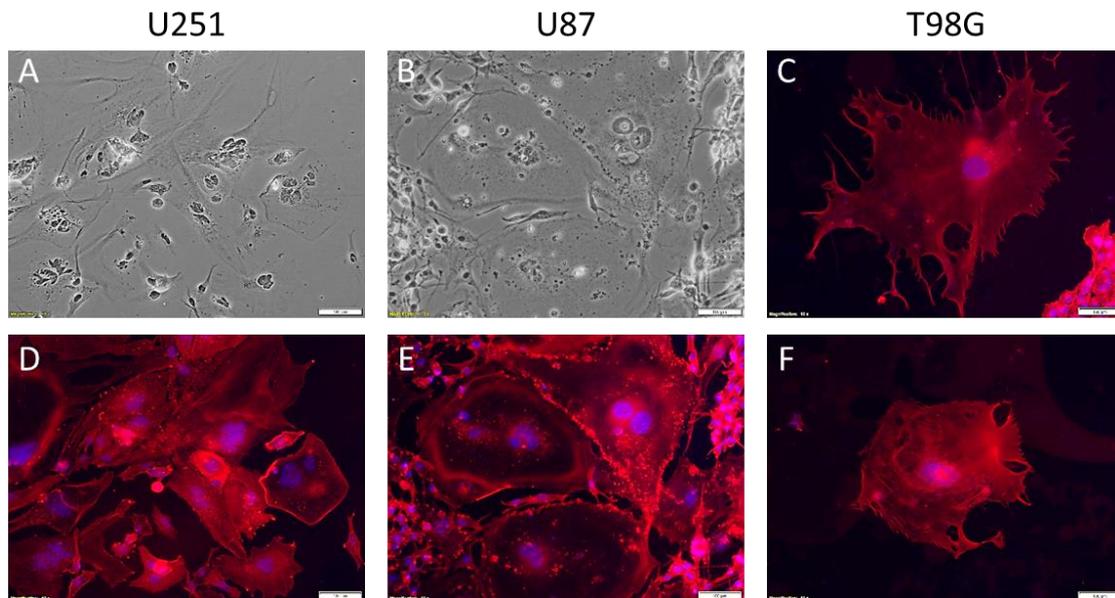
Nous avons également effectué une fixation puis une coloration morphologique des cellules après 13 et 20 jours à 37°C (Figure 123). Ces analyses n’ont pas permis d’obtenir des images exploitables pour les cellules A172 en raison du très faible nombre de cellules adhérentes. Pour chaque condition, les deux images les plus représentatives des altérations morphologiques observées ont été choisies, qu’elles aient été obtenues en contraste de phase ou en fluorescence après une coloration. Les images de la Figure 123C et de la Figure 123F représentent les mêmes cellules. Après 13 jours à 37°C, nous avons observé de fortes modifications de l’adhésion cellulaire avec un étalement des cellules (Figure 123E et F), des extensions et des irrégularités du cytoplasme (Figure 123B, D et E), des regroupements de noyaux (Figure 123A, E et F), ainsi qu’une détérioration de l’intégrité des membranes et des noyaux cellulaires (Figure 123A, C et E).



A, B, C : contraste de phase – D, E, F : fluorescence

Figure 123 : Observations en microscopie après 30J à 28°C suivis de 13J à 37°C, barre d’échelle : 100µm

Après 20 jours à 37°C, nous avons observé des altérations morphologiques similaires mais plus marquées qu’après 13 jours à 37°C (Figure 124). Les images de la Figure 124A et de la Figure 124D représentent les mêmes cellules, tout comme celles des Figure 124B et Figure 124E. Nous avons observé de fortes modifications de l’adhésion cellulaire avec un étalement des cellules (Figure 124C, D, E et F), des extensions et des irrégularités du cytoplasme (Figure 124C et F), des regroupements de noyaux (Figure 124A, B et F), ainsi qu’une détérioration de l’intégrité des membranes et des noyaux cellulaires (Figure 124A, B et F).



A, B : contraste de phase – C, D, E, F : fluorescence

Figure 124 : Observations en microscopie après 30J à 28°C suivis de 20J à 37°C, barre d'échelle : 100µm

IV.5.d.iii. Discussion

Au vu de l'arrêt de la prolifération après 30 jours d'hypothermie, nous avons laissé les cellules de glioblastome proliférer sur des durées plus importantes à 37°C. Nous avons alors montré que les cellules A172 ne reprenaient pas leur prolifération, alors que les cellules U251, U87 et T98G sortaient progressivement de leur état de dormance pour revenir à un état prolifératif, avec une différence significative après 20 jours. Nous avons également mis en évidence une augmentation de la viabilité cellulaire significative dès 13 jours, suggérant que les cellules sortent de leur état de dormance dans les jours suivant le retour à 37°C. Enfin, les altérations morphologiques observées indiquent une forte dégradation de l'intégrité nucléaire et membranaire, qui ne semble pas disparaître avec la reprise de la prolifération. De plus, nous avons pu observer que ces altérations étaient bien plus marquées que celles qui avaient pu être observées après 6 jours à 28°C (IV.3.a Morphologie). Par la suite, une analyse approfondie des caractéristiques moléculaires et cellulaires des cellules de glioblastome après le réchauffement pourrait permettre de comprendre certains mécanismes d'action de l'hypothermie.

IV.5.e. Différents cycles d'hypothermie intermittente

IV.5.e.i. Plan d'expériences

Nous avons pu observer que les effets inhibiteurs de l'hypothermie ne se limitaient pas au conditionnement direct, et qu'ils étaient prolongés après un retour à 37°C. Nous avons alors décidé de comparer différentes séquences alternant hypothermie et normothermie, et avons étudié l'influence de trois cycles différents sur la prolifération de cellules de glioblastome humain. Pour chacun des cycles, les cellules ont été placées pendant une durée totale de 7 jours à 28°C et de 6 jours à 37°C (Figure 125). Le cycle long a été défini dans la continuité des expériences précédentes, consistant à alterner un cycle d'hypothermie avec un cycle de normothermie. Le cycle moyen a consisté à diviser ces deux séquences, en alternant 3 jours à 28°C, 3 jours à 37°C, 4 jours à 28°C et enfin 3 jours à 37°C. Enfin, un cycle court a consisté à diviser davantage les cycles afin d'avoir la séquence suivante : 3 jours à 28°C, 1 jour à 37°C, 1 jour à 28°C, 1 jour à 37°C, 1 jour à 28°C, 3 jours à 37°C, 1 jour à 28°C, 1 jour à 37°C et 1 jour à 28°C.

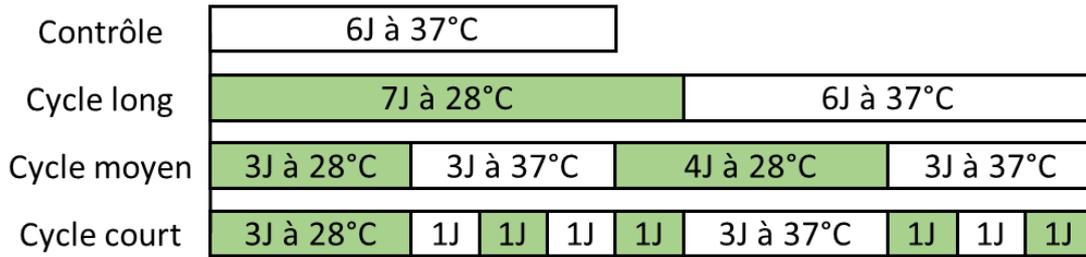


Figure 125 : Schéma expérimental – Différents cycles d’intermittence

IV.5.e.ii. Résultats

Nous avons testé trois séquences d’hypothermie intermittente et nos résultats ont montré que les effets inhibiteurs de l’hypothermie perduraient après les cycles, quelle que soit leur longueur (Figure 126 ; $p < 0,001$ pour toutes les lignées). Nous avons également montré que ces effets augmentaient en intensité avec la longueur du cycle, avec une inhibition plus importante pour le cycle long et pour le cycle moyen par rapport au cycle court ($p < 0,001$ pour tous). Pour les cellules A172, U87 et T98G, il n’y a pas eu de différence significative entre les cycles long et moyen ($p > 0,05$), tandis que pour les cellules U251, les effets inhibiteurs du cycle long ont été significativement plus importants que ceux du cycle moyen ($p < 0,001$).

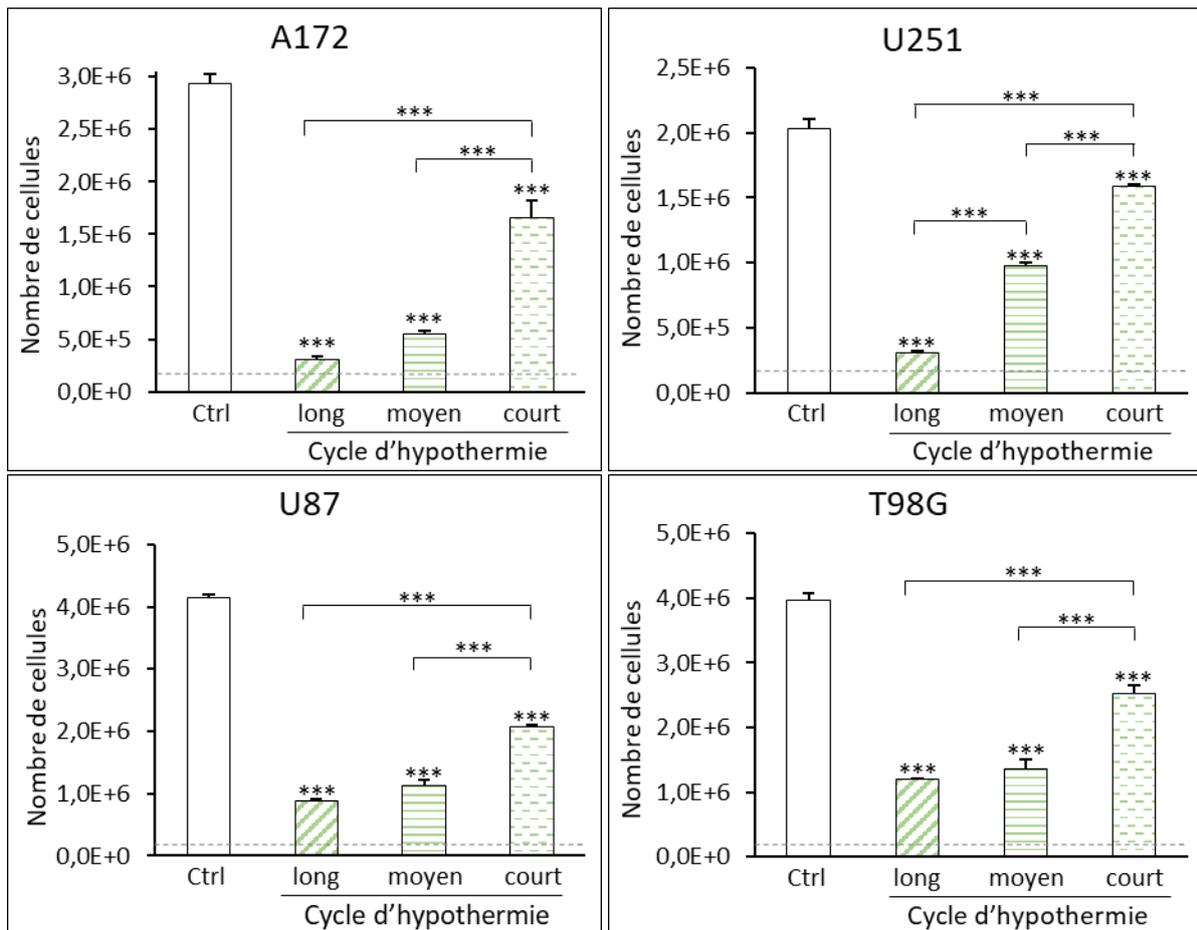


Figure 126 : Influence de la durée des cycles d’hypothermie intermittente sur la prolifération cellulaire

Nous avons également démontré que les effets de la durée des cycles d’hypothermie sur la prolifération cellulaire n’étaient pas dus à une altération de la viabilité cellulaire (Figure 127). En effet, les différents cycles n’ont pas modifié la viabilité des cellules de glioblastome de manière significative, excepté pour les cellules U251 où le cycle long a légèrement diminué la viabilité par rapport au cycle moyen ($p = 0,032$) et pour les cellules U87 où le cycle court a davantage réduit la viabilité par rapport au cycle moyen ($p = 0,024$).

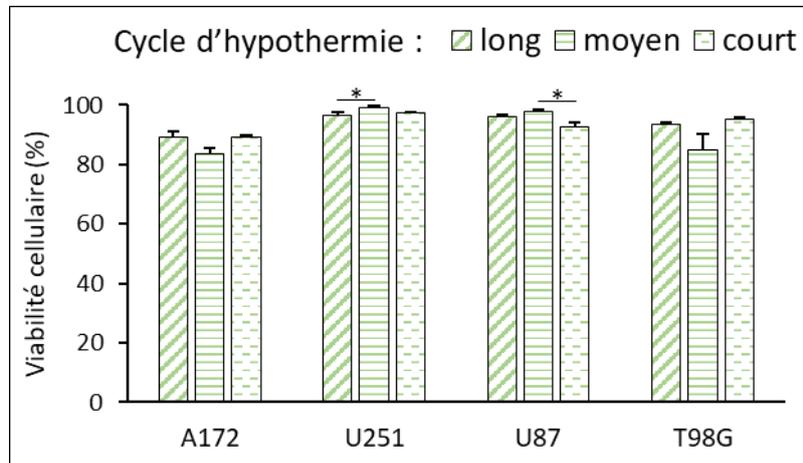


Figure 127 : Influence de la durée des cycles d’hypothermie intermittente sur la viabilité cellulaire

IV.5.e.iii. Discussion

Nous avons montré qu’une augmentation de la durée des séquences d’hypothermie et de normothermie permettait d’augmenter les effets inhibiteurs de l’hypothermie sur la prolifération cellulaire. Dans une des parties précédentes (IV.5.c Durée du préconditionnement hypothermique), nous avons démontré que les effets inhibiteurs de l’hypothermie augmentaient avec la durée du préconditionnement. Ainsi, ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les cellules aient été placées à 37°C plus rapidement lors des cycles courts, correspondant à un préconditionnement hypothermique plus court. En effet, les cellules ont été placées à 37°C au bout de 3 jours d’hypothermie lors du cycle moyen et du cycle court, et au bout de 7 jours d’hypothermie pour le cycle long. De ce fait, la reprise de la prolifération à 37°C a probablement été plus importante après 3 jours à 28°C plutôt qu’après 7 jours à 28°C. Afin de confirmer que les cycles longs inhibent davantage la prolifération des cellules de glioblastome que les cycles courts, d’autres cycles d’hypothermie intermittente pourraient être comparés, en démarrant notamment par le cycle normothermique.

IV.6. Thérapie adjuvante

Après avoir étudié différentes séquences d’hypothermie, nous avons choisi de la positionner comme une thérapie adjuvante par rapport au protocole de Stupp. Nous savons déjà que l’hypothermie a des effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires qui devraient améliorer les séquelles de l’ablation chirurgicale. De plus, le blocage de la division cellulaire en phase G2/M suggère un fort potentiel adjuvant de l’hypothermie avec la radiothérapie, puisque les cellules sont particulièrement radiosensibles dans cette phase. De ce fait, nous avons d’abord choisi de combiner ses effets à ceux de la chimiothérapie, et une combinaison avec la radiothérapie pourra être envisagée par la suite.

IV.6.a. Expériences préliminaires

Pour comparer puis combiner les effets de l’hypothermie avec ceux de la chimiothérapie, nous avons choisi d’utiliser le témozolomide (TMZ), médicament de référence pour traiter les patients atteints d’un glioblastome. Le témozolomide (Sigma-Aldrich, PHR1437-1G) a été dilué dans du DMSO et utilisé à une concentration finale de **100 μ mol/L**, qui représente la concentration cliniquement pertinente (Pandey et al., 2019). Les expériences ont toutes été répétées trois fois de manière indépendante. Afin de garantir que le solvant n’altérerait pas la viabilité cellulaire, le DMSO a été utilisé à une concentration maximale de 0,03%. Des expériences préliminaires réalisées sur les lignées A172 et T98G ont permis de vérifier que la concentration de 0,03% ne modifiait pas la croissance et la viabilité des cellules de glioblastome (Figure 128). En effet, nous avons démontré qu’il n’y avait aucune différence significative entre la prolifération de cellules en présence du milieu contrôle (DMEM seul) et du milieu contenant du DMSO (Figure 128A ; $p > 0,05$). Pour la lignée A172, nous avons observé une inhibition de la prolifération des cellules mises en culture avec du TMZ, tant par rapport au milieu contrôle ($p = 0,046$) que par rapport à celui contenant le DMSO ($p = 0,037$). Nous avons également montré que la présence de DMSO n’altérerait pas la viabilité cellulaire de nos lignées de glioblastome (Figure 128B ; $p > 0,05$).

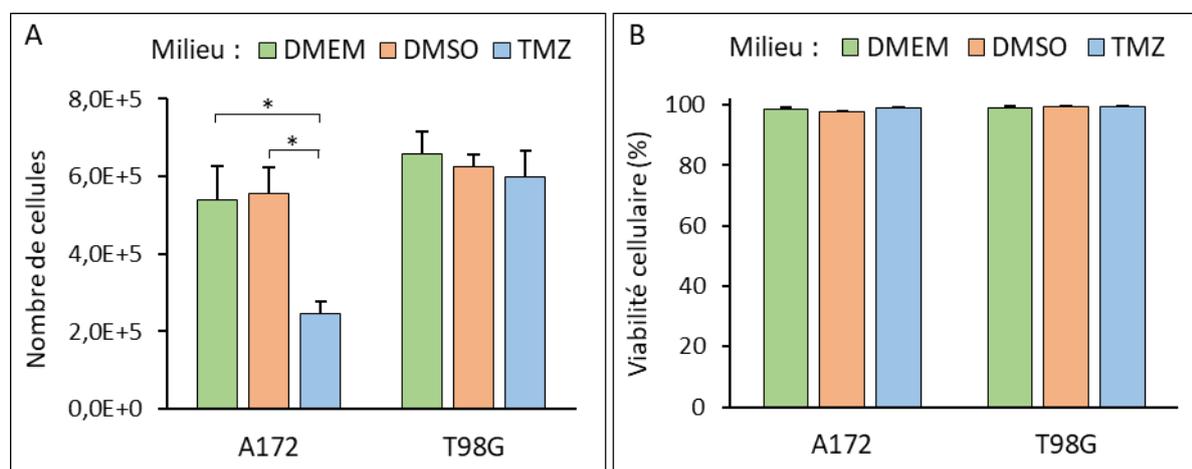


Figure 128 : Effets du solvant DMSO et du TMZ sur la prolifération (A) et la viabilité cellulaire (B)

Par la suite, nous avons effectué des contrôles avec du DMSO seul en parallèle de chaque expérience utilisant du témozolomide. Dans chacune des expériences et pour chacune des lignées, le solvant n’a altéré ni la viabilité ni la prolifération des cellules, et nous avons choisi de ne pas représenter ces résultats sur les graphes pour plus de clarté.

IV.6.b. Comparaison avec le témozolomide

IV.6.b.i. Plan d’expériences

Nous avons commencé par comparer les effets de l’hypothermie modérée (28°C) avec ceux de la chimiothérapie (TMZ) sur la prolifération de cellules de glioblastome humain pendant 6 jours. Quelle que soit la condition, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6-puits à raison de 60 000 cellules par puits ($6,25 \cdot 10^4$ cellules/cm²), puis incubées à 37°C. Après 4h30, une partie du milieu (1/3) a été remplacée par du milieu complet (contrôle), ou du milieu contenant du témozolomide ou du DMSO, et les cellules ont été mises en culture pendant 6 jours à la température appropriée. Ainsi, pour la condition hypothermique, les cellules ont été mises en culture à 28°C, tandis que pour la chimiothérapie, les cellules ont été mises en culture à 37°C, après un unique ajout initial de témozolomide (Figure 129).

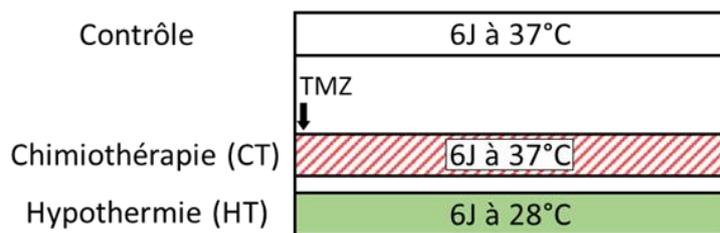
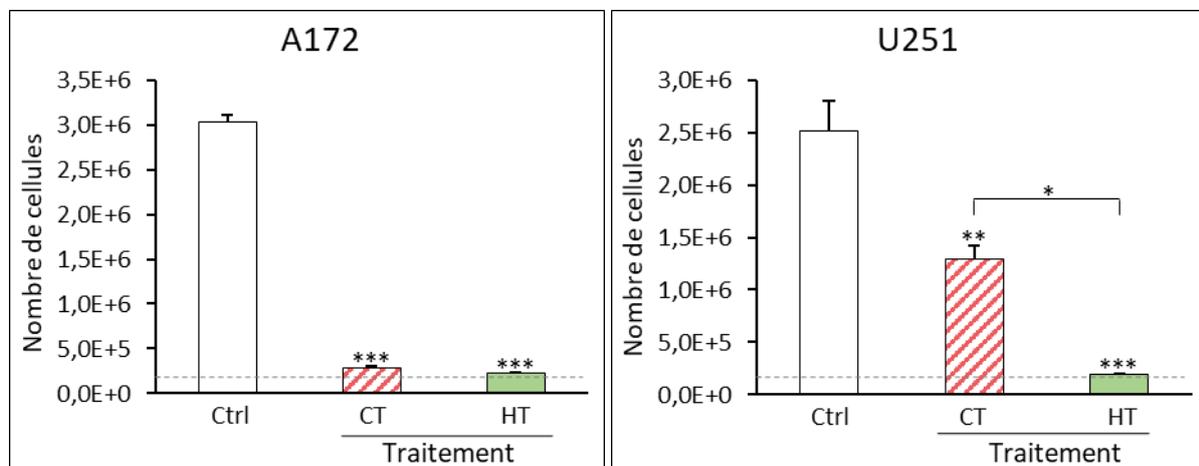


Figure 129 : Schéma expérimental – comparaison de l’hypothermie avec la chimiothérapie

IV.6.b.ii. Résultats

Nous avons comparé les effets de l’hypothermie à ceux de la chimiothérapie, afin de la positionner comme une thérapie adjuvante pour le glioblastome (Figure 130). L’hypothermie modérée a inhibé la prolifération des cellules de glioblastome de manière quasi-totale ($\geq 99\%$) pour les quatre lignées cellulaires ($p < 0,001$). Au contraire, la chimiothérapie a eu des effets variables en fonction des lignées. D’une part, l’ajout de témozolomide a très fortement inhibé la prolifération cellulaire des lignées A172 et U87, en les réduisant respectivement de 96 et 95% ($p < 0,001$). D’autre part, le TMZ a induit une inhibition modérée de 53% pour les cellules U251 ($p = 0,0087$), qui n’ont répondu que partiellement aux effets de la chimiothérapie. Enfin, le témozolomide a inhibé la prolifération des cellules T98G de seulement 15% ($p > 0,05$), démontrant une résistance des cellules à la chimiothérapie. Ainsi, pour les lignées U251 et T98G, l’hypothermie modérée a eu des effets inhibiteurs plus importants que ceux du témozolomide ($p = 0,015$ pour U251 et $p < 0,001$ pour T98G), alors que les deux traitements ont affecté les cellules A172 et U87 de manière similaire ($p > 0,05$).



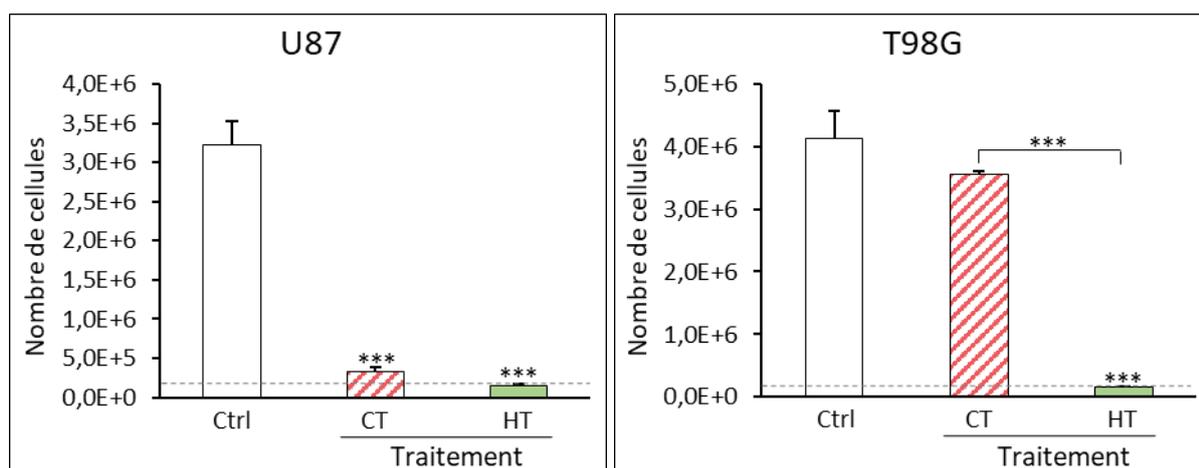


Figure 130 : Effets de l’hypothermie modérée et de la chimiothérapie sur la prolifération cellulaire

Nous avons également évalué les effets des deux traitements sur la viabilité cellulaire (Figure 131). Les résultats ont montré que l’hypothermie n’altérait pas la viabilité des quatre lignées cellulaires ($p > 0,05$), tandis que la chimiothérapie induisait une légère diminution de la viabilité des cellules A172 (91% vs 99% ; $p = 0,049$) et U87 (88 vs 99% ; $p > 0,05$), et n’affectait pas celle des cellules U251 et T98G ($p > 0,05$).

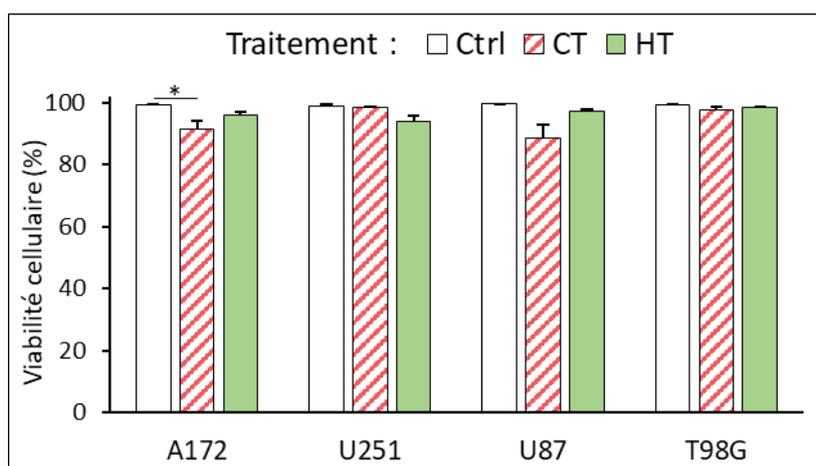


Figure 131 : Effets de l’hypothermie modérée et de la chimiothérapie sur la viabilité cellulaire

IV.6.b.iii. Discussion

Pour étudier le potentiel thérapeutique adjuvant de l’hypothermie modérée, nous avons comparé ses effets sur la prolifération des cellules de glioblastome avec ceux du témozolomide. Nous avons alors démontré que les effets inhibiteurs de l’hypothermie étaient plus importants que ceux du TMZ pour les cellules U251 et T98G. De plus, nous avons redémontré l’effet uniforme de l’hypothermie, qui a affecté les quatre lignées cellulaires de manière similaire, avec une inhibition totale de leur prolifération. En revanche, les cellules se sont révélées plus ou moins sensibles au témozolomide en fonction de certaines de leurs altérations génétiques. En effet, nous avons démontré que les cellules A172 et U87 – avec le promoteur du gène *MGMT* méthylé et un gène *TP53* de type sauvage – étaient sensibles au témozolomide, avec une inhibition de 95 à 96% de leur prolifération. Les cellules U251, qui ont un promoteur de *MGMT* méthylé et des mutations du gène *TP53*, ont partiellement répondu au témozolomide, avec une inhibition de 53% de leur prolifération. Enfin, les cellules T98G, qui ont un promoteur de *MGMT* non méthylé et des mutations de *TP53*, ont montré une forte résistance au témozolomide, avec une inhibition de seulement 15% de leur prolifération.

Pour expliquer ces différences, il est important de rappeler que l’alkylation cytotoxique du témozolomide peut être réparée par l’enzyme MGMT (Lee, 2016; J. Zhang et al., 2012). Lorsque le promoteur du gène *MGMT* est méthylé, ce dernier devient silencieux et les cellules ne produisent plus l’enzyme de réparation de l’ADN associée. Ainsi, la méthylation du promoteur de *MGMT* est associée à une sensibilité au témozolomide (Perazzoli et al., 2015). De plus, certaines études ont démontré que la résistance au témozolomide était également associée aux mutations de *TP53*, notamment en raison d’une surexpression de MGMT (Hientz et al., 2017; Wang et al., 2013). Ces études mettent en évidence deux facteurs de résistance au témozolomide : les mutations de *TP53* et la non-méthylation du promoteur de *MGMT*. Ainsi, les cellules A172 et U87 qui ne possèdent aucun des deux facteurs se sont révélées chimiosensibles, les cellules T98G qui possèdent les deux facteurs se sont révélées chimiorésistantes, et les cellules U251 possédant un facteur de sensibilité et un facteur de résistance ont été faiblement chimiosensibles.

IV.6.c. Combinaison avec le témozolomide

IV.6.c.i. Résultats préliminaires

Après avoir comparé les effets de l’hypothermie modérée à ceux de la chimiothérapie, nous les avons combinés. Nous avons d’abord souhaité vérifier que l’ajout de témozolomide à l’hypothermie modérée n’altérait pas ses effets inhibiteurs, et avons démontré que ce dernier induisait une inhibition supplémentaire de la prolifération cellulaire de l’ordre de 7 à 30% en fonction des lignées. Cependant, puisque la prolifération cellulaire était déjà totalement arrêtée par l’hypothermie modérée, l’addition de témozolomide n’était pas réellement quantifiable, avec une inhibition totale de la prolifération dans les deux cas. De ce fait, la combinaison du témozolomide avec une hypothermie administrée en continu ne nous a pas semblé idéale, et nous avons préféré choisir de le combiner avec une hypothermie intermittente.

IV.6.c.ii. Plan d’expériences

Nous avons ainsi choisi de combiner la chimiothérapie avec l’hypothermie intermittente, afin de voir si la combinaison de ces deux thérapies permettait d’inhiber davantage la prolifération des cellules de glioblastome. Nous avons alors choisi une séquence d’hypothermie intermittente composée d’un cycle de 6 jours à 28°C suivi par 6 jours à 37°C, et comparé l’addition de témozolomide à deux instants différents, afin d’optimiser la combinaison de ces thérapies (Figure 132). Une addition a été réalisée au bout de cinq jours de culture, pendant la période d’hypothermie, tandis que l’autre a été faite au bout de neuf jours de culture, après le retour à 37°C. Le contrôle normothermique usuel de 6 jours à 37°C a été effectué en parallèle de chaque expérience, et nous avons également ajouté un contrôle de prolifération pour l’hypothermie intermittente (6 jours à 28°C puis 6 jours à 37°C), sans ajout de témozolomide. Comme décrit précédemment (IV.6.a Expériences préliminaires), des expériences ont été effectuées en parallèle en ajoutant du DMSO dans le milieu de culture, afin de s’assurer que le solvant n’induisait pas de dommages supplémentaires.

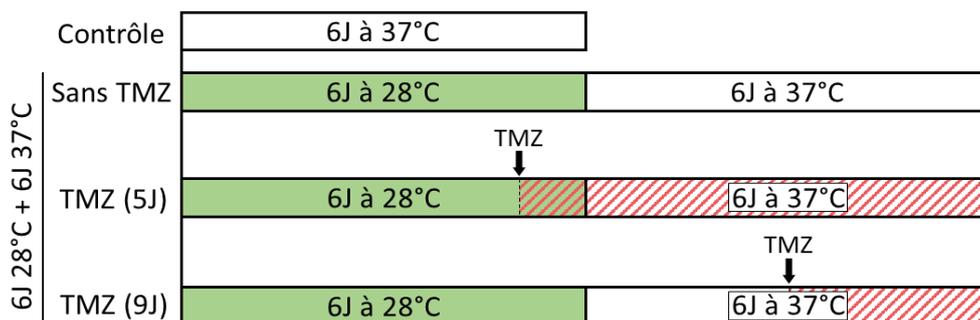


Figure 132 : Schéma expérimental – Combinaison de l’hypothermie avec la chimiothérapie

IV.6.c.iii. Résultats

Nous avons choisi de représenter les résultats selon deux graphes différents. Un premier graphe représente l’expérience dans son ensemble, permettant de voir les effets de l’hypothermie intermittente avec différentes additions de témozolomide par rapport au contrôle normothermique (Figure 133). Les trois séquences thérapeutiques ont permis d’inhiber la prolifération des cellules de glioblastome de manière significative pour l’ensemble des lignées ($p < 0,001$ pour tous excepté la condition sans TMZ des U87 : $p = 0,0011$).

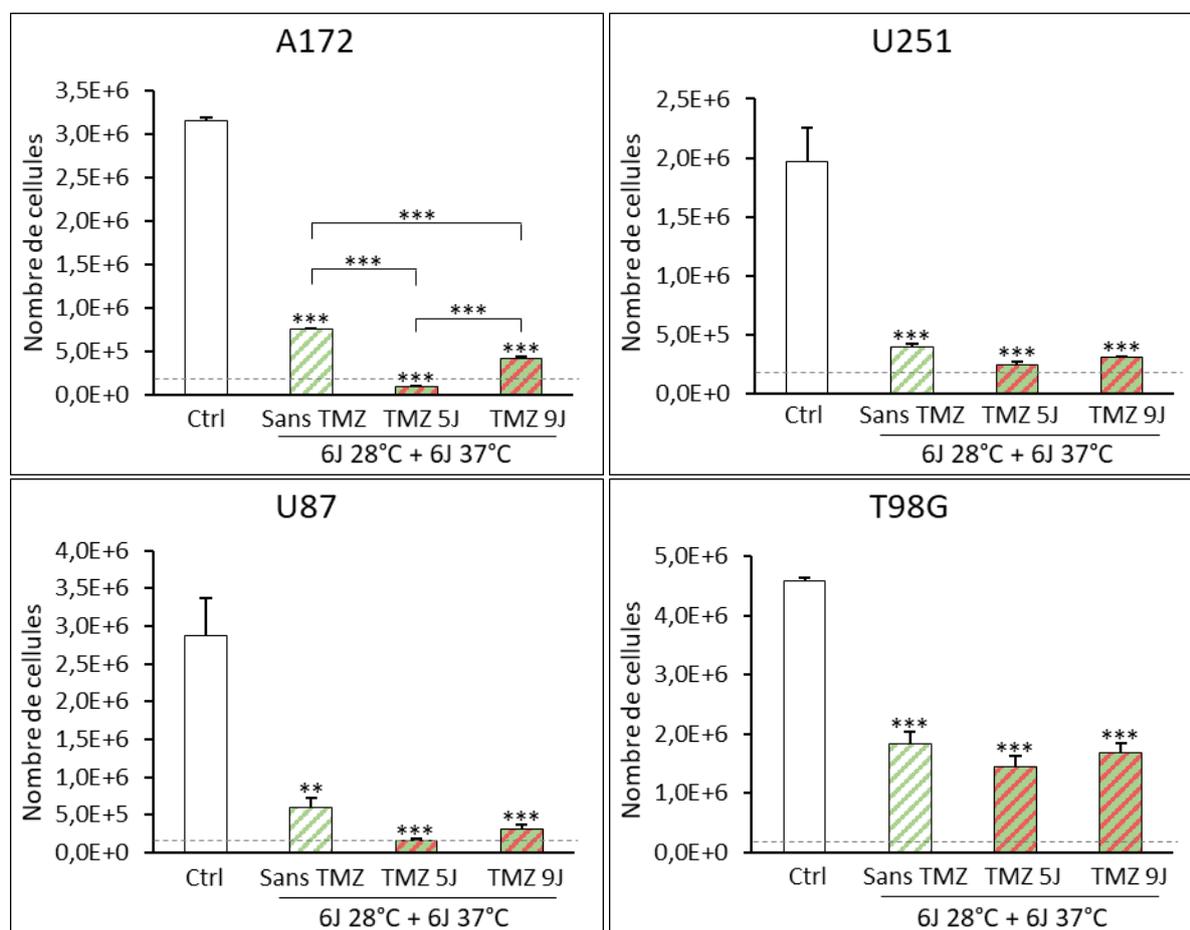


Figure 133 : Effets de la combinaison d’hypothermie avec la chimiothérapie sur la prolifération cellulaire

Un deuxième graphe représente uniquement les trois séquences thérapeutiques, permettant de mieux voir les différences entre elles (Figure 134). Pour les cellules A172 et U87, l’ajout de témozolomide a renforcé les effets inhibiteurs du préconditionnement hypothermique, passant respectivement de 81 % et 84 % à 100 % après 5 jours et à 92 % et 95 % après 9 jours ($p < 0,001$).

Pour les cellules U251, la combinaison s’est également révélée prometteuse, avec une inhibition passant de 88% à 96% après 5 jours et 93% après 9 jours ($p = 0,0022$ après 5 jours et $p = 0,021$ après 9 jours). Pour les cellules T98G, l’ajout de témozolomide a renforcé les effets inhibiteurs du préconditionnement hypothermique de manière moins importante, avec une inhibition allant de 63% à 72% après 5 jours et 66% après 9 jours ($p > 0,05$). Pour les quatre lignées, l’inhibition de la prolifération s’est avérée plus importante lors d’un ajout de TMZ après 5 jours plutôt que 9, bien que la différence n’ait été significative que pour les cellules chimiosensibles A172 ($p < 0,001$) et U87 ($p = 0,027$).

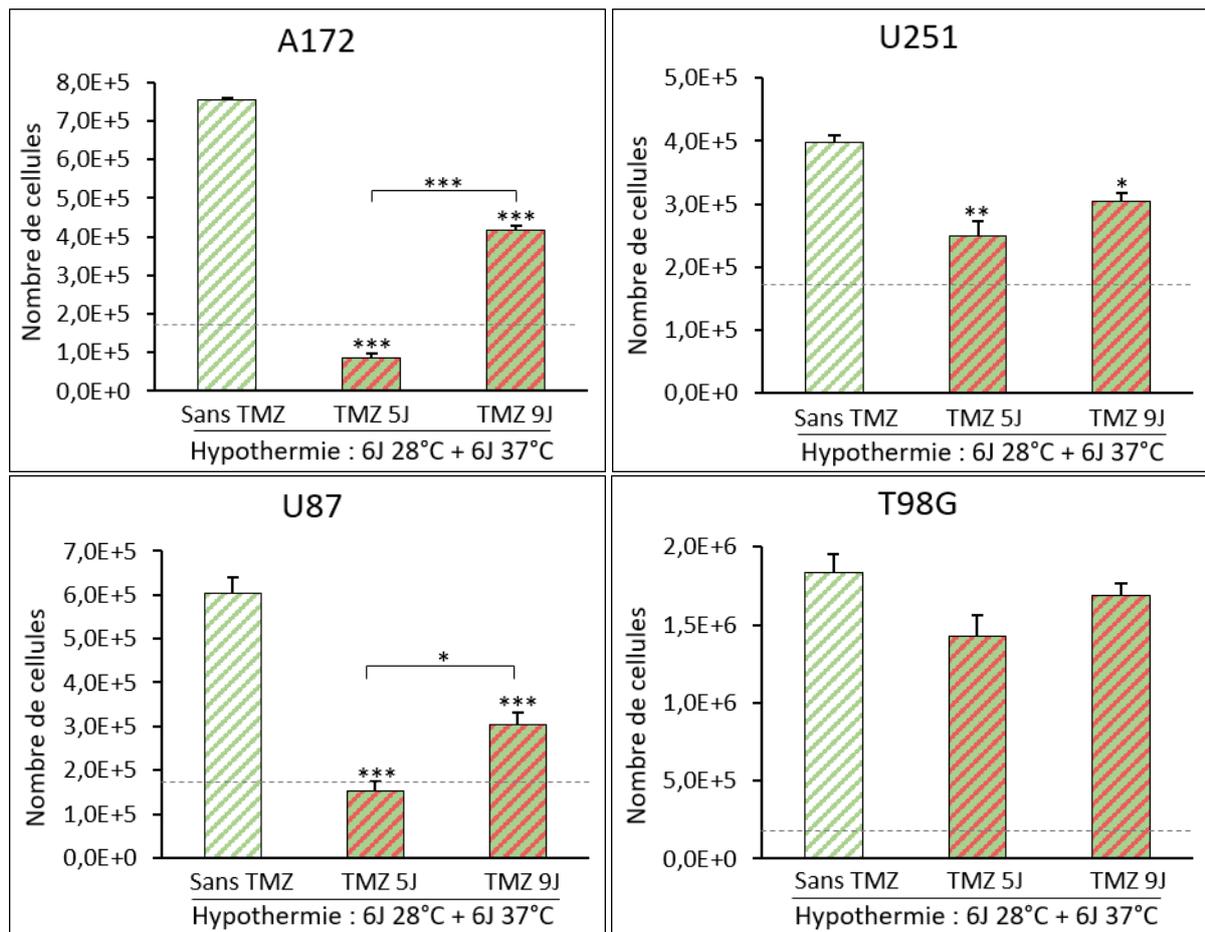


Figure 134 : Influence de l'ajout de chimiothérapie à l'hypothermie sur la prolifération cellulaire

Nous avons également évalué les effets des différentes séquences thérapeutiques sur la viabilité cellulaire (Figure 135). Pour les cellules A172, l'ajout de TMZ a induit une réduction de la viabilité de 14% après 5 jours ($p = 0,0084$) et de 3% après 9 jours ($p = 0,023$). Pour les autres lignées, aucune différence significative n'a été observée entre les trois traitements.

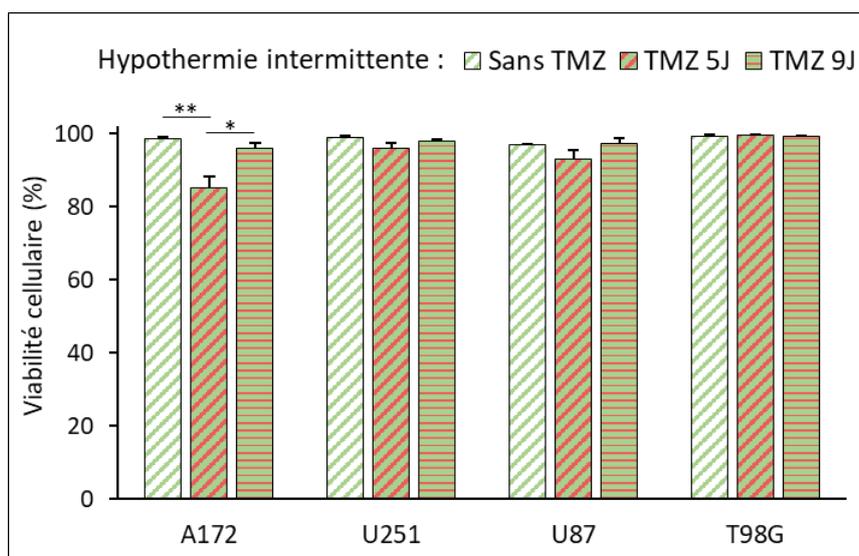


Figure 135 : Effets de la combinaison d'hypothermie avec la chimiothérapie sur la viabilité cellulaire

IV.6.c.iv. Discussion

Pour finir, nous avons étudié les effets combinés de la chimiothérapie et de l'hypothermie intermittente, tout en optimisant l'addition de témozolomide. Nous avons montré que le témozolomide augmentait les effets inhibiteurs de l'hypothermie intermittente, en particulier sur les lignées chimiosensibles A172 et U87. Nous avons également démontré que le témozolomide était plus efficace lorsqu'il était ajouté au bout de 5 jours plutôt qu'après 9 jours. Pour expliquer cette différence, une première hypothèse est que l'action du témozolomide est plus efficace sur les cellules en hypothermie, déjà arrêtées dans leur cycle cellulaire. Une seconde hypothèse est que l'ajout de témozolomide après 5 jours est plus précoce que celui de 9 jours, et permet de bloquer la croissance des cellules de glioblastome avant qu'elles ne reprennent progressivement leur prolifération à 37°C. De plus, pour une même quantité de témozolomide ajoutée, un nombre de cellules largement supérieur sera traité après 9 jours plutôt qu'après 5 jours, diminuant ainsi la concentration de l'agent thérapeutique. Pour compléter ces résultats, des expériences pourraient être menées afin de comparer deux ajouts pendant la période d'hypothermie, deux ajouts pendant la période de normothermie, mais également des ajouts effectués juste avant et juste après le retour à 37°C. En résumé, l'hypothermie modérée potentialise les effets de la chimiothérapie, et pourrait permettre de réduire les variabilités de sensibilité aux traitements entre les patients. Ces résultats prometteurs suggèrent que l'hypothermie modérée pourrait être un traitement adjuvant approprié pour le glioblastome, et pourrait maintenir les cellules tumorales dans un état de dormance tout en potentialisant les effets d'autres thérapies. Cependant, le potentiel thérapeutique de l'hypothermie modérée ne pourra être confirmé que par des expériences *in vivo* démontrant les mêmes effets anti-tumoraux.

Chapitre V

Effets de l'hypothermie sur des cellules saines

Après avoir démontré que l’hypothermie parvenait à inhiber la prolifération et la migration de cellules de glioblastome humain, nous avons choisi d’étudier ses effets sur la croissance de cellules saines. Les objectifs de cette partie étaient de caractériser les effets de l’hypothermie sur des cellules humaines non-tumorales pour évaluer la spécificité d’un tel traitement, mais aussi d’évaluer la sûreté de son utilisation pour une future application clinique. Dans ce document, nous décrivons d’abord les différents résultats puis les comparons dans un second temps à ceux obtenus sur des lignées de glioblastome. Une seconde partie sur la culture primaire de neurones corticaux mis en culture à partir d’embryons de souris avait pour but de compléter ces résultats en étudiant également les effets de l’hypothermie sur des cellules neuronales, omniprésentes dans le microenvironnement du glioblastome.

Concernant la valorisation des résultats, la partie V.1 dédiée aux expériences sur les astrocytes humains a fait l’objet d’une publication conjointe avec les résultats d’intermittence et de thérapie adjuvante précédemment décrits (Publications et communications, (Fulbert et al., 2021)). L’ensemble des expériences de la partie V.1 a été réalisé par la doctorante. Pour la partie V.2, la mise au point du protocole a été effectuée en collaboration avec Christophe Gaude et Audrey LeNaour. Le prélèvement des cerveaux a été effectué par Christophe Gaude et David Ratel, et la dissociation ainsi que la mise en culture par la doctorante.

V.1. Astrocytes humains

V.1.a. Méthode générale

V.1.a.i. Matériel et réactifs

Les supports et le matériel de culture ont été obtenus chez Falcon, Eppendorf, Bio-Rad et Fisher (Annexe 3). Les solutions, milieux et réactifs sont décrits dans le Tableau 7, les chambres de culture Lab-Tek® ont été commandées chez Fisher Scientific, et les lames TC20™ chez Bio-Rad.

Fournisseur	Réactifs et solutions	Référence
Sigma-Aldrich	Bleu de trypan	T8154
	Formaldéhyde (<i>Formalin solution 10%</i>)	HT501128
	Triton™ X-100	T9284
	Phalloïdine TRITC	P1951
	DAPI	D9542
Gibco	DMEM (<i>Dulbecco’s modified Eagle’s medium</i>)	10569-010
	FBS (<i>Fetal bovine serum</i>)	16000-044
	N2 (<i>N-2 Supplement</i>)	17502-048
	Accutase (réactif de dissociation de cellules StemPro™)	A11105-01
	Geltrex™ (LDEV-free, Reduced growth factor basement membrane matrix, no phenol red)	A14132-02
	DPBS (avec calcium et magnésium)	14040-133
	DPBS (sans calcium ni magnésium)	14190-144
Fisher Bioreagents	PBS (<i>Phosphate buffered saline (10X)</i>)	BP399
Merck Millipore	Réactif FluorSave™	345789
PeptoTech	EGF (facteur de croissance épidermique humain)	AF-100-15-100UG

Tableau 7 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture cellulaire

Le DPBS avec calcium et magnésium a été utilisé pour rincer les surfaces de culture après le dépôt du revêtement Geltrex, le DPBS sans calcium ni magnésium a été utilisé dans les rinçages des astrocytes, et le PBS a été utilisé pour les colorations phalloïdine et DAPI.

V.1.a.ii. Conditions de culture

Les astrocytes humains ont été commandés chez Gibco (K1884) et mis en culture dans du DMEM supplémenté avec du FBS (10%), du supplément N2 (1X) et de l’EGF (10ng/mL) (milieu complet). La culture a été effectuée sans antibiotiques, et le milieu de culture a été conservé à l’abri de la lumière et refait toutes les deux semaines pour éviter sa dégradation. Les expériences ont été réalisées dans des incubateurs (SANYO, MCO-19AIC) réglés à 37 et 28°C, dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. Les astrocytes humains étant parfois délicats à manipuler de par leur adhérence au plastique, tout le matériel de laboratoire – notamment les cônes et tubes – a été préalablement rincé avec du milieu complet. De plus, ce type de cellules a besoin d’un revêtement spécifique pour adhérer au mieux à la surface de culture. Ainsi, toutes les surfaces de culture ont été préalablement recouvertes de Geltrex pendant 1 heure à 37°C, puis placées à température ambiante avant chaque expérience. Après avoir retiré le Geltrex, les surfaces ont été rincées avec du PBS (avec calcium et magnésium) puis les cellules ont pu êtreensemencées. Afin d’être récoltés, les astrocytes ont d’abord été rincés avec du PBS (sans calcium ni magnésium) puis décollés avec de l’acutase. Les protocoles expérimentaux ont été adaptés à partir du chapitre précédent (Chapitre IV), notamment pour les analyses statistiques (IV.1.c Analyse statistique), le comptage cellulaire (IV.2.a.ii Comptage cellulaire), le test de cicatrisation (IV.4.a Migration non-orientée) et la coloration avec de la phalloïdine et du DAPI (IV.3.a Morphologie).

V.1.b. Étude de la prolifération

V.1.b.i. Méthode

Pour l’ensemble des expériences de prolifération, la culture a été effectuée dans des plaques 6-puits, et chaque condition expérimentale a été répétée 3 fois de manière indépendante. Pour cela, une suspension cellulaire a été préparée afin d’ensemencer 60 000 cellules par puits dans 3mL de milieu complet, à une densité cellulaire de $6,25 \cdot 10^4$ cellules/cm². Chaque condition expérimentale correspond à 2 puits et donc à 120 000 cellules, qui ont été récupérées et comptées ensemble à la fin de chaque expérience. Les cellules ont été mises en culture pendant 24h à 37°C avant le début de chaque expérience, afin d’adhérer aux supports de culture avant d’être placées en condition hypothermique. Comme précédemment, le nombre de cellules rapporté sur les graphes représente le nombre de cellules vivantes pour chaque condition expérimentale, tandis que la viabilité cellulaire représente la proportion de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules. La ligne en pointillés correspond au nombre de cellulesensemencées au début de chaque test, qui est de 120 000 cellules.

V.1.b.ii. Évolution au cours du temps

◆ Plan d’expériences

Pour commencer, nous avons étudié l’influence d’une hypothermie modérée sur la prolifération d’astrocytes humains au cours du temps, en les plaçant pendant 6, 12 et 30 jours en culture à 28°C (Figure 136). Un contrôle de prolifération normothermique a été effectué en parallèle en plaçant les cellules pendant 6 jours à 37°C. Les contrôles de 12 et 30 jours à 37°C n’ont pu être obtenus en raison de la confluence des cellules.

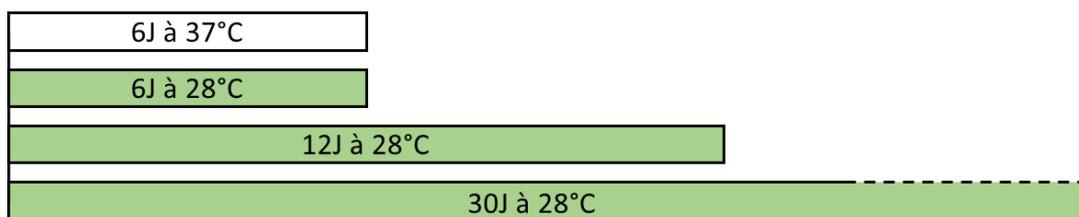


Figure 136 : Schéma expérimental – Hypothermie modérée de 6 à 30 jours

◆ Résultats

Pour évaluer l'impact de l'hypothermie modérée sur les cellules saines, nous avons étudié ses effets sur la prolifération d’astrocytes humains (Figure 137). Nous avons démontré que l’hypothermie inhibait la prolifération astrocytaire de manière totale et durable ($p < 0,001$), et aucune différence n’a été observée entre les différentes durées à 28°C ($p > 0,05$).

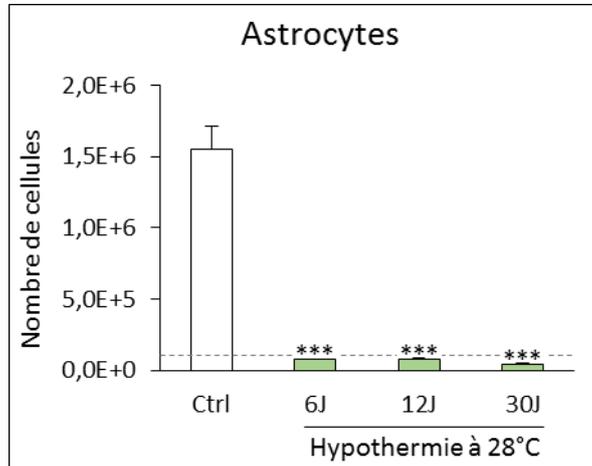


Figure 137 : Influence de l’hypothermie modérée sur la prolifération astrocytaire au cours du temps

Nous avons également évalué l’influence d’une hypothermie modérée prolongée sur la viabilité cellulaire (Figure 138). Nous avons montré que la viabilité des astrocytes était de 96% à 37°C, et qu’elle était affectée dès 6 jours à 28°C (81% ; $p = 0,042$), avec une diminution similaire après 12 jours d’hypothermie (84% ; $p > 0,05$). Après 30 jours, certaines des cellules se sont détachées de la surface de culture et sont entrées en apoptose, avec une réduction plus importante de leur viabilité (58% ; $p < 0,001$).

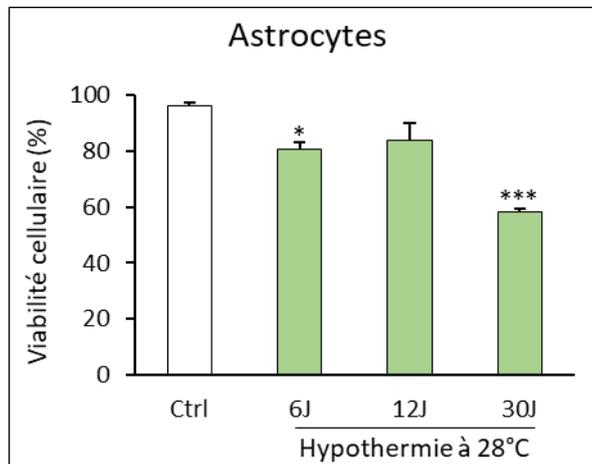


Figure 138 : Influence de l’hypothermie modérée sur la viabilité astrocytaire au cours du temps

V.1.b.iii. Influence d’un préconditionnement hypothermique

◆ Plan d’expériences

Après avoir observé que la prolifération des astrocytes était totalement inhibée par une hypothermie modérée de 28°C, nous avons étudié les effets d’un retour à la normothermie après un préconditionnement hypothermique de 6 jours (Figure 139). Pour cela, nous avons mis les cellules en culture pendant 6 jours à 28°C, puis les avons placées à 37°C pendant 6 jours. Cette condition de réchauffement avait pour but d’étudier la reprise de la prolifération après un retour à 37°C.



Figure 139 : Schéma expérimental – Hypothermie continue ou intermittente de 6 jours

◆ Résultats

Nous avons étudié la réversibilité des effets de l’hypothermie en suivant la prolifération astrocytaire pendant 6 jours après le retour à 37°C (Figure 140). Nous avons alors montré qu’il n’y avait pas de différence significative entre la prolifération astrocytaire avant et après le réchauffement ($p > 0,05$). En effet, la prolifération astrocytaire est restée inhibée après 6 jours à 37°C ($p < 0,001$), démontrant une certaine irréversibilité des effets de l’hypothermie sur les astrocytes.

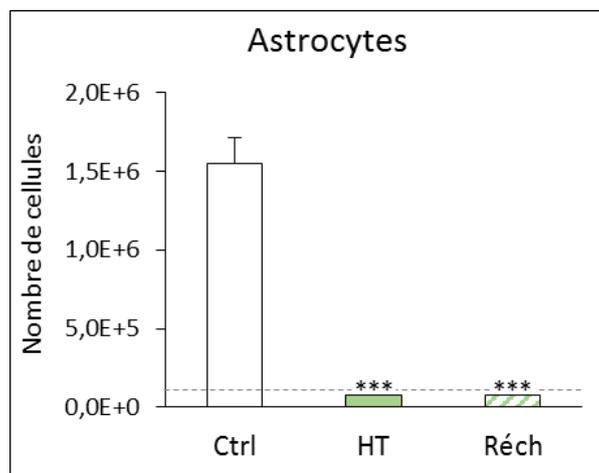


Figure 140 : Influence de l’hypothermie intermittente sur la prolifération astrocytaire

Nous avons également étudié l’influence du retour à la normothermie sur la viabilité cellulaire, et avons démontré qu’il induisait une réduction significative de celle-ci (Figure 141 ; $p < 0,001$), tout comme l’hypothermie continue ($p = 0,0020$). De plus, nous avons montré que le retour à 37°C accentuait les effets de l’hypothermie, avec une viabilité cellulaire passant de 81 à 65% ($p < 0,001$).

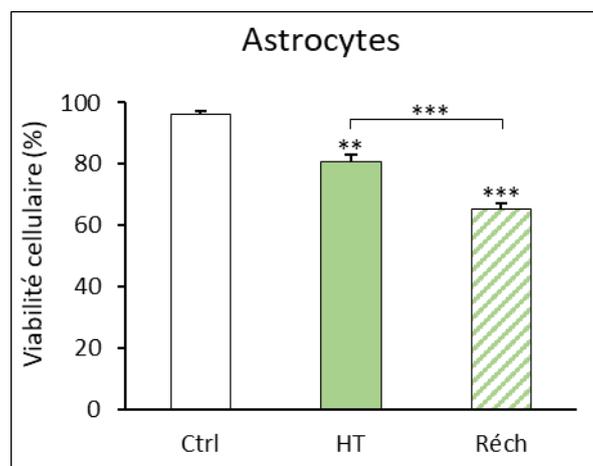


Figure 141 : Influence de l’hypothermie intermittente sur la viabilité astrocytaire

V.1.b.iv. Étude de la morphologie

En parallèle des expériences de prolifération, nous avons effectué un suivi des cellules par microscopie (Olympus CKX41), en réalisant notamment des photographies avec une caméra numérique (Olympus DP22) (Figure 142). Nous avons suivi la prolifération des cellules sur la période d’hypothermie continue de 30 jours à 28°C ainsi que lors du réchauffement après 6 jours à 28°C. Nous avons observé que les astrocytes étaient à confluence dès 6 jours à 37°C, et que l’inhibition de la prolifération par l’hypothermie était bien visible, avec un faible nombre de cellules adhérentes à 28°C. De plus, nos données ont illustré la difficulté des astrocytes à établir des connexions intercellulaires en condition hypothermique, ainsi que des altérations morphologiques. Enfin, ces résultats ont montré une forte influence du retour à 37°C sur la morphologie astrocytaire, puisque nous avons pu observer la formation de nouvelles connexions intercellulaires ainsi qu’une augmentation de l’adhésion cellulaire.

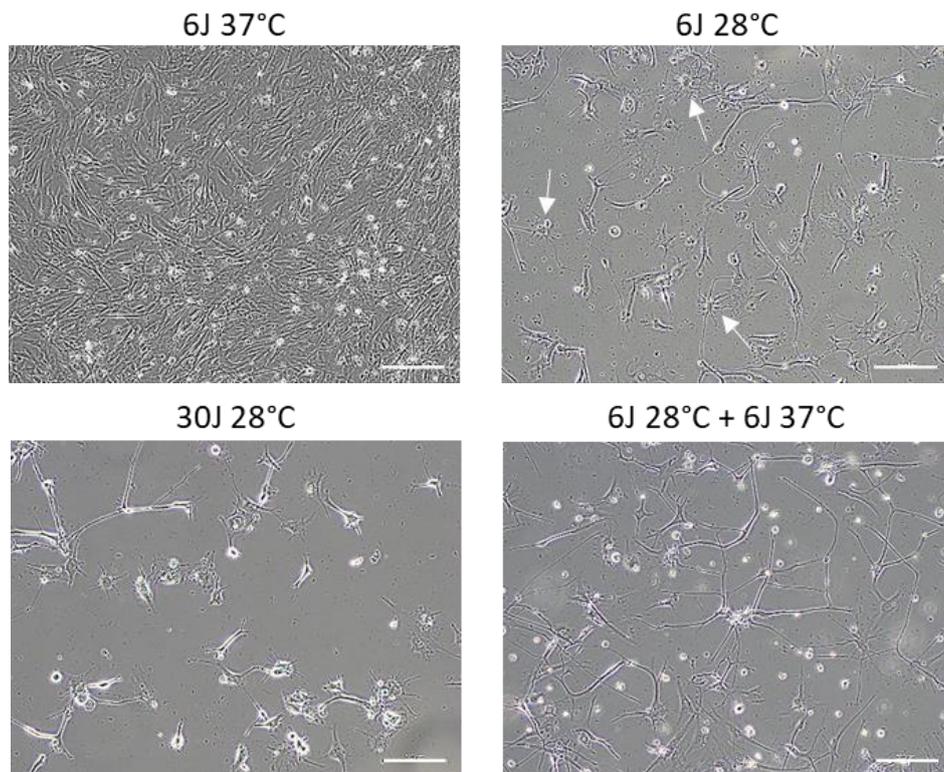


Figure 142 : Influence de différentes séquences d'hypothermie sur la morphologie astrocytaire, barre d'échelle : 200µm

Par la suite, nous avons fixé et coloré les astrocytes avec de la phalloïdine et du DAPI afin d'étudier leur morphologie après 6 et 30 jours à 28°C (Figure 143). Les images de microscopie ont montré que l’hypothermie induisait différentes altérations morphologiques, davantage prononcées après 30 jours, et semblables à celles observées sur les lignées de glioblastome (IV.5.d IV.5.d.ii Reprise de la prolifération après 30 jours d’hypothermie). Nous avons à nouveau observé un faible nombre de connexions intercellulaires, mais également une altération de l’adhésion cellulaire. De plus, nous avons pu voir une détérioration des membranes cellulaires, avec la présence d’irrégularités dès 6 jours et de « blebs » après 30 jours.

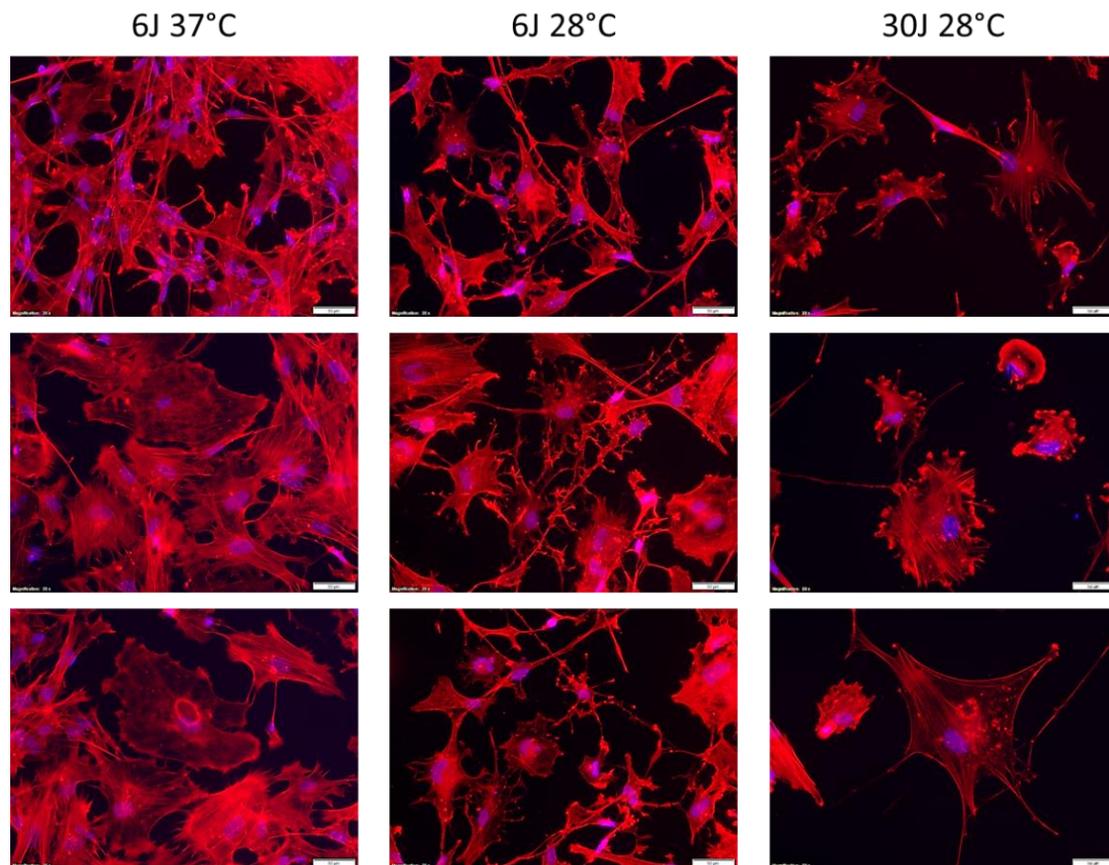


Figure 143 : Influence de l'hypothermie sur la morphologie astrocytaire, barre d'échelle : 50µm

V.1.b.v. Étude de la migration

◆ Plan d'expériences

Après avoir étudié l'influence de l'hypothermie sur la prolifération et la morphologie des astrocytes, nous avons étudié son impact sur la migration des cellules, grâce à un test de cicatrisation. En résumé, après avoir réalisé une lésion régulière sur un tapis cellulaire homogène, les cellules ont été mises en culture à 37 ou 28°C, et la recolonisation de la lésion a été suivie par microscopie. Après 18 heures de culture, les cellules ont été fixées et colorées avec du DAPI afin de quantifier leur migration. Dans la suite du document, une image de microscopie représentative de la migration est présentée, suivie d'une quantification des résultats comprenant quatre expériences indépendantes pour chaque condition.

◆ Résultats

Nous avons étudié la recolonisation d'une lésion par des astrocytes placés en culture à 28 et 37°C, et avons montré une recolonisation totale à 37°C, et faible à 28°C (Figure 144).

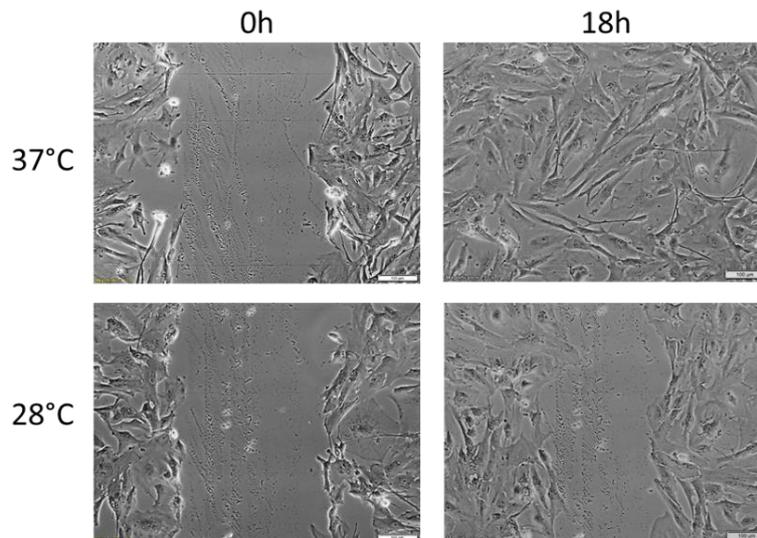


Figure 144 : Influence d'une hypothermie modérée sur la recolonisation de lésions par des astrocytes, barre d'échelle : 100µm

La quantification des résultats a montré qu'une hypothermie modérée inhibait la migration astrocytaire de manière significative, à hauteur de 65 % (Figure 145 ; $p < 0,001$).

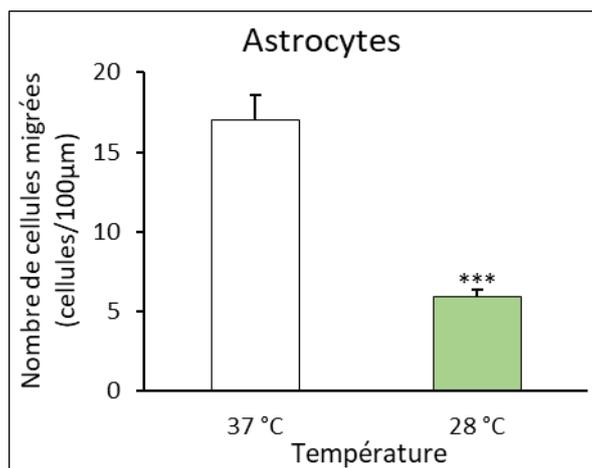


Figure 145 : Influence d'une hypothermie modérée sur la migration astrocytaire non-orientée

V.1.b.vi. Discussion

Nous avons démontré qu'une hypothermie modérée induisait un blocage total et durable de la prolifération astrocytaire, similaire à celui observé sur les lignées de glioblastome. Cependant, nous avons observé une différence majeure concernant les effets du retour à la normothermie après un préconditionnement hypothermique. En effet, pour les astrocytes, le blocage de la prolifération a perduré pendant au moins 6 jours après le retour à 37°C, alors que les cellules de glioblastome sont rapidement sorties de leur état de dormance. Ce résultat peut s'expliquer de par le caractère non transformé des cellules saines, plus fragiles et avec une capacité de division limitée par rapport aux cellules immortalisées. Nous supposons que les cellules saines auraient besoin de davantage de temps pour proliférer à nouveau après un arrêt de la division cellulaire, et que la reprise de la prolifération astrocytaire aurait été observée sur des durées plus longues. De plus, nous avons pu observer la formation de connexions intercellulaires ainsi que l'amélioration de l'adhésion cellulaire au fil des jours à 37°C, suggérant une modification de l'état de dormance des cellules pour retourner vers un état prolifératif.

Nous avons également mis en évidence diverses altérations morphologiques ainsi qu’une diminution significative de la viabilité cellulaire au cours du temps. Les astrocytes ont été moins affectés par des périodes prolongées d’hypothermie que les cellules de glioblastomes, puisque leur viabilité après 30 jours à 28°C était de 58% alors que celle des cellules tumorales variait entre 7 et 44% en fonction des lignées. Enfin, nous avons démontré une inhibition significative de 65% de la migration astrocytaire, moins importante que celle des cellules de glioblastome, comprise entre 86 et 91% en fonction de lignées. Nous avons ainsi démontré que l’hypothermie affectait le comportement des cellules tumorales et des cellules astrocytaires saines de manière comparable, avec une meilleure tolérance par les cellules saines.

Deux autres études ont déjà démontré des effets similaires de l’hypothermie sur les cellules saines et tumorales. D’une part, Matijasevic (Matijasevic, 2002; Matijasevic et al., 1998) a démontré que des fibroblastes humains expérimentaient un arrêt du cycle cellulaire à 28°C, tout comme des cellules provenant d’un cancer du sein (MCF-7). D’autre part, l’équipe de Plesnila (Plesnila et al., 2000) a démontré que des astrocytes primaires de rat subissaient un gonflement similaire à celui des cellules de gliome de rat (C6) à 32°C (Plesnila et al., 2000).

Enfin, bien que l’hypothermie affecte la croissance des cellules saines, il est important de rappeler qu’elle a également des effets neuroprotecteurs notables. En effet, plusieurs études ont montré qu’elle permettait de réduire les dommages liés à certains agents cytotoxiques sur des cellules murines neuronales et microgliales (Lee et al., 2016b; Seo et al., 2012).

V.2. Neurones primaires de souris

Nous avons également étudié les effets de l’hypothermie modérée sur la croissance et la morphologie de neurones primaires corticaux issus d’embryons de souris. En effet, le microenvironnement du glioblastome est composé de cellules gliales mais également de neurones, omniprésents dans le cerveau.

V.2.a. Méthode générale

V.2.a.i. Matériel et réactifs

Les supports et le matériel de culture ont été obtenus chez Falcon, Eppendorf, Bio-Rad et Fisher (Annexe 3). Les solutions, milieux et réactifs sont décrits dans le Tableau 8 et les chambres de culture Lab-Tek® ont été commandées chez Fisher Scientific. La notion de milieu chaud se réfère à un milieu préconditionné à 37°C, alors que celle de milieu froid fait référence à un milieu préconditionné à 4°C.

Fournisseur	Réactifs et solutions	Référence
Sigma-Aldrich	Bleu de trypan	T8154
	Poly-L-lysine	P2636
	AraC (Cytosine β -D-arabinofuranoside)	C1768
	PBS (<i>DPBS with calcium chloride and magnesium chloride 10X</i>)	D1283
Gibco	DMEM (<i>Dulbecco’s modified Eagle’s medium</i>)	11960-044
	FBS (<i>Fetal bovine serum</i>)	16000-044
	GlutaMAX 100X	35050-061
	HBSS (<i>Hank’s Balanced Salt Solution 10X</i>)	14185-045
	Milieu Neurobasal	21103-049
	Supplément B-27™	17504-044
	Trypsine (<i>Trypsin-EDTA 0,05%</i>)	25300-054
	Pénicilline streptomycine	15140-122
Merck Millipore	Acide borique	1001650100
MP Biomedicals	Borax	11491831
Laboratoire Aguetant	Eau sterile (Versol®)	0459

Tableau 8 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture primaire de neurones

V.2.a.ii. Conditions de culture

◆ Environnement stérile

La dissection a été effectuée à l’aide de matériel stérile, et les étapes de dissociation et de mise en culture ont été réalisées dans un environnement lui aussi stérile. Des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture pendant les premières heures pour éliminer les éventuels contaminants provenant de la dissection, et la culture des cellules neuronales a ensuite été effectuée sans antibiotiques. L’ensemble des solutions préparées avec des éléments non stériles ou en conditions non stériles a été filtré à 0,22 μ m.

◆ Conditions thermiques

Le maintien des cultures cellulaires à 37°C ainsi que les conditions expérimentales de normothermie ont été réalisées dans un incubateur (SANYO, MCO-19AIC) sous atmosphère humide à 5% de CO₂, et les expériences d’hypothermie modérée (28°C) ont été réalisées dans une enceinte climatique (Mettler, ICH110C) avec une atmosphère humide (80%) et 5% de CO₂.

◆ Milieux de culture

Le milieu de Hanks utilisé pour le rinçage des tissus a été préparé en diluant du HBSS (1:10) dans de l’eau stérile. Le DMEM complet utilisé pour l’ensemencement des cellules a été préparé en ajoutant du FBS (1:10), du glutamax (1:100) et de la pénicilline streptomycine (1:1000) au DMEM. Enfin, le milieu neurobasal complet utilisé pour le maintien de la culture a été préparé en ajoutant 3mL de supplément B-27 et 37 μ L de glutamax dans 146,4mL de milieu neurobasal. Afin de permettre aux neurones primaires d’adhérer aux surfaces de culture, ces dernières ont été préalablement recouvertes d’une solution de poly-l-lysine, puis rincées à l’eau stérile et remplies avec du DMEM jusqu’à l’ensemencement. La solution de poly-l-lysine a été utilisée à 10mg/mL et préparée dans du tampon borate, en ajoutant du borax (4,75g/L) à une solution d’acide borique (3,1g/L) et en laissant le soluté se dissoudre à 4°C.

V.2.a.iii. Protocole expérimental

◆ Provenance des animaux

Toutes les procédures d’expérimentation animale ont été réalisées en suivant la directive européenne 2010/63/EU et la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Pour l’ensemble des expériences, un dossier Apafis décrivant les différentes étapes expérimentales a été validé par le Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation (dossier n°2018012215397984), et le protocole a été soumis à l’approbation du Comité d’éthique en expérimentation animale de Grenoble. Les cultures ont été réalisées à partir d’embryons E16 prélevés sur des souris C57BL/6 J01aHsd gestantes (Envigo). Le protocole de culture primaire a été adapté de « Culture de neurones hippocampiques ou corticaux » (Barlovatz-Meimon and Ronot, 2014).

◆ Dissection et dissociation

La souris gestante a été euthanasiée par dislocation cervicale, puis les cornes utérines contenant les sacs embryonnaires ont été prélevées et rincées avec du PBS stérile. Les sacs embryonnaires ont été sortis sur glace et les cerveaux ont été prélevés un à un puis placés dans une boîte de pétri contenant du milieu de Hanks froid. Après ouverture des hémisphères, le cortex a été prélevé puis placé dans une boîte de pétri contenant 3,6mL de milieu de Hanks froid. Le tissu cérébral et la solution ont été récupérés et placés dans un tube Falcon contenant 400 μ L de trypsine, puis incubés pendant 15 minutes à 37°C pour optimiser la dissociation enzymatique. Ensuite, le tissu a été rincé trois fois avec du milieu de Hanks chaud, et le culot cellulaire a été resuspendu dans 2,5mL de milieu DMEM complet chaud, puis dissocié mécaniquement avec une pipette.

◆ Mise en culture

Une fois la suspension cellulaire homogène, les cellules ont été comptées à l’aide de cellules de Malassez. La suspension cellulaire a alors étéensemencée sur des supports de culture préalablement recouverts de poly-l-lysine, à raison de 315 000 cellules par pétri (15 000 cellules/cm²), puis ces derniers incubés à 37°C, 5% CO₂. Après 2 à 3 heures, le milieu DMEM a été retiré avec précaution et remplacé par 3mL de milieu neurobasal complet chaud, et les cellules ont été incubées à 37 ou 28°C. Après 2 jours de culture, une partie du milieu (20%) a été remplacée par du milieu neurobasal complet contenant 3 μ M d’araC (Cytosine β -D-arabinofuranoside), afin de limiter la prolifération des cellules gliales et conserver uniquement les neurones. Par la suite, le milieu de culture a été renouvelé en partie (1/3) tous les 3 à 4 jours. La culture a été suivie par microscopie (Olympus IX81), avec des acquisitions régulières en contraste de phase (Cell Sens Dimension).

V.2.a.iv. Résultats

Les images obtenues en microscopie illustrent la croissance des neurones à 37 et 28°C, après 5 et 7 jours de culture (Figure 146). Ces images montrent que les neurones ont adhéré aux surfaces de culture et sont parvenus à établir des connexions entre eux, à 37°C comme à 28°C. De plus, le nombre de dendrites et la longueur des axones sont similaires à 37°C et 28°C, indiquant une bonne tolérance des neurones primaires à l’hypothermie modérée.

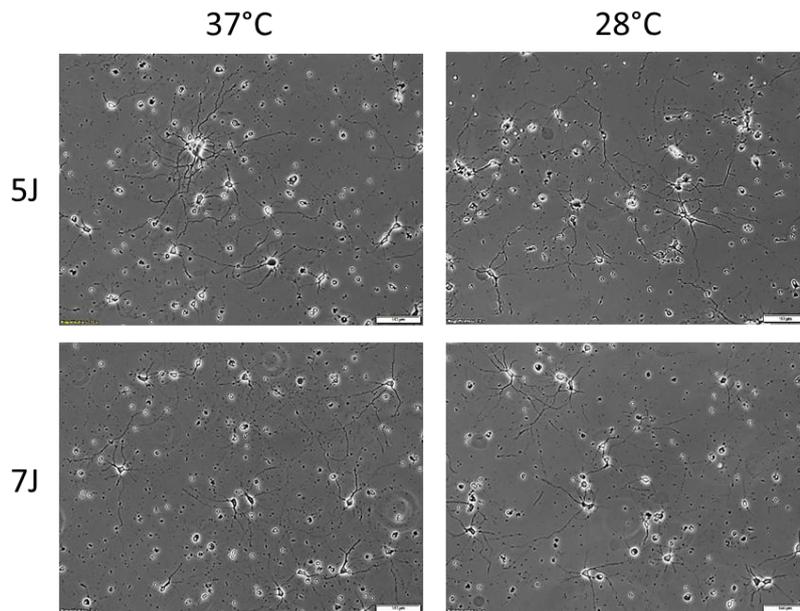


Figure 146 : Influence de la température de culture sur la croissance neuronale, barre d'échelle : 100µm

D'autres images réalisées avec un grossissement plus important ont permis de davantage observer la morphologie des neurones (Figure 147). Ces images confirment que les neurones parviennent à établir des connexions synaptiques à 28°C.

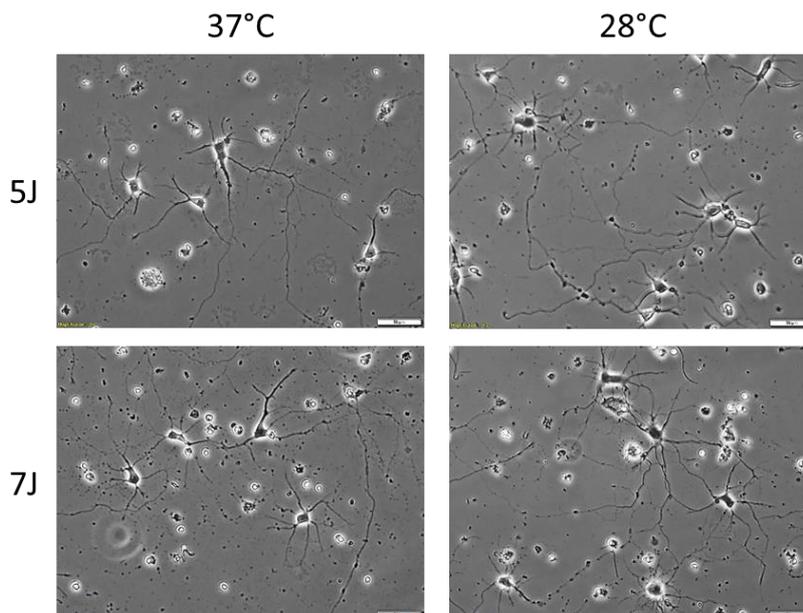


Figure 147 : Influence de la température de culture sur la croissance neuronale, barre d'échelle : 50µm

V.2.a.v. Discussion

Ces résultats préliminaires ont permis de montrer une bonne tolérance des neurones à l’hypothermie modérée (28°C), mais devront être confirmés par des études approfondies. Une étude de prolifération pourrait être menée sur une durée prolongée (3, 6, 9 et 12 jours par exemple) grâce à un comptage cellulaire, et l’apoptose neuronale pourrait être mesurée à l’aide d’un marquage par l’Annexine V. La morphologie des neurones pourrait être étudiée de façon plus précise avec une coloration immunohistochimique basée sur un anticorps anti-NeuN ou anti- β III tubuline. Enfin, le fonctionnement des neurones pourrait être évalué par des mesures électrophysiologiques, permettant de s’assurer que l’hypothermie prolongée n’altère pas leurs capacités d’interaction.

Dans ce chapitre, nous avons montré que l’hypothermie était un traitement non spécifique aux cellules tumorales, puisqu’elle affecte également la croissance des cellules saines. Nous avons également montré une bonne tolérance des cellules astrocytaires et neuronales par rapport à une hypothermie modérée de plusieurs jours. Concernant la sûreté d’un tel traitement chez l’Homme, il nous paraît important de rappeler que la profondeur de pénétration de l’hypothermie est de quelques millimètres, et que seules les cellules présentes au voisinage des berges d’exérèse seront placées en hypothermie.

Chapitre VI

Preuve de concept *ex vivo*

Nous avons montré au travers des chapitres précédents que l'hypothermie inhibait à la fois la croissance des cellules tumorales et celle des cellules saines. Nous avons également démontré une bonne tolérance des astrocytes humains et des neurones de souris à l'hypothermie modérée, permettant d'envisager concrètement une application thérapeutique. Afin de confirmer son potentiel thérapeutique, nous avons décidé d'étudier les effets de l'hypothermie modérée sur la croissance tumorale dans un environnement plus complexe, en mettant des cerveaux embryonnaires de souris en culture *ex vivo* à différentes températures. Dans un premier temps, l'objectif de ces travaux était de maintenir les cerveaux en culture pendant plusieurs jours, puis de réaliser des analyses histologiques permettant d'observer les effets de l'hypothermie sur le tissu cérébral. A notre connaissance, cette preuve de concept est sans précédent et pourrait permettre d'améliorer les modèles de culture cellulaire *in vitro*, et de proposer une alternative à certaines études *in vivo*, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux sacrifiés. Nous sommes cependant conscients que ce type d'expériences est limité et ne permet d'étudier qu'une partie des interactions intercellulaires, de par leur réalisation post-mortem.

Les résultats de la partie VI.2.a sur les lignées tumorales de souris ont été obtenus par la doctorante. Pour la culture en elle-même, le prélèvement des cerveaux a été effectué par Christophe Gaude, la récupération des cellules tumorales par la doctorante et leur injection par David Ratel. La mise en culture ainsi que l'ensemble des analyses ont été réalisés par la doctorante. Une aide ponctuelle a été apportée par Fostine Giroud et Christophe Gaude pour la réalisation de coupes de cerveaux de souris adultes. La mise au point des protocoles d'histologie a été effectuée avec l'aide précieuse de Jenny Molet.

VI.1. Contexte

Après avoir étudié les effets de l'hypothermie sur la croissance de quatre lignées cellulaires de glioblastome, nous avons souhaité les étudier dans un environnement plus complexe. Nous avons d'abord réfléchi à la réalisation d'un essai préclinique *in vivo*. Une hypothermie modérée généralisée étant peu pertinente en vue d'une future étude clinique et non envisageable pour la santé des animaux, nous avons envisagé un dispositif de refroidissement cérébral localisé. Cependant, la conception et le développement de tels dispositifs pour un grand nombre d'animaux nécessitaient des moyens humains et technologiques trop importants pour notre étude. De plus, les délais incompressibles d'approbation éthique et de production des dispositifs n'étaient pas compatibles avec la durée impartie dans le cadre de la fin du projet doctoral.

Nous avons alors décidé de réaliser des expériences *ex vivo* à partir de cerveaux embryonnaires et adultes de souris. Les cerveaux ont été injectés avec des cellules de gliome murin, puis placés en culture pendant plusieurs jours en normothermie ou en hypothermie modérée. Après la culture, ils ont été fixés puis congelés. Des coupes ont ensuite été réalisées au cryostat puis elles ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine afin d'étudier les effets de l'hypothermie sur les tissus.

Nous avons choisi un modèle orthotopique, consistant à injecter des cellules tumorales dans le site correspondant à celui de la tumeur d'origine : le cerveau. De plus, nous avons utilisé un modèle syngénique, en injectant chez la souris des cellules tumorales provenant de gliome murin (GL261 et GL26), dans le but d'éviter une réaction immunitaire de rejet de la cellule tumorale qui aurait pu introduire un biais dans l'interprétation des résultats obtenus.

VI.2. Méthode

VI.2.a. Culture de lignées tumorales murines

VI.2.a.i. Conditions de culture

La culture des lignées GL26 et GL261 a été réalisée avec le matériel de culture et selon le protocole précédemment définis pour la culture des cellules de glioblastome humain (IV.1 Méthode générale). Pour rappel, les lignées ont été mises en culture dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS et 1% de glutamax, dans un environnement stérile ne contenant pas d'antibiotiques, et maintenues dans une atmosphère humide, à 37°C et 5% CO₂.

VI.2.a.ii. Lignées cellulaires

Les lignées GL26 et GL261 sont deux modèles de gliome murin immunocompétents. La lignée GL261 est un modèle orthotopique, qui provient de tumeurs induites par une induction chimique de 3-méthylcholanthrène et transplantées de façon sous-cutanée et intracrânienne dans des souris C57BL/6. La lignée GL26 a également été induite chimiquement chez la souris et ressemble fortement à la lignée GL261, mais est moins utilisée dans la recherche. Les deux lignées présentent un phénotype de type glioblastome mais ressemblent davantage à un épendymoblastome d'un point de vue histologique. Leurs caractéristiques génétiques sont semblables aux gliomes humains, et les tumeurs formées suite à leur injection rassemblent plusieurs caractéristiques du glioblastome. Enfin, les tumeurs issues des cellules GL26 présentent plus de nécrose et de vascularisation que celles issues des cellules GL261 (Oh et al., 2014). Ces deux lignées ont été fournies gracieusement par le Dr. Didier Wion, et les expériences ont été menées avec des cellules ayant subi un maximum de 5 passages après réception.

VI.2.a.iii. Étude de la prolifération

◆ Plan d'expériences

Un des objectifs de cette étude *ex vivo* étant d'étudier les effets anti-tumoraux de l'hypothermie sur des cellules de gliome de souris, nous avons d'abord étudié ces effets *in vitro*. En effet, nous avons précédemment démontré que l'hypothermie avait des effets inhibiteurs sur la prolifération de cellules de glioblastome humain, mais ces effets n'avaient pas été évalués sur des cellules tumorales de souris. Pour ce faire, nous avons mis en culture les cellules GL261 et GL26 pendant 3 et 6 jours en hypothermie modérée (28°C) et sévère (23°C). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6-puits à une densité de $6,25 \cdot 10^4$ cellules/cm², puis mises en culture à différentes températures pendant 3 et 6 jours. Ensuite, elles ont été récoltées et comptées à l'aide d'un appareil TC20™, et leur viabilité a été évaluée avec un test d'exclusion au bleu de trypan.

Pour rappel, le nombre de cellules rapporté sur chaque graphe représente le nombre de cellules vivantes pour chaque condition expérimentale, permettant de suivre la prolifération des cellules, tandis que la viabilité cellulaire correspond à la proportion de cellules vivantes par rapport au nombre total de cellules. Chaque expérience a été répétée 3 fois de manière indépendante, et la ligne en pointillés correspond au nombre de cellulesensemencées au début de chaque expérience (180 000 cellules).

◆ Résultats

Nous avons démontré que les deux lignées de gliome murin étaient sensibles aux effets de l'hypothermie modérée (Figure 148). En effet, nous avons montré qu'une hypothermie modérée de 3 jours à 28°C inhibait la prolifération cellulaire des cellules GL261 et GL26 de respectivement 99% et 100% (Figure 148p < 0,001), et qu'une hypothermie sévère de 3 jours à 23°C inhibait totalement la prolifération cellulaire des deux lignées (p < 0,001).

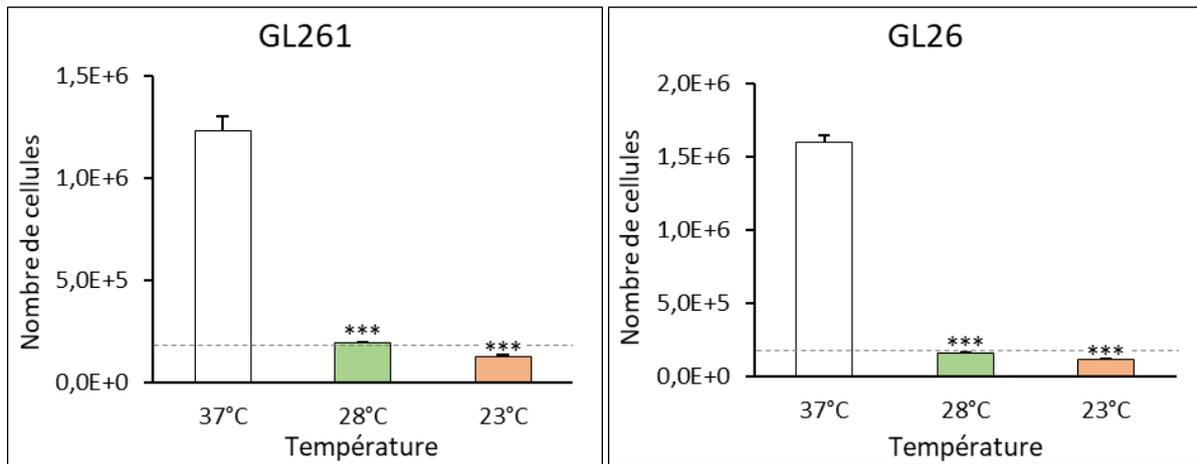


Figure 148 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la prolifération cellulaire à 3 jours

De plus, nous avons montré que les effets inhibiteurs de l'hypothermie étaient toujours présents après 6 jours de culture, avec une inhibition quasi-totale de 99% de la prolifération en hypothermie modérée (Figure 149 ; $p < 0,001$) et totale en hypothermie sévère ($p < 0,001$).

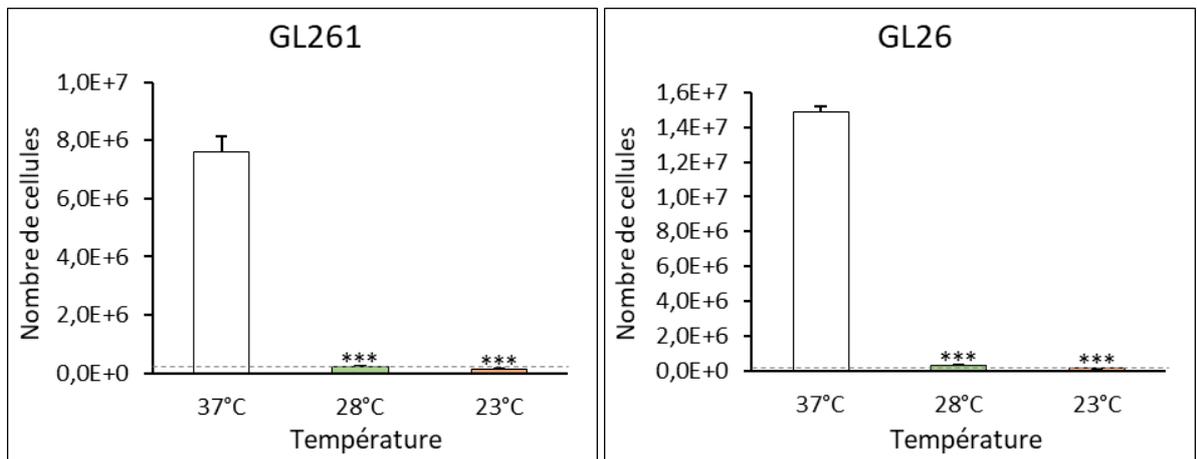


Figure 149 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la prolifération cellulaire à 6 jours

Nous avons également étudié l'influence de ces deux niveaux d'hypothermie sur la viabilité cellulaire après 3 et 6 jours de culture (Figure 150A et B), et avons démontré qu'il n'y avait pas de différence significative par rapport au contrôle ($p > 0,05$), ni entre les deux températures ($p > 0,05$).

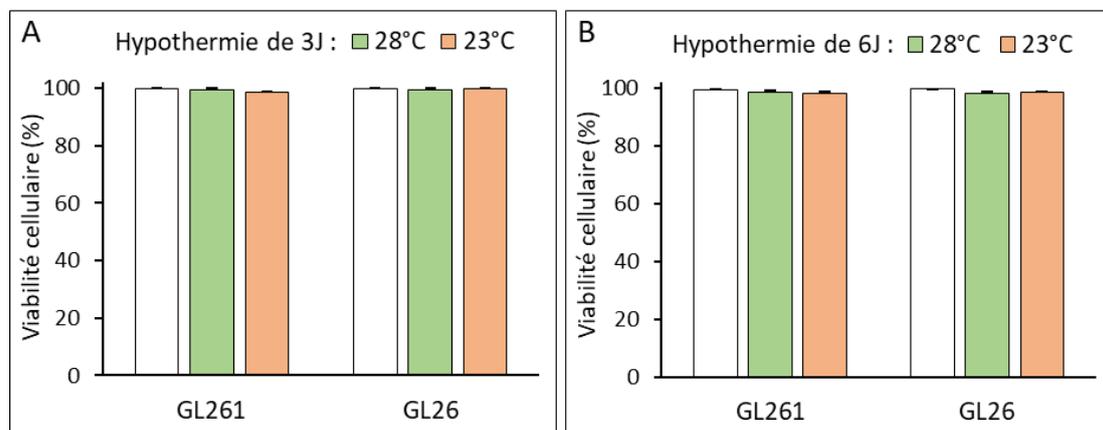


Figure 150 : Influence de différents niveaux d'hypothermie sur la viabilité cellulaire à 3 jours (A) et 6 jours (B)

Ainsi, nous avons démontré que l’hypothermie avait des effets similaires sur des lignées de gliome murin et sur des lignées de glioblastome humain, induisant un blocage total de la prolifération cellulaire à 28 et à 23°C. Nous avons alors pu utiliser ces lignées dans notre étude *ex vivo*, et avons décidé d’injecter uniquement les cellules GL261 – les plus fréquemment étudiées – pour pouvoir comparer au mieux les expériences entre elles.

VI.2.b. Culture *ex vivo* de cerveaux de souris

VI.2.b.i. Matériel et réactifs

Les supports et le matériel de culture ont été obtenus chez Falcon, Eppendorf, Bio-Rad et Fisher (Annexe 3). Les solutions, milieux et réactifs sont décrits dans le Tableau 9. Le cryostat utilisé est de la marque Leica (CM3050S), les lames porte-objets et les lamelles (24x65mm) ont été choisis chez Menzel-Gläser et la seringue Hamilton chez Hamilton (65459-01). Pour l’analyse des coupes, les images ont été réalisées avec un microscope à fond clair (Olympus BX53), avec l’aide du logiciel CellSens. Le PBS commercial a été utilisé pour l’injection des cellules tumorales.

Fournisseur	Réactifs et solutions	Référence
Sigma-Aldrich	Glucose (<i>D-(+)- glucose solution 100 g/L</i>)	G8644
	Formaldéhyde (<i>Formalin solution 10%</i>)	HT501128
	NaH ₂ PO ₄ (<i>Sodium phosphate monobasic monohydrate</i>)	71504-1KG-M
	Na ₂ HPO ₄ (<i>Sodium phosphate dibasic heptahydrate</i>)	S9390-500G-M
	NaCl (<i>Sodium chloride</i>)	S5886-500G
	Sucrose (<i>sucrose ≥ 99,5%</i>)	S9378
	Isopentane (<i>2-Methylbutane</i>)	277258
	Ammoniaque (<i>Ammonium hydroxide solution</i>)	09859
	Milieu de montage Eukitt®	03989
Supelco	Acetic acid (glacial) 100%	1000631011
Gibco	Opti-MEM (<i>Reduced serum medium</i>)	31985-070
	Pénicilline-streptomycine	15140-122
	2-mercaptoéthanol	21985-023
	PBS (DPBS sans calcium ni magnésium)	14190-144
Corning	Matrigel (<i>Matrigel® Matrix Basement Membrane</i>)	356231
Laboratoire Aguetant	NaCl (Sodium chlorure 0,9% en solution aqueuse, stérile)	AGUE600502
	Eau stérile (Versol®)	0459
VWR	Milieu d’inclusion O.C.T.	00411243
Thermo Scientific	Hématoxyline (Hématoxyline de Harris Shandon™)	6765001
Merck Millipore	Acide chlorhydrique (<i>Hydrochloric acid</i>)	109057
RAL REACTIFS	Éosine (Eosine J (jaunâtre) 1% en solution aqueuse)	720-1062
VWR Chemicals	Ethanol absolu	20821.296
Fisher Chemical	Xylène	X/0250/15

Tableau 9 : Références des réactifs et solutions utilisés pour la culture de cerveaux de souris

VI.2.b.ii. Conditions de culture

De manière semblable à la culture de neurones primaires (V.2 Neurones primaires de souris), la dissection a été réalisée avec du matériel stérile préalablement passé à l'autoclave, et la culture des cerveaux a été effectuée dans un environnement stérile de culture cellulaire. Les étapes d'injection et de suivi en microscopie n'ayant pas été réalisées dans des conditions stériles en raison du retrait du couvercle des plaques, le milieu de culture a été supplémenté en antibiotiques. La culture des cerveaux a été effectuée dans deux incubateurs (SANYO, MCO-19AIC) réglés à 37 et 28°C, sous atmosphère humide et à 5% de CO₂. En raison d'un problème technique, les expériences en condition hypothermique ont dû être effectuées à 30°C au lieu des 28°C initialement prévus.

Le milieu de culture a été préparé en ajoutant de la pénicilline streptomycine (2mL), du glucose (7,206mL) et du 2-mercaptoéthanol (200µL) à de l'OptiMEM (190,594mL). Le milieu supplémenté en sérum a été préparé en ajoutant du FBS (4mL) à la solution précédente, afin d'obtenir une solution à 2% de sérum.

VI.2.b.iii. Protocole expérimental

Les différentes étapes du protocole et le choix des paramètres expérimentaux seront discutés ultérieurement (VI.4.b Pistes d'amélioration).

◆ Prélèvement des cerveaux

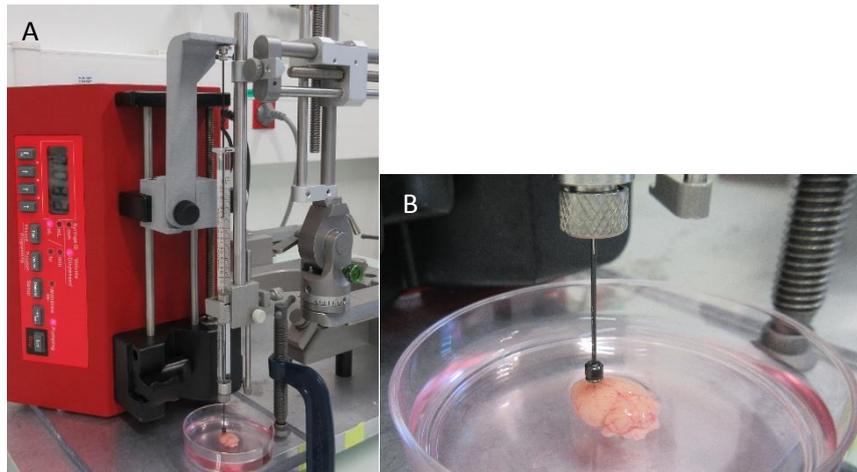
De manière similaire à la culture primaire de neurones de souris (V.2 Neurones primaires de souris 173), les expériences ont été approuvées par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation et par le Comité d'éthique en expérimentation animale de Grenoble. Les cultures ont été réalisées à partir d'embryons E17 prélevés sur des souris C57BL/6 J01aHsd gestantes (Envigo). Le protocole a été adapté à partir de celui de l'équipe de Rehen (Rehen et al., 2006), qui a étudié l'influence de différents facteurs de croissance sur la culture d'hémisphères cérébraux embryonnaires.

La souris gestante a été euthanasiée par dislocation cervicale, puis les cornes utérines contenant les sacs embryonnaires ont été prélevées et rincées avec une solution physiologique stérile (NaCl 0,9%). Les cerveaux embryonnaires ont été prélevés un à un, placés dans des boîtes de pétri contenant du milieu complet sans sérum et laissés à 37°C avant d'être injectés. Le cerveau de la femelle gestante a également été récupéré après l'euthanasie, et conservé à 37°C avant injection.

◆ Injection de cellules tumorales

En parallèle de la dissection, les cellules GL261 ont été récoltées et comptées. Ensuite, le culot cellulaire a été resuspendu dans un volume contenant 1/4 de Matrigel et 3/4 de PBS stérile, afin d'avoir une suspension cellulaire à une concentration de 200.10⁶ cellules/mL. Cette étape a été effectuée sur glace pour éviter la polymérisation du Matrigel. Pour l'injection, les cellules GL261 ont été prélevées avec une seringue Hamilton (2µL, 30G, modèle 7002 KH).

Pour les **cerveaux embryonnaires**, l'aiguille a été descendue en dorso-ventral à -0,5mm grâce à un cadre stéréotaxique. Les cerveaux ont été immobilisés dans leur boîte de pétri en retirant une partie du milieu juste avant l'injection, et un volume de 0,2µL correspondant à 40 000 cellules a été injecté à un débit de 0,1µL/minute à l'aide d'un pousse seringue automatisé (Figure 151). Après l'injection, l'aiguille a été laissée pendant 3 minutes afin d'éviter le reflux, puis remontée lentement.



A : Ensemble du dispositif d'injection ; B : injection dans l'hémisphère gauche d'un cerveau de souris adulte
Figure 151 : Dispositif expérimental d'injection de cellules tumorales dans des cerveaux de souris

Pour chaque cerveau, une unique injection a été réalisée dans l'hémisphère gauche, en laissant l'hémisphère droit en contrôle non injecté (Figure 152). Une fois injectés, les cerveaux ont été mis en culture dans des plaques 12-puits contenant 2mL de milieu complet supplémenté en sérum et de l'eau stérile autour, pour éviter l'évaporation du milieu. Ensuite, les plaques ont été placées pendant 2h30 à 37°C, puis certaines ont été déplacées à 30°C pour la condition hypothermique. Les cerveaux ont alors été maintenus en culture pendant 6 jours, sous agitation orbitale à 50rpm. Après 3 jours de culture, une partie du milieu de culture a été remplacée par du milieu neuf.

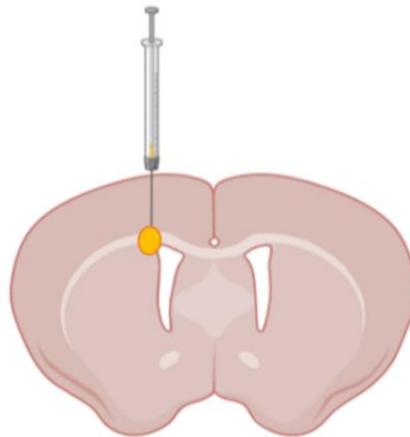


Figure 152 : Représentation schématique de l'injection intracérébrale de cellules tumorales en coupe coronale

Pour les **cerveaux adultes**, le protocole d'injection a été adapté, avec un volume de 0,4µL correspondant à 80 000 cellules qui ont été injectées à 2mm de profondeur, à un débit de 0,1µL/minute. Les cerveaux ont reçu deux injections dans l'hémisphère gauche, une postérieure et une antérieure. Ensuite, ils ont été mis en culture dans des plaques 6-puits contenant 8mL de milieu complet supplémenté en sérum et de l'eau stérile autour.

VI.2.b.iv. Traitement des cerveaux

◆ Fixation et congélation

Après 6 jours de culture, les cerveaux ont été photographiés puis fixés et imprégnés en sucrose. Pour cette étape, le PB (tampon phosphate) et le PBS (tampon phosphate salin) ont été fraîchement préparés au laboratoire dans les jours précédant la fixation. Pour le PB (0,1M), nous avons ajouté 1,31g de NaH_2PO_4 et 10,865g de Na_2HPO_4 dans 500mL d'eau distillée, en vérifiant que le pH était de 7,4. Pour le PBS (0,1M), nous avons ajouté 4,25g de NaCl à la solution précédente, et ajusté le pH à 7,4. Les solutions de sucrose 15% et 30% ont été préparées en ajoutant respectivement 6g et 12g de sucrose dans 40mL de PB.

Pour la fixation, chaque cerveau embryonnaire a été rincé 3 fois avec du PBS puis fixé dans du formaldéhyde à 4°C pendant 4h30 – ou 24h pour les cerveaux adultes. Après la fixation, il a été de nouveau rincé 3 fois pendant 1 minute avec du PBS à 4°C, puis placé dans une solution de sucrose 15% jusqu'à son imprégnation (3h en moyenne pour les cerveaux embryonnaires, et 24h pour les cerveaux adultes). Ensuite, il a été transféré dans une solution de sucrose 30% (1 nuit pour les cerveaux embryonnaires et 2 nuits pour les cerveaux adultes). Une fois fixé et imprégné en sucrose, chaque cerveau a été congelé dans de l'isopentane froid. Pour commencer, il a été plongé dans un bain d'eau distillée afin de dégorger après l'imprégnation sucrose, puis il a été délicatement essuyé et transféré dans un pot contenant de l'isopentane froid, entre -40°C et -30°C. Une fois congelé, il a été transféré dans des tubes eppendorf et stocké à -80°C.

◆ Coupes au cryostat

Avant d'être coupé, chaque cerveau a été transféré à -20°C afin d'homogénéiser sa température. Les coupes ont été réalisées à l'aide d'un microtome cryostat, qui permet de faire des coupes d'épaisseur homogène dans une chambre thermostatée. La température de la chambre a été fixée à -22°C et la température du porte-objet à -19°C. Le cerveau a été fixé sur le porte-objet suivant une orientation antéro-postérieur, à l'aide d'un milieu d'inclusion (Tissue-Tek® O.C.T.™).

Les coupes tissulaires ont été réalisées de façon manuelle, avec une épaisseur de 25µm pour les cerveaux embryonnaires et 20µm pour les cerveaux adultes. Les coupes ont été successivement déposées sur des lames de microscopie en verre, puis stockées à -20°C avant leur coloration.

◆ Coloration hématoxyline éosine

Une fois déposées sur lame, les coupes tissulaires ont été colorées afin de mettre en évidence les différents constituants cellulaires, notamment les cellules tumorales injectées. Nous avons choisi de réaliser une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) car elle permet à la fois de colorer les noyaux et le cytoplasme.

Concernant la préparation des solutions, l'hématoxyline a été filtrée puis complétée avec de l'acide acétique glacial (15mL/L), le tout dans l'obscurité. La solution de différenciation a été préparée en ajoutant de l'acide chlorhydrique à 0,5% dans de l'éthanol 70%. La solution de bleuissage a été préparée en ajoutant de l'ammoniaque à 0,25% dans de l'eau distillée. Tous les rinçages ont été effectués avec de l'eau distillée pendant 1 minute, sauf mention contraire.

Pour la coloration, les coupes tissulaires montées sur lames ont d'abord été rincées pendant 2 minutes à l'eau distillée, puis colorées à l'hématoxyline pendant 4 minutes dans l'obscurité. Après un rinçage, elles ont été placées pendant 30 secondes dans une solution de différenciation, puis à nouveau rincées et placées pendant 45 secondes dans une solution de bleuissage. Après un nouveau rinçage, elles ont été colorées par l'éosine pendant 45 secondes. Après un rinçage de quelques secondes, les coupes ont été déshydratées à l'éthanol 95% pendant 1 minute, puis dans deux bains d'éthanol 100% successifs pendant 1 minute. Enfin, elles ont été nettoyées avec du xylène pendant deux bains de 2 minutes, et montées avec des lamelles couvre-objet à l'aide du milieu de montage Eukitt.

◆ Analyses

Une fois sèches, les lames ont été observées avec un microscope à fond clair (Olympus BX53). Après avoir repéré le site d'injection, toutes les coupes comportant des cellules tumorales ont été imagées, à l'aide du logiciel Cell Sens. Ensuite, l'étendue de la masse tumorale a été mesurée sur chaque coupe à l'aide du logiciel Image J (1.53a, National Institutes of Health, USA), puis le volume tumoral a été calculé pour chaque échantillon en utilisant Microsoft Excel.

VI.3. Résultats

VI.3.a. Preuve de concept *ex vivo*

VI.3.a.i. Mise en culture des cerveaux

Nous sommes parvenus à maintenir les cerveaux en culture pendant 6 jours à 37°C. Pour les cerveaux embryonnaires, nous avons observé une disparition de la vascularisation dès 3 jours de culture à 37°C, avec aucune différence visible entre 3 et 6 jours (Figure 153).

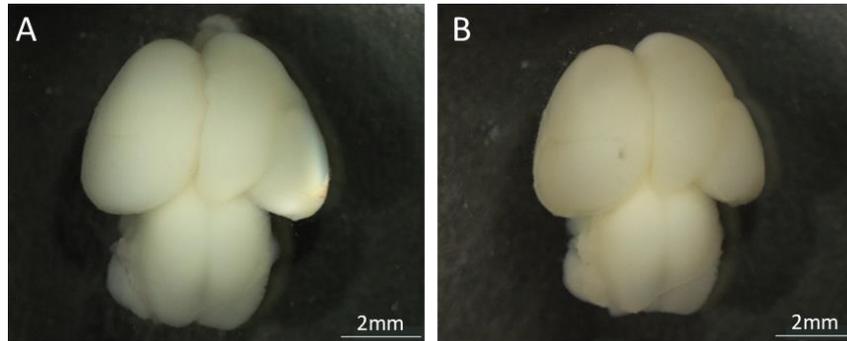


Figure 153 : Cerveau embryonnaire de souris maintenu en culture *ex vivo* à 37°C pendant 3 jours (A) et 6 jours (B)

Pour les cerveaux adultes, nous avons observé une diminution de la vascularisation après 3 jours de culture, et une disparition après 6 jours (Figure 154).

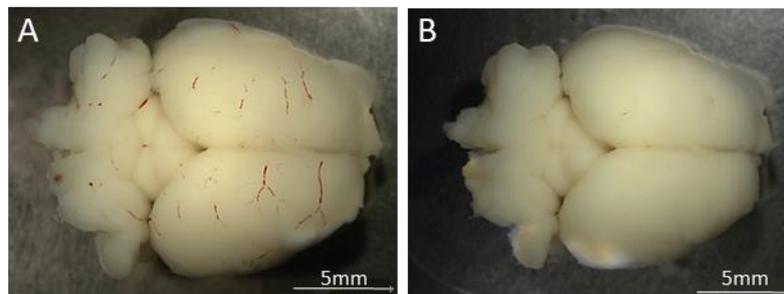


Figure 154 : Cerveau de souris adulte maintenu pendant 3 jours (A) et 6 jours (B) en culture *ex vivo* à 37°C

VI.3.a.ii. Suivi des cellules tumorales

Nous sommes également parvenus à réaliser des analyses histologiques permettant de distinguer les différents composants tissulaires des cerveaux embryonnaires (Figure 155) et adultes de souris, après une culture de 6 jours.

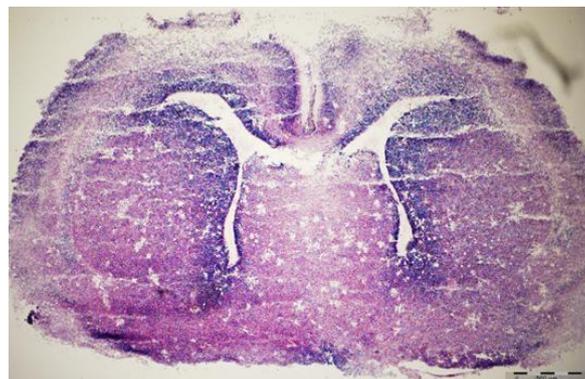


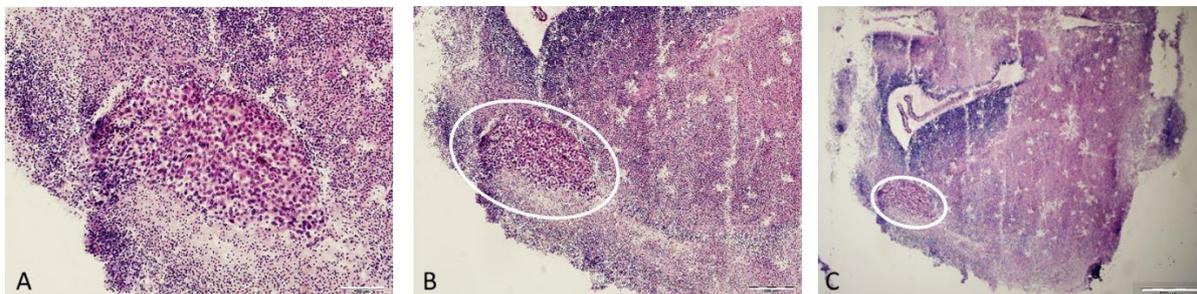
Figure 155 : Coupe coronale de cerveau embryonnaire de souris après 6 jours de culture à 37°C, barre d'échelle : 500µm

Ces images nous ont permis de valider notre preuve de concept concernant la culture *ex vivo* de cerveaux embryonnaires de souris, mais surtout de suivre la distribution des cellules tumorales injectées, puis la formation de masses tumorales dans les cerveaux (Figure 156).



Figure 156 : Cellules tumorales dans l'hémisphère gauche d'un cerveau embryonnaire de souris, barre d'échelle : 500 μ m

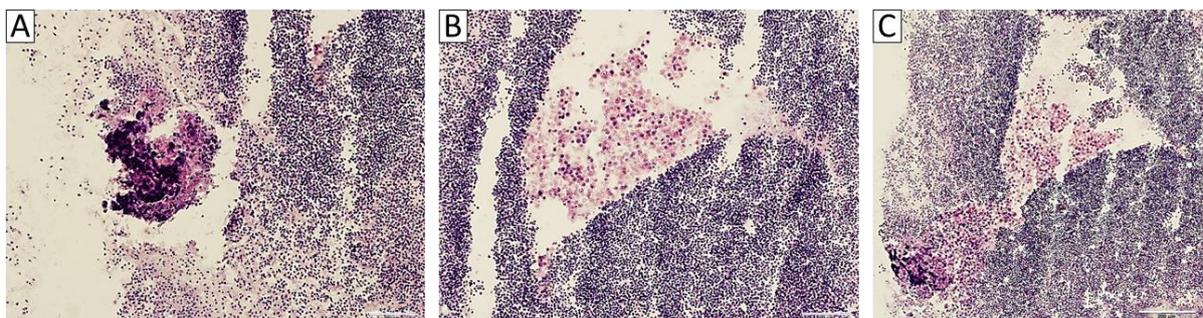
Nous avons en effet observé la présence d'amas de cellules tumorales dans les cerveaux, pouvant se situer en profondeur, dans le parenchyme ou dans le ventricule, ou bien en surface. Les cellules tumorales ont été identifiées de par leur taille plus importante, leur morphologie et leur coloration plus marquée. Nous avons pu valider les paramètres d'injection en observant une masse tumorale localisée et clairement identifiable (Figure 157A), et recouvrant une petite partie de l'hémisphère (Figure 157B et Figure 157C).



Barres d'échelle : A : 100 μ m, B : 200 μ m, C : 500 μ m

Figure 157 : Surface occupée par les cellules tumorales dans un cerveau embryonnaire de souris

Nous avons parfois observé la présence de deux masses distinctes, l'une se formant en surface (Figure 158A), et l'autre en profondeur (Figure 158B), finissant par se rejoindre pour former un seul amas de cellules tumorales (Figure 158C).



Barres d'échelle : A et B : 100 μ m, C : 200 μ m

Figure 158 : Évolution de deux masses tumorales situées en surface (A) et en profondeur (B) et finissant par se rejoindre (C)

De plus, nous avons pu observer certaines propriétés caractéristiques des cellules tumorales, notamment leur invasivité. Nous avons notamment suivi l'évolution de cellules initialement injectées dans le ventricule (Figure 159A), qui ont migré dans le parenchyme (Figure 159B) et proliféré pour former une masse unique, altérant au passage le tissu cérébral (Figure 159C).

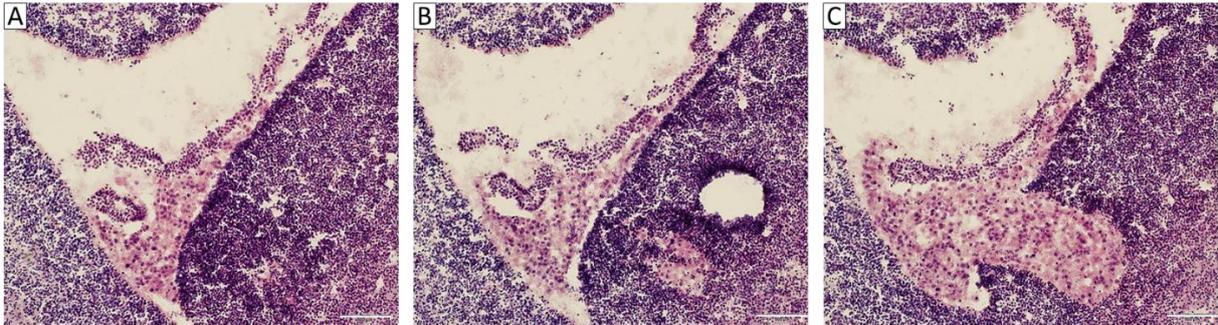


Figure 159 : Invasion du parenchyme cérébral par des cellules tumorales situées dans le ventricule, barre d'échelle : 100µm

VI.3.b. Influence de l'hypothermie

VI.3.b.i. Effets de l'hypothermie sur le tissu cérébral

◆ Vascularisation des cerveaux

Nous avons ensuite étudié les effets de l'hypothermie sur le tissu cérébral, et montré que la température de culture avait une incidence sur la vascularisation cérébrale, avec une conservation des vaisseaux à 30°C par rapport à 37°C, tant sur les cerveaux embryonnaires (Figure 160) que les cerveaux adultes (Figure 161). Ce résultat pourrait probablement être expliqué par les propriétés vasoconstrictrices de l'hypothermie.

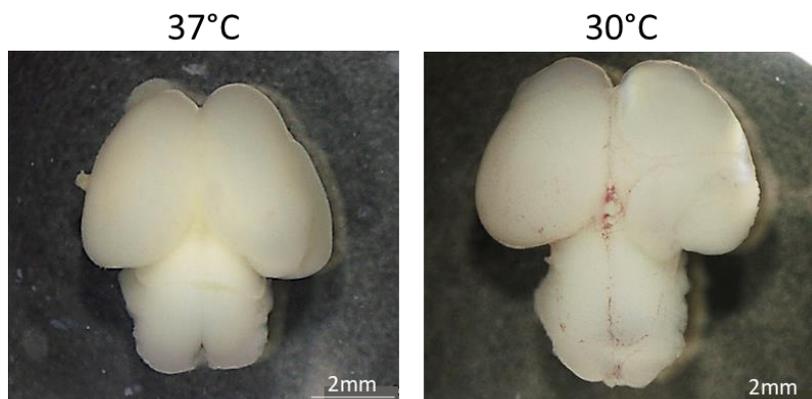


Figure 160 : Effets de l'hypothermie sur la vascularisation de cerveaux embryonnaires de souris après 6 jours de culture

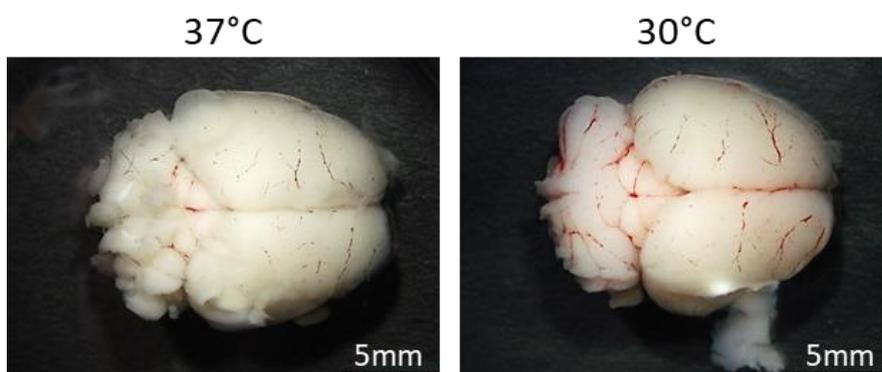


Figure 161 : Effets de l'hypothermie sur la vascularisation de cerveaux de souris après 2 jours de culture

◆ Morphologie des cerveaux

Nous avons également montré que l’hypothermie induisait une modification de la structure des cerveaux pendant la culture, se traduisant par une dilatation des tissus et un gonflement apparent. Pour quantifier ces résultats, nous avons mesuré la longueur selon l’axe antéro-postérieur et la largeur dans le plan latéral de 10 cerveaux embryonnaires – 5 par condition – mis en culture à 37°C (Ctrl) et à 30°C (HT). Notre étude a montré que l’hypothermie modérée induisait une augmentation significative de 13% de la longueur des cerveaux embryonnaires (Figure 162A ; $p = 0,0014$) et de 13% de leur largeur (Figure 162B ; $p < 0,001$). Nous avons également observé une absorption du milieu de culture par les cerveaux, entraînant une altération des structures. Cette modification pourrait être liée à une dissolution des jonctions intracellulaires après la mise en hypothermie, qui rendrait les tissus plus sensibles à l’imprégnation. Le gonflement apparent pourrait quant à lui être attribué à un affaissement des cerveaux suite à l’altération des tissus, et des expériences complémentaires devront confirmer ce résultat.

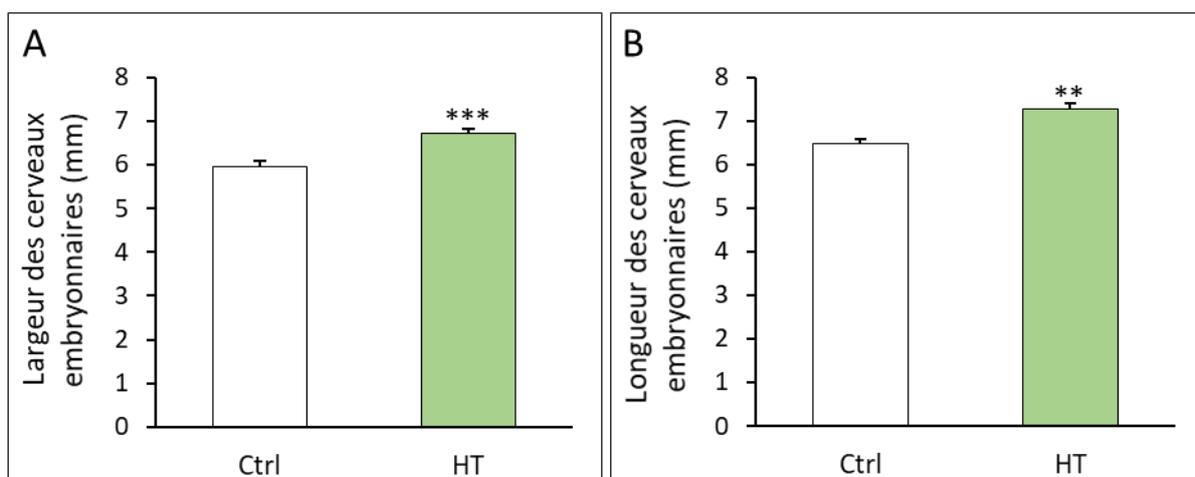


Figure 162 : Influence de la température de culture sur la taille des cerveaux embryonnaires

◆ Coloration des tissus

Concernant les effets de l’hypothermie sur les tissus, nous avons observé une coloration moins intense – notamment du cytoplasme par l’éosine – pour les cerveaux placés en culture à 30°C par rapport à 37°C (Figure 163), indiquant une certaine détérioration par l’hypothermie. Ce résultat pourrait être expliqué par une diminution de la synthèse protéique induite par l’hypothermie, résultant en un contenu cytoplasmique moins riche à 30°C par rapport à 37°C.

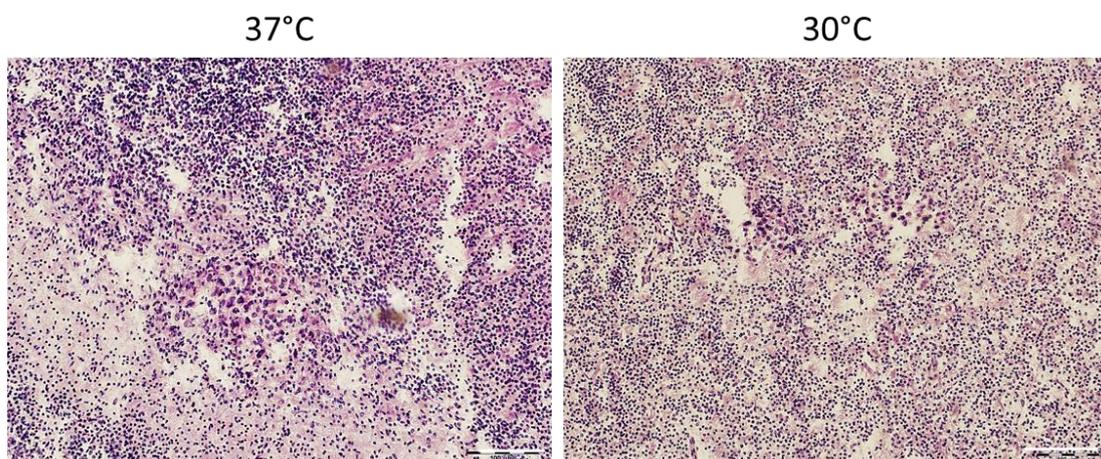


Figure 163 : Influence de la température de culture sur le tissu cérébral d’embryons de souris, barre d’échelle : 100µm

VI.3.b.ii. Effets de l'hypothermie sur la croissance tumorale

Nous avons également étudié les effets de l'hypothermie sur le développement des masses tumorales. Pour une majorité de cerveaux, les cellules tumorales se sont bien développées à 37°C comme à 30°C, formant des masses de forme ellipsoïdale (Figure 164).

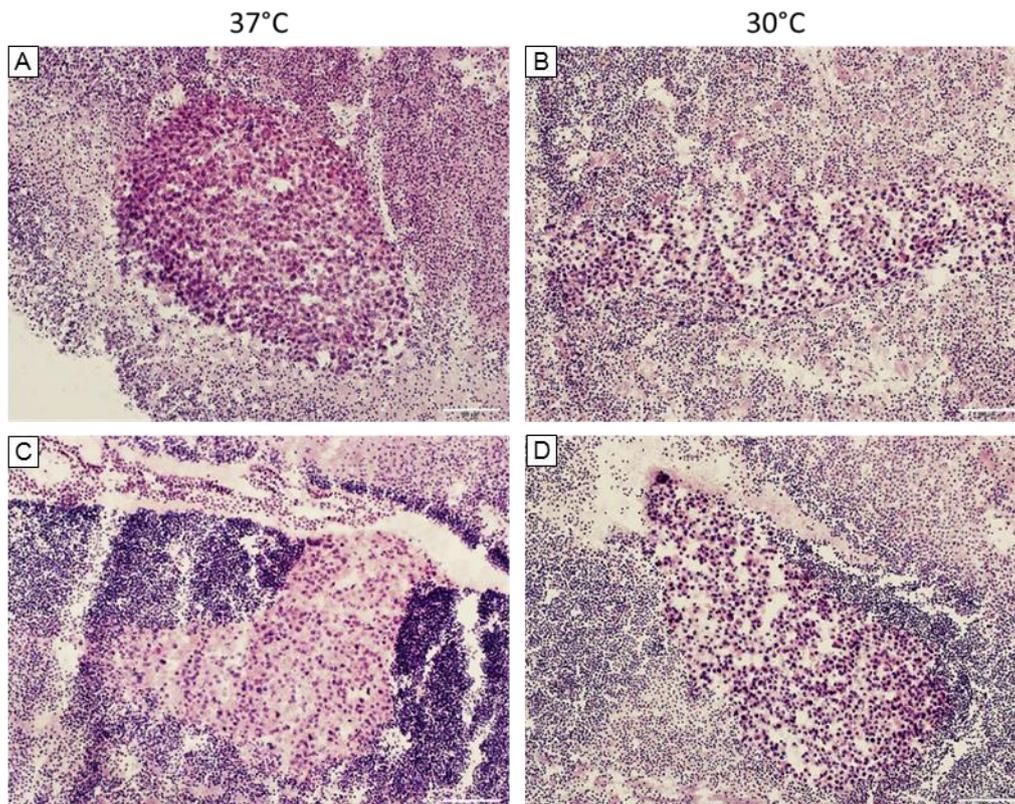


Figure 164 : Influence de l'hypothermie sur la progression de cellules tumorales dans un cerveau embryonnaire de souris, barre d'échelle : 100µm

Ces images confirment les observations faites précédemment (VI.3.b.i Effets de l'hypothermie sur le tissu cérébral) et mettent en évidence un gonflement des cerveaux placés en condition hypothermique, se traduisant notamment par une dilatation des tissus au niveau de la masse tumorale. En effet, bien que leur volume soit inchangé, les cellules semblent plus éloignées les unes des autres (Figure 164B et Figure 164D).

Après avoir optimisé les différents paramètres d'injection et de culture, nous avons réalisé plusieurs expériences en injectant une suspension cellulaire contenant 40 000 cellules GL261 dans un mélange de PBS et de Matrigel 25% dans l'hémisphère gauche de cerveaux embryonnaires (E17) de souris. Les cerveaux ont été maintenus en culture pendant 6 jours à 37°C et à 30°C. Nous avons alors quantifié les résultats obtenus lors de deux cultures différentes, provenant de quatre souris gestantes, avec 20 cerveaux embryonnaires dont 10 dans chaque condition. Comme décrit précédemment, nous avons mesuré les surfaces S couvertes par les cellules tumorales à l'aide d'un logiciel de traitement d'image et en avons déduit le volume V tumoral, correspondant à une approximation du volume occupé par les cellules GL261 dans chaque cerveau embryonnaire ($V = S \cdot e$, avec e l'épaisseur de coupe, équivalente à 25µm). Les résultats ont montré que l'hypothermie modérée (30°C) induisait une légère diminution non significative de 4% du volume tumoral (Figure 165 ; $p > 0,05$).

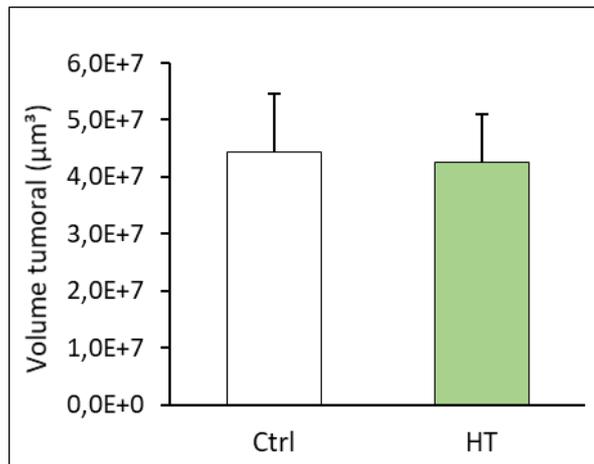


Figure 165 : Influence de la température de culture sur le volume de la masse tumorale

Afin d'obtenir davantage d'informations sur le développement des cellules tumorales, nous avons défini la dimension de la masse tumorale selon l'axe antéro-postérieur comme étant la distance sur laquelle nous avons pu observer des cellules GL261. Les résultats ont montré une légère augmentation non significative de 11% (Figure 166A ; $p > 0,05$), pouvant être expliquée par l'élongation des tissus décrite précédemment. Enfin, nous avons choisi de comparer l'étendue des masses tumorales observées sur les coupes coronales, en choisissant la surface maximale pour chaque cerveau embryonnaire. La quantification des données a montré que l'hypothermie modérée induisait une diminution non significative de 11% de l'étendue des masses tumorales dans le plan latéral (Figure 166B ; $p > 0,05$).

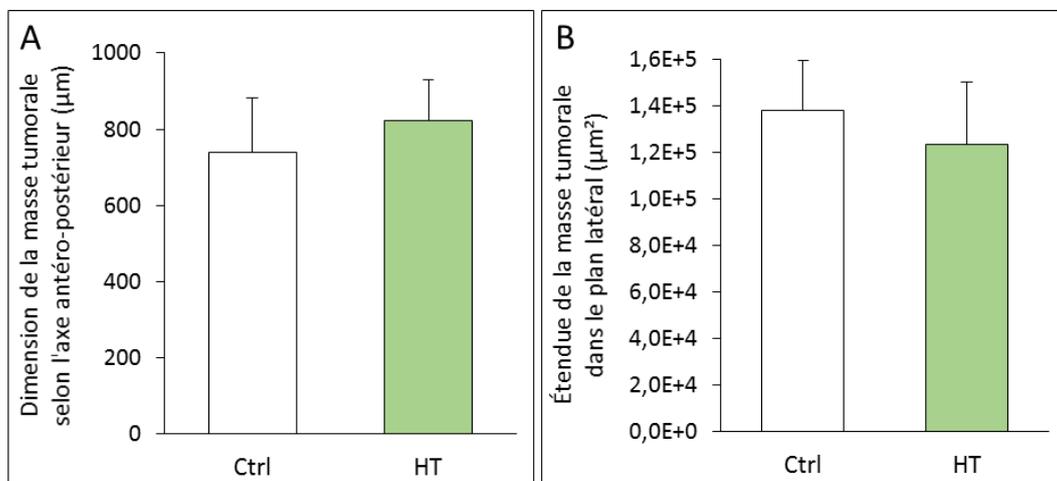


Figure 166 : Influence de l'hypothermie sur l'étendue des masses tumorales

Nous avons également étudié les effets de l'hypothermie sur la croissance tumorale en fonction du site d'injection, qu'il soit parenchymateux ou ventriculaire, mais les résultats n'ont pas permis d'observer de différences entre les deux conditions de culture. Nos observations menées sur l'ensemble des cultures tendent à indiquer un plus grand nombre de cellules tumorales ainsi que de masses tumorales nettement identifiables à 37°C plutôt qu'à 30°C. En effet, pour un grand nombre de cerveaux embryonnaires mis en culture en condition hypothermique, nous avons éprouvé des difficultés à discerner les cellules tumorales du tissu cérébral. Ces difficultés peuvent être expliquées par une légère détérioration des tissus limitant l'identification des différents types cellulaires et par des erreurs d'orientation des cerveaux au moment des coupes. Une autre explication pourrait être la moins bonne prise des masses tumorales en hypothermie plutôt qu'en condition normothermique.

Pour les cerveaux des souris femelles gestantes, nous sommes également parvenus à les mettre en culture et à observer la formation de masses tumorales (Figure 167). Cependant, les paramètres d'injection ont été modifiés entre les différentes cultures pour permettre la mise au point du protocole expérimental, et les masses tumorales ont été très différentes en fonction des souris. De ce fait, la quantification des résultats n'a pas permis d'obtenir des données exploitables. Nous avons observé une légère augmentation non significative du volume tumoral en condition hypothermique, qui devra être confirmée ou non par de futures expériences.

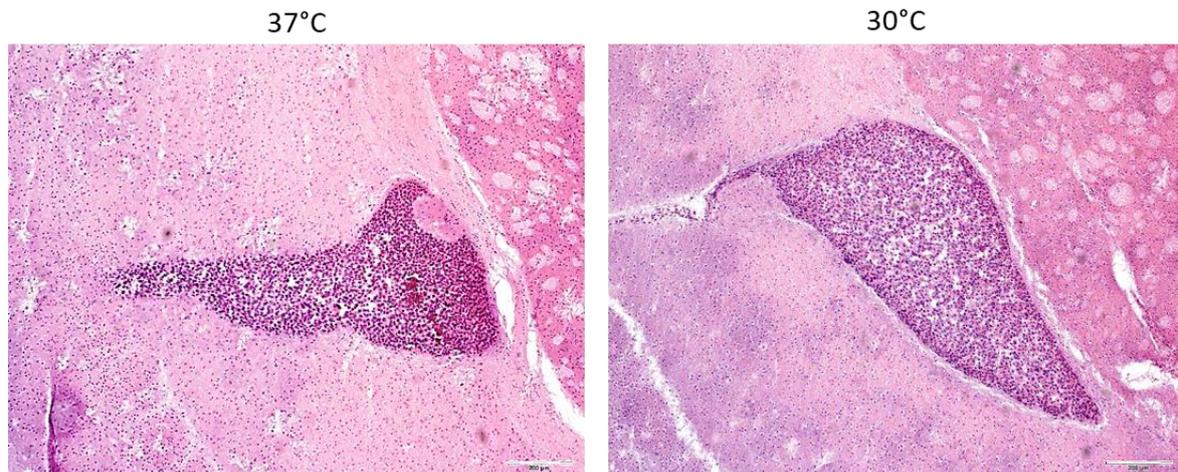


Figure 167 : Cellules tumorales dans un cerveau de souris en fonction de la température de culture, barre d'échelle : 200 μ m

VI.4. Discussion

VI.4.a. Mise au point du protocole

Nous n'avons pas trouvé de document décrivant la mise en culture de cerveaux de souris pendant plusieurs jours, et nous nous sommes alors basés sur le protocole de l'équipe de Rehen (Rehen et al., 2006), notamment pour la préparation des milieux. Cependant, cette étude prévoit uniquement la mise en culture d'hémisphères cérébraux – et non de cerveaux entiers – pour une durée de 24 heures, insuffisante pour le développement tumoral que nous souhaitons étudier. De plus, elle avait pour objectif d'analyser l'influence de différents facteurs de croissance solubles dans le milieu sur les hémisphères cérébraux, et non d'étudier une quelconque progression tumorale. Nous avons rencontré plusieurs difficultés tout au long de la mise au point de ce protocole de culture innovant, mais sommes finalement parvenus à maintenir des cerveaux de souris en culture pendant 6 jours à différentes températures, puis à réaliser des analyses histologiques.

VI.4.a.i. Injection de cellules tumorales

◆ Suspension cellulaire

Nous avons d'abord dû optimiser le nombre de cellules à injecter, puisqu'un nombre trop important de cellules pourrait former des amas ou occuper un volume trop important dans le cerveau, et un nombre trop faible pourrait être insuffisant pour former une masse tumorale. Nous avons successivement expérimenté l'injection de 5 000, 10 000, 20 000 et 40 000 cellules pour les cerveaux embryonnaires, et 20 000, 40 000 et 80 000 cellules pour les cerveaux adultes, et avons décidé de conserver la valeur la plus haute, correspondant à 200 000 cellules/ μL .

Afin d'optimiser la formation d'une masse tumorale, nous avons mélangé les cellules avec du Matrigel, permettant de les lier davantage entre elles. Nos études ont montré que l'utilisation de Matrigel à une concentration de 25% était préférable, puisqu'une concentration de 50% pouvait altérer la fluidité de la suspension cellulaire à injecter, et les cellules sans Matrigel avaient plus de difficultés à former une masse.

◆ Débit

Afin d'injecter les cellules le plus lentement possible et ne pas abimer les structures cérébrales, nous avons commencé par palliers, en injectant manuellement 1/4 du volume toutes les minutes. Cependant, cette procédure était peu reproductible, et nous avons alors mis en place un système d'injection automatisée, en adaptant un pousse-seringue automatisé à une seringue Hamilton grâce à une pièce fabriquée en impression 3D. Nous avons choisi un débit de 0,1 μL /minute, afin d'induire le moins de dommages possibles dans les tissus.

◆ Volume

Pour le volume, nous avons commencé par injecter 1 μL de suspension cellulaire par cerveau embryonnaire, et avons finalement choisi un volume de 0,2 μL , plus adapté à la taille des embryons (entre 4 et 5mm de long en moyenne). Les cerveaux adultes étant plus développés et de plus grande taille, nous avons choisi d'injecter un volume de 0,4 μL . L'aiguille a été vidée et de nouveau remplie avec la suspension cellulaire toutes les deux injections, afin d'éviter de perdre trop de cellules. Cependant, il est possible que ce choix ait entraîné une légère différence entre la première et la deuxième injection.

◆ Localisation

Etant donné la petite taille et la variabilité entre les cerveaux, nous n'avons pas pu mesurer précisément les coordonnées d'injection. Pour certaines cultures, les injections ont principalement été réalisées dans le ventricule, pouvant entraîner une dispersion des cellules dans le reste du cerveau. Par la suite, les cellules ont été davantage injectées dans le parenchyme. Nous avons également évalué différentes profondeurs d'injection, et constaté que les injections effectuées à 1,5mm et 1mm de profondeur étaient trop profondes pour les cerveaux embryonnaires, et avons donc choisi 0,5mm. Pour les cerveaux adultes, nous avons observé qu'une profondeur de 1mm n'était pas suffisante, et avons choisi 2mm.

Afin de s'assurer que les cellules étaient bien injectées dans le tissu et qu'elles ne se dispersaient pas dans le milieu, nous avons effectué plusieurs tests de vérification au préalable. D'abord, nous avons mélangé la suspension cellulaire avec du bleu de trypan afin d'observer à l'œil nu sa propagation après l'injection intracérébrale, et avons montré qu'elle restait localisée. Ensuite, nous avons souhaité étudier les milieux de culture récupérés après l'injection des cellules tumorales. Nous les avons mis en culture dans des conditions optimales pour la croissance de cellules tumorales, afin de maximiser les chances de faire proliférer les éventuelles cellules GL261 qu'ils contiendraient. Nous avons maintenu la culture pendant plusieurs semaines et n'avons pas observé de cellules tumorales. Ces deux étapes de vérification nous ont ainsi permis de montrer que les cellules tumorales restaient localisées dans les cerveaux après l'injection.

◆ Retrait de l'aiguille

Dans les premières cultures, nous n'avons pas attendu entre la fin de l'injection et le retrait de l'aiguille, ce qui a pu entraîner un reflux et une diminution de la reproductibilité entre les expériences. Bien que l'injection soit lente et contrôlée, nous avons choisi d'attendre 3 minutes à la fin de chaque injection avant de retirer délicatement l'aiguille, afin d'éviter ce potentiel reflux.

VI.4.a.ii. Mise en culture des cerveaux

Nous avons d'abord réalisé nos expériences avec des embryons au stade E16, et avons ensuite choisi des embryons au stade E17 puisque nos expériences ont montré que les cerveaux se détérioraient davantage lorsqu'ils étaient petits. L'agitation orbitale a d'abord été réglée sur 70 rpm en suivant les directives du protocole de Rehen (Rehen et al., 2006), mais cette vitesse était trop élevée pour nos cerveaux et aurait risqué de les endommager. Nous avons alors choisi une agitation de 50 rpm, qui a permis de nourrir les cerveaux tout en préservant leur structure. Enfin, nous avons rencontré des difficultés concernant le maintien et la stabilité de la température de culture en condition hypothermique. En effet, nous avons été contraints d'utiliser un incubateur (SANYO, MCO-19AIC) en raison d'une défaillance prolongée de l'enceinte climatique prévue à cet effet. Ce type d'appareil supporte habituellement une consigne de 28°C, mais l'utilisation d'un agitateur orbital a induit une augmentation moyenne de la température de 2°C, passant alors à 30°C (29,8°C – 30,1°C), avec des variations pouvant atteindre 31°C. Cette instabilité a pu altérer la qualité de nos résultats, et certains effets ont pu être minimisés par un niveau d'hypothermie plus léger que prévu.

En raison de la Covid-19, plusieurs expériences ont dû être arrêtées et modifiées. De plus, nous avons rencontré certains problèmes de livraison, avec des embryons à E10 environ (inexploitables) ou l'annulation de carboglace compromettant le bon déroulement du protocole de congélation.

VI.4.a.iii. Traitement des cerveaux

◆ Fixation et congélation

La fragilité des cerveaux embryonnaires a été la principale difficulté pour parvenir à effectuer des analyses histologiques de qualité. D'une part, la mise en culture des cerveaux a altéré certaines de leurs structures, et ils se sont imbibés de milieu de culture, leur ôtant parfois toute consistance, alors plus proche de l'état liquide que solide. De par leur taille, les cerveaux étaient d'autant plus fragiles, et ne pouvaient être manipulés sans dommages. Nous avons d'abord fixé puis congelé les cerveaux embryonnaires selon un protocole classique adapté des expériences *in vivo*, mais les cerveaux ont été fortement endommagés par ces étapes, notamment la fixation. Nous avons alors congelé les cerveaux directement après la culture pour éviter de les manipuler lors de la fixation. En plus de perdre leur forme, les cerveaux ont été abimés par la congélation, avec un effritement manifeste du tissu lors de la coupe après une congélation sur vapeur d'azote, et la présence d'une coque de glace autour du cerveau après une congélation dans de l'isopentane. Nous avons alors décidé de rétablir une fixation des tissus, permettant de consolider les structures et de les manipuler lors de la congélation, en réduisant les durées du protocole classique pour s'adapter à leur taille. Ensuite, nous avons ajouté des étapes d'imprégnation en sucrose, permettant de déshydrater progressivement les tissus, alors mieux conservés lors de la congélation. Après l'imprégnation en sucrose, les cerveaux ont dû être rincés pour éviter la formation d'une coque de sucrose cristallisé lors de la congélation. Cependant, lorsque les cerveaux n'ont pas été essuyés après ce rinçage, la présence d'eau résiduelle a entraîné l'éclatement de certaines structures et la formation de stries lors des coupes, et un essuyage délicat de la surface des tissus a entraîné une perte de matière. Nous avons finalement trouvé un compromis en retirant l'excédent d'eau sur le support, sans jamais être en contact direct avec le cerveau.

Pour la congélation, nous avons préférentiellement choisi l'isopentane à la vapeur d'azote car cette méthode était plus rapide, évitant ainsi que l'eau contenue dans le tissu n'ait le temps de le déformer. Tout le matériel utilisé lors de cette étape a été placé dans de la carboglace à -80°C afin d'éviter tout réchauffement des cerveaux.

◆ Coupes au cryostat

Avant d'être coupés avec un cryostat, les cerveaux ont dû être fixés sur un porte-objet grâce à un milieu d'inclusion (Tissue-Tek®), qui est liquide à température ambiante et se solidifie au froid. Nous avons essayé de fixer nos échantillons dans un minimum de milieu d'inclusion possible afin d'éviter leur réchauffement à son contact, mais ils ont parfois été fragilisés par cette étape. Les difficultés rencontrées lors de la congélation se sont retrouvées lors de cette étape, avec un écrasement des coupes ou un tissu pas assez dur pour être coupé. Enfin, la contrainte majeure rencontrée lors de cette étape a été la difficulté d'orientation des cerveaux pour la coupe. En effet, pour certains cerveaux, leur aspect après congélation ne permettait pas de différencier les différentes structures ou hémisphères. Concernant les coupes elles-mêmes, nous avons d'abord choisi une épaisseur de 35µm car les coupes plus fines se déchiraient. Après avoir obtenu un tissu plus homogène grâce à l'optimisation des différentes étapes, nous avons finalement pu couper les cerveaux embryonnaires à 25µm d'épaisseur et les cerveaux adultes à 20µm.

◆ Analyses

Nous avons d'abord envisagé de compter le nombre de cellules tumorales sur les différentes coupes afin de comparer les deux températures. Cependant, l'ampleur des masses tumorales a rendu l'exercice compliqué, en raison de leur étalement sur un nombre de coupes trop important (pouvant aller jusqu'à 80) et du nombre de cellules sur chaque coupe (Figure 168).

De plus, l'organisation des structures a parfois rendu difficile l'individualisation des cellules, notamment pour les masses situées près de la surface ou dans les ventricules (Figure 169).

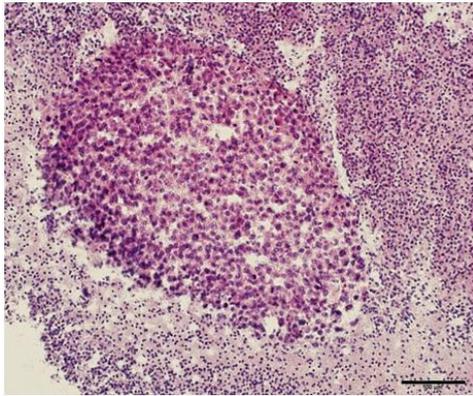


Figure 168 : Exemple de masse tumorale avec un grand nombre de cellules, barre d'échelle : 100µm

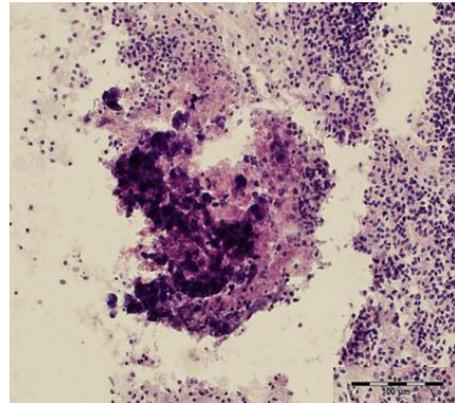


Figure 169 : Exemple de masse tumorale difficile à dénombrer, barre d'échelle : 100µm

Pour ces raisons, nous avons décidé de quantifier nos résultats en mesurant la surface occupée par les cellules tumorales sur chaque coupe. Nous avons ensuite assemblé les données afin d'estimer le volume tumoral associé à chaque injection. Cette méthode nous a permis de quantifier nos résultats, mais pourrait encore être optimisée ou modifiée, car le contour des masses tumorales a parfois été difficile à délimiter (Figure 170).

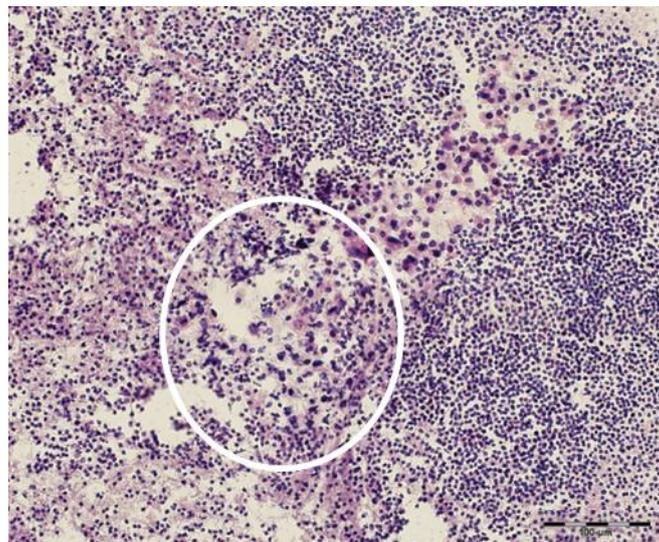


Figure 170 : Exemple de masse tumorale avec un contour difficile à délimiter, barre d'échelle : 100µm

VI.4.b. Pistes d'amélioration

Cette étude est, à notre connaissance, la première étude *ex vivo* montrant la mise en culture de cerveaux embryonnaires et adultes de souris pendant plusieurs jours. Ce protocole nous a permis d'obtenir des premiers résultats concernant l'influence d'une hypothermie modérée sur le tissu cérébral. Nous avons notamment démontré que l'hypothermie préservait la vascularisation cérébrale, probablement en raison de ses propriétés vasoconstrictrices, et qu'elle induisait un probable gonflement des cerveaux.

Par la suite, nous avons injecté des cellules tumorales provenant de gliome murin dans l'hémisphère cérébral gauche de cerveaux embryonnaires de souris. Nous avons alors étudié la prolifération ainsi que la migration de ces cellules en fonction de la température de culture.

Les analyses histologiques ont montré que les cellules tumorales se développaient dans les deux conditions de culture, à 37°C comme à 30°C, avec une légère diminution du volume tumoral en hypothermie. Cependant, aucune différence significative n'a été démontrée entre les deux conditions. En considérant le gonflement des cerveaux en hypothermie, qui a pu induire une augmentation du volume tumoral mesuré, l'hypothermie pourrait avoir inhibé la croissance tumorale, bien que ces résultats soient à confirmer par des expériences supplémentaires.

Nous avons réfléchi à différentes perspectives d'amélioration pour cette étude, afin d'obtenir des résultats plus reproductibles. Déjà, les expériences pourraient être répétées avec les derniers paramètres optimisés, notamment sur les cerveaux adultes, permettant un plus grand nombre d'échantillons pour le traitement des données. De plus, la suspension cellulaire pourrait être renouvelée entre chaque injection, pour améliorer la répétabilité entre deux injections. Concernant l'injection elle-même, l'aiguille pourrait être insérée quelques millimètres plus bas puis remontée pour l'injection, permettant de diminuer encore les risques de reflux. Nous avons choisi de n'injecter qu'un seul des deux hémisphères cérébraux pour avoir un contrôle propre à chaque cerveau, mais nous pourrions envisager deux injections symétriques dans chaque hémisphère, permettant d'augmenter le nombre de données tout en conservant un nombre restreint d'animaux, mais aussi d'estimer au mieux la répétabilité entre les injections.

Pour diminuer davantage la variabilité inter-cerveaux, la localisation de l'injection pourrait également être optimisée, en évitant l'injection ventriculaire d'une part, et en envisageant une injection basée sur des coordonnées précises. Pour cela, un développement technologique pourrait permettre de fabriquer un support pour les cerveaux, permettant de les maintenir précisément lors de l'injection, tout en conservant une certaine perfusion par le milieu. Par exemple, le développement d'un support souple réalisé dans un matériau poreux, et fabriqué selon plusieurs tailles pour s'adapter à chaque cerveau pourrait permettre d'améliorer la qualité de l'étude. Ce support pourrait alors être inséré dans un socle gradué avec des coordonnées millimétrées, qui pourrait à la fois permettre de définir précisément le site d'injection à l'aide du cadre stéréotaxique, et de limiter le gonflement des cerveaux en hypothermie, afin de mieux comparer les conditions entre elles.

Concernant les paramètres de culture, des durées plus courtes pourront être envisagées pour éviter la détérioration des tissus, si elles permettent toujours d'observer une évolution des cellules tumorales. Au contraire, des durées plus longues pourront être envisagées pour permettre de voir des différences entre les deux conditions de culture, si elles n'altèrent pas davantage l'état des tissus. Enfin, le maintien d'une température stable de 28°C tout au long de la culture est primordial pour la condition hypothermique. De plus, si aucune différence significative n'est observée, des températures plus faibles pourront être étudiées, telles qu'une hypothermie sévère de 25°C.

Chapitre VII

Dispositif implantable de refroidissement

En parallèle des études expérimentales, un travail a été réalisé autour du développement d'un dispositif implantable de refroidissement localisé. En effet, si les effets thérapeutiques de l'hypothermie ont été démontrés pour le traitement des tumeurs cérébrales il y a bientôt 80 ans, aucune solution concrète n'a été mise au point, probablement en raison de nombreux verrous technologiques. Ainsi, nous proposons une solution permettant de répondre aux critères cliniques et technologiques tout en préservant la qualité de vie du patient.

Ces travaux ont mené au dépôt par le CEA d'un brevet d'invention intitulé « Dispositif de refroidissement localisé » le 10/12/2020, sous le numéro de dépôt FR2012954 (Publications et communications). Le concept du dispositif a été apporté par David Ratel (inventeur), et une première version a été élaborée avec l'aide de Quentin Borntrager (inventeur). Ce travail a été appuyé par le Dr. Andréa Desagneaux (CHU) et le Pr. Stéphan Chabardès (CHU, Clinatec) pour la définition précise des contraintes médicales, et par Hervé Lemonnier (CEA) pour la réalisation des simulations thermiques nécessaires au dimensionnement. Concernant la rédaction du document, l'étude d'antériorité et les aspects biologiques et médicaux ont été définis par la doctorante, qui a également participé à l'élaboration de la solution finale (rédactrice, inventrice principale). Claude Chabrol (rédacteur, inventeur principal) a complété la première version envisagée, et a mis au point l'ensemble des solutions techniques proposées dans l'invention finale, avec un travail de conception, de dimensionnement, d'assemblage et la réalisation des schémas de principe.

VII.1. Contexte

VII.1.a. Résultats préliminaires

VII.1.a.i. Effets anti-tumoraux de l'hypothermie

Les données expérimentales acquises durant cette thèse ont permis de confirmer l'hypothèse que l'hypothermie modérée pouvait inhiber le développement de cellules de glioblastome, notamment en bloquant leur prolifération et en réduisant leur migration. Ces études ont également permis de montrer que les effets de l'hypothermie persistaient après un retour à 37°C, et que l'hypothermie modérée permettait d'inhiber davantage la prolifération tumorale en combinaison avec la chimiothérapie. De plus, toutes les lignées cellulaires évaluées ont été sensibles à l'hypothermie, alors que certaines ont montré une résistance à la chimiothérapie. Ces résultats prometteurs suggèrent qu'un refroidissement localisé des berges d'exérèse de patients atteints d'un glioblastome pourrait permettre de retarder, voire empêcher la récurrence. En effet, l'hypothermie permettrait de maintenir les cellules tumorales résiduelles dans un état de dormance, mais également d'apporter ses effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires.

VII.1.a.ii. Données cliniques

Le dimensionnement du dispositif a été réalisé en se basant sur des données cliniques obtenues grâce au Dr. Andréa Desagneaux (Service radiothérapie, CHU Grenoble Alpes). L'étude de ces données provenant de patients atteints de glioblastome nous a permis de déterminer que le diamètre moyen d'une cavité d'exérèse post-opératoire se situait entre 3 et 4cm, et que le volume de cette cavité se situait entre 30 et 40cm³.

VII.1.a.iii. Simulations thermiques

L'invention se base également sur des simulations thermiques concernant la propagation du froid dans les tissus, réalisées par Hervé Lemonnier (CEA). La profondeur de pénétration du froid dépend directement de la température cible en surface du dispositif. Les simulations thermiques ont montré que pour atteindre une température cible de 28°C dans les 4mm autour d'une cavité de 30 à 40cm³, le refroidissement devait être effectué à 4°C, avec une puissance de 30 à 40W.

VII.1.b. Recherche d'antériorité

Une recherche d'antériorité a été effectuée sur la base de données Orbit, principalement autour des inventions destinées au refroidissement intracérébral, au traitement et au refroidissement d'une cavité cérébrale et au traitement des tumeurs cérébrales. Les inventions principales en lien avec notre sujet d'étude sont détaillées ci-dessous.

VII.1.b.i. Brevet US7156867 : Uniform selective cerebral hypothermia (2002)

La revendication principale de cette invention est d'assurer un refroidissement uniforme du cerveau (Figure 171, (Lennox, 2007)). Elle est basée sur une sonde de refroidissement venant refroidir le liquide céphalo-rachidien dans les ventricules, ainsi qu'un chapeau de refroidissement permettant un refroidissement surfacique. En complément, une unité de contrôle externe ainsi qu'un dispositif de réchauffement du corps sont prévus. Pour notre application clinique, les inconvénients de cette solution sont le refroidissement entier du cerveau et l'inadaptabilité d'un tel dispositif à une cavité d'exérèse.

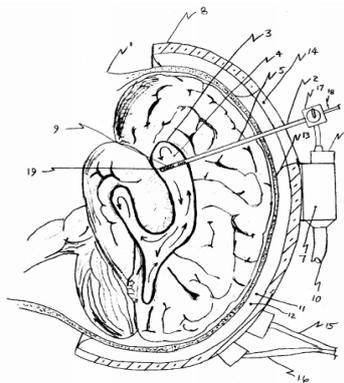


Figure 171 : Dispositif de refroidissement uniforme du cerveau, brevet US7156867 (Lennox, 2007)

VII.1.b.ii. Brevet US7004961 : Medical device and method for temperature control and treatment of the brain and spinal cord (2003)

La revendication principale de cette invention est de refroidir ou de réchauffer le liquide céphalo-rachidien (Figure 172, (Wong et al., 2006)). Pour cela, un ballonnet gonflable est disposé à l'extrémité d'un stylet implantable, relié à un système de circulation de fluides. Le dispositif prévoit des capteurs de pression et de température, un système de contrôle externe, ainsi que des ports d'irrigation ou d'aspiration permettant l'échange de fluides ou d'éventuelles thérapies. Le refroidissement non localisé du cerveau est un inconvénient majeur pour notre application, mais ce type de dispositif implantable pourrait être envisagé dans une cavité d'exérèse.

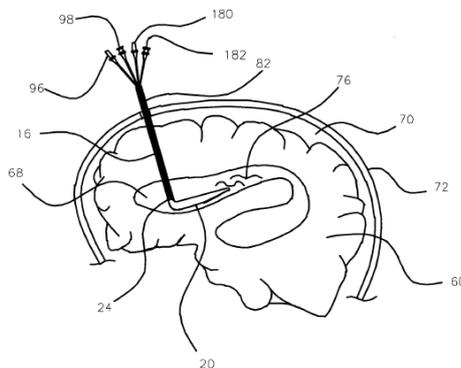


Figure 172 : Dispositif de refroidissement ou réchauffement du liquide céphalo-rachidien, brevet US7004961 (Wong et al., 2006)

VII.1.b.iii. Brevet WO9222350 : Tumor treatment (1991)

Cette invention a pour but de délivrer un agent thérapeutique dans la cavité d'exérèse d'une tumeur cérébrale, afin de traiter directement les tissus entourant cette cavité (Figure 173, (Williams, 1992)). Le dispositif comprend un ballonnet gonflable visant à être disposé dans la cavité ainsi qu'un réservoir fluide implantable en sous-cutanée, connectés par un cathéter. Les thérapies envisagées sont le traitement par la chaleur, l'utilisation de fluides chargés en particules radioactives ainsi que la chimiothérapie. L'inconvénient de cette invention est qu'elle ne prévoit pas de système de refroidissement.

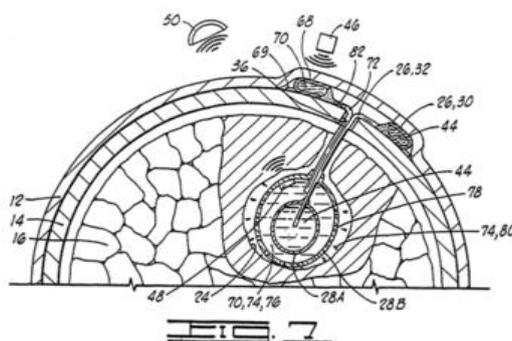


Figure 173 : Dispositif de traitement localisé d'une cavité d'exérèse, brevet WO9222350 (Williams, 1992)

VII.1.b.iv. Brevet WO2019/147210 : pressure-regulated balloon apparatus positioned in the cavity formed in the brain after surgery (2019)

La revendication principale de cette dernière invention est de réguler la pression dans une cavité d'exérèse après une chirurgie cérébrale (Figure 174, (Aydin, 2019)). Pour cela, le dispositif est un ballonnet implantable rempli par de l'air ou de l'eau, complété par un système de sécurité externe comprenant un ballonnet, un drain, ainsi qu'une valve régulant la pression. L'objectif d'un tel dispositif est d'éviter l'effondrement du cerveau après une chirurgie, de mieux réguler la pression intracrânienne et de limiter les saignements post-opératoires. Cependant, ce type de dispositif ne prévoit pas de système de refroidissement de la cavité d'exérèse.

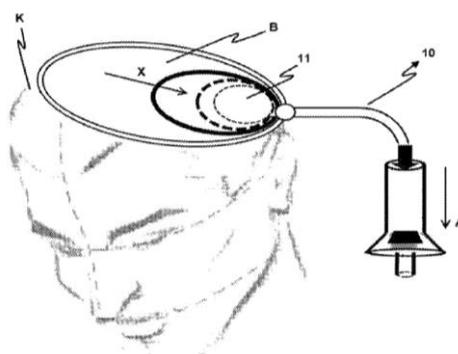


Figure 174 : Dispositif de régulation de pression dans une cavité cérébrale, brevet WO2019/147210 (Aydin, 2019)

VII.1.b.v. Bilan

En résumé, certaines inventions antérieures ont déjà protégé des dispositifs permettant un refroidissement global du cerveau à travers le liquide céphalo-rachidien, comme dans les brevets US7004961 et US7156867. Cependant, ces solutions ne permettent pas de traiter localement une cavité d'exérèse, et un refroidissement de l'ensemble du cerveau se révélerait délétère pour le patient avec une température cible comprise entre 25 et 30°C.

D'autres équipes ont travaillé sur des dispositifs permettant un traitement localisé d'une cavité d'exérèse, comme dans les brevets WO2019/147210 et WO9222350. Néanmoins, aucune de ces inventions n'a mentionné ou envisagé un système de refroidissement. A ce jour, il n'existe aucun dispositif implantable permettant le refroidissement localisé d'une cavité d'exérèse. De plus, aucun des dispositifs décrits par ces inventions n'a réellement été fabriqué et testé pour traiter des patients atteints de tumeurs cérébrales.

VII.2. Description du dispositif

VII.2.a. Positionnement thérapeutique

Nous avons travaillé sur la conception d'un dispositif implantable de refroidissement intracérébral localisé. Ce dispositif vise à refroidir l'ensemble des berges d'exérèse après la résection chirurgicale d'une tumeur cérébrale, afin de placer les cellules tumorales en dormance et ainsi prévenir la récurrence. En effet, la récurrence du glioblastome se fait dans les premiers millimètres autour des berges d'exérèse, de par l'activation de cellules en dormance ou bien la migration de cellules tumorales en dehors de la zone de traitement. Le dispositif vise à être implanté à la suite de l'exérèse chirurgicale, afin de prévenir l'affaissement du cerveau et le remplissage de la cavité par le liquide céphalo-rachidien. Le refroidissement pourrait être démarré le plus tôt possible avec l'accord du praticien, dans le but de limiter l'inflammation due aux différentes opérations chirurgicales, et d'empêcher au plus tôt la récurrence. Nous positionnons le refroidissement localisé comme une thérapie adjuvante au traitement standard, venant compléter – et non remplacer – les thérapies existantes. De plus, un tel dispositif pourrait permettre de délivrer localement des médicaments anti-inflammatoires ou des agents de chimiothérapie, afin d'accroître leur efficacité tout en limitant les effets secondaires liés aux traitements systémiques.

VII.2.b. Contraintes médicales

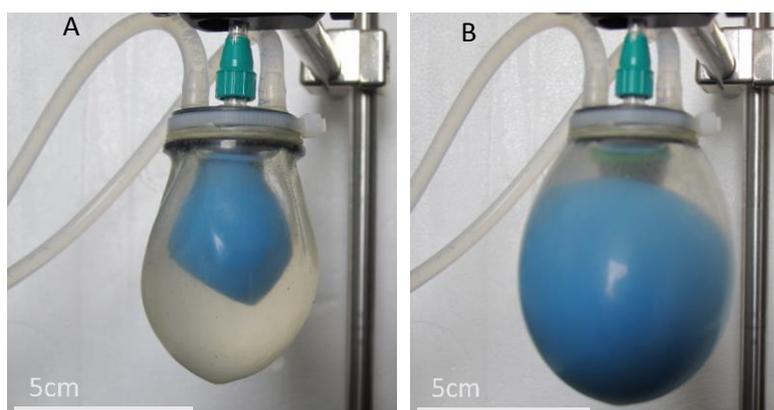
Un tel dispositif doit répondre à des contraintes médicales et techniques complexes. Celui-ci doit notamment pouvoir être implanté en profondeur dans la cavité d'exérèse, et notamment être inséré et extrait sans dommages. Il doit aussi permettre le refroidissement localisé des parois de la cavité laissée par l'exérèse, avec une uniformité en température sur l'ensemble de la surface de contact malgré un environnement à 37°C. De plus, il doit être suffisamment souple pour se conformer à la cavité, afin d'assurer un contact permanent avec le tissu cérébral. Le dispositif doit aussi être compatible avec l'administration de radiothérapie, et avec le suivi par IRM des patients.

Enfin, il faut également veiller à minimiser les risques médicaux liés à l'utilisation du dispositif, tout en étant compatible avec le quotidien d'un patient pour une implantation chronique d'au moins 30 jours. En effet, le dispositif vise à être implanté sur une durée prolongée, bien qu'une administration du refroidissement par cycles intermittents puisse être envisagée. Le risque médical principal est l'infection au niveau du site chirurgical, qui augmente d'autant plus après une craniotomie, avec une incidence variant de 1 à 6% en fonction des études (Korinek et al., 2005; Kurz et al., 1996; Santé Publique France, 2017; Valentini et al., 2018). De plus, l'hypothermie généralisée est associée à une augmentation du risque infectieux, car elle altère le fonctionnement du système immunitaire (Assis et al., 2019; Wood and Thoresen, 2015). Cependant, nous envisageons uniquement une hypothermie localisée au niveau de la cavité d'exérèse, qui ne devrait pas augmenter le risque infectieux au niveau de la fenêtre peropératoire de façon significative. De plus, une étude récente a montré qu'il n'y avait pas de lien de causalité entre l'hypothermie peropératoire et l'infection au niveau du site chirurgical (Bu et al., 2019).

VII.2.c. Solutions proposées

VII.2.c.i. Prototype test

Nous avons envisagé un système de double ballonnet extensible, pouvant s'adapter au volume d'une cavité. Le système de double ballonnet permet de gérer d'une part le système de refroidissement grâce à la circulation d'un fluide refroidi, et d'autre part son homogénéité ainsi que le contact permanent avec la cavité. Une première maquette de test a été réalisée afin de s'affranchir de certains problèmes techniques évidents. Un dispositif composé d'un ballon interne rempli d'air et une circulation d'eau entre les deux ballons a été réalisé, avec un volume externe d'environ 60cm³ (Figure 175).



A : ballon interne dégonflé ; B : ballon interne gonflé d'air

Figure 175 : Prototype test d'un dispositif avec une circulation de fluide entre deux ballonnets

Une expérience réalisée à température ambiante a permis de mettre en évidence que les parois des deux ballonnets avaient tendance à se coller entre elles, pouvant limiter l'efficacité du refroidissement en certains points. De ce fait, nous avons ajouté un système de circulation guidée entre les deux parois, permettant d'avoir une température homogène dans l'ensemble du ballonnet, et donc de la cavité.

VII.2.c.ii. Éléments constitutifs

Les éléments envisagés pour la partie implantable doivent être amagnétiques pour permettre une compatibilité IRM, et composés de matériaux biocompatibles et non-biodégradables pour permettre une implantation clinique sur le long terme. Une représentation schématique du dispositif proposé est illustrée dans la Figure 176, et l'ensemble des éléments est détaillé ci-dessous.

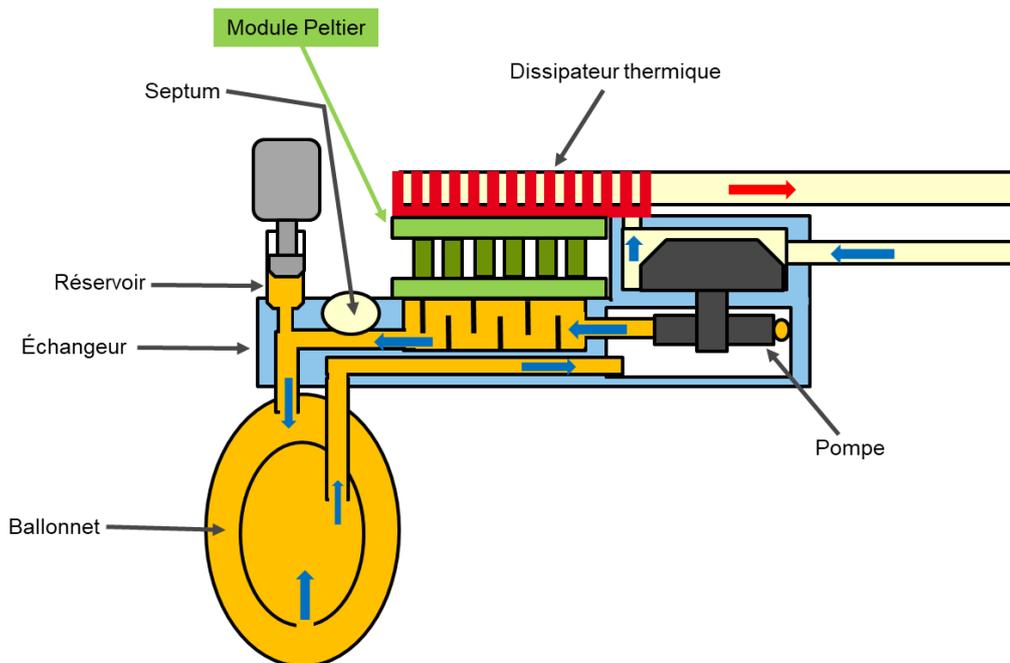


Figure 176 : Différents éléments constitutifs du dispositif implantable de refroidissement localisé

- ◆ Ballonnet extensible
 - Système double ballonnet

Le dispositif proposé est principalement composé d'un ballonnet extensible dans lequel circule un fluide refroidi, visant à être implanté dans la cavité d'exérèse. Nous avons précédemment défini l'importance d'un refroidissement uniforme en température au niveau des parois de la cavité d'exérèse, et avons alors envisagé un système de double ballonnet, avec une circulation guidée entre les deux parois (Figure 177). En effet, la paroi située entre les deux ballonnets est un conduit en serpentin, qui permet de guider la circulation du fluide (Figure 178) Cette circulation se fait alors en suivant le serpentin et en parcourant l'intégralité de la paroi, puis en terminant par le ballonnet interne, permettant d'assurer une homogénéité optimale de la température au contact de la cavité d'exérèse (Figure 179).

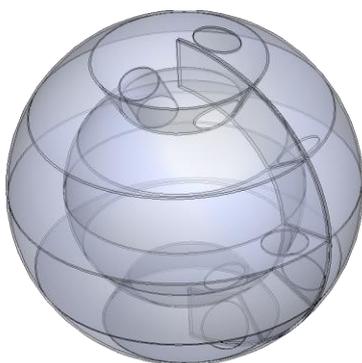


Figure 177 : Système de double ballonnet



Figure 178 : Paroi du ballonnet externe en vue de coupe

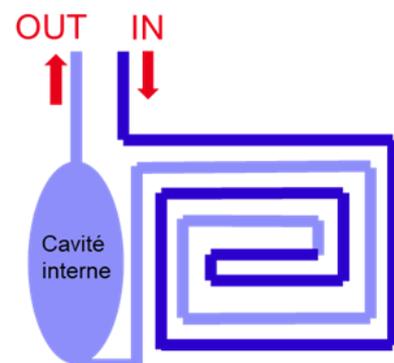


Figure 179 : Circulation du fluide dans le système de double ballonnet

○ Matériau

Le ballonnet externe peut être réalisé en polyuréthane afin d'être thermoformé pour s'adapter au mieux à la cavité d'exérèse, ou en composite silicone extensible – notamment le polypropylène, le polyamide ou le polyester – qui sont compatibles avec la radiothérapie. Le ballonnet envisagé doit être rétractable, afin d'être inséré puis gonflé une fois en place dans la cavité.

○ Thermoformage

Nous avons envisagé la possibilité de thermoformer le ballonnet, afin qu'il s'adapte au mieux à chaque patient (Figure 180). Pour cela, une image IRM de la cavité d'exérèse peut être segmentée afin d'avoir une représentation 3D de la cavité. Un moule de cette cavité est alors réalisé par impression 3D, dans lequel le ballonnet est placé et thermoformé grâce à un gonflage avec de l'air chaud.

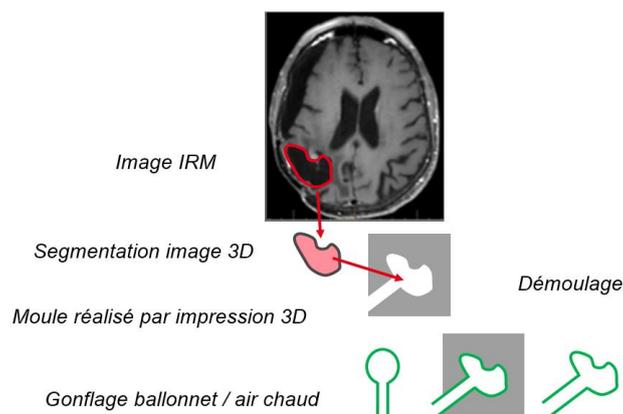


Figure 180 : Etapes de thermoformage du ballonnet

Si cette option n'est pas envisageable, plusieurs tailles de ballonnet pourront être proposées en fonction du volume de la cavité d'exérèse. L'ajustement du ballonnet à chaque cavité est essentiel car il permet d'assurer une efficacité maximale du refroidissement au contact des berges, tout en évitant d'avoir à appliquer une pression trop élevée.

◆ Système de refroidissement

Concernant le système de refroidissement, un fluide circule dans le ballonnet grâce à un circuit de pompage et est refroidi à l'aide d'un échangeur thermique, relié à un module de refroidissement. Le module de refroidissement est un système thermoélectrique – pouvant être de type Peltier – qui permet de transformer le courant électrique provenant d'une alimentation externe en une différence de température. Il doit avoir une densité de puissance élevée, un bon rendement et une grande fiabilité pour permettre une intégration dans un système compact et implantable en clinique. Ce module comporte alors une face froide en lien avec l'échangeur thermique, et une face chaude tournée vers l'extérieur, devant être refroidie par un dissipateur thermique.

◆ Unité de commande et d'alimentation

Une unité de commande permet d'envoyer des informations à l'ensemble de pompage du circuit fluide et au module de refroidissement grâce à un contrôleur. Une alimentation électrique externe permet d'alimenter les différents composants, notamment le contrôleur, le module de refroidissement et l'ensemble de pompage.

Nous avons également prévu différents moyens de surveillance permettant de contrôler la température en différents points, la pression dans la boîte crânienne, la pression du fluide dans le circuit ainsi que son pH, et le niveau de fluide dans le réservoir. Un système de suivi prévoit également de vérifier le contact permanent entre le ballonnet et les parois de la cavité.

◆ Réservoir

Nous prévoyons également un réservoir relié au circuit fluide et commandé par un actionneur – un moteur piézoélectrique par exemple – permettant d’ajuster le niveau du fluide de refroidissement, notamment en cas éventuel de fuite. Ce réservoir peut être rempli par un septum, disposé à travers le cuir chevelu afin de limiter les infections, et peut également servir d’évent afin de réguler la pression interne.

◆ Agent thérapeutique

Enfin, nous avons envisagé une option permettant l’administration localisée d’agents thérapeutiques, tels que des médicaments anti-inflammatoires ou de chimiothérapie. Grâce à deux circuits de remplissage indépendants, un ballonnet externe perméable supplémentaire permet la diffusion d’agents thérapeutiques à travers ses parois, tandis que le ballonnet interne assure la fonction de refroidissement. Un système de réservoir et de septum peut alors permettre le remplissage du circuit de fluide thérapeutique.

VII.2.c.iii. Exemple de réalisation

Afin d’altérer le moins possible la qualité de vie du patient, nous avons conçu un dispositif compact, avec un boîtier hermétique intégrant le module de refroidissement, l’échangeur thermique et l’ensemble de pompage. Un travail important a été fait pour réduire au maximum les sources de vibrations et de bruit du dispositif, pouvant provenir d’un moteur par exemple. Dans une première variante (Figure 181), le boîtier est fixé sur la boîte crânienne, au plus proche de la cavité d’exérèse, afin de réduire les pertes thermiques.

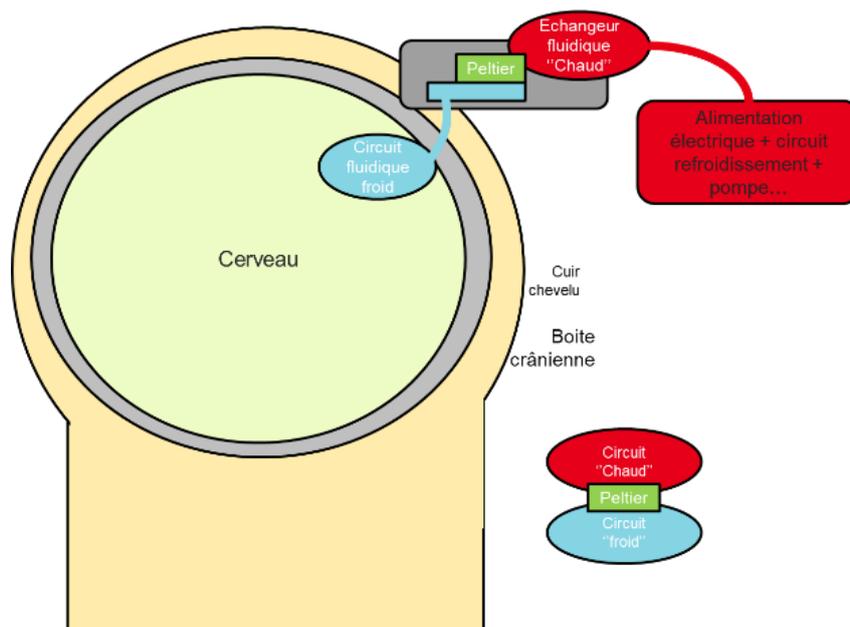


Figure 181 : Dispositif de refroidissement avec un boîtier fixé sur la boîte crânienne

Dans une deuxième variante (Figure 182), le boîtier est directement encastré dans la boîte crânienne. Il est relié à l'unité de commande et d'alimentation par un câble comportant à la fois les liaisons électriques et fluidiques, et qui passe par un connecteur transcutané unique et déporté, afin de limiter le risque infectieux. De plus, la périphérie du boîtier peut être étanchéifiée grâce à du ciment dentaire, afin de garantir une barrière contre les infections susceptibles de passer par le port transcutané et de se propager le long du câble.

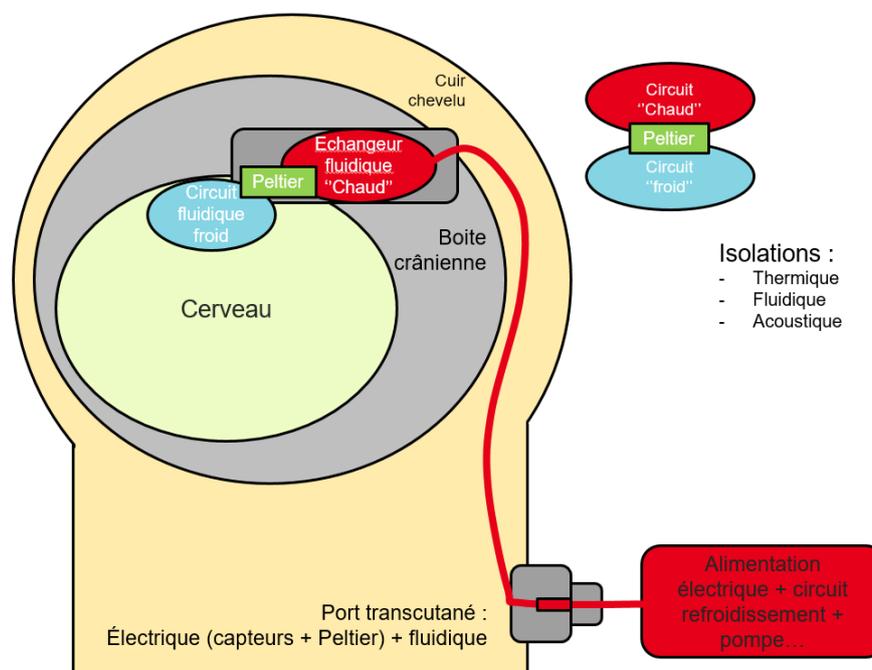


Figure 182 : Dispositif de refroidissement avec un boîtier encastré dans la boîte crânienne

VII.2.c.iv. Bilan

Les principales exigences médicales et les solutions proposées pour notre dispositif sont décrites dans le Tableau 10.

Contrainte médicale	Solution proposée
Implantable dans une cavité	Ballonnet expansible
Implantable en profondeur	Ballonnet rétractable
Uniforme en température	Paroi alvéolée + double serpentin
Conformable aux parois de la cavité	Ballonnet souple et/ou thermoformable
Gestion de la pression interne	Réservoir + septum
Solution en cas de fuite	Réservoir + septum
Injection d'agent thérapeutique	Matériau poreux, réservoir + septum
Compatible avec le quotidien d'un patient avec une implantation chronique	Encapsulation et compacité, encastrement dans la boîte crânienne, réduction des vibrations et du bruit
Compatible avec les traitements existants	Matériaux supportant l'irradiation
Compatible avec le suivi IRM du patient	Matériaux amagnétiques
Minimisation du risque infectieux	Port transcutané unique et déporté, ciment dentaire
Température et pression contrôlées	Moyens de suivi

Tableau 10 : Contraintes médicales et solutions techniques proposées

Par la suite, la réalisation d'un prototype du dispositif à taille réelle pourra permettre de caractériser les performances du refroidissement, notamment la vitesse, la stabilité temporelle et l'homogénéité de la température dans un volume de type cavitaire. De plus, cela permettra d'optimiser l'agencement des différents éléments, et de vérifier le bon fonctionnement du dispositif, notamment en termes de bruit et de vibrations.

Conclusion générale

Bilan des travaux de thèse

A travers ces travaux de thèse, nous avons évalué le potentiel thérapeutique de l'hypothermie sur quatre lignées cellulaires de glioblastome humain. Jusqu'à présent, deux autres études *in vitro* avaient étudié ses effets sur la croissance de cellules de glioblastome humain, démontrant qu'une hypothermie légère de 3 jours à 34°C réduisait la prolifération cellulaire des lignées U87 et T98G (Kalamida et al., 2015), et qu'une hypothermie modérée de 28°C réduisait la prolifération ainsi que la viabilité cellulaire de la lignée SF-126 au fil des jours (Matijasevic, 2002). Nous avons démontré que l'hypothermie inhibait la prolifération de quatre lignées cellulaires de façon température-dépendante, avec une réduction en hypothermie légère (33°C) et un arrêt total de la prolifération en hypothermie modérée (28°C) et sévère (23°C). Nous avons également mis en évidence la durabilité de ces effets inhibiteurs, avec un blocage total de la prolifération cellulaire à 28°C jusqu'à au moins 30 jours. Par ailleurs, nous avons montré que l'arrêt de la prolifération ne se traduisait pas par une augmentation de la mort cellulaire mais par un arrêt de la division cellulaire dans la phase G2/M du cycle, indiquant un état de dormance. De plus, nos résultats ont illustré pour la première fois une inhibition de la migration de cellules de glioblastome par l'hypothermie. En effet, nous avons montré qu'une hypothermie modérée de 28°C réduisait la migration des cellules de glioblastome de manière significative, tant lors de tests de cicatrization que lors du passage des cellules à travers une membrane poreuse. Ces différents tests *in vitro* nous ont permis de confirmer les effets anti-tumoraux de l'hypothermie modérée, avec une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaires, deux processus clés impliqués dans la progression tumorale. De plus, nous avons mis en évidence un effet uniforme de l'hypothermie, capable de modifier de manière similaire la croissance de lignées tumorales variées.

Nous avons ensuite décidé d'approfondir ces résultats et d'optimiser les modalités d'administration thérapeutique de l'hypothermie. Les objectifs étaient à la fois d'analyser la réversibilité des effets de l'hypothermie en étudiant la prolifération cellulaire après l'arrêt du traitement, et d'évaluer son potentiel thérapeutique adjuvant en la combinant avec le témozolomide. Nous avons démontré que les effets inhibiteurs de l'hypothermie étaient prolongés après un retour à la normothermie, et que l'abaissement de la température en dessous de 28°C ne permettait pas d'affecter davantage la prolifération après réchauffement. Nous avons également montré que les effets inhibiteurs du préconditionnement hypothermique dépendaient directement de sa durée. Après 30 jours à 28°C, certaines cellules ont mis plusieurs semaines à reprendre leur prolifération à 37°C, tandis que d'autres sont entrées en apoptose. Les résultats ont montré une amélioration de la viabilité au fil des jours à 37°C, montrant la sortie progressive de l'état de dormance pour revenir à un état prolifératif. Par ailleurs, nous avons comparé différents cycles d'hypothermie intermittente et avons démontré que les effets inhibiteurs de l'hypothermie sur la prolifération des cellules de glioblastome étaient davantage prononcés pour les cycles longs. Ces données soulignent l'intérêt d'utiliser des périodes prolongées d'hypothermie et de la combiner avec d'autres traitements, pour parvenir à bloquer totalement la récurrence.

Par la suite, nous avons comparé ses effets inhibiteurs avec ceux du témozolomide, le médicament de chimiothérapie de référence pour le glioblastome. Deux des quatre lignées évaluées ont montré une certaine résistance à la chimiothérapie, pouvant être expliquée par l'absence de méthylation du promoteur de *MGMT* et par des mutations de *TP53*. En revanche, l'hypothermie a eu des effets uniformes sur les quatre lignées cellulaires, inhibant davantage leur prolifération que le témozolomide, avec une différence d'autant plus marquée pour les lignées chimiorésistantes. Nous avons également montré que l'addition de témozolomide augmentait les effets inhibiteurs de l'hypothermie intermittente, en particulier pour les lignées chimiosensibles.

En conclusion, notre étude *in vitro* suggère l'hypothermie modérée comme un traitement adjuvant prometteur pour le glioblastome, capable de potentialiser les effets de la chimiothérapie et de réduire les variabilités inter-patients de réponse aux traitements.

Dans un second temps, nous avons étudié les effets de l'hypothermie sur des cellules non-tumorales pour évaluer la spécificité et la sûreté du traitement, afin de préparer au mieux les futures études préclinique et clinique. Nous avons montré que les effets de l'hypothermie modérée sur les astrocytes étaient comparables à ceux observés sur des lignées de glioblastome, avec un blocage total et durable de leur prolifération, une inhibition significative de leur migration ainsi que diverses altérations morphologiques. De plus, nous avons montré une bonne tolérance du traitement en termes de mort cellulaire et de morphologie, tant pour les astrocytes humains que pour les neurones primaires de souris. Nos résultats suggèrent que l'hypothermie diminue le métabolisme des cellules tumorales comme celui des cellules saines, sans pour autant entraîner leur mort. Ils sont cohérents avec deux autres études menées sur des fibroblastes humains (Matijasevic, 2002) et des astrocytes primaires de rat (Plesnila et al., 2000) démontrant des effets similaires sur les cellules saines et tumorales.

Par la suite, nous avons mis au point un protocole de culture *ex vivo* de cerveaux embryonnaires et adultes de souris, qui ont été maintenus pendant 6 jours à 37°C ou 30°C. Nos résultats ont montré que l'hypothermie préservait la vascularisation cérébrale, probablement en raison de ses propriétés vasoconstrictrices. Après une injection intracérébrale de cellules de gliome murin, nous avons étudié la croissance tumorale grâce à des analyses histologiques. Nous avons obtenu des résultats préliminaires prometteurs, avec une diminution non-significative du volume tumoral en condition hypothermique, mais ces expériences devront être poursuivies pour confirmer cette hypothèse.

Enfin, en parallèle des travaux expérimentaux, nous avons participé au développement d'un dispositif implantable de refroidissement localisé, permettant de répondre à des contraintes médicales et technologiques concrètes. Nous sommes parvenus à mettre au point un dispositif clinique implantable en profondeur, permettant un refroidissement uniforme des parois d'une cavité d'exérèse et compatible avec le quotidien d'un patient atteint de glioblastome. En effet, ce dispositif doit à la fois permettre le suivi IRM du patient, impliquant l'utilisation de matériaux amagnétiques, et l'administration concomitante de radiothérapie et de chimiothérapie. De plus, il doit être compatible avec une implantation chronique sans trop altérer la qualité de vie des patients. Enfin, il ne doit pas altérer la santé du patient, avec une minimisation du risque infectieux et différents systèmes de contrôle permettant d'assurer sa sûreté.

Limites des travaux de thèse

Une des limites majeures de notre étude est l'utilisation de lignées cellulaires, génétiquement modifiées pour former des populations homogènes de cellules immortalisées. La culture cellulaire peut parfois mener à un processus de dérive des lignées, qui ne présentent alors plus les mêmes caractéristiques génétiques que les cellules de départ. Pour se prémunir de cet effet, nous avons utilisé nos cellules avec un nombre de passage restreint, et avons suivi une éventuelle dérive en vérifiant leur aspect morphologique et leur taux de prolifération. En cas de doute, un nouveau tube de cellules a été décongelé pour relancer les expériences. Pour vérifier la qualité des lignées et se prémunir de leur dérive, une caractérisation approfondie – tant sur le plan moléculaire que cellulaire – pourrait être envisagée.

Nous avons étudié quatre lignées différentes afin d'avoir des résultats aussi représentatifs que possible de l'hétérogénéité intertumorale. Nous avons d'ailleurs choisi des lignées comportant des caractéristiques génétiques variées, notamment le statut de méthylation du promoteur de *MGMT*, facteur clé de réponse aux traitements actuels, et les mutations de *TP53*, un des gènes les plus fréquemment mutés. Cependant, ces lignées ne reflètent que partiellement la complexité clinique du glioblastome, et leur utilisation est insuffisante pour étendre nos conclusions à grande échelle. Pour améliorer la pertinence de notre étude, des expériences pourraient être menées à partir de tumeurs dérivées de patients, permettant alors une meilleure représentation de l'hétérogénéité intratumorale, une des caractéristiques principales du glioblastome. Nous pourrions également envisager la réalisation de culture cellulaire en trois dimensions, permettant d'évaluer les effets de l'hypothermie sur une masse tumorale et non sur une monocouche de cellules adhérentes, peu fidèle à la réalité clinique. Une étude a démontré la pertinence d'un tel modèle en étudiant l'efficacité de l'irradiation et de la chimiothérapie (témozolomide, cisplatine et carmustine) sur des sphéroïdes tumoraux (Jiguet Jiglaire et al., 2014). Pour cela, des cellules U87 et des échantillons tumoraux de patients ont été mis en culture sous forme de sphéroïdes dans un hydrogel à base de collagène et d'acide hyaluronique. Une autre étude a établi un modèle de glioblastome utilisant des organoïdes cérébraux humains (Ogawa et al., 2018). Cette étude a d'abord utilisé les organoïdes pour former des sphéroïdes tumoraux qui ont ensuite été greffés dans des souris immunodéficientes, mais également pour mimer le cerveau humain alors transplanté avec des cellules de glioblastome, dans le but d'étudier leur invasivité dans une structure complexe.

Au-delà de la complexification du modèle, certaines expériences *in vitro* pourraient permettre d'améliorer nos résultats. D'une part, l'étude des dommages cellulaires causés par l'hypothermie a uniquement été faite avec des tests d'exclusion au bleu de trypan et des études morphologiques. Pour la compléter, une étude précise d'apoptose sur les cellules tumorales et saines pourrait être effectuée à l'aide d'un marquage TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) ou avec de l'Annexine V. D'autre part, des tests d'invasion pourraient être réalisés afin de compléter les résultats obtenus sur la prolifération et la migration des cellules tumorales, en ajoutant une couche de matrice extracellulaire aux chambres de Boyden ou en utilisant des tests basés sur la dégradation de gels. Concernant l'étude des effets de l'hypothermie sur les cellules saines, la culture de neurones primaires devrait être poursuivie avec des tests de prolifération, une étude de viabilité ainsi que des marquages immuno-histochimiques afin d'observer d'éventuelles altérations morphologiques. Des mesures électrophysiologiques pourraient également permettre d'évaluer l'impact de l'hypothermie sur le fonctionnement des neurones. De plus, les études menées sur les astrocytes humains pourraient être prolongées, notamment la période de réchauffement après un préconditionnement hypothermique à 28°C, permettant de voir si les astrocytes reprennent leur prolifération. Une coloration GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) pourrait aussi compléter les études de morphologie déjà réalisées.

Enfin, la mise au point d'une méthode de culture *ex vivo* de cerveaux embryonnaires de souris a montré de nombreuses limites. D'abord, le manque de répétabilité entre deux injections a limité la précision des résultats, notamment concernant le site d'injection. Pour améliorer ce point, un support poreux pourrait être conçu afin de maintenir au mieux les cerveaux pendant l'expérience et pouvoir injecter les cellules selon des coordonnées précises. La suspension pourrait également être renouvelée entre chaque injection, afin d'avoir un nombre de cellules injectées le plus similaire possible entre deux cerveaux. Ensuite, l'identification et le comptage des cellules tumorales ont été basés sur des différences morphologiques mais pourraient être améliorés. La prolifération de ces cellules pourrait être étudiée plus précisément à l'aide d'un marquage Ki67, et l'injection réalisée avec des cellules GL261 marquées avec de la GFP (*green fluorescent protein*) afin de suivre précisément leur croissance. Enfin, ce modèle ne comporte pas de contrôle quantitatif permettant d'évaluer la viabilité des tissus et des cellules tumorales, et pourrait être amélioré par un marquage des cellules avec de l'iodure de propidium, par exemple.

Perspectives

Les travaux réalisés et présentés dans ce document constituent une preuve de concept *in vitro* des effets anti-tumoraux du refroidissement sur des lignées de glioblastome humain. Ils ont également permis d'optimiser certains paramètres du traitement afin de dimensionner et concevoir un premier dispositif de refroidissement intra-cavitaire. A présent, ces travaux pourront être complétés par une étude approfondie des mécanismes d'action de l'hypothermie, permettant de définir au mieux les différents paramètres d'administration du traitement. Ensuite, une étude préclinique *in vivo* permettra d'évaluer les effets anti-tumoraux de l'hypothermie chez le rongeur. Enfin, un dispositif clinique sera conçu et évalué chez le porc, afin de valider l'ensemble des étapes réglementaires, puis un essai clinique sera entrepris.

A court terme, une étude approfondie des mécanismes d'action de l'hypothermie est envisagée. Nous avons déjà entrepris d'étudier les effets de l'hypothermie sur l'expression des protéines de choc froid RBM3 et CIRBP sur les cellules U251, en utilisant une technique de western blot. Cependant, le protocole expérimental doit encore être optimisé, et les résultats n'ont pas permis d'observer de différence avec la condition contrôle à ce jour. Les effets de l'hypothermie pourront également être évalués sur l'expression de certains marqueurs de l'inflammation tels que TNF- α , IL-6 et IL-1 β , et de certaines espèces réactives de l'oxygène et de l'azote telles que le peroxyde d'hydrogène et l'ion nitrite. Il serait aussi intéressant d'étudier ses effets sur l'angiogenèse en évaluant notamment l'expression du VEGF en condition hypothermique, d'autant que les cellules A172 et U251 ont un faible niveau basal de VEGF alors que les cellules U87 et T98G sécrètent un haut niveau de VEGF (Hovinga et al., 2005; Yoshino et al., 2006). Enfin, un séquençage génétique pourra permettre d'évaluer l'influence de différentes séquences d'hypothermie et de réchauffement sur l'expression de gènes d'intérêts et leurs mutations. Concernant l'effet thérapeutique de l'hypothermie, la combinaison avec le témozolomide pourra être étudiée sur des durées prolongées. L'hypothermie sera également étudiée en combinaison avec la radiothérapie, l'autre traitement de référence dans la prise en charge du glioblastome. En parallèle de cette étude, la culture de cerveaux embryonnaires de souris devra être répétée en condition hypothermique stable à 28°C, et un marquage des cellules tumorales sera réalisé pour quantifier les résultats obtenus.

A moyen terme, afin d'apporter plus de complexité au modèle d'étude et de poursuivre les études *in vitro* et *ex vivo* réalisées, nous envisageons de poursuivre ces travaux par un essai préclinique dans les trois prochaines années. Ainsi, un essai mené chez le rat nous permettrait d'évaluer l'efficacité thérapeutique de l'hypothermie dans un modèle animal de tumeur cérébrale, de valider certains paramètres du refroidissement et de réaliser une étude de sûreté. Dans un premier temps, un modèle syngénique de récurrence tumorale sera mis au point, puisque l'injection de cellules humaines impliquerait l'utilisation d'animaux immunodéficients, limitant alors la pertinence de l'étude en retirant l'action du système immunitaire lors du processus de récurrence. De ce fait, l'injection de cellules animales nous paraît plus appropriée, mais l'étendue des effets de l'hypothermie sur ces cellules tumorales devra être évaluée au préalable *in vitro*. En parallèle, un dispositif de refroidissement surfacique – de type chapeau refroidissant – sera mis au point, et son efficacité sera évaluée *ex vivo*. En effet, la miniaturisation d'un dispositif de refroidissement implantable semble complexe chez le rongeur. Par la suite, un essai préclinique pourra être démarré, permettant d'évaluer l'impact du refroidissement sur le développement tumoral ainsi que sur la cicatrisation gliale, avec une étude des effets anti-inflammatoires de l'hypothermie *in vivo*. De plus, une étude de sûreté sera réalisée en évaluant les effets de l'hypothermie sur le tissu sain pendant plusieurs semaines.

Différentes séquences d'administration seront évaluées – notamment la comparaison entre l'hypothermie continue et l'hypothermie intermittente – et les paramètres de refroidissement optimisés serviront ensuite au dimensionnement du dispositif clinique final.

Sur le long terme, si l'essai préclinique réalisé chez le rongeur confirme les effets anti-tumoraux du refroidissement localisé, plusieurs étapes mèneront à la réalisation d'un essai clinique dans les 10 ans à venir. D'abord, un dispositif implantable de refroidissement préclinique devra être développé, afin de réaliser une étude d'innocuité chez le porc, dans un modèle de récurrence tumorale. Actuellement, il n'existe pas de modèle de glioblastome syngénique chez le porc, et l'injection des cellules humaines U87 nécessitera son immunodépression, justifiant la réalisation des études fonctionnelles chez le rongeur. Le dispositif de refroidissement de type ballonnet sera implanté pendant plusieurs semaines et sa tolérance locale sera évaluée après implantation. L'objectif sera également d'observer les interactions entre les cellules du système nerveux central et un tel dispositif. Une fois cette étude réalisée, le dispositif sera modifié et adapté à un contexte clinique en fonction des résultats obtenus. Un essai clinique pourra ensuite être envisagé, en positionnement l'hypothermie comme une thérapie adjuvante, administrée de façon intermittente, avec un retour à 37°C progressif pour éviter tout dommage neurologique.

Annexes

Annexe 1

Classification des tumeurs du système nerveux central

Il existe différents types de classification des tumeurs du SNC prenant en compte différents critères et différents niveaux de détails. La classification générale de l'ICD-O de 2013 est définie comme suit (Fritz, 2013) :

- Tumeurs astrocytaires
- Oligodendrogliomes
- Oligoastrocytomes
- Tumeurs ependymaires
- Tumeurs du plexus choroïde
- Autres tumeurs neuroépithéliales
- Tumeurs mixtes glio-neurales
- Tumeurs de la région pinéale
- Tumeurs embryonnaires
- Tumeurs des nerfs crâniens et spinaux
- Tumeurs des méninges
- Tumeurs de la région sellaire

La classification officielle de l'OMS (2016) comporte quant à elle les catégories suivantes (Louis et al., 2016) :

- Tumeurs diffuses astrocytaires et oligodendrogliales
- Autres tumeurs astrocytaires
- Tumeurs épendymaires
- Autres gliomes
- Tumeurs du plexus choroïde
- Tumeurs neuronales et mixtes glio-neurales
- Tumeurs de la région pinéale
- Tumeurs embryonnaires
- Tumeurs des nerfs crâniens et spinaux
- Méningiomes
- Tumeurs mésenchymateuses et non méningothéliales
- Tumeurs mélanocytaires
- Lymphomes
- Tumeurs histiocytaires
- Tumeurs germinales
- Tumeurs de la région sellaire
- Tumeurs métastatiques

Enfin, l'équipe de Darlix a combiné ces deux classifications et en a établi une troisième, basée sur l'origine des cellules (Darlix et al., 2017) :

- Tumeurs du tissu neuroépithélial
 - Gliomes (gliomes NOS, tumeurs astrocytaires, tumeurs oligodendrogliales, tumeurs oligoastrocytaires, tumeurs épendymaires)
 - Tumeurs du plexus choroïde
 - Autres tumeurs neuroépithéliales
 - Tumeurs neuronales et mixtes glio-neurales

- Tumeurs de la région pinéale
- Tumeurs embryonnaires
- Tumeurs des nerfs crâniens et spinaux
- Tumeurs des méninges
 - Tumeurs des cellules méningothéliales
 - Tumeurs mésenchymateuses
 - Lésions mélanocytaires primaires
 - Autres néoplasmes liés aux méninges
- Lymphomes et néoplasmes hématopoïétiques
- Tumeurs germinales
- Tumeurs de la région sellaire
- Tumeurs pituitaires
- Divers

Annexe 2**Échelles de performance évaluant l'état neurologique d'un patient**

Score	Description
100	Activité normale – asymptomatique, aucune plainte
90	Activité normale – signes ou symptômes mineurs de la maladie
80	Activité normale, avec un effort – signes ou symptômes de la maladie
70	Activité limitée – capacité de soins autonomes, incapacité de poursuivre un travail actif ou une activité normale
60	Activité très restreinte – capacité de soins autonomes, besoin occasionnel d'assistance
50	Activité très restreinte – autonomie limitée, besoin fréquent d'assistance et de soins médicaux
40	Invalidité partielle – pas d'autonomie, besoin permanent d'assistance et de soins médicaux, alitement plus de 50% de la journée
30	Invalidité totale – hospitalisation recommandée, alitement quasi-total
20	Invalidité totale – hospitalisation et soins intensifs nécessaires, confinement total au lit
10	Invalidité totale – issue fatale proche, état comateux ou peu éveillé
0	Décès

Tableau 11 : Echelle de performance de Karnofsky, adapté d'après (Péus et al., 2013)

Score	Description
0	Activité normale – asymptomatique, poursuite normale des activités précédant la maladie
1	Activité limitée – mobilité, autonomie, capacité d'assurer un travail léger ou sédentaire
2	Activité très restreinte – mobilité, capacité de soins autonomes, pas de capacité de travail, alitement moins de 50 % de la journée
3	Invalidité partielle – capacité limitée de soins autonomes, alitement plus de 50 % de la journée
4	Invalidité totale – confinement total au lit ou à une chaise, pas de possibilité de soins autonomes
5	Décès

Tableau 12 : Echelle de performance de l'OMS, adapté d'après (Oken et al., 1982)

Annexe 3**Références du matériel utilisé en culture cellulaire**

Les supports et le matériel de culture ont été obtenus chez Falcon, Eppendorf, Bio-Rad et Fisher (Tableau 13).

Fournisseur	Matériel et supports de culture
Falcon	Pipettes graduées et pipettes d'aspiration
	Tubes (15 et 50mL)
	Boîtes de Pétri (60 et 100mm)
	Plaques multi-puits à fond plat (6, 12, 24, 48 et 96 puits)
	Flacons de culture (25 et 75cm ²)
Eppendorf	Tubes (1,5 et 2mL)
	Cônes à filtre pour pipettes (10, 100, 1000µL)
Fisher Scientific	Cryotubes
	Chambres de culture Lab-Tek® (2 et 4 puits)
	Inserts (polycarbonate inserts with 8µm size in 24-well plate, 140629)
Bio-Rad	Lames TC20™
Merck Millipore	Module de filtration 0,22µm (Stericup-Gv Durapore pvdf, S2GVU05RE)

Tableau 13 : Supports et matériel utilisés pour la culture cellulaire

Bibliographie

- Ablah, E., Tran, M.P., Isaac, M., Kaufman, D.A.S., Moufarrij, N., Liow, K., 2009. Effect of cortical cooling on interictal epileptiform activities. *Seizure* 18, 61–63. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2008.06.005>
- Abou-Chebl, A., Sung, G., Barbut, D., Torbey, M., 2011. Local brain temperature reduction through intranasal cooling with the RhinoChill device: preliminary safety data in brain-injured patients. *Stroke* 42, 2164–2169. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.613000>
- Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox, A.K., Bigner, D.D., 2009. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 1061–1083. <https://doi.org/10.1517/13543780903052764>
- Agnihotri, S., Aldape, K.D., Zadeh, G., 2014. Isocitrate dehydrogenase status and molecular subclasses of glioma and glioblastoma. *Neurosurg. Focus* 37, E13. <https://doi.org/10.3171/2014.9.FOCUS14505>
- Ahir, B.K., Engelhard, H.H., Lakka, S.S., 2020. Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor: Glioblastoma. *Mol. Neurobiol.* 57, 2461–2478. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01892-8>
- Aihara, H., Okada, Y., Tamaki, N., 2001. The effects of cooling and rewarming on the neuronal activity of pyramidal neurons in guinea pig hippocampal slices. *Brain Res.* 893, 36–45.
- Al-Astal, H.I.M., Massad, M., AlMatar, M., Ekal, H., 2016. Cellular Functions of RNA-Binding Motif Protein 3 (RBM3): Clues in Hypothermia, Cancer Biology and Apoptosis. *Protein Pept. Lett.* 23, 828–835. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160628090340>
- Alexander, B.M., Cloughesy, T.F., 2017. Adult Glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 35, 2402–2409. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.0119>
- Alexander, B.M., Wang, M., Yung, W.K.A., Fine, H.A., Donahue, B.A., Tremont, I.W., Richards, R.S., Kerlin, K.J., Hartford, A.C., Curran, W.J., Mehta, M.P., 2013. A phase II study of conventional radiation therapy and thalidomide for supratentorial, newly-diagnosed glioblastoma (RTOG 9806). *J. Neurooncol.* 111, 33–39. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-0987-0>
- Alifieris, C., Trafalis, D.T., 2015. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacol. Ther.* 152, 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>
- Alkabie, S., Boileau, A.J., 2016. The Role of Therapeutic Hypothermia After Traumatic Spinal Cord Injury—A Systematic Review. *World Neurosurg.* 86, 432–449. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2015.09.079>
- Allers, M., Boris-Möller, F., Lunderquist, A., Wieloch, T., 2006. A New Method of Selective, Rapid Cooling of the Brain: An Experimental Study. *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 29, 260–263. <https://doi.org/10.1007/s00270-004-0271-6>
- Al-Senani, F.M., Graffagnino, C., Grotta, J.C., Saiki, R., Wood, D., Chung, W., Palmer, G., Collins, K.A., 2004. A prospective, multicenter pilot study to evaluate the feasibility and safety of using the CoolGard™ System and Icy™ catheter following cardiac arrest. *Resuscitation* 62, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2004.02.016>
- Ardon, H., Van Gool, S.W., Verschuere, T., Maes, W., Fieuids, S., Sciot, R., Wilms, G., Demaerel, P., Goffin, J., Van Calenbergh, F., Menten, J., Clement, P., Debiec-Rychter, M., De Vleeschouwer, S., 2012. Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the standard of care treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma: results of the HGG-2006 phase I/II trial. *Cancer Immunol. Immunother.* 61, 2033–2044. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1261-1>
- Assis, F.R., Narasimhan, B., Ziai, W., Tandri, H., 2019. From systemic to selective brain cooling - Methods in review. *Brain Circ.* 5, 179–186. https://doi.org/10.4103/bc.bc_23_19
- Austin, J.P., Glaser, E.M., 1969. Enhancement of anti-tumour effect by cooling. *Int. J. Biometeorol.* 13, 183–187. <https://doi.org/10.1007/bf01552739>
- Aydin, M.D., 2019. Pressure-regulated balloon apparatus positioned in the cavity formed in the brain after surgery. *Brevet WO2019147210 (A2)*.
- Azzopardi, D.V., Strohm, B., Edwards, A.D., Dyet, L., Halliday, H.L., Juszczak, E., Kapellou, O., Levene, M., Marlow, N., Porter, E., Thoresen, M., Whitelaw, A., Brocklehurst, P., TOBY Study Group,

2009. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 361, 1349–1358. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900854>
- Balça-Silva, J., Matias, D., Carmo, A. do, Sarmento-Ribeiro, A.B., Lopes, M.C., Moura-Neto, V., 2019. Cellular and molecular mechanisms of glioblastoma malignancy: Implications in resistance and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol., Advances in Molecular Oncology* 58, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2018.09.007>
- Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L., Loiseau, H., 2010. Épidémiologie des glioblastomes. *Neurochirurgie, SNCLF - Journées annuelles, Marne-la-Vallée (Paris), 5-8 décembre 2010* 56, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.011>
- Barlovatz-Meimon, G., Ronot, X., 2014. *Culture de cellules animales (3^e Éd.)*. Lavoisier.
- Bastide, A., Peretti, D., Knight, J.R.P., Grosso, S., Spriggs, R.V., Pichon, X., Sbarrato, T., Roobol, A., Roobol, J., Vito, D., Bushell, M., von der Haar, T., Smales, C.M., Mallucci, G.R., Willis, A.E., 2017. RTN3 Is a Novel Cold-Induced Protein and Mediates Neuroprotective Effects of RBM3. *Curr. Biol. CB* 27, 638–650. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.01.047>
- Batchelor, T.T., Mulholland, P., Neyns, B., Nabors, L.B., Campone, M., Wick, A., Mason, W., Mikkelsen, T., Phuphanich, S., Ashby, L.S., Degroot, J., Gattamaneni, R., Cher, L., Rosenthal, M., Payer, F., Jürgensmeier, J.M., Jain, R.K., Sorensen, A.G., Xu, J., Liu, Q., van den Bent, M., 2013. Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, versus lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 3212–3218. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.2464>
- Batich, K.A., Reap, E.A., Archer, G.E., Sanchez-Perez, L., Nair, S.K., Schmittling, R.J., Norberg, P., Xie, W., Herndon, J.E., Healy, P., McLendon, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Bigner, D., Vlahovic, G., Mitchell, D.A., Sampson, J.H., 2017. Long-term Survival in Glioblastoma with Cytomegalovirus pp65-Targeted Vaccination. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 23, 1898–1909. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2057>
- Baulac, S., Depaulis, A., Kahane, P., 2018. Inserm | Épilepsie: Un ensemble de maladies complexe, encore mal compris [WWW Document]. <https://www.inserm.fr>. URL <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/epilepsie#> (accessed 5.15.18).
- Baum, M., Demicheli, R., Hrushesky, W., Retsky, M., 2005. Does surgery unfavourably perturb the “natural history” of early breast cancer by accelerating the appearance of distant metastases? *Eur. J. Cancer* 41, 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.09.031>
- Béduneau, A., Saulnier, P., Benoit, J.-P., 2007. Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials* 28, 4947–4967. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.011>
- Beier, C.P., Schmid, C., Gorlia, T., Kleinletzenberger, C., Beier, D., Grauer, O., Steinbrecher, A., Hirschmann, B., Brawanski, A., Dietmaier, C., Jauch-Worley, T., Kölbl, O., Pietsch, T., Proescholdt, M., Rümmele, P., Muigg, A., Stockhammer, G., Hegi, M., Bogdahn, U., Hau, P., 2009. RNOP-09: pegylated liposomal doxorubicine and prolonged temozolomide in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma—a phase II study. *BMC Cancer* 9, 308. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-308>
- Ben Sghier, A., 2014. *Les épilepsies pharmacorésistantes (A propos de 25 cas) (Doctorat en Médecine)*. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah - Faculté de Médecine et de Pharmacie, FES, Maroc.
- Berger, C., Xia, F., Köhrmann, M., Schwab, S., 2007. Hypothermia in acute stroke—Slow versus fast rewarming. *Exp. Neurol.* 204, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.10.002>
- Bernal, W., Murphy, N., Brown, S., Whitehouse, T., Bjerring, P.N., Hauerberg, J., Frederiksen, H.J., Auzinger, G., Wendon, J., Larsen, F.S., 2016. A multicentre randomized controlled trial of moderate hypothermia to prevent intracranial hypertension in acute liver failure. *J. Hepatol.* 65, 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.003>
- Bernard, S., Buist, M., Monteiro, O., Smith, K., 2003. Induced hypothermia using large volume, ice-cold intravenous fluid in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest:: a preliminary report. *Resuscitation* 56, 9–13. [https://doi.org/10.1016/S0300-9572\(02\)00276-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9572(02)00276-9)

- Bernard, S.A., Gray, T.W., Buist, M.D., Jones, B.M., Silvester, W., Gutteridge, G., Smith, K., 2002. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N. Engl. J. Med.* 346, 557–563.
- Bernard, S.A., Jones, B.M., Horne, M.K., 1997. Clinical trial of induced hypothermia in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *Ann. Emerg. Med.* 30, 146–153. [https://doi.org/10.1016/s0196-0644\(97\)70133-1](https://doi.org/10.1016/s0196-0644(97)70133-1)
- Bernshtein, V.A., Kleinbok, T.S., Chulanova-Nurkina, M.T., 1970. Irradiation of ascites tumors of the ovaries in rats under hypothermia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 70, 1049–1051. <https://doi.org/10.1007/BF00802912>
- Bielamowicz, K., Fousek, K., Byrd, T.T., Samaha, H., Mukherjee, M., Aware, N., Wu, M.-F., Orange, J.S., Sumazin, P., Man, T.-K., Joseph, S.K., Hegde, M., Ahmed, N., 2018. Trivalent CAR T cells overcome interpatient antigenic variability in glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 20, 506–518. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox182>
- Bienkowski, M., Furtner, J., Hainfellner, J.A., 2018. Chapter 32 - Clinical neuropathology of brain tumors, in: Kovacs, G.G., Alafuzoff, I. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology, Neuropathology*. Elsevier, pp. 477–534. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802395-2.00032-8>
- Biga, L.M., Dawson, S., Harwell, A., Hopkins, R., Kaufmann, J., LeMaster, M., Matern, P., Morrison-Graham, K., Quick, D., Runyeon, J., 2020. *Anatomy & Physiology*. OpenStax/Oregon State University.
- Blough, M.D., Beauchamp, D.C., Westgate, M.R., Kelly, J.J., Cairncross, J.G., 2011. Effect of aberrant p53 function on temozolomide sensitivity of glioma cell lines and brain tumor initiating cells from glioblastoma. *J. Neurooncol.* 102, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0283-9>
- Blumenthal, D.T., Gorlia, T., Gilbert, M.R., Kim, M.M., Burt Nabors, L., Mason, W.P., Hegi, M.E., Zhang, P., Golfinopoulos, V., Perry, J.R., Hyun Nam, D., Erridge, S.C., Corn, B.W., Mirimanoff, R.O., Brown, P.D., Baumert, B.G., Mehta, M.P., van den Bent, M.J., Reardon, D.A., Weller, M., Stupp, R., 2017. Is more better? The impact of extended adjuvant temozolomide in newly diagnosed glioblastoma: a secondary analysis of EORTC and NRG Oncology/RTOG. *Neuro-Oncol.* 19, 1119–1126. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox025>
- Bohl, M.A., Martirosyan, N.L., Killeen, Z.W., Belykh, E., Zabramski, J.M., Spetzler, R.F., Preul, M.C., 2018. The history of therapeutic hypothermia and its use in neurosurgery. *J. Neurosurg.* 130, 1006–1020. <https://doi.org/10.3171/2017.10.JNS171282>
- Bota, D.A., Chung, J., Dandekar, M., Carrillo, J.A., Kong, X.-T., Fu, B.D., Hsu, F.P., Schönthal, A.H., Hofman, F.M., Chen, T.C., Zidovetzki, R., Pretto, C., Strik, A., Schijns, V.E., Stathopoulos, A., 2018. Phase II study of ERC1671 plus bevacizumab versus bevacizumab plus placebo in recurrent glioblastoma: interim results and correlations with CD4+ T-lymphocyte counts. *CNS Oncol.* 7, CNS22. <https://doi.org/10.2217/cns-2018-0009>
- Bramlett, H.M., Green, E.J., Dietrich, W.D., Busto, R., Globus, M.Y.-T., Ginsberg, M.D., 1995. Posttraumatic Brain Hypothermia Provides Protection from Sensorimotor and Cognitive Behavioral Deficits. *J. Neurotrauma* 12, 289–298. <https://doi.org/10.1089/neu.1995.12.289>
- Brandes, A.A., Carpentier, A.F., Kesari, S., Sepulveda-Sanchez, J.M., Wheeler, H.R., Chinot, O., Cher, L., Steinbach, J.P., Capper, D., Specenier, P., Rodon, J., Cleverly, A., Smith, C., Gueorguieva, I., Miles, C., Guba, S.C., Desai, D., Lahn, M.M., Wick, W., 2016a. A Phase II randomized study of galunisertib monotherapy or galunisertib plus lomustine compared with lomustine monotherapy in patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 18, 1146–1156. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now009>
- Brandes, A.A., Finocchiaro, G., Zagonel, V., Reni, M., Caserta, C., Fabi, A., Clavarezza, M., Maiello, E., Eoli, M., Lombardi, G., Monteforte, M., Proietti, E., Agati, R., Eusebi, V., Franceschi, E., 2016b. AVAREG: a phase II, randomized, noncomparative study of fotemustine or bevacizumab for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 18, 1304–1312. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now035>
- Brem, H., Piantadosi, S., Burger, P.C., Walker, M., Selker, R., Vick, N.A., Black, K., Sisti, M., Brem, S., Mohr, G., Muller, P., Morawetz, R., Schold, S.C., 1995. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for

- recurrent gliomas. *The Lancet* 345, 1008–1012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90755-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90755-6)
- Brochu, C., Cabrita, M.A., Melanson, B.D., Hamill, J.D., Lau, R., Pratt, M.A.C., McKay, B.C., 2013. NF- κ B-dependent role for cold-inducible RNA binding protein in regulating interleukin 1 β . *PLoS One* 8, e57426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057426>
- Brown, C.E., Alizadeh, D., Starr, R., Weng, L., Wagner, J.R., Naranjo, A., Ostberg, J.R., Blanchard, M.S., Kilpatrick, J., Simpson, J., Kurien, A., Priceman, S.J., Wang, X., Harshbarger, T.L., D'Apuzzo, M., Ressler, J.A., Jensen, M.C., Barish, M.E., Chen, M., Portnow, J., Forman, S.J., Badie, B., 2016. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N. Engl. J. Med.* 375, 2561–2569. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1610497>
- Brown, N., McBain, C., Nash, S., Hopkins, K., Sanghera, P., Saran, F., Phillips, M., Dungey, F., Clifton-Hadley, L., Wanek, K., Krell, D., Jeffries, S., Khan, I., Smith, P., Mulholland, P., 2016. Multi-Center Randomized Phase II Study Comparing Cediranib plus Gefitinib with Cediranib plus Placebo in Subjects with Recurrent/Progressive Glioblastoma. *PLoS One* 11, e0156369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156369>
- Bu, N., Zhao, E., Gao, Y., Zhao, S., Bo, W., Kong, Z., Wang, Q., Gao, W., 2019. Association between perioperative hypothermia and surgical site infection: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 98, e14392. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014392>
- Burton, J.M., Peebles, G.A., Binder, D.K., Rothman, S.M., Smyth, M.D., 2005. Transcortical Cooling Inhibits Hippocampal-kindled Seizures in the Rat. *Epilepsia* 46, 1881–1887.
- Busto, R., Globus, M.Y., Dietrich, W.D., Martinez, E., Valdes, I., Ginsberg, M.D., 1989. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 20, 904–910.
- Cancer Genome Atlas Research Network, 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature07385>
- Cao, Z., Balasubramanian, A., Marrelli, S.P., 2014. Pharmacologically induced hypothermia via TRPV1 channel agonism provides neuroprotection following ischemic stroke when initiated 90 min after reperfusion. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R149–R156. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00329.2013>
- Carpentier, A., Canney, M., Vignot, A., Reina, V., Beccaria, K., Horodyckid, C., Karachi, C., Leclercq, D., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., Capelle, L., Cornu, P., Sanson, M., Hoang-Xuan, K., Delattre, J.-Y., Idbaih, A., 2016. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci. Transl. Med.* 8, 343re2. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6086>
- Castrén Maaret, Nordberg Per, Svensson Leif, Taccone Fabio, Vincent Jean-Louise, Desruelles Didier, Eichwede Frank, Mols Pierre, Schwab Tilmann, Vergnion Michel, Storm Christian, Pesenti Antonio, Pachtl Jan, Guérisse Fabien, Elste Thomas, Roessler Markus, Fritz Harald, Durnez Pieterjan, Busch Hans-Jörg, Inderbitzen Becky, Barbut Denise, 2010. Intra-Arrest Transnasal Evaporative Cooling. *Circulation* 122, 729–736. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.931691>
- Chakravarti, A., Wang, M., Robins, H.I., Lautenschlaeger, T., Curran, W.J., Brachman, D.G., Schultz, C.J., Choucair, A., Dolled-Filhart, M., Christiansen, J., Gustavson, M., Molinaro, A., Mischel, P., Dicker, A.P., Bredel, M., Mehta, M., 2013. RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 85, 1206–1211. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2012.10.008>
- Chang, S.M., Wen, P., Cloughesy, T., Greenberg, H., Schiff, D., Conrad, C., Fink, K., Robins, H.I., De Angelis, L., Raizer, J., Hess, K., Aldape, K., Lamborn, K.R., Kuhn, J., Dancey, J., Prados, M.D., North American Brain Tumor Consortium and the National Cancer Institute, 2005. Phase II study of CCI-779 in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Invest. New Drugs* 23, 357–361. <https://doi.org/10.1007/s10637-005-1444-0>
- Chen, H., Wu, F., Yang, P., Shao, J., Chen, Q., Zheng, R., 2019. A meta-analysis of the effects of therapeutic hypothermia in adult patients with traumatic brain injury. *Crit. Care Lond. Engl.* 23, 396. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2667-3>

- Chen, J., Liu, L., Zhang, H., Geng, X., Jiao, L., Li, G., Coutinho, J.M., Ding, Y., Liebeskind, D.S., Ji, X., 2016. Endovascular Hypothermia in Acute Ischemic Stroke: Pilot Study of Selective Intra-Arterial Cold Saline Infusion. *Stroke* 47, 1933–1935. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012727>
- Chen, Y., Liu, L., 2012. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev., Delivery of Therapeutics to the Central Nervous System* 64, 640–665. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.010>
- Childs, C., 2018. Chapter 29 - Body temperature and clinical thermometry, in: Romanovsky, A.A. (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology, Thermoregulation: From Basic Neuroscience to Clinical Neurology, Part II*. Elsevier, pp. 467–482. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00029-X>
- Chinnaiyan, P., Won, M., Wen, P.Y., Rojiani, A.M., Werner-Wasik, M., Shih, H.A., Ashby, L.S., Michael Yu, H.-H., Stieber, V.W., Malone, S.C., Fiveash, J.B., Mohile, N.A., Ahluwalia, M.S., Wendland, M.M., Stella, P.J., Kee, A.Y., Mehta, M.P., 2018. A randomized phase II study of everolimus in combination with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma: results of NRG Oncology RTOG 0913. *Neuro-Oncol.* 20, 666–673. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox209>
- Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., Brandes, A.A., Hilton, M., Abrey, L., Cloughesy, T., 2014. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308345>
- Chip, S., Zelmer, A., Ogunshola, O.O., Felderhoff-Mueser, U., Nitsch, C., Bühner, C., Wellmann, S., 2011. The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol. Dis.* 43, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.010>
- Choi, J.H., Marshall, R.S., Neimark, M.A., Konstas, A.A., Lin, E., Chiang, Y.T., Mast, H., Rundek, T., Mohr, J.P., Pile-Spellman, J., 2010. Selective brain cooling with endovascular intracarotid infusion of cold saline: a pilot feasibility study. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 31, 928–934. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1961>
- Choi, J.H., Pile-Spellman, J., 2018. Selective brain hypothermia. *Handb. Clin. Neurol.* 157, 839–852. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64074-1.00052-5>
- Choi, K.-E., Hall, C.L., Sun, J.-M., Wei, L., Mohamad, O., Dix, T.A., Yu, S.P., 2012. A novel stroke therapy of pharmacologically induced hypothermia after focal cerebral ischemia in mice. *FASEB J.* 26, 2799–2810. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201822>
- Clifton, G.L., Coffey, C.S., Fourwinds, S., Zygun, D., Valadka, A., Smith, K.R., Frisby, M.L., Bucholz, R.D., Wilde, E.A., Levin, H.S., Okonkwo, D.O., 2012. Early induction of hypothermia for evacuated intracranial hematomas: a post hoc analysis of two clinical trials. *J. Neurosurg.* 117, 714–720. <https://doi.org/10.3171/2012.6.JNS111690>
- Clifton, G.L., Jiang, J.Y., Lyeth, B.G., Jenkins, L.W., Hamm, R.J., Hayes, R.L., 1991. Marked Protection by Moderate Hypothermia after Experimental Traumatic Brain Injury: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1991.13>
- Cloughesy, T.F., Drappatz, J., de Groot, J., Prados, M.D., Reardon, D.A., Schiff, D., Chamberlain, M., Mikkelsen, T., Desjardins, A., Ping, J., Holland, J., Weitzman, R., Wen, P.Y., 2018. Phase II study of cabozantinib in patients with progressive glioblastoma: subset analysis of patients with prior antiangiogenic therapy. *Neuro-Oncol.* 20, 259–267. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox151>
- Cloughesy, T.F., Mochizuki, A.Y., Orpilla, J.R., Hugo, W., Lee, A.H., Davidson, T.B., Wang, A.C., Ellingson, B.M., Rytlewski, J.A., Sanders, C.M., Kawaguchi, E.S., Du, L., Li, G., Yong, W.H., Gaffey, S.C., Cohen, A.L., Mellinshoff, I.K., Lee, E.Q., Reardon, D.A., O'Brien, B.J., Butowski, N.A., Nghiemphu, P.L., Clarke, J.L., Arrillaga-Romany, I.C., Colman, H., Kaley, T.J., de Groot, J.F., Liao, L.M., Wen, P.Y., Prins, R.M., 2019. Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nat. Med.* 25, 477–486. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0337-7>
- Coffey, J.C., Smith, M.J.F., Wang, J.H., Bouchier-Hayes, D., Cotter, T.G., Redmond, H.P., 2006. Cancer surgery: risks and opportunities. *BioEssays* 28, 433–437. <https://doi.org/10.1002/bies.20381>
- Colbourne, F., Corbett, D., 1995. Delayed postischemic hypothermia: a six month survival study using behavioral and histological assessments of neuroprotection. *J. Neurosci.* 15, 7250–7260.

- Condon, H.A., 1967. Protective hypothermia for cancer chemotherapy. *Br. J. Anaesth.* 39, 806–812. <https://doi.org/10.1093/bja/39.10.806>
- Cooper, D.J., Nichol, A.D., Bailey, M., Bernard, S., Cameron, P.A., Pili-Floury, S., Forbes, A., Gantner, D., Higgins, A.M., Huet, O., Kasza, J., Murray, L., Newby, L., Presneill, J.J., Rashford, S., Rosenfeld, J.V., Stephenson, M., Vallance, S., Varma, D., Webb, S.A.R., Trapani, T., McArthur, C., 2018. Effect of Early Sustained Prophylactic Hypothermia on Neurologic Outcomes Among Patients With Severe Traumatic Brain Injury: The POLAR Randomized Clinical Trial. *JAMA* 320, 2211–2220. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.17075>
- Corbett, R.J., Laptook, A.R., 1998. Failure of localized head cooling to reduce brain temperature in adult humans. *Neuroreport* 9, 2721–2725. <https://doi.org/10.1097/00001756-199808240-00007>
- Corry, J.J., Dhar, R., Murphy, T., Diringier, M.N., 2008. Hypothermia for refractory status epilepticus. *Neurocrit. Care* 9, 189–197. <https://doi.org/10.1007/s12028-008-9092-9>
- Covaciu, L., Weis, J., Bengtsson, C., Allers, M., Lunderquist, A., Ahlström, H., Rubertsson, S., 2011. Brain temperature in volunteers subjected to intranasal cooling. *Intensive Care Med.* 37, 1277–1284. <https://doi.org/10.1007/s00134-011-2264-7>
- Cuoco, J.A., Benko, M.J., Busch, C.M., Rogers, C.M., Prickett, J.T., Marvin, E.A., 2018. Vaccine-Based Immunotherapeutics for the Treatment of Glioblastoma: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *World Neurosurg.* 120, 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.08.202>
- D'Ambrosio, R., Eastman, C.L., Darvas, F., Fender, J.S., Verley, D.R., Farin, F.M., Wilkerson, H.-W., Temkin, N.R., Miller, J.W., Ojemann, J., Rothman, S.M., Smyth, M.D., 2013. Mild passive focal cooling prevents epileptic seizures after head injury in rats: Cooling Prevents Seizures. *Ann. Neurol.* 73, 199–209. <https://doi.org/10.1002/ana.23764>
- Danno, S., Nishiyama, H., Higashitsuji, H., Yokoi, H., Xue, J.-H., Itoh, K., Matsuda, T., Fujita, J., 1997. Increased Transcript Level of RBM3, a Member of the Glycine-Rich RNA-Binding Protein Family, in Human Cells in Response to Cold Stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 804–807. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7059>
- Darlix, A., Baumann, C., Lorgis, V., Ghiringhelli, F., Blonski, M., Chauffert, B., Zouaoui, S., Pinelli, C., Rech, F., Beauchesne, P., Taillandier, L., 2013. Prolonged administration of adjuvant temozolomide improves survival in adult patients with glioblastoma. *Anticancer Res.* 33, 3467–3474.
- Darlix, A., Zouaoui, S., Rigau, V., Bessaoud, F., Figarella-Branger, D., Mathieu-Daudé, H., Trétarre, B., Bauchet, F., Duffau, H., Taillandier, L., Bauchet, L., 2017. Epidemiology for primary brain tumors: a nationwide population-based study. *J. Neurooncol.* 131, 525–546. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2318-3>
- Davis, M.E., 2016. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 20, S2-8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>
- De Georgia, M.A., Krieger, D.W., Abou-Chebl, A., Devlin, T.G., Jauss, M., Davis, S.M., Koroshetz, W.J., Rordorf, G., Warach, S., 2004. Cooling for Acute Ischemic Brain Damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling. *Neurology* 63, 312–317. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000129840.66938.75>
- de Tayrac, M., Mosser, J., 2010. Catégorisation des glioblastomes : typologie et profilage du génome. *Neurochirurgie* 56, 464–466. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.009>
- De Vleeschouwer, S. (Ed.), 2017. Glioblastoma, Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium. ed. Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codon.glioblastoma.2017.ind>
- Demicheli, R., Retsky, M.W., Hrushesky, W.J.M., Baum, M., Gukas, I.D., 2008. The effects of surgery on tumor growth: a century of investigations. *Ann. Oncol.* 19, 1821–1828. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn386>
- Deng, H., Han, H.S., Cheng, D., Sun, G.H., Yenari, M.A., 2003. Mild Hypothermia Inhibits Inflammation After Experimental Stroke and Brain Inflammation. *Stroke* 34, 2495–2501. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000091269.67384.E7>
- Desjardins, A., Gromeier, M., Herndon, J.E., Beaubier, N., Bolognesi, D.P., Friedman, A.H., Friedman, H.S., McSherry, F., Muscat, A.M., Nair, S., Peters, K.B., Randazzo, D., Sampson, J.H., Vlahovic,

- G., Harrison, W.T., McLendon, R.E., Ashley, D., Bigner, D.D., 2018. Recurrent Glioblastoma Treated with Recombinant Poliovirus. *N. Engl. J. Med.* 379, 150–161. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716435>
- Deye, N., Cariou, A., Girardie, P., Pichon, N., Megarbane, B., Midez, P., Tonnelier, J.-M., Boulain, T., Outin, H., Delahaye, A., Cravoisy, A., Mercat, A., Blanc, P., Santr , C., Quintard, H., Brivet, F., Charpentier, J., Garrigue, D., Francois, B., Quenot, J.-P., Vincent, F., Gueugniaud, P.-Y., Mira, J.-P., Carli, P., Vicaut, E., Baud, F.J., Clinical and Economical Impact of Endovascular Cooling in the Management of Cardiac Arrest (ICEREA) Study Group, 2015. Endovascular Versus External Targeted Temperature Management for Patients With Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Randomized, Controlled Study. *Circulation* 132, 182–193. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012805>
- Dididze, M., Green, B.A., Dietrich, W.D., Vanni, S., Wang, M.Y., Levi, A.D., 2013. Systemic hypothermia in acute cervical spinal cord injury: a case-controlled study. *Spinal Cord* 51, 395–400. <https://doi.org/10.1038/sc.2012.161>
- Diestel, A., Roessler, J., Berger, F., Schmitt, K.R.L., 2008. Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells. *Cryobiology* 57, 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.08.005>
- Diestel, A., Troeller, S., Billecke, N., Sauer, I.M., Berger, F., Schmitt, K.R.L., 2010. Mechanisms of hypothermia-induced cell protection mediated by microglial cells *in vitro*. *Eur. J. Neurosci.* 31, 779–787. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07128.x>
- Dietrich, W.D., Alonso, O., Busto, R., Globus, M.Y.-T., Ginsberg, M.D., 1994. Post-traumatic brain hypothermia reduces histopathological damage following concussive brain injury in the rat. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 87, 250–258. <https://doi.org/10.1007/BF00296740>
- Dietrich, W.D., Bramlett, H.M., 2017. Therapeutic hypothermia and targeted temperature management for traumatic brain injury: Experimental and clinical experience. *Brain Circ.* 3, 186–198. https://doi.org/10.4103/bc.bc_28_17
- Dixit, S., Hingorani, M., Achawal, S., Scott, I., 2011. The sequential use of carmustine wafers (Gliadel®) and post-operative radiotherapy with concomitant temozolomide followed by adjuvant temozolomide: a clinical review. *Br. J. Neurosurg.* 25, 459–469. <https://doi.org/10.3109/02688697.2010.550342>
- Du, G., Liu, Y., Li, J., Liu, W., Wang, Y., Li, H., 2013. Hypothermic microenvironment plays a key role in tumor immune subversion. *Int. Immunopharmacol.* 17, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.018>
- Dunkley, S., McLeod, A., 2017. Therapeutic hypothermia in patients following traumatic brain injury: a systematic review. *Nurs. Crit. Care* 22, 150–160. <https://doi.org/10.1111/nicc.12242>
- EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure, 2017. *J. Hepatol.* 66, 1047–1081. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.003>
- Eicher, D.J., Wagner, C.L., Katikaneni, L.P., Hulsey, T.C., Bass, W.T., Kaufman, D.A., Horgan, M.J., Languani, S., Bhatia, J.J., Givelichian, L.M., Sankaran, K., Yager, J.Y., 2005. Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: efficacy outcomes. *Pediatr. Neurol.* 32, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2004.06.014>
- Epilepsy Action | Epilepsy information and advice [WWW Document], 2018. *Br. Epilepsy Assoc.* URL <https://www.epilepsy.org.uk/> (accessed 5.9.18).
- Erlinge, D., G tberg, M., Noc, M., Lang, I., Holzer, M., Clemmensen, P., Jensen, U., Metzler, B., James, S., B tker, H.E., Omerovic, E., Koul, S., Engblom, H., Carlsson, M., Arheden, H.,  stlund, O., Wallentin, L., Klos, B., Harnek, J., Olivecrona, G.K., 2015. Therapeutic hypothermia for the treatment of acute myocardial infarction-combined analysis of the RAPID MI-ICE and the CHILL-MI trials. *Ther. Hypothermia Temp. Manag.* 5, 77–84. <https://doi.org/10.1089/ther.2015.0009>
- Esambert, B., Allonneau-Roubertie, E., n.d. FFRE | Les m dicaments contre l’ pilepsie [WWW Document]. *Fond. Fr. Pour Rech. Sur Epilepsie.* URL <http://www.fondation-epilepsie.fr/comprendre-epilepsie/traitements/medicaments/> (accessed 5.7.18).

- Fay, T., 1959. Early experiences with local and generalized refrigeration of the human brain. *J. Neurosurg.* 16, 239–259; discussion 259–260. <https://doi.org/10.3171/jns.1959.16.3.0239>
- Field, K.M., Simes, J., Nowak, A.K., Cher, L., Wheeler, H., Hovey, E.J., Brown, C.S.B., Barnes, E.H., Sawkins, K., Livingstone, A., Freilich, R., Phal, P.M., Fitt, G., CABARET/COGNO investigators, Rosenthal, M.A., 2015. Randomized phase 2 study of carboplatin and bevacizumab in recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 17, 1504–1513. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov104>
- Figarella-Branger, D., Bouvier, C., Moroch, J., Michalak, S., F. Burel-Vandenbos, 2010a. Classification morphologique des glioblastomes. *Neurochirurgie, SNCLF - Journées annuelles, Marne-la-Vallée (Paris), 5-8 décembre 2010* 56, 459–463. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.014>
- Figarella-Branger, D., Colin, C., Tchoghandjian, A., Baeza, N., Bouvier, C., 2010b. Glioblastomas: Gliomagenesis, genetics, angiogenesis, and microenvironment. *Neurochirurgie* 56, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2010.07.010>
- Fischer, S., Renz, D., Wiesnet, M., Schaper, W., Karliczek, G.F., 1999. Hypothermia abolishes hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 74, 135–144.
- Fisher, C.J., Niu, C., Foltz, W., Chen, Y., Sidorova-Darmos, E., Eubanks, J.H., Lilge, L., 2017. ALA-PpIX mediated photodynamic therapy of malignant gliomas augmented by hypothermia. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181654>
- Fisher, R.S., 2012. Therapeutic Devices for Epilepsy. *Ann. Neurol.* 71, 157–168. <https://doi.org/10.1002/ana.22621>
- Forrester, J.M., 2000. The origins and fate of James Currie's cold water treatment for fever. *Med. Hist.* 44, 57–74.
- Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K.A., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R., Vredenburgh, J., Huang, J., Zheng, M., Cloughesy, T., 2009. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4733–4740. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8721>
- Frink, M., Flohé, S., van Griensven, M., Mommsen, P., Hildebrand, F., 2012. Facts and Fiction: The Impact of Hypothermia on Molecular Mechanisms following Major Challenge. *Mediators Inflamm.* 2012, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2012/762840>
- Fritz, A.G. (Ed.), 2013. International classification of diseases for oncology: ICD-O, Third edition, First revision. ed. World Health Organization, Geneva.
- Fu, T., Blei, A.T., Takamura, N., Lin, T., Guo, D., Li, H., O'Gorman, M.R., Soriano, H.E., 2004. Hypothermia inhibits Fas-mediated apoptosis of primary mouse hepatocytes in culture. *Cell Transplant.* 13, 667–676. <https://doi.org/10.3727/000000004783983495>
- Fuernau, G., Beck, J., Desch, S., Eitel, I., Jung, C., Erbs, S., Mangner, N., Lurz, P., Fengler, K., Jobs, A., Vonthein, R., de Waha-Thiele, S., Sandri, M., Schuler, G., Thiele, H., 2019. Mild Hypothermia in Cardiogenic Shock Complicating Myocardial Infarction. *Circulation* 139, 448–457. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.032722>
- Fujii, M., Fujioka, H., Oku, T., Tanaka, N., Imoto, H., Maruta, Y., Nomura, S., Kajiwara, K., Saito, T., Yamakawa, Toshitaka, Yamakawa, Takeshi, Suzuki, M., 2010. Application of focal cerebral cooling for the treatment of intractable epilepsy. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 50, 839–844.
- Fujii, M., Inoue, T., He, Y., Maruta, Y., Imoto, H., Koizumi, H., Nomura, S., Suzuki, M., Tokiwa, T., Ishizuka, S., 2011. Alternative treatment of intractable epilepsy with focal brain cooling-A review of our past studies, in: *Systems, Man, and Cybernetics (SMC), 2011 IEEE International Conference On. IEEE*, pp. 681–685.
- Fujii, M., Inoue, T., Nomura, S., Maruta, Y., He, Y., Koizumi, H., Shirao, S., Owada, Y., Kunitsugu, I., Yamakawa, Toshitaka, Tokiwa, T., Ishizuka, S., Yamakawa, Takeshi, Suzuki, M., 2012. Cooling of the epileptic focus suppresses seizures with minimal influence on neurologic functions: Hypothermal Modulation of Focal Epilepsy. *Epilepsia* 53, 485–493. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03388.x>
- Fujita, J., 1999. Cold shock response in mammalian cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 243–255.
- Fulbert, C., Chabardès, S., Ratel, D., 2021. Adjuvant therapeutic potential of moderate hypothermia for glioblastoma. *J. Neurooncol.* 152, 467–482. <https://doi.org/10.1007/s11060-021-03704-y>

- Fulbert, C., Gaude, C., Sulpice, E., Chabardès, S., Ratel, D., 2019. Moderate hypothermia inhibits both proliferation and migration of human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03263-3>
- Gainer, J.L., Sheehan, J.P., Lerner, J.M., Jones, D.R., 2017. Trans sodium crocetin with temozolomide and radiation therapy for glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* 126, 460–466. <https://doi.org/10.3171/2016.3.JNS152693>
- Gao, X.-Y., Zhu, S.-Z., Xiang, W., Huang, K., Hu, Y.-F., Gu, Y., Pan, S.-Y., 2016. Prolonged hypothermia exposure diminishes neuroprotection for severe ischemic-hypoxic primary neurons. *Cryobiology* 72, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.01.003>
- Gaudio, F.G., Grissom, C.K., 2016. Cooling Methods in Heat Stroke. *J. Emerg. Med.* 50, 607–616. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2015.09.014>
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P.D., Jaeckle, K.A., Schiff, D., Stieber, V.W., Brachman, D.G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I.W., Sulman, E.P., Aldape, K.D., Curran, W.J., Mehta, M.P., 2014. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 699–708. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308573>
- Gilbert, M.R., Pugh, S.L., Aldape, K., Sorensen, A.G., Mikkelsen, T., Penas-Prado, M., Bokstein, F., Kwok, Y., Lee, R.J., Mehta, M., 2017. NRG oncology RTOG 0625: a randomized phase II trial of bevacizumab with either irinotecan or dose-dense temozolomide in recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* 131, 193–199. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2288-5>
- Gluckman, P.D., Wyatt, J.S., Azzopardi, D., Ballard, R., Edwards, A.D., Ferriero, D.M., Polin, R.A., Robertson, C.M., Thoresen, M., Whitelaw, A., Gunn, A.J., 2005. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet Lond. Engl.* 365, 663–670. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17946-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17946-X)
- González-Ibarra, F.P., Varon, J., López-Meza, E.G., 2011. Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action. *Front. Neurol.* 2, 4. <https://doi.org/10.3389/fneur.2011.00004>
- Goury, A., Poirson, F., Chaput, U., Voicu, S., Garçon, P., Beeken, T., Malissin, I., Kerdjana, L., Chelly, J., Vodovar, D., Oueslati, H., Ekherian, J.M., Marteau, P., Vicaut, E., Megarbane, B., Deye, N., 2017. Targeted temperature management using the “Esophageal Cooling Device” after cardiac arrest (the COOL study): A feasibility and safety study. *Resuscitation* 121, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2017.09.021>
- Grabowski, M.M., Recinos, P.F., Nowacki, A.S., Schroeder, J.L., Angelov, L., Barnett, G.H., Vogelbaum, M.A., 2014. Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J. Neurosurg.* 121, 1115–1123. <https://doi.org/10.3171/2014.7.JNS132449>
- Groysman, L.I., Emanuel, B.A., Kim-Tenser, M.A., Sung, G.Y., Mack, W.J., 2011. Therapeutic hypothermia in acute ischemic stroke. *Neurosurg. Focus* 30, E17. <https://doi.org/10.3171/2011.4.FOCUS1154>
- Grupp, K., Wilking, J., Prien, K., Hube-Magg, C., Sirma, H., Simon, R., Steurer, S., Budäus, L., Haese, A., Izbicki, J., Sauter, G., Minner, S., Schlomm, T., Tsourlakis, M.C., 2014. High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions. *Eur. J. Cancer* 50, 852–861. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.12.003>
- Gunn, A.J., Laptook, A.R., Robertson, N.J., Barks, J.D., Thoresen, M., Wassink, G., Bennet, L., 2017. Therapeutic hypothermia translates from ancient history in to practice. *Pediatr. Res.* 81, 202–209. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.198>
- Ha, K.-Y., Kim, Y.-H., 2008. Neuroprotective effect of moderate epidural hypothermia after spinal cord injury in rats. *Spine* 33, 2059–2065. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31818018f6>
- Hachimi-Idrissi, S., Van Hemelrijck, A., Michotte, A., Smolders, I., Sarre, S., Ebinger, G., Huyghens, L., Michotte, Y., 2004. Postischemic mild hypothermia reduces neurotransmitter release and astroglial cell proliferation during reperfusion after asphyxial cardiac arrest in rats. *Brain Res.* 1019, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.06.013>

- Hadjipanayis, C.G., Stummer, W., 2019. 5-ALA and FDA approval for glioma surgery. *J. Neurooncol.* 141, 479–486. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03098-y>
- Hamard, L., Ratel, D., Selek, L., Berger, F., van der Sanden, B., Wion, D., 2016. The brain tissue response to surgical injury and its possible contribution to glioma recurrence. *J. Neurooncol.* 128, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2096-y>
- Hardee, M.E., Zagzag, D., 2012. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *Am. J. Pathol.* 181, 1126–1141. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.030>
- Harrison, D.F.N., 1967. The Use of Hypothermia in Intra-Arterial Chemotherapy for Head and Neck Cancer. *J. Laryngol. Otol.* 81, 173–186. <https://doi.org/10.1017/S0022215100066937>
- Haugk, M., Sterz, F., Grassberger, M., Uray, T., Kliegel, A., Janata, A., Richling, N., Herkner, H., Laggner, A.N., 2007. Feasibility and efficacy of a new non-invasive surface cooling device in post-resuscitation intensive care medicine. *Resuscitation* 75, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2007.03.001>
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., Bromberg, J.E.C., Hau, P., Mirimanoff, R.O., Cairncross, J.G., Janzer, R.C., Stupp, R., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 997–1003. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043331>
- Hemmen, T.M., Raman, R., Guluma, K.Z., Meyer, B.C., Gomes, J.A., Cruz-Flores, S., Wijman, C.A., Rapp, K.S., Grotta, J.C., Lyden, P.D., ICTuS-L Investigators, 2010. Intravenous thrombolysis plus hypothermia for acute treatment of ischemic stroke (ICTuS-L): final results. *Stroke* 41, 2265–2270. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.592295>
- Hermisson, M., Klumpp, A., Wick, W., Wischhusen, J., Nagel, G., Roos, W., Kaina, B., Weller, M., 2006. O6-methylguanine DNA methyltransferase and p53 status predict temozolomide sensitivity in human malignant glioma cells. *J. Neurochem.* 96, 766–776. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03583.x>
- Herrlinger, U., Schäfer, N., Steinbach, J.P., Weyerbrock, A., Hau, P., Goldbrunner, R., Friedrich, F., Rohde, V., Ringel, F., Schlegel, U., Sabel, M., Ronellenfitsch, M.W., Uhl, M., Maciaczyk, J., Grau, S., Schnell, O., Hänel, M., Krex, D., Vajkoczy, P., Gerlach, R., Kortmann, R.-D., Mehdorn, M., Tüttenberg, J., Mayer-Steinacker, R., Fietkau, R., Brehmer, S., Mack, F., Stuplich, M., Kebir, S., Kohnen, R., Dunkl, E., Leutgeb, B., Proescholdt, M., Pietsch, T., Urbach, H., Belka, C., Stummer, W., Glas, M., 2016. Bevacizumab Plus Irinotecan Versus Temozolomide in Newly Diagnosed O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Nonmethylated Glioblastoma: The Randomized GLARIUS Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 34, 1611–1619. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.4691>
- Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J.P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R.-D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., Suchorska, B., Brehmer, S., Weyerbrock, A., Renovanz, M., Bullinger, L., Galldiks, N., Vajkoczy, P., Misch, M., Vatter, H., Stuplich, M., Schäfer, N., Kebir, S., Weller, J., Schaub, C., Stummer, W., Tonn, J.-C., Simon, M., Keil, V.C., Nelles, M., Urbach, H., Coenen, M., Wick, W., Weller, M., Fimmers, R., Schmid, M., Hattingen, E., Pietsch, T., Coch, C., Glas, M., Neurooncology Working Group of the German Cancer Society, 2019. Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 393, 678–688. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31791-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31791-4)
- Hickey, R.W., Ferimer, H., Alexander, H.L., Garman, R.H., Callaway, C.W., Hicks, S., Safar, P., Graham, S.H., Kochanek, P.M., 2000. Delayed, spontaneous hypothermia reduces neuronal damage after asphyxial cardiac arrest in rats. *Crit. Care Med.* 28, 3511–3516. <https://doi.org/10.1097/00003246-200010000-00027>
- Hicks, S.D., DeFranco, D.B., Callaway, C.W., 2000. Hypothermia during reperfusion after asphyxial cardiac arrest improves functional recovery and selectively alters stress-induced protein expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 520–530. <https://doi.org/10.1097/00004647-200003000-00011>

- Hientz, K., Mohr, A., Bhakta-Guha, D., Efferth, T., 2017. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 8, 8921–8946. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13475>
- Hildebrand, F., Giannoudis, P.V., van Griensven, M., Chawda, M., Pape, H.-C., 2004. Pathophysiologic changes and effects of hypothermia on outcome in elective surgery and trauma patients. *Am. J. Surg.* 187, 363–371. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2003.12.016>
- Hilf, N., Kuttruff-Coqui, S., Frenzel, K., Bukur, V., Stevanović, S., Gouttefangeas, C., Platten, M., Tabatabai, G., Dutoit, V., van der Burg, S.H., Thor Straten, P., Martínez-Ricarte, F., Ponsati, B., Okada, H., Lassen, U., Admon, A., Ottensmeier, C.H., Ulges, A., Kreiter, S., von Deimling, A., Skardelly, M., Migliorini, D., Kroep, J.R., Idorn, M., Rodon, J., Piró, J., Poulsen, H.S., Shraibman, B., McCann, K., Mendrzyk, R., Löwer, M., Stieglbauer, M., Britten, C.M., Capper, D., Welters, M.J.P., Sahuquillo, J., Kiesel, K., Derhovannessian, E., Rusch, E., Bunse, L., Song, C., Heesch, S., Wagner, C., Kemmer-Brück, A., Ludwig, J., Castle, J.C., Schoor, O., Tadmor, A.D., Green, E., Fritsche, J., Meyer, M., Pawlowski, N., Dorner, S., Hoffgaard, F., Rössler, B., Maurer, D., Weinschenk, T., Reinhardt, C., Huber, C., Rammensee, H.-G., Singh-Jasuja, H., Sahin, U., Dietrich, P.-Y., Wick, W., 2019. Actively personalized vaccination trial for newly diagnosed glioblastoma. *Nature* 565, 240–245. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0810-y>
- Hill, M.W., Wong, M., Amarakone, A., Rothman, S.M., 2000. Rapid Cooling Aborts Seizure-Like Activity in Rodent Hippocampal-Entorhinal Slices. *Epilepsia* 41, 1241–1248.
- Hoedemaekers, C.W., Ezzahti, M., Gerritsen, A., van der Hoeven, J.G., 2007. Comparison of cooling methods to induce and maintain normo- and hypothermia in intensive care unit patients: a prospective intervention study. *Crit. Care* 11, R91. <https://doi.org/10.1186/cc6104>
- Hofland, K.F., Hansen, S., Sorensen, M., Engelholm, S., Schultz, H.P., Muhic, A., Grunnet, K., Ask, A., Costa, J.C., Kristiansen, C., Thomsen, C., Poulsen, H.S., Lassen, U., 2014. Neoadjuvant bevacizumab and irinotecan versus bevacizumab and temozolomide followed by concomitant chemoradiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme: A randomized phase II study. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 53, 939–944. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2013.879607>
- Holzer, M., 2008. Devices for rapid induction of hypothermia: *Eur. J. Anaesthesiol.* 25, 31–38. <https://doi.org/10.1017/S0265021507003274>
- Horn, C.M., Sun, C.-H.J., Nogueira, R.G., Patel, V.N., Krishnan, A., Glenn, B.A., Belagaje, S.R., Thomas, T.T., Anderson, A.M., Frankel, M.R., Schindler, K.M., Gupta, R., 2014. Endovascular Reperfusion and Cooling in Cerebral Acute Ischemia (ReCCLAIM I). *J. Neurointerventional Surg.* 6, 91–95. <https://doi.org/10.1136/neurintsurg-2013-010656>
- Horst, K., Eschbach, D., Pfeifer, R., Relja, B., Sassen, M., Steinfeldt, T., Wulf, H., Vogt, N., Frink, M., Ruchholtz, S., Pape, H.C., Hildebrand, F., 2016. Long-Term Effects of Induced Hypothermia on Local and Systemic Inflammation - Results from a Porcine Long-Term Trauma Model. *PLOS ONE* 11, e0154788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154788>
- Hovinga, K.E., Stalpers, L.J.A., van Bree, C., Donker, M., Verhoeff, J.J.C., Rodermond, H.M., Bosch, D.A., van Furth, W.R., 2005. Radiation-Enhanced Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Secretion in Glioblastoma Multiforme Cell Lines – A Clue to Radioresistance? *J. Neurooncol.* 74, 99–103. <https://doi.org/10.1007/s11060-004-4204-7>
- Hu, X., Shi, Q., Zhou, X., He, W., Yi, H., Yin, X., Gearing, M., Levey, A., Yan, R., 2007. Transgenic mice overexpressing reticulon 3 develop neuritic abnormalities. *EMBO J.* 26, 2755–2767. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601707>
- Huang, X., Yang, H., Zhou, Y., Liu, J., Yin, B., Peng, X., Qiang, B., Yuan, J., 2004. Overexpression of human reticulon 3 (hRTN3) in astrocytoma. *Clin. Neuropathol.* 23, 1–7.
- Huber, C., Huber, M., Ding, Y., 2019. Evidence and opportunities of hypothermia in acute ischemic stroke: Clinical trials of systemic versus selective hypothermia. *Brain Circ.* 5, 195–202. https://doi.org/10.4103/bc.bc_25_19
- Hultborn, R., Lundgren-Eriksson, L., Ottosson-Lönn, S., Ryd, W., Weiss, L., 1990. Chlorpromazine-induced hypothermia in tumour-bearing mice, acute cytotoxic drug lethality and long-term

- survival. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 29, 941–944. <https://doi.org/10.3109/02841869009096394>
- Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group, M., 2002. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N. Engl. J. Med.* 346, 549–556.
- Inglis, J.M., Turner, E., 1957. Use of Hypothermia in Non-vascular Intracranial Tumours | *The BMJ. Br. Med. J.* 1335. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5031.1335>
- Inoue, T., Fujii, M., Kida, H., Yamakawa, Toshitaka, Maruta, Y., Tokiwa, T., He, Y., Nomura, S., Owada, Y., Yamakawa, Takeshi, Suzuki, M., 2017. Epidural focal brain cooling abolishes neocortical seizures in cats and non-human primates. *Neurosci. Res.* 122, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.04.007>
- Institut National du Cancer, 2019. Institut National Du Cancer - Accueil [WWW Document]. URL <https://www.e-cancer.fr/> (accessed 3.19.20).
- Institut National du Cancer, 2010. Les tumeurs du cerveau.
- International Agency for Research on Cancer, 2020. Global Cancer Observatory [WWW Document]. IARC. URL <https://gco.iarc.fr/> (accessed 5.8.20).
- Irazuzta, J.E., Pretzlaff, R., Rowin, M., Milam, K., Zemlan, F.P., Zingarelli, B., 2000. Hypothermia as an adjunctive treatment for severe bacterial meningitis. *Brain Res.* 881, 88–97. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02894-8](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02894-8)
- Islam, S., Hampton-Till, J., Watson, N., Mannakkara, N.N., Hamarneh, A., Webber, T., Magee, N., Abbey, L., Jagathesan, R., Kabir, A., Sayer, J., Robinson, N., Aggarwal, R., Clesham, G., Kelly, P., Gamma, R., Tang, K., Davies, J.R., Keeble, T.R., 2015. Early targeted brain COOLing in the cardiac CATHeterisation laboratory following cardiac arrest (COOLCATH). *Resuscitation* 97, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2015.09.386>
- Jackson, T.C., Kochanek, P.M., 2019. A New Vision for Therapeutic Hypothermia in the Era of Targeted Temperature Management: A Speculative Synthesis. *Ther. Hypothermia Temp. Manag.* 9, 13–47. <https://doi.org/10.1089/ther.2019.0001>
- Jackson, T.C., Manole, M.D., Kotermanski, S.E., Jackson, E.K., Clark, R.S.B., Kochanek, P.M., 2015. Cold stress protein RBM3 responds to temperature change in an ultra-sensitive manner in young neurons. *Neuroscience* 305, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.012>
- Jalan, R., O Damink, S.W., Deutz, N.E., Lee, A., Hayes, P.C., 1999. Moderate hypothermia for uncontrolled intracranial hypertension in acute liver failure. *Lancet Lond. Engl.* 354, 1164–1168. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)12440-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)12440-6)
- Jalan, R., Olde Damink, S.W.M., Deutz, N.E.P., Hayes, P.C., Lee, A., 2004. Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Gastroenterology* 127, 1338–1346. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.08.005>
- Ji, N., Zhang, Y., Liu, Y., Xie, J., Wang, Y., Hao, S., Gao, Z., 2018. Heat shock protein peptide complex-96 vaccination for newly diagnosed glioblastoma: a phase I, single-arm trial. *JCI Insight* 3. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99145>
- Jiang, J.Y., Lyeth, B.G., Kapasi, M.Z., Jenkins, L.W., Povlishock, J.T., 1992. Moderate hypothermia reduces blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury in the rat. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 84, 495–500. <https://doi.org/10.1007/BF00304468>
- Jiang, W., Desjardins, P., Butterworth, R.F., 2009. Direct Evidence for Central Proinflammatory Mechanisms in Rats with Experimental Acute Liver Failure: Protective Effect of Hypothermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 944–952. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.18>
- Jiguet Jiglaire, C., Baeza-Kallee, N., Denicolaï, E., Baretts, D., Metellus, P., Padovani, L., Chinot, O., Figarella-Branger, D., Fernandez, C., 2014. Ex vivo cultures of glioblastoma in three-dimensional hydrogel maintain the original tumor growth behavior and are suitable for preclinical drug and radiation sensitivity screening. *Exp. Cell Res.* 321, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.010>
- Jonsson, L., Gaber, A., Ulmert, D., Uhlén, M., Bjartell, A., Jirström, K., 2011. High RBM3 expression in prostate cancer independently predicts a reduced risk of biochemical recurrence and disease progression. *Diagn. Pathol.* 6, 91. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-6-91>

- Joseph, N.M., Phillips, J., Dahiya, S., Felicella, M.M., Tihan, T., Brat, D.J., Perry, A., 2013. Diagnostic implications of IDH1-R132H and OLIG2 expression patterns in rare and challenging glioblastoma variants. *Mod. Pathol.* 26, 315–326. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.173>
- Kalamida, D., Karagounis, I.V., Mitrakas, A., Kalamida, S., Giatromanolaki, A., Koukourakis, M.I., 2015. Fever-Range Hyperthermia vs. Hypothermia Effect on Cancer Cell Viability, Proliferation and HSP90 Expression. *PLOS ONE* 10, e0116021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116021>
- Kaley, T., Touat, M., Subbiah, V., Hollebecque, A., Rodon, J., Lockhart, A.C., Keedy, V., Bielle, F., Hofheinz, R.-D., Joly, F., Blay, J.-Y., Chau, I., Puzanov, I., Raje, N.S., Wolf, J., DeAngelis, L.M., Makrutzki, M., Riehl, T., Pitcher, B., Baselga, J., Hyman, D.M., 2018. BRAF Inhibition in BRAFV600-Mutant Gliomas: Results From the VE-BASKET Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 36, 3477–3484. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.9990>
- Kaneko, T., Kibayashi, K., 2012. Mild hypothermia facilitates the expression of cold-inducible RNA-binding protein and heat shock protein 70.1 in mouse brain. *Brain Res.* 1466, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.05.001>
- Kang, S.H., Cho, J., Jeong, H., Kwon, S.Y., 2018. High RNA-binding Motif Protein 3 Expression Is Associated with Improved Clinical Outcomes in Invasive Breast Cancer. *J. Breast Cancer* 21, 288–296. <https://doi.org/10.4048/jbc.2018.21.e34>
- Karnatovskaia, L.V., Wartenberg, K.E., Freeman, W.D., 2014. Therapeutic Hypothermia for Neuroprotection: History, Mechanisms, Risks, and Clinical Applications. *The Neurohospitalist* 4, 153–163. <https://doi.org/10.1177/1941874413519802>
- Karvellas, C.J., Stravitz, R.T., Battenhouse, H., Lee, W.M., Schilsky, M.L., 2015. Therapeutic hypothermia in acute liver failure: A multicenter retrospective cohort analysis. *Liver Transpl.* 21, 4–12. <https://doi.org/10.1002/lt.24021>
- Kelleher, D.K., Nauth, C., Thews, O., Krueger, W., Vaupel, P., 1998. Localized hypothermia: impact on oxygenation, microregional perfusion, metabolic and bioenergetic status of subcutaneous rat tumours. *Br. J. Cancer* 78, 56–61. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.442>
- Keskin, D.B., Anandappa, A.J., Sun, J., Tirosh, I., Mathewson, N.D., Li, S., Oliveira, G., Giobbie-Hurder, A., Felt, K., Gjini, E., Shukla, S.A., Hu, Z., Li, L., Le, P.M., Allesøe, R.L., Richman, A.R., Kowalczyk, M.S., Abdelrahman, S., Geduldig, J.E., Charbonneau, S., Pelton, K., Iorgulescu, J.B., Elagina, L., Zhang, W., Olive, O., McCluskey, C., Olsen, L.R., Stevens, J., Lane, W.J., Salazar, A.M., Daley, H., Wen, P.Y., Chiocca, E.A., Harden, M., Lennon, N.J., Gabriel, S., Getz, G., Lander, E.S., Regev, A., Ritz, J., Neuberg, D., Rodig, S.J., Ligon, K.L., Suvà, M.L., Wucherpennig, K.W., Hacohen, N., Fritsch, E.F., Livak, K.J., Ott, P.A., Wu, C.J., Reardon, D.A., 2019. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature* 565, 234–239. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0792-9>
- Khar, A., Pardhasaradhi, B.V.V., Ali, A.M., Kumari, A.L., 2003. Protection conferred by Bcl-2 expression involves reduced oxidative stress and increased glutathione production during hypothermia-induced apoptosis in AK-5 tumor cells. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 949–957. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(03\)00469-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(03)00469-6)
- Kim, E.L., Yoshizato, K., Kluwe, L., Meissner, H., Warnecke, G., Zapf, S., Westphal, M., Deppert, W., Giese, A., 2005. Comparative assessment of the functional p53 status in glioma cells. *Anticancer Res.* 25, 213–224.
- Kim, I.H., Park, C.-K., Heo, D.S., Kim, C.-Y., Rhee, C.H., Nam, D.-H., Lee, S.H., Han, J.H., Lee, S.-H., Kim, T.M., Kim, D.-W., Kim, J.E., Paek, S.H., Kim, D.G., Kim, I.A., Kim, Y.J., Kim, J.H., Park, B.-J., Jung, H.-W., 2011. Radiotherapy followed by adjuvant temozolomide with or without neoadjuvant ACNU-CDDP chemotherapy in newly diagnosed glioblastomas: a prospective randomized controlled multicenter phase III trial. *J. Neurooncol.* 103, 595–602. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0427-y>
- Kim, J.-H., Cho, Y.-E., Seo, M., Baek, M.-C., Suk, K., 2012. Glial proteome changes in response to moderate hypothermia. *PROTEOMICS* 12, 2571–2583. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200024>

- Kim, J.-H., Seo, M., Suk, K., 2013. Effects of therapeutic hypothermia on the glial proteome and phenotype. *Curr. Protein Pept. Sci.* 14, 51–60.
- Kim, Y.-H., Ha, K.-Y., Kim, S.-I., 2017. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clin. Orthop. Surg.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.4055/cios.2017.9.1.1>
- Kliegel, A., Janata, A., Wandaller, C., Uray, T., Spiel, A., Losert, H., Kliegel, M., Holzer, M., Haugk, M., Sterz, F., Laggner, A.N., 2007. Cold infusions alone are effective for induction of therapeutic hypothermia but do not keep patients cool after cardiac arrest. *Resuscitation* 73, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2006.08.023>
- Kohlhauer, M., Berdeaux, A., Ghaleh, B., Tissier, R., 2016. Therapeutic hypothermia to protect the heart against acute myocardial infarction. *Arch. Cardiovasc. Dis.* 109, 716–722. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.05.005>
- Korinek, A.-M., Golmard, J.-L., Elcheick, A., Bismuth, R., van Effenterre, R., Coriat, P., Puybasset, L., 2005. Risk factors for neurosurgical site infections after craniotomy: a critical reappraisal of antibiotic prophylaxis on 4,578 patients. *Br. J. Neurosurg.* 19, 155–162. <https://doi.org/10.1080/02688690500145639>
- Krcilkova, M., Musil, J., Navratil, J., Olejnik, O., 1958. The successful removal of a tumour from the right atrium under hypothermia. *Thorax* 13, 173–176. <https://doi.org/10.1136/thx.13.3.173>
- Krech, J., Tong, G., Wowro, S., Walker, C., Rosenthal, L.-M., Berger, F., Schmitt, K.R.L., 2017. Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes. *Mitochondrion* 35, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.04.001>
- Kuczynski, A.M., Demchuk, A.M., Almekhlafi, M.A., 2019. Therapeutic hypothermia: Applications in adults with acute ischemic stroke. *Brain Circ.* 5, 43–54. https://doi.org/10.4103/bc.bc_5_19
- Kunwar, S., Chang, S., Westphal, M., Vogelbaum, M., Sampson, J., Barnett, G., Shaffrey, M., Ram, Z., Piepmeyer, J., Prados, M., Croteau, D., Pedain, C., Leland, P., Husain, S.R., Joshi, B.H., Puri, R.K., PRECISE Study Group, 2010. Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 12, 871–881. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nop054>
- Kurusu, K., Kim, J.Y., You, J., Yenari, M.A., 2019. Therapeutic Hypothermia and Neuroprotection in Acute Neurological Disease. *Curr. Med. Chem.* 26, 5430–5455. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190506124836>
- Kurz, A., Sessler, D.I., Lenhardt, R., 1996. Perioperative Normothermia to Reduce the Incidence of Surgical-Wound Infection and Shorten Hospitalization. *N. Engl. J. Med.* 334, 1209–1216. <https://doi.org/10.1056/NEJM199605093341901>
- Lacouture, M.E., Elizabeth Davis, M., Elzinga, G., Butowski, N., Tran, D., Villano, J.L., DiMeglio, L., Davies, A.M., Wong, E.T., 2014. Characterization and Management of Dermatologic Adverse Events With the NovoTTF-100A System, a Novel Anti-mitotic Electric Field Device for the Treatment of Recurrent Glioblastoma. *Semin. Oncol.*, Characterization and Management of Dermatologic Adverse Events With the NovoTTF-100A System, a Novel Anti-mitotic Electric Field Device for the Treatment of Recurrent Glioblastoma 41, S1–S14. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.03.011>
- Lassen, U., Sorensen, M., Gaziell, T.B., Hasselbalch, B., Poulsen, H.S., 2013. Phase II study of bevacizumab and temsirolimus combination therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* 33, 1657–1660.
- Lassman, A.B., van den Bent, M.J., Gan, H.K., Reardon, D.A., Kumthekar, P., Butowski, N., Lwin, Z., Mikkelsen, T., Nabors, L.B., Papadopoulos, K.P., Penas-Prado, M., Simes, J., Wheeler, H., Walbert, T., Scott, A.M., Gomez, E., Lee, H.-J., Roberts-Rapp, L., Xiong, H., Ansell, P.J., Bain, E., Holen, K.D., Maag, D., Merrell, R., 2019. Safety and efficacy of deparatuzumab mafodotin + temozolomide in patients with EGFR-amplified, recurrent glioblastoma: results from an international phase I multicenter trial. *Neuro-Oncol.* 21, 106–114. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noy091>

- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D.A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., Weller, M., 2019. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat. Rev.* 80, 101896. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2019.101896>
- Lee, E.Q., Kaley, T.J., Duda, D.G., Schiff, D., Lassman, A.B., Wong, E.T., Mikkelsen, T., Purow, B.W., Muzikansky, A., Ancukiewicz, M., Huse, J.T., Ramkissoon, S., Drappatz, J., Norden, A.D., Beroukhi, R., Weiss, S.E., Alexander, B.M., McCluskey, C.S., Gerard, M., Smith, K.H., Jain, R.K., Batchelor, T.T., Ligon, K.L., Wen, P.Y., 2015. A Multicenter, Phase II, Randomized, Noncomparative Clinical Trial of Radiation and Temozolomide with or without Vandetanib in Newly Diagnosed Glioblastoma Patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 21, 3610–3618. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3220>
- Lee, E.Q., Kuhn, J., Lamborn, K.R., Abrey, L., DeAngelis, L.M., Lieberman, F., Robins, H.I., Chang, S.M., Yung, W.K.A., Drappatz, J., Mehta, M.P., Levin, V.A., Aldape, K., Dancey, J.E., Wright, J.J., Prados, M.D., Cloughesy, T.F., Gilbert, M.R., Wen, P.Y., 2012. Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro-Oncol.* 14, 1511–1518. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos264>
- Lee, H.N., Ahn, S.-M., Jang, H.H., 2015. Cold-inducible RNA-binding protein, CIRP, inhibits DNA damage-induced apoptosis by regulating p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 916–921. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.066>
- Lee, J.H., Wei, L., Gu, X., Wei, Z., Dix, T.A., Yu, S.P., 2014. Therapeutic effects of pharmacologically induced hypothermia against traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* 31, 1417–1430. <https://doi.org/10.1089/neu.2013.3251>
- Lee, J.H., Wei, L., Gu, X., Won, S., Wei, Z.Z., Dix, T.A., Yu, S.P., 2016a. Improved Therapeutic Benefits by Combining Physical Cooling With Pharmacological Hypothermia After Severe Stroke in Rats. *Stroke* 47, 1907–1913. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013061>
- Lee, J.H., Wei, Z.Z., Cao, W., Won, S., Gu, X., Winter, M., Dix, T.A., Wei, L., Yu, S.P., 2016b. Regulation of therapeutic hypothermia on inflammatory cytokines, microglia polarization, migration and functional recovery after ischemic stroke in mice. *Neurobiol. Dis.* 96, 248–260. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.09.013>
- Lee, J.H., Zhang, J., Yu, S.P., 2017. Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke. *Neural Regen. Res.* 12, 341–350. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.202915>
- Lee, J.-W., Shahzad, M.M.K., Lin, Y.G., Armaiz-Pena, G., Mangala, L.S., Han, H.-D., Kim, H.-S., Nam, E.J., Jennings, N.B., Halder, J., Nick, A.M., Stone, R.L., Lu, C., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W., Lokshin, A.E., Sood, A.K., 2009. Surgical Stress Promotes Tumor Growth in Ovarian Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 15, 2695–2702. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2966>
- Lee, S.Y., 2016. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* 3, 198–210. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
- Lemée, J.-M., Clavreul, A., Menei, P., 2015. Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-Oncol.* 17, 1322–1332. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov119>
- Lennox, C.D., 2007. Uniform selective cerebral hypothermia. Brevet US7156867 (B2).
- LFCE | Epilepsies Pharmacorésistantes : les options thérapeutiques non médicamenteuses [WWW Document], 2015. . Ligue Fr. Contre Epilepsie. URL https://www.lfce.fr/Epilepsies-Pharmacoresistantes-les-options-therapeutiques-non-medicamenteuses_a447.html (accessed 5.7.18).
- Lher, E., 2005. L'hypothermie induite en réanimation : un sujet brûlant ? *Réanimation* 14, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2005.02.016>
- Liao, Y., Tong, L., Tang, L., Wu, S., 2017. The role of cold-inducible RNA binding protein in cell stress response. *Int. J. Cancer* 141, 2164–2173. <https://doi.org/10.1002/ijc.30833>
- Liau, L.M., Ashkan, K., Tran, D.D., Campian, J.L., Trusheim, J.E., Cobbs, C.S., Heth, J.A., Salacz, M., Taylor, S., D'Andre, S.D., Iwamoto, F.M., Dropcho, E.J., Moshel, Y.A., Walter, K.A., Pillainayagam, C.P., Aiken, R., Chaudhary, R., Goldlust, S.A., Bota, D.A., Duic, P., Grewal, J., Elinzano, H., Toms, S.A.,

- Lillehei, K.O., Mikkelsen, T., Walbert, T., Abram, S.R., Brenner, A.J., Brem, S., Ewend, M.G., Khagi, S., Portnow, J., Kim, L.J., Loudon, W.G., Thompson, R.C., Avigan, D.E., Fink, K.L., Geoffroy, F.J., Lindhorst, S., Lutzky, J., Sloan, A.E., Schackert, G., Krex, D., Meisel, H.-J., Wu, J., Davis, R.P., Duma, C., Etame, A.B., Mathieu, D., Kesari, S., Piccioni, D., Westphal, M., Baskin, D.S., New, P.Z., Lacroix, M., May, S.-A., Pluard, T.J., Tse, V., Green, R.M., Villano, J.L., Pearlman, M., Petrecca, K., Schulder, M., Taylor, L.P., Maida, A.E., Prins, R.M., Cloughesy, T.F., Mulholland, P., Bosch, M.L., 2018. First results on survival from a large Phase 3 clinical trial of an autologous dendritic cell vaccine in newly diagnosed glioblastoma. *J. Transl. Med.* 16, 142. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1507-6>
- Liu, A., Zhang, Z., Li, A., Xue, J., 2010. Effects of hypothermia and cerebral ischemia on cold-inducible RNA-binding protein mRNA expression in rat brain. *Brain Res.* 1347, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.05.029>
- Liu, J., Xue, J., Zhang, H., Li, S., Liu, Y., Xu, D., Zou, M., Zhang, Z., Diao, J., 2015. Cloning, expression, and purification of cold inducible RNA-binding protein and its neuroprotective mechanism of action. *Brain Res.* 1597, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.11.061>
- Liu, L., Kim, J.Y., Koike, M.A., Yoon, Y.J., Tang, X.N., Ma, H., Lee, H., Steinberg, G.K., Lee, J.E., Yenari, M.A., 2008. FasL shedding is reduced by hypothermia in experimental stroke. *J. Neurochem.* 106, 541–550. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05411.x>
- Liu, L.-Q., Liu, X.-R., Zhao, J.-Y., Yan, F., Wang, R.-L., Wen, S.-H., Wang, L., Luo, Y.-M., Ji, X.-M., 2018. Brain-selective mild hypothermia promotes long-term white matter integrity after ischemic stroke in mice. *CNS Neurosci. Ther.* 24, 1275–1285. <https://doi.org/10.1111/cns.13061>
- Liu, Y.-X., Zhou, J.-N., Liu, K.-H., Fu, X., Zhang, Z.-W., Zhang, Q.-H., Yue, W., 2019. CIRP regulates BEV-induced cell migration in gliomas. *Cancer Manag. Res.* 11, 2015–2025. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S191249>
- Lombardi, G., De Salvo, G.L., Brandes, A.A., Eoli, M., Rudà, R., Faedi, M., Lolli, I., Pace, A., Daniele, B., Pasqualetti, F., Rizzato, S., Bellu, L., Pambuku, A., Farina, M., Magni, G., Indraccolo, S., Gardiman, M.P., Soffietti, R., Zagonel, V., 2019. Regorafenib compared with lomustine in patients with relapsed glioblastoma (REGOMA): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 20, 110–119. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30675-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30675-2)
- Long, K.C., Tanner, E.J., Frey, M., Leitao, M.M., Levine, D.A., Gardner, G.J., Sonoda, Y., Abu-Rustum, N.R., Barakat, R.R., Chi, D.S., 2013. Intraoperative hypothermia during primary surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer: risk factors and associations with postoperative morbidity. *Gynecol. Oncol.* 131, 525–530. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.08.034>
- Lopez-de-Sa, E., Juarez, M., Armada, E., Sanchez-Salado, J.C., Sanchez, P.L., Loma-Osorio, P., Sionis, A., Monedero, M.C., Martinez-Sellés, M., Martín-Benitez, J.C., Ariza, A., Uribarri, A., Garcia-Acuña, J.M., Villa, P., Perez, P.J., Storm, C., Dee, A., Lopez-Sendon, J.L., 2018. A multicentre randomized pilot trial on the effectiveness of different levels of cooling in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest: the FROST-I trial. *Intensive Care Med.* 44, 1807–1815. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5256-z>
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Lownie, S.P., Menkis, A.H., Craen, R.A., Mezon, B., MacDonald, J., Steinman, D.A., 2004. Extracorporeal femoral to carotid artery perfusion in selective brain cooling for a giant aneurysm. Case report. *J. Neurosurg.* 100, 343–347. <https://doi.org/10.3171/jns.2004.100.2.0343>
- Lujan, D.A., Ochoa, J.L., Hartley, R.S., 2018. Cold-inducible RNA binding protein in cancer and inflammation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 9, e1462. <https://doi.org/10.1002/wrna.1462>
- Luo, M., Liu, H., Hu, S.-J., Bai, F.-H., 2015. Potential targeted therapies for the inflammatory pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 39, 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2015.06.020>

- Lyden, P.D., Allgren, R.L., Ng, K., Akins, P., Meyer, B., Al-Sanani, F., Lutsep, H., Dobak, J., Matsubara, B.S., Zivin, J., 2005. Intravascular Cooling in the Treatment of Stroke (ICTuS): early clinical experience. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 14, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2005.01.001>
- Ma, D.J., Galanis, E., Anderson, S.K., Schiff, D., Kaufmann, T.J., Peller, P.J., Giannini, C., Brown, P.D., Uhm, J.H., McGraw, S., Jaeckle, K.A., Flynn, P.J., Ligon, K.L., Buckner, J.C., Sarkaria, J.N., 2015. A phase II trial of everolimus, temozolomide, and radiotherapy in patients with newly diagnosed glioblastoma: NCCTG N057K. *Neuro-Oncol.* 17, 1261–1269. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou328>
- Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov, R., Hadjipanayis, C., 2018. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* 34, 1316–1328. <https://doi.org/10.1080/02656736.2018.1430867>
- Maier-Hauff, K., Rothe, R., Scholz, R., Gneveckow, U., Wust, P., Thiesen, B., Feussner, A., von Deimling, A., Waldoefner, N., Felix, R., Jordan, A., 2007. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 81, 53–60. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9195-0>
- Maier-Hauff, K., Ulrich, F., Nestler, D., Niehoff, H., Wust, P., Thiesen, B., Orawa, H., Budach, V., Jordan, A., 2011. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 103, 317–324. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>
- Malakhov, N., Lee, A., Garay, E., Becker, D.J., Schreiber, D., 2018. Patterns of care and outcomes for glioblastoma in patients with poor performance status. *J. Clin. Neurosci.* 52, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.03.006>
- Mandrik, É.V., 1959. The effect of hypothermia on metastasis of Brown-Pearce tumors. *Bull. Exp. Biol. Med.* 47, 66–70. <https://doi.org/10.1007/BF00781021>
- Martínez-Arribas, F., Agudo, D., Pollán, M., Gómez-Esquer, F., Díaz-Gil, G., Lucas, R., Schneider, J., 2006. Positive correlation between the expression of X-chromosome RBM genes (RBMX, RBM3, RBM10) and the proapoptotic Bax gene in human breast cancer. *J. Cell. Biochem.* 97, 1275–1282. <https://doi.org/10.1002/jcb.20725>
- Mason, W.P., Belanger, K., Nicholas, G., Vallières, I., Mathieu, D., Kavan, P., Desjardins, A., Omuro, A., Raymond, D., 2012. A phase II study of the Ras-MAPK signaling pathway inhibitor TLN-4601 in patients with glioblastoma at first progression. *J. Neurooncol.* 107, 343–349. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0747-6>
- Matijasevic, Z., 2002. Selective protection of non-cancer cells by hypothermia. *Anticancer Res.* 22, 3267–3272.
- Matijasevic, Z., Snyder, J.E., Ludlum, D.B., 1998. Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts. *Oncol. Res.* 10, 605–610.
- Matsuda, A., Ogawa, M., Yanai, H., Naka, D., Goto, A., Ao, T., Tanno, Y., Takeda, K., Watanabe, Y., Honda, K., Taniguchi, T., 2011. Generation of mice deficient in RNA-binding motif protein 3 (RBM3) and characterization of its role in innate immune responses and cell growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.038>
- Matsui, T., Yoshida, Y., 2016. Reduction of the expression and production of adhesion molecules and chemokines by brain endothelial cells in response to tumor necrosis factor- α and interleukin-17 in hypothermia. *Clin. Exp. Neuroimmunol.* 7, 174–182. <https://doi.org/10.1111/cen3.12298>
- Matsushita, Y., Bramlett, H.M., Alonso, O., Dietrich, W.D., 2001. Posttraumatic hypothermia is neuroprotective in a model of traumatic brain injury complicated by a secondary hypoxic insult. *Crit. Care Med.* 29, 2060–2066.
- Mckissock, W., Taylor, J.C., 1960. A comparison of supratentorial intracranial meningiomas operated upon with and without induced hypothermia. *Br. J. Surg.* 48, 155–157.

- Miller-Prodraza, H., Fishman, P.H., 1984. Effect of drugs and temperature on biosynthesis and transport of glycosphingolipids in cultured neurotumor cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* 804, 44–51.
- Mitov, M.I., Harris, J.W., Alstott, M.C., Zaytseva, Y.Y., Evers, B.M., Butterfield, D.A., 2017. Temperature induces significant changes in both glycolytic reserve and mitochondrial spare respiratory capacity in colorectal cancer cell lines. *Exp. Cell Res.* 354, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.046>
- Moslemi-Kebria, M., El-Nashar, S.A., Aletti, G.D., Cliby, W.A., 2012. Intraoperative hypothermia during cytoreductive surgery for ovarian cancer and perioperative morbidity. *Obstet. Gynecol.* 119, 590–596. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e3182475f8a>
- Motamedi, G.K., Lesser, R.P., Vicini, S., 2013. Therapeutic brain hypothermia, its mechanisms of action, and its prospects as a treatment for epilepsy. *Epilepsia* 54, 959–970. <https://doi.org/10.1111/epi.12144>
- Motamedi, G.K., Salazar, P., Smith, E.L., Lesser, R.P., Webber, W.R.S., Ortinski, P.I., Vicini, S., Rogawski, M.A., 2006. Termination of epileptiform activity by cooling in rat hippocampal slice epilepsy models. *Epilepsy Res.* 70, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.05.001>
- Mourvillier, B., Tubach, F., van de Beek, D., Garot, D., Pichon, N., Georges, H., Lefevre, L.M., Bollaert, P.-E., Boulain, T., Luis, D., Cariou, A., Girardie, P., Chelha, R., Megarbane, B., Delahaye, A., Chalumeau-Lemoine, L., Legriel, S., Beuret, P., Brivet, F., Bruel, C., Camou, F., Chatellier, D., Chillet, P., Clair, B., Constantin, J.-M., Duguet, A., Galliot, R., Bayle, F., Hyvernats, H., Ouchenir, K., Plantefevre, G., Quenot, J.-P., Richecoeur, J., Schwebel, C., Sirodot, M., Esposito-Farèse, M., Le Tulzo, Y., Wolff, M., 2013. Induced hypothermia in severe bacterial meningitis: a randomized clinical trial. *JAMA* 310, 2174–2183. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.280506>
- Muacevic, A., Kreth, F.W., 2003. Quality-adjusted survival after tumor resection and/or radiation therapy for elderly patients with glioblastoma multiforme. *J. Neurol.* 250, 561–568. <https://doi.org/10.1007/s00415-003-1036-x>
- Nakamura, T., Miyamoto, O., Yamagami, S., Hayashida, Y., Itano, T., Nagao, S., 1999. Influence of rewarming conditions after hypothermia in gerbils with transient forebrain ischemia. *J. Neurosurg.* 91, 114–120. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.91.1.0114>
- Nam, J.Y., de Groot, J.F., 2017. Treatment of Glioblastoma. *J. Oncol. Pract.* 13, 629–638. <https://doi.org/10.1200/JOP.2017.025536>
- Neutelings, T., Lambert, C.A., Nusgens, B.V., Colige, A.C., 2013. Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* 8, e69687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069687>
- Neveu, M.-A., Joudiou, N., Preter, G.D., Dehoux, J.-P., Jordan, B.F., Gallez, B., 2017. 17O MRS assesses the effect of mild hypothermia on oxygen consumption rate in tumors. *NMR Biomed.* 30, e3726. <https://doi.org/10.1002/nbm.3726>
- Nias, A.H., Perry, P.M., Photiou, A.R., 1988. Modulating the oxygen tension in tumours by hypothermia and hyperbaric oxygen. *J. R. Soc. Med.* 81, 633–636.
- Nichol, G., Strickland, W., Shavelle, D., Maehara, A., Ben-Yehuda, O., Genereux, P., Dressler, O., Parvataneni, R., Nichols, M., McPherson, J., Barbeau, G., Laddu, A., Elrod, J.A., Tully, G.W., Ivanhoe, R., Stone, G.W., VELOCITY Investigators, 2015. Prospective, multicenter, randomized, controlled pilot trial of peritoneal hypothermia in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 8, e001965. <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.114.001965>
- Nielsen, N., Wetterslev, J., Cronberg, T., Erlinge, D., Gasche, Y., Hassager, C., Horn, J., Hovdenes, J., Kjaergaard, J., Kuiper, M., Pellis, T., Stamatet, P., Wanscher, M., Wise, M.P., Åneman, A., Al-Subaie, N., Boesgaard, S., Bro-Jeppesen, J., Brunetti, I., Bugge, J.F., Hingston, C.D., Juffermans, N.P., Koopmans, M., Køber, L., Langørgen, J., Lilja, G., Møller, J.E., Rundgren, M., Rylander, C., Smid, O., Werer, C., Winkel, P., Friberg, H., TTM Trial Investigators, 2013. Targeted temperature management at 33°C versus 36°C after cardiac arrest. *N. Engl. J. Med.* 369, 2197–2206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1310519>

- Nishiyama, H., Itoh, K., Kaneko, Y., Kishishita, M., Yoshida, O., Fujita, J., 1997. A Glycine-rich RNA-binding Protein Mediating Cold-inducible Suppression of Mammalian Cell Growth. *J. Cell Biol.* 137, 899–908.
- Noch, E.K., Ramakrishna, R., Magge, R., 2018. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurg.* 116, 505–517. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.04.022>
- Nolan, J.P., Morley, P.T., Vanden Hoek, T.L., Hickey, R.W., Members of the Advanced Life Support Task Force, Kloeck, W.G.J., Billi, J., Böttiger, B.W., Morley, P.T., Nolan, J.P., Okada, K., Reyes, C., Shuster, M., Steen, P.A., Weil, M.H., Wenzel, V., Member of the Pediatric Life Support Task Force, Hickey, R.W., Additional Contributors, Carli, P., Vanden Hoek, T.L., Atkins, D., 2003. Therapeutic Hypothermia After Cardiac Arrest: An Advisory Statement by the Advanced Life Support Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Circulation* 108, 118–121. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000079019.02601.90>
- Nomura, S., Fujii, M., Inoue, T., He, Y., Maruta, Y., Koizumi, H., Suehiro, E., Imoto, H., Ishihara, H., Oka, F., Matsumoto, M., Owada, Y., Yamakawa, T., Suzuki, M., 2014. Changes in glutamate concentration, glucose metabolism, and cerebral blood flow during focal brain cooling of the epileptogenic cortex in humans. *Epilepsia* 55, 770–776. <https://doi.org/10.1111/epi.12600>
- Nomura, S., Inoue, T., Imoto, H., Suehiro, E., Maruta, Y., Hirayama, Y., Suzuki, M., 2017. Effects of focal brain cooling on extracellular concentrations of neurotransmitters in patients with epilepsy. *Epilepsia* 58, 627–634. <https://doi.org/10.1111/epi.13704>
- Ogawa, J., Pao, G.M., Shokhirev, M.N., Verma, I.M., 2018. Glioblastoma Model Using Human Cerebral Organoids. *Cell Rep.* 23, 1220–1229. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.105>
- Oh, T., Fakurnejad, S., Sayegh, E.T., Clark, A.J., Ivan, M.E., Sun, M.Z., Safaee, M., Bloch, O., James, C.D., Parsa, A.T., 2014. Immunocompetent murine models for the study of glioblastoma immunotherapy. *J. Transl. Med.* 12, 107. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-107>
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2013. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 764–772. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3002>
- Ohgaki, H., Kleihues, P., 2007. Genetic Pathways to Primary and Secondary Glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170, 1445–1453. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070011>
- Ok, J.-H., Kim, Y.-H., Ha, K.-Y., 2012. Neuroprotective effects of hypothermia after spinal cord injury in rats: comparative study between epidural hypothermia and systemic hypothermia. *Spine* 37, E1551-1559. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31826ff7f1>
- Oken, M., Creech, R., Tormey, D., Horton, J., Davis, T., McFadden, E., Carbone, P., 1982. Toxicity and Response Criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group [WWW Document]. *Am. J. Clin. Oncol.* URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7165009/> (accessed 5.15.20).
- Okolie, O., Bago, J.R., Schmid, R.S., Irvin, D.M., Bash, R.E., Miller, C.R., Hingtgen, S.D., 2016. Reactive astrocytes potentiate tumor aggressiveness in a murine glioma resection and recurrence model. *Neuro-Oncol.* 18, 1622–1633. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov117>
- Oku, T., Fujii, M., Tanaka, N., Imoto, H., Uchiyama, J., Oka, F., Kunitsugu, I., Fujioka, H., Nomura, S., Kajiwara, K., Fujisawa, H., Kato, S., Saito, T., Suzuki, M., 2009. The influence of focal brain cooling on neurophysiopathology: validation for clinical application: Laboratory investigation. *J. Neurosurg.* 110, 1209–1217. <https://doi.org/10.3171/2009.1.JNS08499>
- Olah, E., Poto, L., Hegyi, P., Szabo, I., Hartmann, P., Solyman, M., Petervari, E., Balasko, M., Habon, T., Rumbus, Z., Tenk, J., Rostas, I., Weinberg, J., Romanovsky, A.A., Garami, A., 2018. Therapeutic Whole-Body Hypothermia Reduces Death in Severe Traumatic Brain Injury if the Cooling Index Is Sufficiently High: Meta-Analyses of the Effect of Single Cooling Parameters and Their Integrated Measure. *J. Neurotrauma* 35, 2407–2417. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.5649>
- O’Leary, D.P., O’Leary, E., Foley, N., Cotter, T.G., Wang, J.H., Redmond, H.P., 2016. Effects of surgery on the cancer stem cell niche. *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO* 42, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2015.12.008>
- Ommaya, A.K., Baldwin, M., 1963. Extravascular Local Cooling of the Brain in Man. *J. Neurosurg.* 20, 8–20. <https://doi.org/10.3171/jns.1963.20.1.0008>

- O'Rourke, D.M., Nasrallah, M.P., Desai, A., Melenhorst, J.J., Mansfield, K., Morrisette, J.J.D., Martinez-Lage, M., Brem, S., Maloney, E., Shen, A., Isaacs, R., Mohan, S., Plesa, G., Lacey, S.F., Navenot, J.-M., Zheng, Z., Levine, B.L., Okada, H., June, C.H., Brogdon, J.L., Maus, M.V., 2017. A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* 9. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0984>
- Ostrom, Q.T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., Barnholtz-Sloan, J.S., 2019. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncol.* 21, v1-v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>
- Osuka, S., Meir, E.G.V., 2017. Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *J. Clin. Invest.* 127, 13.
- Pallud, J., Audureau, E., Noel, G., Corns, R., Lechapt-Zalcman, E., Duntze, J., Pavlov, V., Guyotat, J., Hieu, P.D., Le Reste, P.-J., Faillot, T., Litre, C.-F., Desse, N., Petit, A., Emery, E., Voirin, J., Peltier, J., Caire, F., Vignes, J.-R., Barat, J.-L., Langlois, O., Dezamis, E., Parraga, E., Zanello, M., Nader, E., Lefranc, M., Bauchet, L., Devaux, B., Menei, P., Metellus, P., Club de Neuro-Oncologie of the Société Française de Neurochirurgie, 2015. Long-term results of carmustine wafer implantation for newly diagnosed glioblastomas: a controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. *Neuro-Oncol.* 17, 1609-1619. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov126>
- Pandey, V., Ranjan, N., Narne, P., Babu, P.P., 2019. Roscovitine effectively enhances antitumor activity of temozolomide in vitro and in vivo mediated by increased autophagy and Caspase-3 dependent apoptosis. *Sci. Rep.* 9, 5012. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41380-1>
- Park, W.S., Chang, Y.S., Lee, M., 2001. Effect of hypothermia on brain cell membrane function and energy metabolism in experimental *Escherichia coli* meningitis in the newborn piglet. *Neurochem. Res.* 26, 369-374. <https://doi.org/10.1023/a:1010947030587>
- Parr, E., Sleightholm, R.L., Baine, M.J., Shonka, N.A., Wang, T.J., Zhang, C., 2020. Efficacy of sequential radiation and chemotherapy in treating glioblastoma with poor performance status. *J. Neurooncol.* 147, 91-95. <https://doi.org/10.1007/s11060-020-03402-1>
- Peereboom, D.M., Shepard, D.R., Ahluwalia, M.S., Brewer, C.J., Agarwal, N., Stevens, G.H.J., Suh, J.H., Toms, S.A., Vogelbaum, M.A., Weil, R.J., Elson, P., Barnett, G.H., 2010. Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 98, 93-99. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0067-2>
- Peng, X., Wan, Y., Liu, W., Dan, B., Lin, L., Tang, Z., 2016. Protective roles of intra-arterial mild hypothermia and arterial thrombolysis in acute cerebral infarction. *SpringerPlus* 5, 1988. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3654-7>
- Perazzoli, G., Prados, J., Ortiz, R., Caba, O., Cabeza, L., Berdasco, M., González, B., Melguizo, C., 2015. Temozolomide Resistance in Glioblastoma Cell Lines: Implication of MGMT, MMR, P-Glycoprotein and CD133 Expression. *PloS One* 10, e0140131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140131>
- Peretti, D., Bastide, A., Radford, H., Verity, N., Molloy, C., Martin, M.G., Moreno, J.A., Steinert, J.R., Smith, T., Dinsdale, D., Willis, A.E., Mallucci, G.R., 2015. RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature* 518, 236-239. <https://doi.org/10.1038/nature14142>
- Pérez-Larraya, J.G., Ducray, F., 2014. Treating glioblastoma patients with poor performance status: where do we go from here? *CNS Oncol.* 3, 231. <https://doi.org/10.2217/cns.14.20>
- Perry, J.R., Laperriere, N., O'Callaghan, C.J., Brandes, A.A., Menten, J., Phillips, C., Fay, M., Nishikawa, R., Cairncross, J.G., Roa, W., Osoba, D., Rossiter, J.P., Sahgal, A., Hirte, H., Laigle-Donadey, F., Franceschi, E., Chinot, O., Golfinopoulos, V., Fariselli, L., Wick, A., Feuvret, L., Back, M., Tills, M., Winch, C., Baumert, B.G., Wick, W., Ding, K., Mason, W.P., 2017. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.*

- Péus, D., Newcomb, N., Hofer, S., 2013. Appraisal of the Karnofsky Performance Status and proposal of a simple algorithmic system for its evaluation. *BMC Med. Inform. Decis. Mak.* 13, 72. <https://doi.org/10.1186/1472-6947-13-72>
- Plesnila, N., Müller, E., Guretzki, S., Ringel, F., Staub, F., Baethmann, A., 2000. Effect of hypothermia on the volume of rat glial cells. *J. Physiol.* 523, 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00155.x>
- Polderman, K.H., 2009. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* 37, 17.
- Polderman, K.H., Noc, M., Beishuizen, A., Biermann, H., Girbes, A.R.J., Tully, G.W., Seidman, D., Albertsson, P.A., Holmberg, M., Sterz, F., Holzer, M., 2015. Ultrarapid Induction of Hypothermia Using Continuous Automated Peritoneal Lavage With Ice-Cold Fluids: Final Results of the Cooling for Cardiac Arrest or Acute ST-Elevation Myocardial Infarction Trial. *Read Online Crit. Care Med. Soc. Crit. Care Med.* 43, 2191–2201. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000001158>
- Poli, S., Purrucker, J., Priglinger, M., Diedler, J., Sykora, M., Popp, E., Steiner, T., Veltkamp, R., Bösel, J., Rupp, A., Hacke, W., Hametner, C., 2013. Induction of cooling with a passive head and neck cooling device: effects on brain temperature after stroke. *Stroke* 44, 708–713. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.672923>
- Poon, C.C., Sarkar, S., Yong, V.W., Kelly, J.J.P., 2017. Glioblastoma-associated microglia and macrophages: targets for therapies to improve prognosis. *Brain J. Neurol.* 140, 1548–1560. <https://doi.org/10.1093/brain/aww355>
- Popovic, P., Popovic, V., Weathers, D., 1976. Effects of differential hypothermia and 5-fluorouracil on C3H mouse mammary tumors: histologic study. *Cryobiology* 13, 347–353. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(76\)90117-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(76)90117-6)
- Popovic, V.P., Masironi, R., 1966. Disappearance of normothermic tumors in shallow (30° C) hypothermia. *Cancer Res.* 26, 863–864.
- Popovic, V.P., Masironi, R., 1965. Disappearance of euthermic tumors after 10-hour generalized hypothermia. *Life Sci.* 1962 4, 533–543. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(65\)90262-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(65)90262-6)
- Pouchieu, C., Lacour, B., Delafosse, P., Cowppli-Bony, A., Baldi, I., 2019. Tumeurs solides / Système nerveux central, in: *Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018.* p. 372.
- Povlishock, J.T., Wei, E.P., 2009. Posthypothermic Rewarming Considerations following Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 26, 333–340. <https://doi.org/10.1089/neu.2008.0604>
- Powers William J., Rabinstein Alejandro A., Ackerson Teri, Adeoye Opeolu M., Bambakidis Nicholas C., Becker Kyra, Biller José, Brown Michael, Demaerschalk Bart M., Hoh Brian, Jauch Edward C., Kidwell Chelsea S., Leslie-Mazwi Thabele M., Ovbiagele Bruce, Scott Phillip A., Sheth Kevin N., Southerland Andrew M., Summers Deborah V., Tirschwell David L., null null, 2019. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 50, e344–e418. <https://doi.org/10.1161/STR.0000000000000211>
- Prins, R.M., Cloughesy, T.F., Liau, L.M., 2008. Cytomegalovirus immunity after vaccination with autologous glioblastoma lysate. *N. Engl. J. Med.* 359, 539–541. <https://doi.org/10.1056/NEJMc0804818>
- Prise en charge des épilepsies partielles pharmaco-résistantes (Conférence de consensus: textes des recommandations), 2004. . Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé, Maison de l'Unesco - Paris.
- Proulx, C.I., Ducharme, M.B., Kenny, G.P., 2003. Effect of water temperature on cooling efficiency during hyperthermia in humans. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 94, 1317–1323. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00541.2002>
- Qazi, M.A., Vora, P., Venugopal, C., Sidhu, S.S., Moffat, J., Swanton, C., Singh, S.K., 2017. Intratumoral heterogeneity: pathways to treatment resistance and relapse in human glioblastoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 28, 1448–1456. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx169>

- Qiang, X., Yang, W.-L., Wu, R., Zhou, M., Jacob, A., Dong, W., Kuncewitch, M., Ji, Y., Yang, H., Wang, H., Fujita, J., Nicastro, J., Coppa, G.F., Tracey, K.J., Wang, P., 2013. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nat. Med.* 19, 1489–1495. <https://doi.org/10.1038/nm.3368>
- Quan, R., Zhang, H., Li, Z., Li, X., 2020. Survival analysis of patients with glioblastoma treated by long-term administration of temozolomide. *Medicine (Baltimore)* 99. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018591>
- Rajayer, S.R., Jacob, A., Yang, W.-L., Zhou, M., Chaung, W., Wang, P., 2013. Cold-inducible RNA-binding protein is an important mediator of alcohol-induced brain inflammation. *PLoS One* 8, e79430. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079430>
- Rao, M., Ke, D., Cheng, G., Hu, S., Wu, Y., Wang, Y., Zhou, F., Liu, H., Zhu, C., Xia, W., 2019. The regulation of CIRBP by transforming growth factor beta during heat shock-induced testicular injury. *Andrology* 7, 244–250. <https://doi.org/10.1111/andr.12566>
- Reap, E.A., Suryadevara, C.M., Batich, K.A., Sanchez-Perez, L., Archer, G.E., Schmittling, R.J., Norberg, P.K., Herndon, J.E., Healy, P., Congdon, K.L., Gedeon, P.C., Campbell, O.C., Swartz, A.M., Riccione, K.A., Yi, J.S., Hossain-Ibrahim, M.K., Saraswathula, A., Nair, S.K., Dunn-Pirio, A.M., Broome, T.M., Weinhold, K.J., Desjardins, A., Vlahovic, G., McLendon, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Bigner, D.D., Fecci, P.E., Mitchell, D.A., Sampson, J.H., 2018. Dendritic Cells Enhance Polyfunctionality of Adoptively Transferred T Cells That Target Cytomegalovirus in Glioblastoma. *Cancer Res.* 78, 256–264. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-0469>
- Reardon, D.A., Brandes, A.A., Omuro, A., Mulholland, P., Lim, M., Wick, A., Baehring, J., Ahluwalia, M.S., Roth, P., Bähr, O., Phuphanich, S., Sepulveda, J.M., De Souza, P., Sahebjam, S., Carleton, M., Tatsuoka, K., Taitt, C., Zwiertes, R., Sampson, J., Weller, M., 2020. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 6, 1003–1010. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2020.1024>
- Reardon, D.A., Fink, K.L., Mikkelsen, T., Cloughesy, T.F., O'Neill, A., Plotkin, S., Glantz, M., Ravin, P., Raizer, J.J., Rich, K.M., Schiff, D., Shapiro, W.R., Burdette-Radoux, S., Dropcho, E.J., Wittemer, S.M., Nippgen, J., Picard, M., Nabors, L.B., 2008. Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 5610–5617. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.7510>
- Reardon, D.A., Freeman, G., Wu, C., Chiocca, E.A., Wucherpfennig, K.W., Wen, P.Y., Fritsch, E.F., Curry, W.T., Sampson, J.H., Dranoff, G., 2014. Immunotherapy advances for glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 16, 1441–1458. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou212>
- Reardon, D.A., Lassman, A.B., van den Bent, M., Kumthekar, P., Merrell, R., Scott, A.M., Fichtel, L., Sulman, E.P., Gomez, E., Fischer, J., Lee, H.-J., Munasinghe, W., Xiong, H., Mandich, H., Roberts-Rapp, L., Ansell, P., Holen, K.D., Gan, H.K., 2017. Efficacy and safety results of ABT-414 in combination with radiation and temozolomide in newly diagnosed glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 19, 965–975. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now257>
- Reardon, D.A., Nabors, L.B., Mason, W.P., Perry, J.R., Shapiro, W., Kavan, P., Mathieu, D., Phuphanich, S., Cseh, A., Fu, Y., Cong, J., Wind, S., Eisenstat, D.D., 2015. Phase I/randomized phase II study of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, with or without protracted temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 17, 430–439. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou160>
- Référentiel de l'ANOCEF pour les glioblastomes (grade IV OMS), 2018. . Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française.
- Rehen, S.K., Kingsbury, M.A., Almeida, B.S.V., Herr, D.R., Peterson, S., Chun, J., 2006. A new method of embryonic culture for assessing global changes in brain organization. *J. Neurosci. Methods* 158, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.05.025>
- Ren, G., Yan, J., Tao, G., Gan, Y., Li, D., Yan, X., Fu, Y., Wang, L., Wang, W., Zhang, Z., Yue, F., Yang, X., 2017. Rapid focal cooling attenuates cortical seizures in a primate epilepsy model. *Exp. Neurol.* 295, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.06.008>

- Retsky, M.W., Demicheli, R., Hrushesky, W.J.M., Baum, M., Gukas, I.D., 2008. Dormancy and surgery-driven escape from dormancy help explain some clinical features of breast cancer. *APMIS* 116, 730–741. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.00990.x>
- Richmond, S., Wyllie, J., 2010. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010: Section 7. Resuscitation of babies at birth. *Resuscitation, European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010* 81, 1389–1399. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2010.08.018>
- Romanovsky, A.A., 2018. Chapter 1 - The thermoregulation system and how it works, in: Romanovsky, A.A. (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology, Thermoregulation: From Basic Neuroscience to Clinical Neurology Part I*. Elsevier, pp. 3–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00001-1>
- Rosen, R.D., Sapra, A., 2020. TNM Classification, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Rosenthal, L.-M., Tong, G., Walker, C., Wowro, S.J., Krech, J., Pfitzer, C., Justus, G., Berger, F., Schmitt, K.R.L., 2017. Neuroprotection via RNA-binding protein RBM3 expression is regulated by hypothermia but not by hypoxia in human SK-N-SH neurons. *Hypoxia Auckl. NZ* 5, 33–43. <https://doi.org/10.2147/HP.S132462>
- Rothman, S., Yang, X.-F., 2003. Local Cooling: A Therapy for Intractable Neocortical Epilepsy. *Epilepsy Curr.* 3, 153–156. <https://doi.org/10.1046/j.1535-7597.2003.03501.x>
- Rothman, S.M., 2009. The therapeutic potential of focal cooling for neocortical epilepsy. *Neurotherapeutics* 6, 251–257.
- Rothman, S.M., Smyth, M.D., Yang, X.-F., Peterson, G.P., 2005. Focal cooling for epilepsy: an alternative therapy that might actually work. *Epilepsy Behav.* EB 7, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.05.021>
- Saigal, S., Sharma, J.P., Dhurwe, R., Kumar, S., Gurjar, M., 2015. Targeted temperature management: Current evidence and practices in critical care. *Indian J. Crit. Care Med. Peer-Rev. Off. Publ. Indian Soc. Crit. Care Med.* 19, 537–546. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.164806>
- Saito, K., Fukuda, N., Matsumoto, T., Iribe, Y., Tsunemi, A., Kazama, T., Yoshida-Noro, C., Hayashi, N., 2010. Moderate low temperature preserves the stemness of neural stem cells and suppresses apoptosis of the cells via activation of the cold-inducible RNA binding protein. *Brain Res.* 1358, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.048>
- Sakurai, T., Itoh, K., Higashitsuji, H., Nonoguchi, K., Liu, Y., Watanabe, H., Nakano, T., Fukumoto, M., Chiba, T., Fujita, J., 2006. Cirp protects against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via activation of extracellular signal-regulated kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.02.007>
- Santé Publique France, 2017. Surveillance des infections du site opératoire dans les établissements de santé 220.
- Sarkaria, J.N., Galanis, E., Wu, W., Dietz, A.B., Kaufmann, T.J., Gustafson, M.P., Brown, P.D., Uhm, J.H., Rao, R.D., Doyle, L., Giannini, C., Jaeckle, K.A., Buckner, J.C., 2010. Combination of temsirolimus (CCI-779) with chemoradiation in newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM) (NCCTG trial N027D) is associated with increased infectious risks. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 16, 5573–5580. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1453>
- Schalper, K.A., Rodriguez-Ruiz, M.E., Diez-Valle, R., López-Janeiro, A., Porciuncula, A., Idoate, M.A., Inogés, S., de Andrea, C., López-Díaz de Cerio, A., Tejada, S., Berraondo, P., Villarroel-Espindola, F., Choi, J., Gúrpide, A., Giraldez, M., Goicoechea, I., Gallego Perez-Larraya, J., Sanmamed, M.F., Perez-Gracia, J.L., Melero, I., 2019. Neoadjuvant nivolumab modifies the tumor immune microenvironment in resectable glioblastoma. *Nat. Med.* 25, 470–476. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0339-5>
- Schijns, V.E.J.C., Pretto, C., Devillers, L., Pierre, D., Hofman, F.M., Chen, T.C., Mespouille, P., Hantos, P., Glorieux, P., Bota, D.A., Stathopoulos, A., 2015. First clinical results of a personalized immunotherapeutic vaccine against recurrent, incompletely resected, treatment-resistant glioblastoma multiforme (GBM) tumors, based on combined allo- and auto-immune tumor reactivity. *Vaccine* 33, 2690–2696. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.095>

- Schmitt, K., Diestel, A., Lehnardt, S., Schwartlander, R., Lange, P., Berger, F., Ullrich, O., Abdulkhalig, H., 2007. Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells. *J. Neuroimmunol.* 189, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.06.010>
- Schmitt, K.R.L., Tong, G., Berger, F., 2014. Mechanisms of hypothermia-induced cell protection in the brain. *Mol. Cell. Pediatr.* 1, 7. <https://doi.org/10.1186/s40348-014-0007-x>
- Sedzimir, C.B., Dundee, J.W., 1958. Hypothermia in the treatment of cerebral tumors. *J. Neurosurg.* 15, 199–206. <https://doi.org/10.3171/jns.1958.15.2.0199>
- Seo, J.-W., Kim, Jong-Heon, Kim, Jae-Hong, Seo, M., Han, H.S., Park, J., Suk, K., 2012. Time-dependent effects of hypothermia on microglial activation and migration. *J. Neuroinflammation* 9, 164.
- Seyedsaadat, S.M., Marasco, S.F., Daly, D.J., McEgan, R., Anderson, J., Rodgers, S., Kreck, T., Kadirvel, R., Kallmes, D.F., 2020. Selective brain hypothermia: feasibility and safety study of a novel method in five patients. *Perfusion* 35, 96–103. <https://doi.org/10.1177/0267659119853950>
- Shafer, D., Tombes, M.B., Shrader, E., Ryan, A., Bandyopadhyay, D., Dent, P., Malkin, M., 2020. Phase I trial of dimethyl fumarate, temozolomide, and radiation therapy in glioblastoma. *Neuro-Oncol. Adv.* 2, vdz052. <https://doi.org/10.1093/oaajnl/vdz052>
- Shibano, T., Morimoto, Y., Kemmotsu, O., Shikama, H., Hisano, K., Hua, Y., 2002. Effects of mild and moderate hypothermia on apoptosis in neuronal PC12 cells. *Br. J. Anaesth.* 89, 301–305. <https://doi.org/10.1093/bja/aef181>
- Shintani, Y., Terao, Y., Ohta, H., 2010. Molecular mechanisms underlying hypothermia-induced neuroprotection. *Stroke Res. Treat.* 2011, 809874. <https://doi.org/10.4061/2011/809874>
- Si, Q.S., Nakamura, Y., Kataoka, K., 1997. Hypothermic suppression of microglial activation in culture: inhibition of cell proliferation and production of nitric oxide and superoxide. *Neuroscience* 81, 223–229.
- Silverman, M.G., Scirica, B.M., 2016. Cardiac arrest and therapeutic hypothermia. *Trends Cardiovasc. Med.* 26, 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.10.002>
- Skardelly, M., Dangel, E., Gohde, J., Noell, S., Behling, F., Lepski, G., Borchers, C., Koch, M., Schittenhelm, J., Bisdas, S., Naumann, A., Paulsen, F., Zips, D., von Hehn, U., Ritz, R., Tatagiba, M.S., Tabatabai, G., 2017. Prolonged Temozolomide Maintenance Therapy in Newly Diagnosed Glioblastoma. *The Oncologist* 22, 570–575. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0347>
- Smyth, M.D., Rothman, S.M., 2011. Focal Cooling Devices for the Surgical Treatment of Epilepsy. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 22, 533–546. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2011.07.011>
- Sonder, P., Janssens, G.N., Beishuizen, A., Henry, C.L., Rittenberger, J.C., Callaway, C.W., Dezfulian, C., Polderman, K.H., 2018. Efficacy of different cooling technologies for therapeutic temperature management: A prospective intervention study. *Resuscitation* 124, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2017.12.026>
- Šourek, K., Trávníček, V., 1970. General and local hypothermia of the brain in the treatment of intractable epilepsy. *J. Neurosurg.* 33, 253–259. <https://doi.org/10.3171/jns.1970.33.3.0253>
- Stadlbauer, A., Mouridsen, K., Doerfler, A., Bo Hansen, M., Oberndorfer, S., Zimmermann, M., Buchfelder, M., Heinz, G., Roessler, K., 2018. Recurrence of glioblastoma is associated with elevated microvascular transit time heterogeneity and increased hypoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 38, 422–432. <https://doi.org/10.1177/0271678X17694905>
- Sterz, F., Safar, P., Tisherman, S., Radovsky, A., Kuboyama, K., Oku, K., 1991. Mild hypothermic cardiopulmonary resuscitation improves outcome after prolonged cardiac arrest in dogs. *Crit. Care Med.* 19, 379–389. <https://doi.org/10.1097/00003246-199103000-00017>
- Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.-J., ALA-Glioma Study Group, 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 7, 392–401. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70665-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70665-9)
- Stupp, R., Hegi, M.E., Gorlia, T., Erridge, S.C., Perry, J., Hong, Y.-K., Aldape, K.D., Lhermitte, B., Pietsch, T., Grujicic, D., Steinbach, J.P., Wick, W., Tarnawski, R., Nam, D.-H., Hau, P., Weyerbrock, A., Taphoorn, M.J.B., Shen, C.-C., Rao, N., Thurzo, L., Herrlinger, U., Gupta, T., Kortmann, R.-D., Adamska, K., McBain, C., Brandes, A.A., Tonn, J.C., Schnell, O., Wiegel, T., Kim, C.-Y., Nabors,

- L.B., Reardon, D.A., van den Bent, M.J., Hicking, C., Markivskyy, A., Picard, M., Weller, M., European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Canadian Brain Tumor Consortium, CENTRIC study team, 2014. Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 15, 1100–1108. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70379-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70379-1)
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.-O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D.M., Lhermitte, B., Toms, S., Idbaih, A., Ahluwalia, M.S., Fink, K., Meco, F.D., Lieberman, F., Zhu, J.-J., Stragliotto, G., Tran, D.D., Brem, S., Hottinger, A.F., Kirson, E.D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C.-Y., Paek, S.-H., Nicholas, G., Bruna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M.E., Ram, Z., 2017. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 318, 2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
- Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A.A., Kesari, S., Steinberg, D.M., Toms, S.A., Taylor, L.P., Lieberman, F., Silvani, A., Fink, K.L., Barnett, G.H., Zhu, J.-J., Henson, J.W., Engelhard, H.H., Chen, T.C., Tran, D.D., Sroubek, J., Tran, N.D., Hottinger, A.F., Landolfi, J., Desai, R., Caroli, M., Kew, Y., Honnorat, J., Idbaih, A., Kirson, E.D., Weinberg, U., Palti, Y., Hegi, M.E., Ram, Z., 2015. Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 314, 2535–2543. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.16669>
- Stupp, R., Wong, E.T., Kanner, A.A., Steinberg, D., Engelhard, H., Heidecke, V., Kirson, E.D., Taillibert, S., Liebermann, F., Dbalý, V., Ram, Z., Villano, J.L., Rainov, N., Weinberg, U., Schiff, D., Kunschner, L., Raizer, J., Honnorat, J., Sloan, A., Malkin, M., Landolfi, J.C., Payer, F., Mehdorn, M., Weil, R.J., Pannullo, S.C., Westphal, M., Smrcka, M., Chin, L., Kostron, H., Hofer, S., Bruce, J., Cosgrove, R., Paleologous, N., Palti, Y., Gutin, P.H., 2012. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 48, 2192–2202. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.04.011>
- Suchorska, B., Weller, M., Tabatabai, G., Senft, C., Hau, P., Sabel, M.C., Herrlinger, U., Ketter, R., Schlegel, U., Marosi, C., Reifenberger, G., Wick, W., Tonn, J.C., Wirsching, H.-G., 2016. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma—results from the DIRECTOR trial. *Neuro-Oncol.* 18, 549–556. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov326>
- Suehiro, E., Ueda, Y., Wei, E.P., Kontos, H.A., Povlishock, J.T., 2003. Posttraumatic hypothermia followed by slow rewarming protects the cerebral microcirculation. *J. Neurotrauma* 20, 381–390. <https://doi.org/10.1089/089771503765172336>

- Sumer, B.D., Myers, L.L., Leach, J., Truelson, J.M., 2009. Correlation between intraoperative hypothermia and perioperative morbidity in patients with head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 135, 682–686. <https://doi.org/10.1001/archoto.2009.65>
- Sureban, S.M., Ramalingam, S., Natarajan, G., May, R., Subramaniam, D., Bishnupuri, K.S., Morrison, A.R., Dieckgraefe, B.K., Brackett, D.J., Postier, R.G., Houchen, C.W., Anant, S., 2008. Translation regulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. *Oncogene* 27, 4544–4556. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.97>
- Taal, W., Oosterkamp, H.M., Walenkamp, A.M.E., Dubbink, H.J., Beerepoot, L.V., Hanse, M.C.J., Buter, J., Honkoop, A.H., Boerman, D., de Vos, F.Y.F., Dinjens, W.N.M., Enting, R.H., Taphoorn, M.J.B., van den Bergmortel, F.W.P.J., Jansen, R.L.H., Brandsma, D., Bromberg, J.E.C., van Heuvel, I., Vernhout, R.M., van der Holt, B., van den Bent, M.J., 2014. Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOB trial): a randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 15, 943–953. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70314-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70314-6)
- Tabuchi, K., 1972. Effects of differential hypothermia on experimental brain tumor. *Acta Med. Okayama* 26, 65–73.
- Taccone, F.S., Picetti, E., Vincent, J.-L., 2020. High Quality Targeted Temperature Management (TTM) After Cardiac Arrest. *Crit. Care Lond. Engl.* 24, 6. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2721-1>
- Tamimi, A.F., Juweid, M., 2017. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma, in: De Vleeschouwer, S. (Ed.), *Glioblastoma*. Codon Publications, Brisbane (AU).
- Testori, C., Holzer, M., Sterz, F., Stratil, P., Hartner, Z., Moscato, F., Schima, H., Behringer, W., 2013. Rapid induction of mild therapeutic hypothermia by extracorporeal veno-venous blood cooling in humans. *Resuscitation* 84, 1051–1055. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2013.03.013>
- Thuillier, R., Hauet, T., 2018. Impact of Hypothermia and Oxygen Deprivation on the Cytoskeleton in Organ Preservation Models [WWW Document]. *BioMed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2018/8926724>
- Thust, S.C., van den Bent, M.J., Smits, M., 2018. Pseudoprogression of brain tumors. *J. Magn. Reson. Imaging* 48, 571–589. <https://doi.org/10.1002/jmri.26171>
- Tiek, D.M., Rone, J.D., Graham, G.T., Pannkuk, E.L., Haddad, B.R., Riggins, R.B., 2018. Alterations in Cell Motility, Proliferation, and Metabolism in Novel Models of Acquired Temozolomide Resistant Glioblastoma. *Sci. Rep.* 8, 7222. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25588-1>
- Tong, G., Endersfelder, S., Rosenthal, L.-M., Wollersheim, S., Sauer, I.M., Bühner, C., Berger, F., Schmitt, K.R.L., 2013. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Res.* 1504, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.01.041>
- Tong, G., Krauss, A., Mochner, J., Wollersheim, S., Soltani, P., Berger, F., Schmitt, K.R.L., 2017. Deep hypothermia therapy attenuates LPS-induced microglia neuroinflammation via the STAT3 pathway. *Neuroscience* 358, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.06.055>
- Touat, M., Idbaih, A., Sanson, M., Ligon, K.L., 2017. Glioblastoma targeted therapy: updated approaches from recent biological insights. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 28, 1457–1472. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx106>
- Truettner, J.S., Bramlett, H.M., Dietrich, W.D., 2017. Posttraumatic therapeutic hypothermia alters microglial and macrophage polarization toward a beneficial phenotype. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 2952–2962. <https://doi.org/10.1177/0271678X16680003>
- Tubiana, M., 2008. Généralités sur la cancérogenèse☆☆Ce texte est très largement inspiré par l'appendice sur la cancérogenèse rédigé par R. Monier et moi-même pour le rapport sur les causes du cancer en France. L'auteur remercie beaucoup R. Monier pour les nombreuses et fructueuses discussions qu'il a eues avec lui. *C. R. Biol., Dossier : Nouveautés en cancérogenèse / New developments in carcinogenesis* 331, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2007.03.003>
- Uray, T., Malzer, R., 2008. Out-of-hospital surface cooling to induce mild hypothermia in human cardiac arrest: A feasibility trial. *Resuscitation* 77, 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2008.01.005>

- Ushio, A., Eto, K., 2018. RBM3 expression is upregulated by NF- κ B p65 activity, protecting cells from apoptosis, during mild hypothermia. *J. Cell. Biochem.* 119, 5734–5749. <https://doi.org/10.1002/jcb.26757>
- Valentini, L., Chiaffarino, F., Bonfanti, N., Pannacci, M., Cortellazzi, P., Uberti-Foppa, C., Furlanetto, M., DI Meco, F., Massimi, L., Passis Group, 2018. Incidence and risk factors of neurosurgical site infections: results of a prospective multicenter cohort study on 6359 surgeries. *J. Neurosurg. Sci.* <https://doi.org/10.23736/S0390-5616.18.04322-9>
- Van Den Bent, M., Eoli, M., Sepulveda, J.M., Smits, M., Walenkamp, A., Frenel, J.-S., Franceschi, E., Clement, P.M., Chinot, O., De Vos, F., Whenham, N., Sanghera, P., Weller, M., Dubbink, H.J., French, P., Looman, J., Dey, J., Krause, S., Ansell, P., Nuyens, S., Spruyt, M., Brillhante, J., Coens, C., Gorlia, T., Golfopoulos, V., 2020. INTELLANCE 2/EORTC 1410 randomized phase II study of Depatux-M alone and with temozolomide vs temozolomide or lomustine in recurrent EGFR amplified glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 22, 684–693. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz222>
- van den Bent, M., Gan, H.K., Lassman, A.B., Kumthekar, P., Merrell, R., Butowski, N., Lwin, Z., Mikkelsen, T., Nabors, L.B., Papadopoulos, K.P., Penas-Prado, M., Simes, J., Wheeler, H., Walbert, T., Scott, A.M., Gomez, E., Lee, H.-J., Roberts-Rapp, L., Xiong, H., Bain, E., Ansell, P.J., Holen, K.D., Maag, D., Reardon, D.A., 2017. Efficacy of depatuxizumab mafodotin (ABT-414) monotherapy in patients with EGFR-amplified, recurrent glioblastoma: results from a multi-center, international study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 80, 1209–1217. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3451-1>
- van den Bent, M.J., Brandes, A.A., Rampling, R., Kouwenhoven, M.C.M., Kros, J.M., Carpentier, A.F., Clement, P.M., Frenay, M., Campone, M., Baurain, J.-F., Armand, J.-P., Taphoorn, M.J.B., Tosoni, A., Kletzl, H., Klughammer, B., Lacombe, D., Gorlia, T., 2009. Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 1268–1274. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.5984>
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O’Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N., Cancer Genome Atlas Research Network, 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
- Vik-Mo, E.O., Nyakas, M., Mikkelsen, B.V., Moe, M.C., Due-Tønnesen, P., Suso, E.M.I., Sæbøe-Larsen, S., Sandberg, C., Brinchmann, J.E., Helseth, E., Rasmussen, A.-M., Lote, K., Aamdal, S., Gaudernack, G., Kvalheim, G., Langmoen, I.A., 2013. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 1499–1509. <https://doi.org/10.1007/s00262-013-1453-3>
- Wang, D., Zhang, J., 2015. Effects of hypothermia combined with neural stem cell transplantation on recovery of neurological function in rats with spinal cord injury. *Mol. Med. Rep.* 11, 1759–1767. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2905>
- Wang, G., Zhang, J.-N., Guo, J.-K., Cai, Y., Sun, H.-S., Dong, K., Wu, C.-G., 2016. Neuroprotective effects of cold-inducible RNA-binding protein during mild hypothermia on traumatic brain injury. *Neural Regen. Res.* 11, 771–778. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.182704>
- Wang, H., Olivero, W., Lanzino, G., Elkins, W., Rose, J., Honings, D., Rodde, M., Burnham, J., Wang, D., 2004. Rapid and selective cerebral hypothermia achieved using a cooling helmet. *J. Neurosurg.* 100, 272–277. <https://doi.org/10.3171/jns.2004.100.2.0272>
- Wang, H., Olivero, W., Wang, D., Lanzino, G., 2006. Cold as a therapeutic agent. *Acta Neurochir. (Wien)* 148, 565–570. <https://doi.org/10.1007/s00701-006-0747-z>
- Wang, J., Pearse, D.D., 2015. Therapeutic Hypothermia in Spinal Cord Injury: The Status of Its Use and Open Questions. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 16848–16879. <https://doi.org/10.3390/ijms160816848>

- Wang, X., Chen, J., Liu, J., You, C., Liu, Y., Mao, Q., 2014. Gain of Function of Mutant TP53 in Glioblastoma: Prognosis and Response to Temozolomide. *Ann. Surg. Oncol.* 21, 1337–1344. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3380-0>
- Wang, X., Chen, J., Liu, Y., You, C., Mao, Q., 2013. Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. *Neurol Sci* 34, 1421–1428. <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1257-9>
- Wang, Y.-S., Zhang, J., Li, Y.-F., Chen, B.-R., Khurwolah, M.R., Tian, Y.-F., Shi, H.-J., Yang, Z.-J., Wang, L.-S., 2018. A pilot clinical study of adjunctive therapy with selective intracoronary hypothermia in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Catheter. Cardiovasc. Interv. Off. J. Soc. Card. Angiogr. Interv.* 92, E433–E440. <https://doi.org/10.1002/ccd.27864>
- Watson, H.I., Shepherd, A.A., Rhodes, J.K.J., Andrews, P.J.D., 2018. Revisited: A Systematic Review of Therapeutic Hypothermia for Adult Patients Following Traumatic Brain Injury. *Crit. Care Med.* 46, 972–979. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000003125>
- Weathers, S.-P., Han, X., Liu, D.D., Conrad, C.A., Gilbert, M.R., Loghin, M.E., O'Brien, B.J., Penas-Prado, M., Pudukall, V.K., Tremont-Lukats, I., Colen, R.R., Yung, W.K.A., de Groot, J.F., 2016. A randomized phase II trial of standard dose bevacizumab versus low dose bevacizumab plus lomustine (CCNU) in adults with recurrent glioblastoma. *J. Neurooncol.* 129, 487–494. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2195-9>
- Weiner, J.S., Khogali, M., 1980. A PHYSIOLOGICAL BODY-COOLING UNIT FOR TREATMENT OF HEAT STROKE. *The Lancet* 315, 507–509. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(80\)92764-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(80)92764-6)
- Weiss, T., Weller, M., Guckenberger, M., Sentman, C.L., Roth, P., 2018. NKG2D-Based CAR T Cells and Radiotherapy Exert Synergistic Efficacy in Glioblastoma. *Cancer Res.* 78, 1031–1043. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1788>
- Weller, M., Butowski, N., Tran, D.D., Recht, L.D., Lim, M., Hirte, H., Ashby, L., Mechtler, L., Goldlust, S.A., Iwamoto, F., Drappatz, J., O'Rourke, D.M., Wong, M., Hamilton, M.G., Finocchiaro, G., Perry, J., Wick, W., Green, J., He, Y., Turner, C.D., Yellin, M.J., Keler, T., Davis, T.A., Stupp, R., Sampson, J.H., 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. *Lancet Oncol.* 18, 1373–1385. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30517-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30517-X)
- Weller, M., Rhun, E.L., Preusser, M., Tonn, J.-C., Roth, P., 2019. How we treat glioblastoma. *ESMO Open* 4, e000520. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000520>
- Wellmann, S., Bührer, C., Moderegger, E., Zelmer, A., Kirschner, R., Koehne, P., Fujita, J., Seeger, K., 2004. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *J. Cell Sci.* 117, 1785–1794. <https://doi.org/10.1242/jcs.01026>
- Wellmann, S., Truss, M., Bruder, E., Tornillo, L., Zelmer, A., Seeger, K., Bührer, C., 2010. The RNA-binding protein RBM3 is required for cell proliferation and protects against serum deprivation-induced cell death. *Pediatr. Res.* 67, 35–41. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181c13326>
- Wen, P.Y., Chang, S.M., Lamborn, K.R., Kuhn, J.G., Norden, A.D., Cloughesy, T.F., Robins, H.I., Lieberman, F.S., Gilbert, M.R., Mehta, M.P., Drappatz, J., Groves, M.D., Santagata, S., Ligon, A.H., Yung, W.K.A., Wright, J.J., Dancey, J., Aldape, K.D., Prados, M.D., Ligon, K.L., 2014. Phase I/II study of erlotinib and temsirolimus for patients with recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium trial 04-02. *Neuro-Oncol.* 16, 567–578. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not247>
- Wen, P.Y., Drappatz, J., de Groot, J., Prados, M.D., Reardon, D.A., Schiff, D., Chamberlain, M., Mikkelsen, T., Desjardins, A., Holland, J., Ping, J., Weitzman, R., Cloughesy, T.F., 2018. Phase II study of cabozantinib in patients with progressive glioblastoma: subset analysis of patients naive to antiangiogenic therapy. *Neuro-Oncol.* 20, 249–258. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox154>
- Wen, P.Y., Reardon, D.A., Armstrong, T.S., Phuphanich, S., Aiken, R.D., Landolfi, J.C., Curry, W.T., Zhu, J.-J., Glantz, M., Peereboom, D.M., Markert, J.M., LaRocca, R., O'Rourke, D.M., Fink, K., Kim, L., Gruber, M., Lesser, G.J., Pan, E., Kesari, S., Muzikansky, A., Pinilla, C., Santos, R.G., Yu, J.S., 2019a. A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Phase II Trial of Dendritic Cell Vaccine

- ICT-107 in Newly Diagnosed Patients with Glioblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 25, 5799–5807. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0261>
- Wen, P.Y., Touat, M., Alexander, B.M., Mellinghoff, I.K., Ramkissoon, S., McCluskey, C.S., Pelton, K., Haidar, S., Basu, S.S., Gaffey, S.C., Brown, L.E., Martinez-Ledesma, J.E., Wu, S., Kim, J., Wei, W., Park, M.-A., Huse, J.T., Kuhn, J.G., Rinne, M.L., Colman, H., Agar, N.Y.R., Omuro, A.M., DeAngelis, L.M., Gilbert, M.R., de Groot, J.F., Cloughesy, T.F., Chi, A.S., Roberts, T.M., Zhao, J.J., Lee, E.Q., Nayak, L., Heath, J.R., Horky, L.L., Batchelor, T.T., Beroukhi, R., Chang, S.M., Ligon, A.H., Dunn, I.F., Koul, D., Young, G.S., Prados, M.D., Reardon, D.A., Yung, W.K.A., Ligon, K.L., 2019b. Buparlisib in Patients With Recurrent Glioblastoma Harboring Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Activation: An Open-Label, Multicenter, Multi-Arm, Phase II Trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 37, 741–750. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01207>
- Westphal, M., Heese, O., Steinbach, J.P., Schnell, O., Schackert, G., Mehdorn, M., Schulz, D., Simon, M., Schlegel, U., Senft, C., Geletneky, K., Braun, C., Hartung, J.G., Reuter, D., Metz, M.W., Bach, F., Pietsch, T., 2015. A randomised, open label phase III trial with nimotuzumab, an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in the treatment of newly diagnosed adult glioblastoma. *Eur. J. Cancer* 51, 522–532. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2014.12.019>
- Westphal, M., Ylä-Herttuala, S., Martin, J., Warnke, P., Menei, P., Eckland, D., Kinley, J., Kay, R., Ram, Z., ASPECT Study Group, 2013. Adenovirus-mediated gene therapy with sitimagene ceradenovec followed by intravenous ganciclovir for patients with operable high-grade glioma (ASPECT): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14, 823–833. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70274-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70274-2)
- Wick, W., Gorlia, T., Bendszus, M., Taphoorn, M., Sahm, F., Harting, I., Brandes, A.A., Taal, W., Domont, J., Idbaih, A., Campone, M., Clement, P.M., Stupp, R., Fabbro, M., Le Rhun, E., Dubois, F., Weller, M., von Deimling, A., Golfopoulos, V., Bromberg, J.C., Platten, M., Klein, M., van den Bent, M.J., 2017. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 377, 1954–1963. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707358>
- Wick, W., Puduvalli, V.K., Chamberlain, M.C., van den Bent, M.J., Carpentier, A.F., Cher, L.M., Mason, W., Weller, M., Hong, S., Musib, L., Liepa, A.M., Thornton, D.E., Fine, H.A., 2010. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1168–1174. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.2595>
- Wick, W., Steinbach, J.P., Platten, M., Hartmann, C., Wenz, F., von Deimling, A., Shei, P., Moreau-Donnet, V., Stoffregen, C., Combs, S.E., 2013. Enzastaurin before and concomitant with radiation therapy, followed by enzastaurin maintenance therapy, in patients with newly diagnosed glioblastoma without MGMT promoter hypermethylation. *Neuro-Oncol.* 15, 1405–1412. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not100>
- Williams, J.A., 1992. Tumor treatment. Brevet WO9222350 (A1).
- Wion, D., 2017. Therapeutic dormancy to delay postsurgical glioma recurrence: the past, present and promise of focal hypothermia. *J. Neurooncol.* 133, 447–454. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2471-3>
- Wion, D., Appaix, F., Burruss, M., Berger, F., van der Sanden, B., 2015. Cancer research in need of a scientific revolution: Using ‘paradigm shift’ as a method of investigation. *J. Biosci.* 40, 657–666. <https://doi.org/10.1007/s12038-015-9543-3>
- Wirsching, H.-G., Galanis, E., Weller, M., 2016. Chapter 23 - Glioblastoma, in: Berger, M.S., Weller, M. (Eds.), *Handbook of Clinical Neurology, Gliomas*. Elsevier, pp. 381–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Wohlfart, S., Gelperina, S., Kreuter, J., 2012. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *J. Controlled Release, Drug Delivery Research in Europe* 161, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.017>
- Wong, E., Zaleski, E.R., Varshney, A., 2006. Medical device and method for temperature control and treatment of the brain and spinal cord. Brevet US7004961 (B2).
- Wong, J.J.-L., Au, A.Y.M., Gao, D., Pinello, N., Kwok, C.-T., Thoeng, A., Lau, K.A., Gordon, J.E.A., Schmitz, U., Feng, Y., Nguyen, T.V., Middleton, R., Bailey, C.G., Holst, J., Rasko, J.E.J., Ritchie, W., 2016.

- RBM3 regulates temperature sensitive miR-142-5p and miR-143 (thermomiRs), which target immune genes and control fever. *Nucleic Acids Res.* 44, 2888–2897. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw041>
- Wood, T., Thoresen, M., 2015. Physiological responses to hypothermia. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 20, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2014.10.005>
- Woodhall, B., Hall, K., Mahaley, S., Jackson, J., 1959. Chemotherapy of brain cancer: experimental and clinical studies in localized hypothermic cerebral perfusion. *Ann. Surg.* 150, 640–652. <https://doi.org/10.1097/00000658-195910000-00009>
- Wu, C., Zhao, W., An, H., Wu, L., Chen, J., Hussain, M., Ding, Y., Li, C., Wei, W., Duan, J., Wang, C., Yang, Q., Wu, D., Liu, L., Ji, X., 2018. Safety, feasibility, and potential efficacy of intraarterial selective cooling infusion for stroke patients treated with mechanical thrombectomy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 38, 2251–2260. <https://doi.org/10.1177/0271678X18790139>
- Wu, D., Shi, J., Elmadhoun, O., Duan, Y., An, H., Zhang, J., He, X., Meng, R., Liu, X., Ji, X., Ding, Y., 2017. Dihydrocapsaicin (DHC) enhances the hypothermia-induced neuroprotection following ischemic stroke via PI3K/Akt regulation in rat. *Brain Res.* 1671, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.06.029>
- Xie, Y.-C., Li, C.-Y., Li, T., Nie, D.-Y., Ye, F., 2007. Effect of mild hypothermia on angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 422, 87–90. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.03.072>
- Xing, W., Shao, C., Qi, Z., Yang, C., Wang, Z., 2015. The role of Gliadel wafers in the treatment of newly diagnosed GBM: a meta-analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 3341–3348. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S85943>
- Xu, S., Hu, Y., Li, W., Wu, Y., Ji, Z., Wang, S., Li, K., Pan, S., 2014. Intermittent hypothermia is neuroprotective in an in vitro model of ischemic stroke. *Int. J. Biol. Sci.* 10, 873–881. <https://doi.org/10.7150/ijbs.8868>
- Yang, H.-J., Ju, F., Guo, X.-X., Ma, S.-P., Wang, L., Cheng, B.-F., Zhuang, R.-J., Zhang, B.-B., Shi, X., Feng, Z.-W., Wang, M., 2017. RNA-binding protein RBM3 prevents NO-induced apoptosis in human neuroblastoma cells by modulating p38 signaling and miR-143. *Sci. Rep.* 7, 41738. <https://doi.org/10.1038/srep41738>
- Yang, X.-F., Duffy, D.W., Morley, R.E., Rothman, S.M., 2002. Neocortical seizure termination by focal cooling: temperature dependence and automated seizure detection. *Epilepsia* 43, 240–245.
- Yang, X.-F., Kennedy, B.R., Lomber, S.G., Schmidt, R.E., Rothman, S.M., 2006. Cooling produces minimal neuropathology in neocortex and hippocampus. *Neurobiol. Dis.* 23, 637–643. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.05.006>
- Yang, X.F., Rothman, S.M., 2001. Focal cooling rapidly terminates experimental neocortical seizures. *Ann. Neurol.* 49, 721–726.
- Yenari, M.A., Han, H.S., 2013. Influence of therapeutic hypothermia on regeneration after cerebral ischemia. *Front. Neurol. Neurosci.* 32, 122–128. <https://doi.org/10.1159/000346428>
- Yoshino, Y., Aoyagi, M., Tamaki, M., Duan, L., Morimoto, T., Ohno, K., 2006. Activation of p38 MAPK and/or JNK contributes to increased levels of VEGF secretion in human malignant glioma cells. *Int. J. Oncol.* 29, 981–987.
- Yoshizu, H., Suga, K., Tabuchi, K., Arimori, M., Oohashi, T., Mizukawa, N., Nobuto, H., Nishimoto, A., 1971. Treatment for Malignant Brain Tumours with Differential Hypothermia. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 11, 254–255. <https://doi.org/10.2176/nmc.11.254>
- Yücel, Y., Barlan, M., Lenhardt, R., Kurz, A., Sessler, D.I., 2005. Perioperative hypothermia does not enhance the risk of cancer dissemination. *Am. J. Surg.* 189, 651–655.
- Zanders, E.D., Svensson, F., Bailey, D.S., 2019. Therapy for glioblastoma: is it working? *Drug Discov. Today* 24, 1193–1201. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.008>
- Zeng, Y., Kulkarni, P., Inoue, T., Getzenberg, R.H., 2009. Down-Regulating Cold Shock Protein Genes Impairs Cancer Cell Survival and Enhances Chemosensitivity. *J. Cell. Biochem.* 107, 179–188. <https://doi.org/10.1002/jcb.22114>
- Zhang, F., Dong, H., Lv, T., Jin, K., Jin, Y., Zhang, X., Jiang, J., 2018. Moderate hypothermia inhibits microglial activation after traumatic brain injury by modulating autophagy/apoptosis and the

- MyD88-dependent TLR4 signaling pathway. *J. Neuroinflammation* 15, 273. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1315-1>
- Zhang, H.-T., Xue, J.-H., Zhang, Z.-W., Kong, H.-B., Liu, A.-J., Li, S.-C., Xu, D.-G., 2015. Cold-inducible RNA-binding protein inhibits neuron apoptosis through the suppression of mitochondrial apoptosis. *Brain Res.* 1622, 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.07.004>
- Zhang, H.-T., Zhang, Z.-W., Xue, J.-H., Kong, H.-B., Liu, A.-J., Li, S.-C., Liu, Y.-X., Xu, D.-G., 2013. Differential expression of the RNA-binding motif protein 3 in human astrocytoma. *Chin. Med. J. (Engl.)* 126, 1948–1952.
- Zhang, J., Stevens, M.F.G., Bradshaw, T.D., 2012. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* 5, 102–114. <https://doi.org/10.2174/1874467211205010102>
- Zhang, M., Wang, H., Zhao, J., Chen, C., Leak, R.K., Xu, Y., Vosler, P., Gao, Y., Zhang, F., 2013. Drug-induced hypothermia in stroke models: does it always protect? *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 12, 371–380.
- Zhang, Q., Wang, Y.-Z., Zhang, W., Chen, X., Wang, J., Chen, J., Luo, W., 2017. Involvement of Cold Inducible RNA-Binding Protein in Severe Hypoxia-Induced Growth Arrest of Neural Stem Cells In Vitro. *Mol. Neurobiol.* 54, 2143–2153. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-9761-1>
- Zhang, W., Ma, J., Danzeng, Q., Tang, Y., Lu, M., Kang, Y., 2017. Safety of Moderate Hypothermia for Perinatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Meta-analysis. *Pediatr. Neurol.* 74, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.04.023>
- Zhang, X., Lv, Y., Chen, G., Zou, Y., Lin, C., Yang, L., Guo, P., Lin, M., 2012. Effect of mild hypothermia on breast cancer cells adhesion and migration. *Biosci. Trends.* <https://doi.org/10.5582/bst.2012.v6.6.313>
- Zhao, H., Wang, J.Q., Shimohata, T., Sun, G., Yenari, M.A., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K., 2007. Conditions of protection by hypothermia and effects on apoptotic pathways in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *J. Neurosurg.* 107, 636–641. <https://doi.org/10.3171/JNS-07/09/0636>
- Zhao, H., Yenari, M.A., Cheng, D., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K., 2005. Biphasic cytochrome c release after transient global ischemia and its inhibition by hypothermia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 1119–1129.
- Zhao, J., Mao, Q., Qian, Z., Zhu, J., Qu, Z., Wang, C., 2018. Effect of mild hypothermia on expression of inflammatory factors in surrounding tissue after minimally invasive hematoma evacuation in the treatment of hypertensive intracerebral hemorrhage. *Exp. Ther. Med.* 15, 4906–4910. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6014>
- Zhou, M., Yang, W.-L., Ji, Y., Qiang, X., Wang, P., 2014. Cold-inducible RNA-binding protein mediates neuroinflammation in cerebral ischemia. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2253–2261. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.027>
- Zhou, Y., Dong, H., Zhong, Y., Huang, J., Lv, J., Li, J., 2015. The Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) Level in Peripheral Blood Predicts Sepsis Outcome. *PloS One* 10, e0137721. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137721>
- Zhu, X., Bühner, C., Wellmann, S., 2016. Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 3839–3859. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2253-7>
- Zingg, W., 1983. Historical use of hypothermia for cancer. *Can. J. Surg. J. Can. Chir.* 26, 97–98.
- Zouaoui, S., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Bauchet, F., Kerr, C., Fabbro, M., Figarella-Branger, D., Taillandier, L., Duffau, H., Trétarre, B., Bauchet, L., Société française de neurochirurgie (SFNC) et le Club de neuro-oncologie de la SFNC, Société française de neuropathologie (SFNP), Association des neuro-oncologues d'expression française (ANOCEF), 2012. [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie.* 58, 4–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2012.01.004>

Publications et communications

Publications dans des journaux internationaux à comité de lecture

C. Fulbert, C. Gaude, E. Sulpice, S. Chabardès, D. Ratel. Moderate hypothermia inhibits both proliferation and migration of human glioblastoma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, Volume 144, Issue 3, pp 489–499, <https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-019-03263-3>.

C. Fulbert, S. Chabardès, D. Ratel. Adjuvant therapeutic potential of moderate hypothermia for glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, Volume 152, Issue 3, pp 467–482, <https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-021-03704-y>.

Posters présentés lors d'une conférence internationale

C Fulbert, C Gaude, E Sulpice, S Chabardès, D Ratel. Hypothermia effect on glioblastoma cell viability, proliferation and migration.

Poster présenté lors de la conférence EANO 2019 (European Association of Neuro-Oncology).

C. Fulbert, C. Gaude, S. Chabardès, D. Ratel. Adjuvant therapeutic potential of hypothermia in the treatment of glioblastoma: An *in vitro* study.

Poster présenté lors de la conférence AACR 2020 (American Association for Cancer Research), en ligne en raison de la Covid-19.

Abstracts publiés

C Fulbert, C Gaude, E Sulpice, S Chabardès, D Ratel. Hypothermia effect on glioblastoma cell viability, proliferation and migration. *Neuro-Oncology*, Volume 21, Issue Supplement_3, August 2019 – <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz126.148>.

C. Fulbert, C. Gaude, S. Chabardès, D. Ratel. Adjuvant therapeutic potential of hypothermia in the treatment of glioblastoma: An *in vitro* study. *Cancer Research*, Proceedings of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020; 2020 Apr 27-28 and Jun 22-24. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2020;80(16 Suppl):Abstract nr 2652 – <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2020-2652>.

C. Fulbert, C. Gaude, E. Sulpice, S. Chabardès, D. Ratel. Adjuvant therapeutic potential of hypothermia: an *in vitro* study on glioblastoma cell growth. Forum de la recherche en cancérologie Auvergne-Rhône-Alpes 2020. https://forum.canceropole-clara.com/wp-content/uploads/2020/03/Abstracts-Forum_FINAL.pdf.

Présentation annulée en raison de la Covid-19, abstract publié sur le site du canceropole CLARA.

Demande de brevet d'invention français

C. Fulbert, C. Chabrol, D. Ratel, Q. Borntrager. Dispositif de refroidissement localisé. Dépôt effectué le 10 décembre 2020 sous le numéro de demande de brevet français FR2012954.



Moderate hypothermia inhibits both proliferation and migration of human glioblastoma cells

Clémentine Fulbert¹ · Christophe Gaude¹ · Eric Sulpice² · Stéphan Chabardès^{1,3,4} · David Ratel¹

Received: 29 May 2019 / Accepted: 6 August 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

Purpose Glioblastoma is the most aggressive malignant brain tumor. Despite multimodal treatments, median survival is only 15 months for glioblastoma patients, with tumor recurring in the resection margins after surgical removal. Hypothermia is emerging as an interesting and safe treatment for several conditions. In the context of glioblastoma, we propose that moderate hypothermia could inhibit both cell proliferation and migration, and thus help prevent secondary tumor growth.

Methods In vitro experiments on A172, U251, U87 and T98G human glioblastoma cell lines explored the effects of severe (23 °C), moderate (28 °C), and mild (33 °C) hypothermia. We further investigated the effects of moderate hypothermia on cell proliferation, migration, morphology, and cell cycle distribution.

Results Similar results were obtained with all four cell lines, indicating a consistent and broad effect of moderate hypothermia. Hypothermia inhibited both cell proliferation and non-oriented migration in a dose-dependent manner, with a significant reduction at 33 °C and almost total arrest at 28 °C. Cell proliferation arrest was long-lasting and oriented cell migration was also reduced at 28 °C. Moreover, moderate hypothermia significantly altered cell cycle distribution, with cells accumulating in the G2/M phase, leading to cell cycle arrest. Lastly, hypothermia at 28 °C also affected cell morphology by deteriorating cell membranes and altering cell shape.

Conclusions The presented results demonstrate that moderate hypothermia could be a promising adjuvant therapy for glioblastoma treatment as it strongly inhibits both cell proliferation and migration. If in vivo preclinical results corroborate our findings, therapeutic hypothermia applied at the resection margins could probably delay tumor recurrence, combined with current treatments.

Keywords Hypothermia · Glioblastoma · Proliferation · Migration · Cell cycle

Introduction

Gliomas are the most aggressive malignant brain tumors, characterized by their heterogeneity and capacity to infiltrate the brain. The WHO (World Health Organization) classification of brain tumors distinguishes between low-grade and high-grade gliomas. Among high-grade gliomas, grade IV astrocytomas—or glioblastomas—show particularly rapid growth which is linked to poor prognosis for patients [1]. Current treatments for glioblastoma consist in surgical resection as a first-line therapy, in order to reduce the tumor mass. Surgery is followed by a combination of radiotherapy and chemotherapy, which aim to kill residual cancer cells. However, in spite of these multimodal therapies, the median survival time is only 15 months from diagnosis [2, 3]. Consequently, there is a strong rationale to improve conventional therapies or develop innovative treatments.

✉ Clémentine Fulbert
clementine.fulbert@cea.fr

✉ David Ratel
david.ratel@cea.fr

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI, Clnatec,
38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG-BGE U1038,
38000 Grenoble, France

³ Neurosurgery Department, CHU Grenoble Alpes,
38000 Grenoble, France

⁴ Grenoble Institut des Neurosciences, Univ. Grenoble Alpes,
Inserm U1216, 38000 Grenoble, France

The poor prognosis for patients with glioblastoma is mainly due to tumor recurrence which concerns more than 90% of patients and occurs in the resection margins. This recurrence may be due to incomplete resection as the invasive properties of glioblastomas result in residual and disseminated cancer cells. In addition, glioblastomas are intrinsically resistant to chemotherapy, a fact that significantly reduces their efficiency [4]. Finally, tumor recurrence could also be triggered by some mediators of surgery-related inflammation which have been shown to increase the proliferation and migration of residual cancer cells [4, 5].

Hypothermia is a therapeutic approach which has been adopted to treat various pathologies in recent years like traumatic brain injury, epilepsy or cardiac arrest. The degree of hypothermia can be categorized based on the temperature range involved: mild hypothermia (32–35 °C), moderate hypothermia (28–32 °C) and severe hypothermia (<28 °C). In cardiac arrest resuscitation, case reports and clinical trials demonstrated that whole-body mild hypothermia provided neuroprotection and improved patient outcome [6, 7]. Since 2002, the guidelines published by the International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) [8] recommend that patients successfully resuscitated from cardiac arrest be subjected to mild therapeutic hypothermia (32–34 °C) for 12 to 24 h. Many of the injury processes involved in traumatic brain injury have also recently been shown to be temperature sensitive [9].

How hypothermia could contribute to the inhibition of tumor and metastasis development has yet to be studied in detail. A few *in vitro* studies demonstrated that hypothermia reduced both cancer cell proliferation and migration, as well as adhesion to endothelial cells [10, 11]. In addition, hypothermia was shown to cause cell cycle arrest in the G2/M phase [12]. These results are very promising and suggest that hypothermia could be useful in cancer therapy. However, the studies performed so far only involved a limited number of cell lines and cancer localizations, much therefore remains to be done before including hypothermia as part of cancer therapy.

The objective of the present study was to test the hypothesis that hypothermia can affect the two critical features of glioblastoma: cell proliferation and migration. The first step was to define the therapeutic effect of hypothermia on glioblastoma cells. More precisely, we hypothesized that applying a moderate hypothermia at 28 °C to the resection margins could inhibit cell proliferation, reduce cell migration and induce cell cycle arrest. To provide a representative therapeutic solution, we focused our study on four distinct cell lines with different growth rates and p53 status.

Materials and methods

Materials and reagents

Cell culture solutions were obtained from Gibco: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 11960-044), FBS (Fetal Bovine Serum, certified, 16000-044), glutamax (GlutaMAX Supplement, 35050-061) and trypsin (0.25% Trypsin-EDTA (1X), 25200-056). Fluorescent stains and reagents were obtained from Sigma unless otherwise indicated: Phalloidin-TRITC (Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate, P-1951), DAPI (DAPI for nucleic acid staining, D-9542), PI (Propidium Iodide Solution, P-4864), Triton (Triton™ X-100, T-9284), RNase (RNase A, R-4875), formalin (Formalin solution 10%, HT501128) and trypan blue (Trypan blue solution, T8154). PBS was from Fisher BioReagents (Phosphate Buffered Saline (10X) Solution, BP399), and both inserts (Polycarbonate Cell Culture Inserts, 140629) and Lab-Tek 2-well (Lab-Tek® II Chamber Slide™, 154461) were from Thermo Fisher Scientific.

Cell lines

Cell lines were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% glutamax ("complete medium"). Cell cultures were maintained under a humid atmosphere at 37 °C with 5% CO₂ to 80–90% confluence. Four human cell lines derived from patients with glioblastoma were cultured and compared: A-172 [A172] (ATCC® CRL-1620™), U-251 MG (ECACC 09063001), U-87 MG (ATCC® HTB-14™) and T98G [T98-G] (ATCC® CRL-1690™). To facilitate reading hereafter, these cell lines will be named A172, U251, U87 and T98G, respectively.

Cell growth and viability determination

Glioblastoma cells were plated at a density of 6.25×10^4 cells/cm² in 6-well culture plates. Temperature experiments were performed with parallel sets of cells incubated at different temperatures for several days. At the end of experiments, cells were harvested by trypsinization and viability was determined based on a trypan blue exclusion assay. Both viable and damaged cells were counted with a TC20™ Automated Cell Counter (Bio-Rad).

Hypothermic conditions

Mild (33 °C), moderate (28 °C) or severe (23 °C) hypothermia was induced in a climatic chamber (Memmert, ICH110C) under a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Wound-healing assay

Migration experiments with glioblastoma cells involved studying the recolonization of an injury under different temperature conditions. Cells were seeded in 2-well Lab-Tek chamber slides and grown to 80% confluence. Then, a regular cross wound was created with a pipette tip (1000 µL), the surface of the cell layer was washed with DMEM, and plates were incubated at 28 °C, 33 °C or 37 °C. Cell migration was monitored by phase-contrast microscopy and, after 48 h, cells were fixed, stained with DAPI, and counted under a fluorescence microscope (Olympus IX81).

Transwell migration assay

Migration was further studied with glioblastoma cells resuspended in low-serum DMEM (2% FBS) and seeded on cell culture inserts (Boyden chambers). Inserts were placed in complete medium (10% FBS) and incubated at either 37 °C or 28 °C. After 24 h, cells that had not passed through the membrane were carefully removed with cotton swabs. Migrated cells were then fixed and stained with phalloidin TRITC and DAPI for counting (five independent fields by using a fluorescence microscope; Olympus IX81).

Flow cytometry

Flow cytometry was used to study cell cycle distribution. For these assays, cells were harvested, fixed in cold ethanol and stored at –20 °C until staining was performed. Before analysis, cells were washed twice with 1X PBS, and the cell pellet was resuspended in 500 µL of working solution containing 50 µg of PI and 100 µg of RNase per mL of 1X PBS. After 30 min incubation in the dark, cells were analyzed by flow cytometry (Beckton Dickinson LSR II).

Fixation and staining

Cells were stained to observe their morphology under different temperature conditions or count them after migration tests. For these assays, cells were washed with 1X PBS, fixed in 10% formalin for 5 min and rinsed again with PBS. Then, they were incubated in permeabilization buffer (0.3% Triton in PBS) for 5 min, rinsed with PBS and incubated in the dark for 30 min in a phalloidin–DAPI solution (1 µL of DAPI and 100 µL of phalloidin TRITC for 2.4 mL of PBS). Cells were washed with PBS and observed under an inverted

fluorescence microscope (Olympus IX81, Cell Sens Dimension software).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.0 software (GraphPad, San Diego, CA). All experiments were repeated independently at least three times. Results are presented as mean ± SEM (standard error of the mean). The threshold for statistical significance was set at a p-value below 0.05. Student's t-test (two-tailed unpaired) was used to compare two experimental groups. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test was used for multiple-group comparison with one factor, and two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test was used for multiple-group comparison with two factors.

Results

Hypothermia reduces glioblastoma cell proliferation in a dose-dependent manner

To study the effects of hypothermia on glioblastoma cell proliferation, we grew cells for three days under mild (33 °C), moderate (28 °C) or severe (23 °C) hypothermic conditions (Fig. 1a). All four cell lines showed a dose-dependent effect of hypothermia on cell proliferation, with a significant reduction at 33 °C ($p=0.039$ for A172; $p<0.001$ for U251, U87 and T98G), and total growth arrest at both 28 °C and 23 °C ($p<0.001$ for both temperatures and all cell lines). Thus, the number of living cells after three days at 28 °C corresponded to the initial seeding number. At 23 °C, the number of adherent cells was slightly reduced because cells rounded and detached from the culture dish. Thus, we decided to focus on the effects of moderate hypothermia at 28 °C which is sufficient to stop cell proliferation.

Moderate hypothermia alters glioblastoma cell morphology

To investigate how hypothermia affects cell morphology, glioblastoma cell cultures were grown for 6 days at 28 °C or 37 °C, then fixed and stained with phalloidin TRITC and DAPI (Fig. 1b). Results showed that moderate hypothermia induced various changes, including deterioration of the cell membrane, alteration of cell adhesion properties and formation of cell nuclei clusters. These observations confirm that glioblastoma cells are significantly affected by moderate hypothermia.

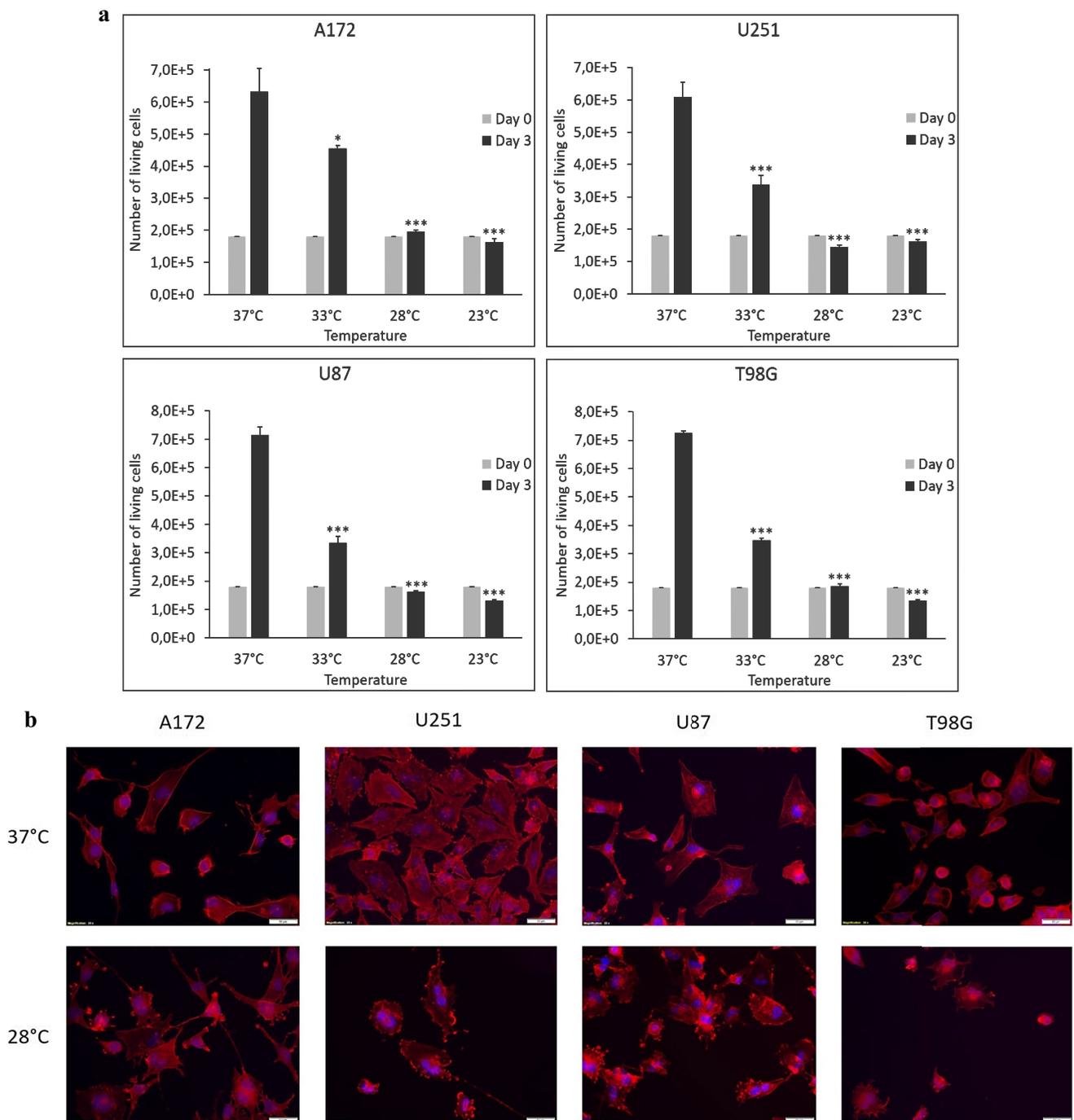


Fig. 1 Effects of mild, moderate and severe hypothermia on the growth of glioblastoma cells. **a** Hypothermia reduces glioblastoma cell proliferation in a dose-dependent manner. A172, U251, U87 and T98G cells were counted after 3 days of hypothermia, bar graphs represent adherent living cells, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus nor-

mothermic control. **b** Moderate hypothermia induces morphological alterations in glioblastoma cells. Cells were cultured during 6 days at 28 °C, then stained with phalloidin TRITC and DAPI, and observed using a fluorescence microscope. Scale bar, 50 μm

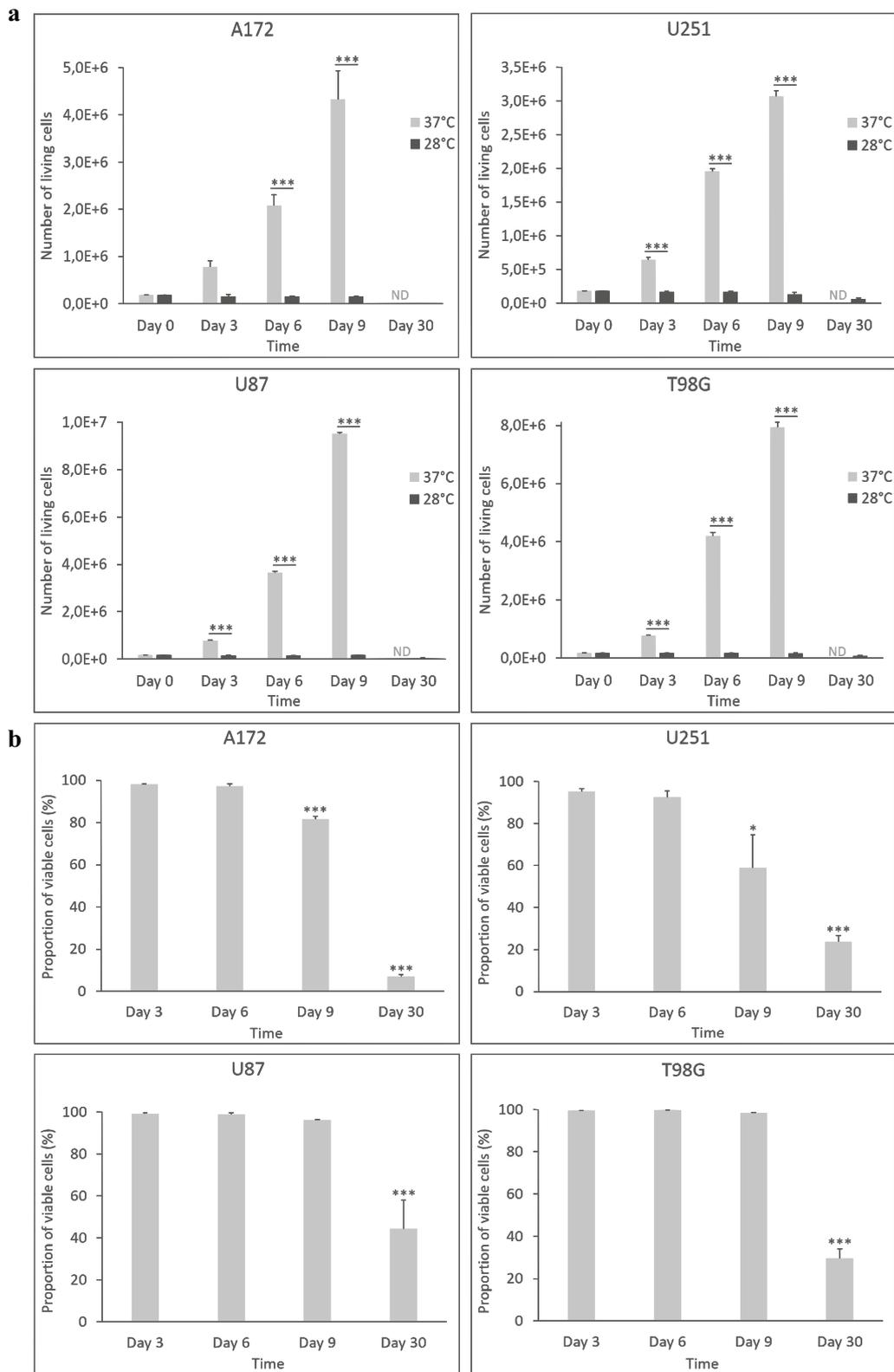


Fig. 2 Influence of moderate hypothermia on glioblastoma cell growth over time. **a** Moderate hypothermia inhibits cell proliferation continuously over time. A172, U251, U87 and T98G cells were cultured until 30 days under 28 °C hypothermia and counted, bar graphs represent adherent living cells, *ND* not determinable due to

cell confluence at 37 °C, ****p* < 0.001 versus normothermic control. **b** Hypothermia affects cell viability over time. Damaged cells were counted using trypan blue dye, bar graphs represent viability percentage of adherent cells under 28 °C hypothermia, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 versus 100% viability

Moderate hypothermia induces long-lasting cell proliferation arrest

To further evaluate the inhibitory effects of hypothermia on cell proliferation, we performed time course studies at 28 °C on the four different cell lines. Cells were grown at either 28 °C or 37 °C for 3, 6, and 9 days, and up to 30 days at 28 °C. Upon harvesting and counting, a long-lasting effect of moderate hypothermia was demonstrated, with a total inhibition of cell proliferation at 3, 6, 9 and 30 days (Fig. 2a). Despite different growth rates between the cell lines, all four responded to 28 °C hypothermia in the same way, with complete growth arrest ($p < 0.001$ for 3, 6 and 9 days and for all cell lines except $p > 0.05$ for A172 after 3 days). Most of the cells rounded and detached from the culture dish after 30 days. Indeed, prolonged hypothermia significantly increased cell death in the four cell lines (Fig. 2b; A172: $p > 0.05$ for 3 and 6 days, $p < 0.001$ for 9 and 30 days; U251: $p > 0.05$ for 3 and 6 days, $p = 0.016$ for 9 days and $p < 0.001$ for 30 days; U87: $p > 0.05$ for 3, 6 and 9 days, $p < 0.001$ for 30 days; T98G: $p > 0.05$ for 3, 6 and 9 days, $p < 0.001$ for 30 days). We can thus conclude that a 28 °C hypothermia arrests the proliferation of glioblastoma cells long-lastingly, and affects their viability over time.

Hypothermia inhibits non-oriented migration of glioblastoma cells in a dose-dependent manner

To assess the impact of hypothermia on non-oriented cell migration, we performed wound-healing assays. Wound recolonization was studied by microscopy at 28 °C, 33 °C or 37 °C. After 48 h, the results showed total recolonization at 37 °C, significant recolonization at 33 °C, and low recolonization at 28 °C (Fig. 3a). In fact, mild hypothermia at 33 °C inhibited the different cell lines to varying degrees (Fig. 3b; $p = 0.022$ for A172; $p < 0.001$ for U251 and U87; $p = 0.0043$ for T98G), from 41% for T98G and 56% for A172 to 68% for U87 and 76% for U251. In contrast, moderate hypothermia at 28 °C had similar inhibitory effects on all cell lines (Fig. 3b; $p = 0.0029$ for A172; $p < 0.001$ for U251, U87 and T98G), with recolonization strongly reduced by between 87 and 91%. Thus, hypothermia has a dose-dependent effect on non-oriented cell migration, with a significant reduction at 33 °C and near-total inhibition at 28 °C.

Moderate hypothermia reduces oriented migration of glioblastoma cells

To investigate the effects of 28 °C hypothermia on oriented cell migration, we performed Transwell migration assays, with different FBS concentrations in the two compartments. Cells were allowed to migrate through cell culture inserts for

24 h at either 28 °C or 37 °C, and were stained and quantified. Results showed that under hypothermic conditions, far fewer cells successfully passed through the membrane than under normothermic conditions (Fig. 4a, b; $p = 0.0012$ for A172; $p < 0.001$ for U251; $p = 0.0073$ for U87 and $p < 0.001$ for T98G). Thus, moderate hypothermia induced 47% inhibition for A172, 70% for U251, 42% for U87 and 45% for T98G. Moderate hypothermia at 28 °C can therefore reduce both oriented and non-oriented migration of glioblastoma cells.

Moderate hypothermia induces cell cycle arrest at the G2/M phase

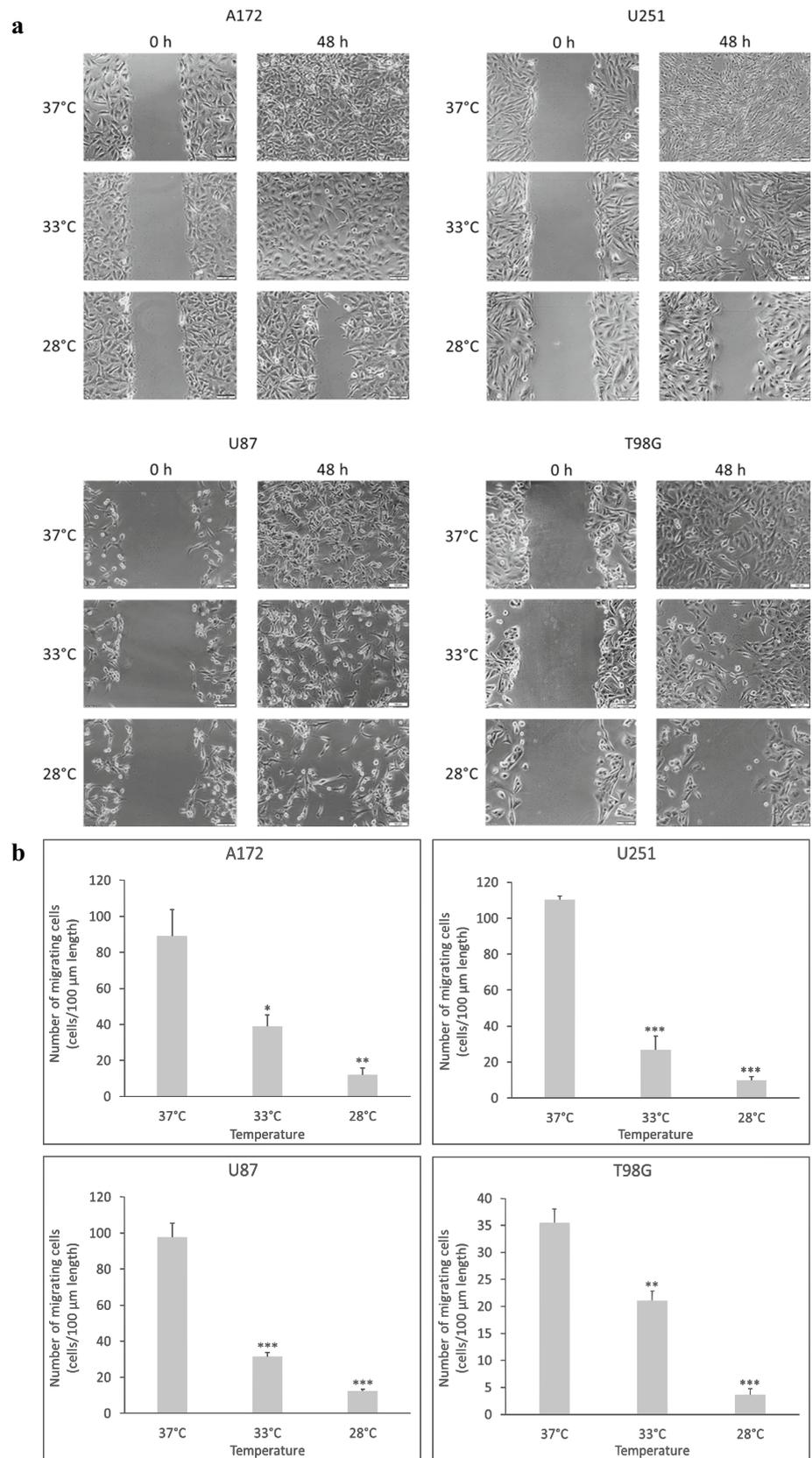
To further investigate the mechanisms by which hypothermia inhibits glioblastoma cell proliferation, we studied the influence of 28 °C hypothermia on cell cycle distribution. Cells were grown for six days at either 28 °C or 37 °C, then harvested and analyzed to determine their distribution in the cell cycle phases. Results of these analyses indicated that hypothermia significantly altered cell distribution in the cell cycle phases for the four cell lines (Fig. 5a, b; A172: $p < 0.001$ for all phases; U251: $p < 0.001$ for all phases, U87: $p < 0.001$ for G0/G1 and G2/M, $p > 0.05$ for S; T98G: $p < 0.001$ for G0/G1 and G2/M, $p > 0.05$ for S). In particular, hypothermia induced a sharp decrease in the proportion of cells in the G0/G1 phase, and a strong accumulation of cells in the G2/M phase, with an increase of 268% for A172, 165% for U251, 48% for U87 and 326% for T98G. Hypothermia thus inhibits cell proliferation by inducing cell cycle arrest at the G2/M phase.

Discussion

Brain hypothermia has been shown to have therapeutic benefits in various clinical applications including hypoxic ischemic neonatal encephalopathy [13], and to prevent brain injury following cardiac arrest [14]. However, the biological effects of hypothermia on cancer cells, in particular glioblastoma, have not been fully investigated. Here, we investigated the effects of hypothermia on the proliferation and migration of four human glioblastoma cell lines (A172, U251, U87 and T98G).

First, we studied the sensitivity of our glioblastoma cells to hypothermia, to identify temperature levels inhibiting cell proliferation, a key process involved in tumor growth. Kalamida et al. [10] had previously reported that both T98G and U87 cell lines were sensitive to mild hypothermia (34 °C) over three days, showing reduced cell proliferation compared to normothermia. Our results were consistent with these findings, and after three days under mild hypothermia (33 °C), all four glioblastoma cell lines

Fig. 3 Hypothermia reduces glioblastoma cell non-oriented migration in a dose-dependent manner using wound healing assay. **a** A172, U251, U87 and T98G cells were scratched and lesion recolonization was followed up over time under different temperatures. Images of the lesion at 0 h and after 48 h under hypothermia were taken using phase contrast microscopy. Scale bar, 100 μ M. **b** Concerning wound healing assay, cells were stained with DAPI, observed using a fluorescence microscope and counted in 100 μ m long wound line. Bar graphs represent migrating cells at 48 h under 37 $^{\circ}$ C, 33 $^{\circ}$ C or 28 $^{\circ}$ C, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 versus normothermic control



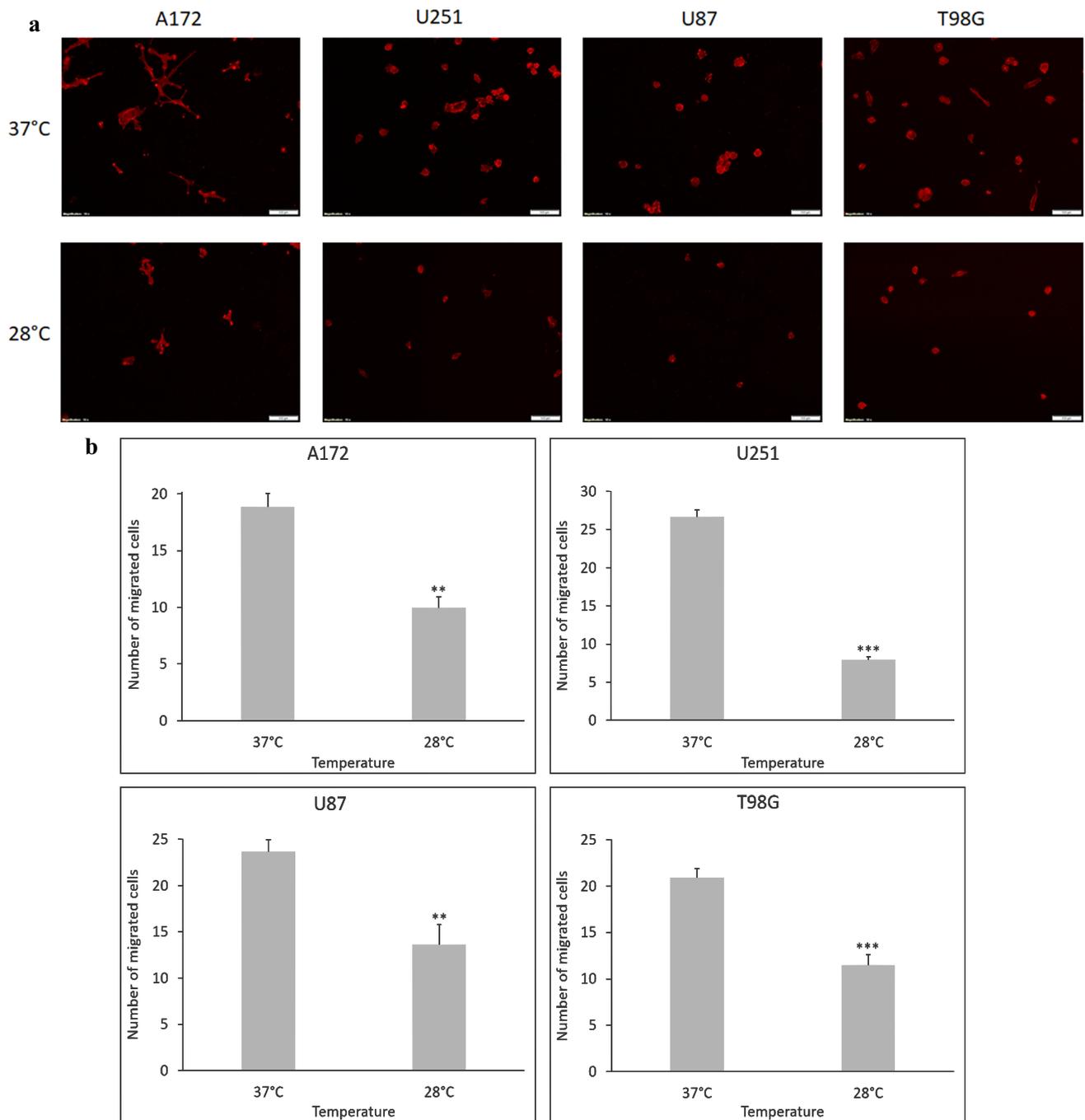


Fig. 4 Moderate hypothermia inhibits glioblastoma cell oriented migration using transwell assay. **a** A172, U251, U87 and T98G cells were seeded on cell culture inserts and migrated during 24 h using serum as a chemoattractant. Cells that migrated through the membrane under hypothermia or normothermia were stained with phal-

loidin TRITC, and images were taken using fluorescence microscopy. Scale bar, 100 μ m. **b** For transwell assays, cells were counted in five independent fields and bar graphs represent the number of cells that migrated through the membrane after 24 h under 37 °C or 28 °C, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus normothermic control

showed significantly reduced proliferation compared to cells incubated at 37 °C. We also demonstrated that both moderate (28 °C) and severe (23 °C) hypothermia could completely inhibit cell proliferation for all cell lines. Thus,

moderate hypothermia at 28 °C is sufficient to stop cell growth, and hypothermia has a universal inhibitory effect on cell proliferation.

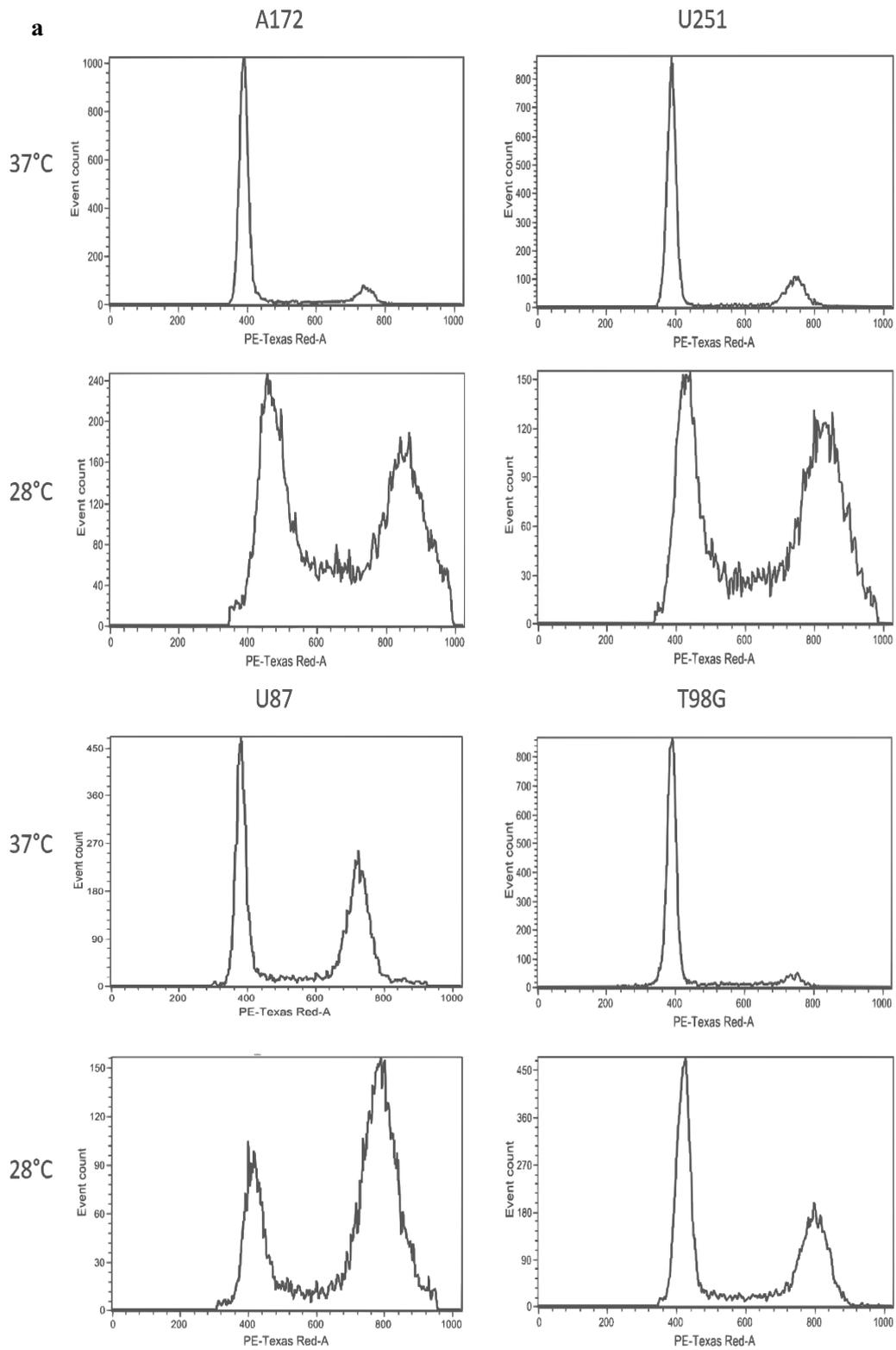


Fig. 5 Moderate hypothermia affects cell cycle distribution by inducing accumulation of glioblastoma cells in the G2/M phase. **a** Cell cycle distribution of A172, U251, U87 and T98G cells under 28 °C hypothermia versus control. **b** Flow cytometry data show that most

cells were arrested in the G2/M phase at 28 °C, bar graphs represent the cell percentage in the different cell cycle phases, *** $p < 0.001$ versus normothermic control

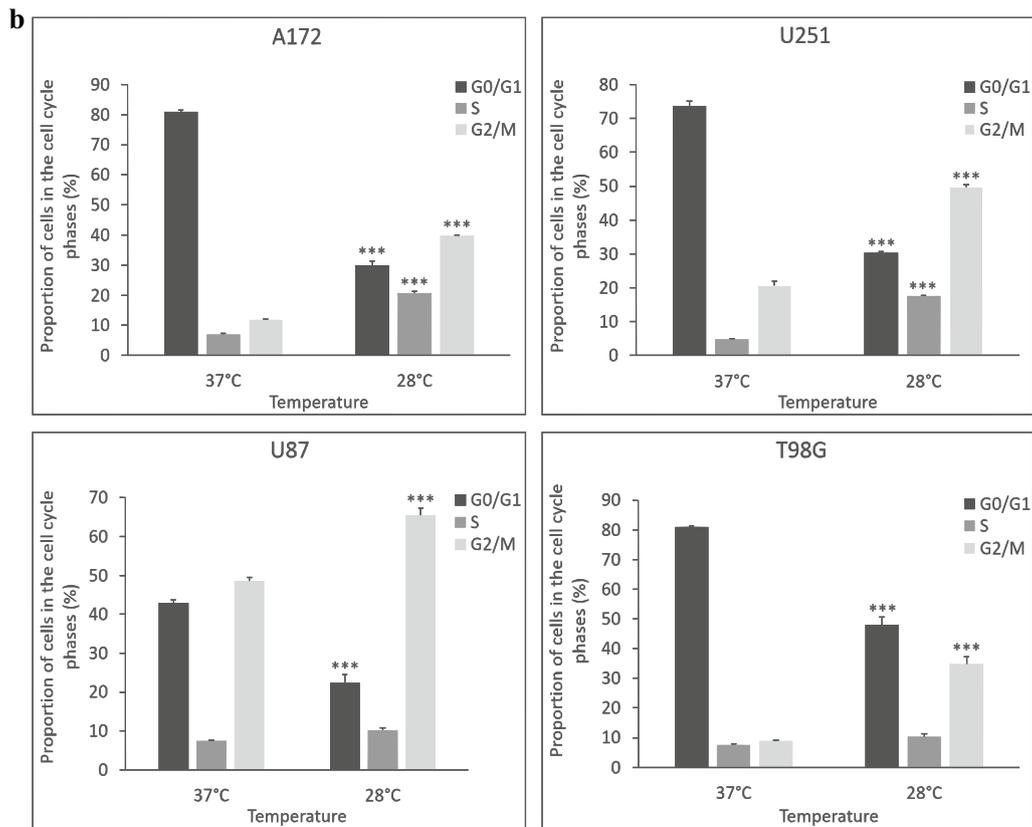


Fig. 5 (continued)

We also examined whether the four glioblastoma cell lines could escape the anti-proliferative effect of moderate hypothermia over time. The effect of extended periods at 28 °C on SF-126 glioblastoma cells was investigated by Matijasevic et al. [12] who reported a constant number of viable cells during the first 10 days and then, a linear decrease until 30 days. In our study, exposure to moderate hypothermia (28 °C) for 30 days totally inhibited the growth of the four cell lines tested, suggesting that chronic moderate hypothermia could be used as an adjuvant therapy to prevent glioblastoma recurrence. We further examined whether glioblastoma cell viability was impaired by prolonged periods of hypothermia. In line with Matijasevic et al. [12], our results clearly indicated that cell viability remained constant over the first six days at 28 °C, and decreased slowly from 9 days for A172 and U251 cell lines. After 30 days at 28 °C, the percentage of viable cells had decreased significantly, falling below 50% for all cell lines. These results suggest that applying a chronic moderate hypothermia could have cytotoxic effects on residual glioblastoma cells within resection margins. We also demonstrated that moderate hypothermia affected glioblastoma cells by inducing various alterations to their

morphology. Further investigations will be needed to better understand the potential cytotoxic effects of hypothermia on glioblastoma cells.

To gain a better understanding of the biological mechanisms behind the observed effects, we used flow cytometry to investigate how moderate hypothermia affected cell cycle progression. Matijasevic et al. [15] had previously reported that after 4 days at 28 °C, normal human AG01522 fibroblasts started to gradually accumulate in the G2/M phase, at the expense of cells in the G1 phase. Our results showed that hypothermia also strongly affected the distribution of glioblastoma cells across the cell cycle phases. After a 6-day incubation at 28 °C, cells accumulated in the G2/M phase, suggesting that hypothermia could activate a G2/M checkpoint. Moreover, we often observed more than one nucleus per cell, which could be indicative of incomplete mitosis, corroborating the G2/M phase arrest. These results are also consistent with cell proliferation findings. The number of viable cells remained constant at 28 °C, with a low proportion of cells dying before 30 days. Consequently, glioblastoma cell proliferation is inhibited at 28 °C as a result of cell cycle arrest

in the G2/M phase, rather than due to an altered balance between cell proliferation and cell death.

We also explored the effects of hypothermia on cell migration, which is a key phenomenon in the context of glioblastoma recurrence. In fact, cell migration is involved in the escape from immune system control, but also in the evasion from potential toxic effects of localized therapy. To test whether moderate hypothermia at 28 °C could affect the migratory capacity of the four glioblastoma cell lines *in vitro*, we performed two different assays. Transwell migration assays are a model for oriented migration, and wound-healing assays correspond to non-oriented migration. Zhang et al. [11] reported that mild hypothermia (35 °C) could reduce oriented migration of MDA-MB-231 breast tumor cells, but no data was available concerning glioblastoma cell migration up to now. For the first time, we demonstrated that moderate hypothermia significantly reduces both non-oriented and oriented migration of glioblastoma cells. Thus, our results suggest that moderate hypothermia may inhibit the escape of glioblastoma cells from resection margins, thus limiting their infiltration into the brain parenchyma and their migration away from the region where radiotherapy is applied. Further studies have to be performed in order to understand the mechanisms involved in the alterations of proliferation, migration and cell cycle progression of glioblastoma cell lines by hypothermia.

In conclusion, our results demonstrate a strong inhibition of both cell proliferation and migration by moderate hypothermia. If *in vivo* preclinical studies demonstrate the same inhibitory effects, therapeutic hypothermia applied at the resection margins could probably delay tumor recurrence, combined with current treatments. Thus, this study supports a therapeutic role for hypothermia as an adjuvant therapy when treating patients with glioblastoma.

Acknowledgements This work received financial support through grants from the Groupement des Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble – Dauphiné – Savoie) and the Fonds de dotation Clinattec. We thank Maighread Gallagher-Gambarelli from TWS Editing for providing linguistic support and suggestions on language usage for the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Louis DN et al (2016) The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol (Berl.)* 131(6):803–820
- Lemée J-M, Clavreul A, Menei P (2015) Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-Oncology* 17(10):1322–1332
- Zhang X, Ding K, Wang J, Li X, Zhao P (2019) Chemoresistance caused by the microenvironment of glioblastoma and the corresponding solutions. *Biomed Pharmacother* 109:39–46
- Okolie O et al (2016) Reactive astrocytes potentiate tumor aggressiveness in a murine glioma resection and recurrence model. *Neuro-Oncology* 18(12):1622–1633
- O'Leary DP, O'Leary E, Foley N, Cotter TG, Wang JH, Redmond HP (2016) Effects of surgery on the cancer stem cell niche. *Eur J Surg Oncol* 42(3):319–325
- Bernard SA et al (2002) Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 346(8):557–563
- Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group (2002) Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 346(8):549–556
- Writing Group et al (2003) Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the international liaison committee on resuscitation. *Circulation* 108(1):118–121
- Dietrich WD, Bramlett HM (2016) Therapeutic hypothermia and targeted temperature management in traumatic brain injury: clinical challenges for successful translation. *Brain Res* 1640:94–103
- Kalamida D, Karagounis IV, Mitrakas A, Kalamida S, Giatromanolaki A, and Koukourakis MI (2015) Fever-range hyperthermia vs. hypothermia effect on cancer cell viability, proliferation and HSP90 expression. *PLoS ONE* 10(1):e0116021
- Zhang H (2012) Effect of mild hypothermia on breast cancer cells adhesion and migration. *Biosci Trends* 6:313–324
- Matijasevic Z (2002) Selective protection of non-cancer cells by hypothermia. *Anticancer Res* 22(6A):3267–3272
- Gluckman PD et al (2005) Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet Lond Engl* 365(9460):663–670
- Nielsen N et al (2013) Targeted temperature management at 33 °C versus 36 °C after cardiac arrest. *N Engl J Med* 369(23):2197–2206
- Matijasevic Z, Snyder JE, Ludlum DB (1998) Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts. *Oncol Res* 10(11–12):605–610

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Adjuvant therapeutic potential of moderate hypothermia for glioblastoma

Clémentine Fulbert¹ · Stéphan Chabardès^{1,2,3} · David Ratel¹

Received: 25 November 2020 / Accepted: 16 January 2021 / Published online: 19 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Purpose Glioblastoma is the most common malignant brain tumor, currently treated by surgery followed by concomitant radiotherapy and temozolomide-based chemotherapy. Despite these treatments, median survival is only 15 months as a result of tumor recurrence in the resection margins. Here, we propose therapeutic hypothermia - known to have neuroprotective effects - as an adjuvant treatment to maintain residual glioblastoma cells in a dormant state, and thus prevent tumor recurrence.

Methods In vitro experiments were performed on healthy tissue with primary human astrocytes, and four human glioblastoma cell lines: A172, U251, U87, and T98G. We explored the adjuvant potential of moderate hypothermia (28 °C) by studying the reversibility of its inhibitory effects on cell proliferation and comparing them to currently used temozolomide.

Results Moderate hypothermia reduced healthy cell growth, but also inhibited glioblastoma cell proliferation even after rewarming. Indeed, hypothermic preconditioning duration strongly enhanced inhibitory effects from 35% after 3 days to 100% after 30 days. In contrast, moderate (28 °C) and severe (23 °C) preconditioning induced similar results. Finally, moderate hypothermia had more uniform inhibitory effects than temozolomide, which reduced proliferation by between 15% and 95%, and also potentiated the effects of the latter.

Conclusion Moderate hypothermia shows promise as an adjuvant therapy for glioblastoma through its inhibition of cell proliferation beyond direct conditioning and potentiation of the effects of chemotherapy. If in vivo preclinical results corroborate our findings, therapeutic hypothermia applied at the resection margins could probably inhibit tumor growth, delay tumor recurrence and reduce inter-patient variability.

Keywords Glioblastoma · Therapeutic hypothermia · Dormancy · Cell proliferation · Temozolomide · Cancer treatment

Introduction

Glioblastoma is an aggressive brain tumor, defined as a grade IV astrocytoma according to the 2016 World Health Organization classification, and divided into primary glioblastoma that develops de novo and secondary glioblastoma

with a clinical history of prior lower grade glioma [1]. This infiltrating tumor is the most common malignant central nervous system (CNS) tumor (48.3%), with an annual incidence ranging from 0.59 to 3.69 per 100,000 inhabitants in the world [2]. Current treatments consist in surgical resection followed by postoperative radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide-based chemotherapy [3, 4]. Despite these treatments, glioblastoma patients have a poor prognosis, with a median survival of 15 months and a 5-year survival rate of 6.8% [2, 5]. This poor survival rate can be partially explained by resistance to treatments [6, 7], and by tumor recurrence in the resection margins for the majority of patients [8]. Indeed, dormant glioblastoma cells disseminated in the peritumoral zone could be activated by stress factors linked to inflammation or angiogenesis that may be triggered by treatments [8–10].

✉ Clémentine Fulbert
clementine.fulbert@gmail.com

✉ David Ratel
david.ratel@cea.fr

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI, Clinatec,
38000 Grenoble, France

² Neurosurgery Department, CHU Grenoble Alpes,
38000 Grenoble, France

³ Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1216, Grenoble Institut des
Neurosciences, 38000 Grenoble, France

To attempt to improve the situation, novel therapies are being developed, such as tumor-treating fields (TTFields), which consist in the focal delivery of alternating electrical fields to the tumor tissue. TTFields have been shown to improve both progression-free survival and overall survival when combined with adjuvant temozolomide, but have not yet been included in the standard treatment protocol [11].

Therapeutic hypothermia – or targeted temperature management – is an intentional and controlled reduction of body temperature below 36 °C that can be classified as mild (32 °C – 36 °C), moderate (28 °C – 32 °C) and severe (< 28 °C) [12]. Numerous experimental studies have investigated its therapeutic effects on various diseases [13, 14]. Currently, mild hypothermia is recommended in medical guidelines following cardiac arrest and when treating neonatal encephalopathy [15, 16]. For cancer treatment, a few in vitro studies demonstrated that severe [17], moderate [18], and mild hypothermia [19, 20] all inhibited tumor cell growth. Our previous results demonstrated that continuous moderate hypothermia at 28 °C could significantly inhibit proliferation and migration of glioblastoma cells, and induce cell-cycle arrest [21]. Our working hypothesis is that hypothermia applied locally at the resection margins could be able to maintain residual glioblastoma cells in a dormant state and thus prevent tumor recurrence.

In this study, we further investigated the therapeutic potential of hypothermia as an adjuvant treatment for glioblastoma. First, we investigated the effects of moderate hypothermia on human primary astrocytes to assess the impact of such treatment on normal tissue. Then, we performed additional in vitro experiments on four human glioblastoma cell lines: A172, U251, U87, and T98G. The adjuvant potential of moderate hypothermia was assessed by exploring the impact of hypothermic preconditioning on cell proliferation following rewarming to 37 °C, and by investigating several intermittent hypothermia sequences. Lastly, we also compared and combined its inhibitory effects with current temozolomide (TMZ)-based chemotherapy protocols.

Materials and methods

Cell culture was performed as previously described in Fulbert et al. [21], including hypothermic conditions, cell growth and viability determination, fixation and staining, and statistical analysis; but also material, reagents and cell lines for glioblastoma cell culture and wound-healing assay protocol. Additional information concerning astrocyte culture and use of temozolomide are described hereafter.

Primary cells

Human primary astrocytes were obtained from Gibco (K1884) and cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 10569–010) supplemented with 10% fetal bovine serum and N-2 supplement (17502–048) from Gibco and human epidermal growth factor (EGF, AF-100-15-100UG) from Peprotech. Cell cultures were maintained under a humid atmosphere at 37 °C with 5% CO₂ until they reached 80–90% confluence.

Temozolomide

For chemotherapy studies, temozolomide (PHR1437-1G) was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, D-2650), both from Sigma-Aldrich. Cells were plated at a density of 6.25×10^4 cells/cm² in 6-well culture plates, and after a few hours, temozolomide was added at a final concentration of 100 μmol/L. Parallel sets of cells were incubated with DMSO at a concentration of 0.03% to ensure that cell viability was not affected by the solvent.

Results

Moderate hypothermia inhibits growth of primary astrocytes and alters their morphology and viability over time

To assess the impact of moderate hypothermia on healthy cells, we investigated its effects on proliferation and viability of human primary astrocytes. Cells were grown at either 37 °C for 6 days (control), or 28 °C for 6, 12, or 30 days (Fig. 1a). Based on cell counts, moderate hypothermia induced long-lasting inhibition of astrocyte proliferation, with complete arrest at 28 °C whatever the duration of treatment (Fig. 1b; $p < 0.001$). Some of the cells detached or entered in apoptosis after 30 days at 28 °C, resulting in a reduction of their viability (Fig. 1c; $p = 0.031$ after 6 days, $p > 0.05$ after 12 days and $p < 0.001$ after 30 days). We next studied the reversibility of these effects by returning astrocytes to 37 °C for 6 days following exposure to 28 °C for 6 days (Fig. 1a, 6D). The inhibitory effects of moderate hypothermia were not fully reversible, since astrocytes did not restart growth after rewarming (Fig. 1b; $p > 0.05$ versus continuous hypothermia) and showed increased cell death (Fig. 1c; $p = 0.030$ versus continuous hypothermia).

We also examined the influence of moderate hypothermia on non-oriented astrocyte migration by performing wound-healing assays. Lesion recolonization at either 28 °C or 37 °C was monitored by microscopy for 18 h. Results showed total recolonization at 37 °C, but only a small

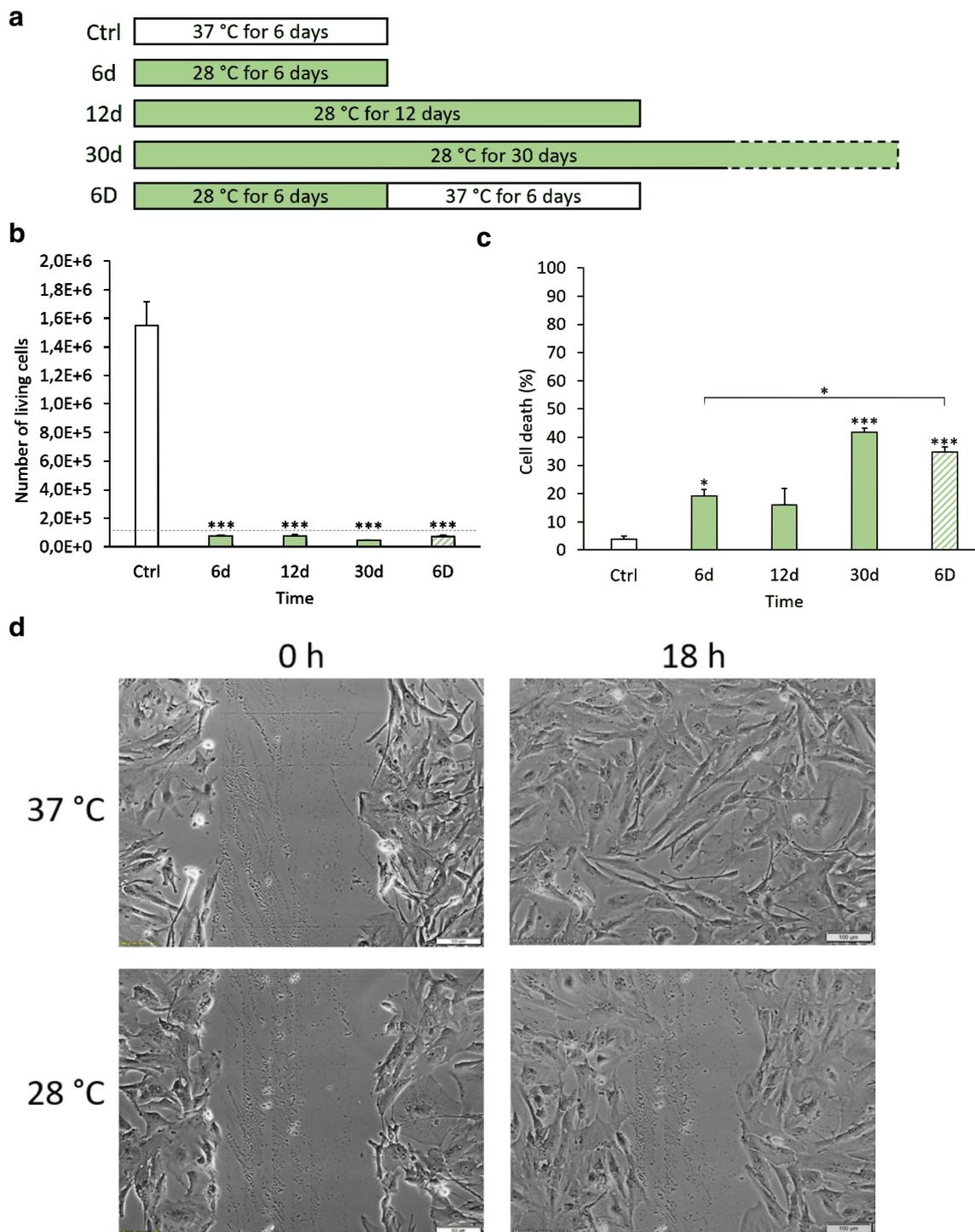


Fig. 1 Moderate hypothermia inhibits growth of human primary astrocytes. **(a)** Moderate hypothermia was initiated for 6, 12 or 30 days, or initiated for 6 days and followed by normothermia for 6 days (6D), as indicated in the experimental scheme. Normothermic control corresponds to 6 days at 37 °C (Ctrl). **(b)** Hypothermia induces total astrocyte proliferation arrest at 28 °C. Astrocytes were counted, bar graphs represent adherent living cells, *** $p < 0.001$ versus normothermic control. Dashed line is the number of seeded cells per condition, which is 1.2×10^5 . **(c)** Hypothermia induces cell death over time and after rewarming. Astrocytes were counted, bar graphs represent percentage of dead cells as measured by trypan blue exclusion assay, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus normothermic control. **(d)** Hypother-

mia reduces non-oriented astrocyte migration in wound-healing assays. Cell layers were scratched, and lesion recolonization was monitored over time at various temperatures. Phase-contrast images of the lesion at 0 h and after 18 h under hypothermia are shown. Scale bar, 100 μ m. **(e)** Cells from wound-healing assays were stained with DAPI, observed under a fluorescence microscope and counted in 100- μ m long wound lines. Bar graphs represent numbers of migrating cells at 18 h from cultures maintained at 37 °C or 28 °C, *** $p < 0.001$. **(f)** Hypothermia induces morphological alterations in astrocytes. Cells were cultured for 6 or 30 days at 28 °C, then stained with phalloidin TRITC and DAPI, and observed using a fluorescence microscope. Scale bar, 50 μ m

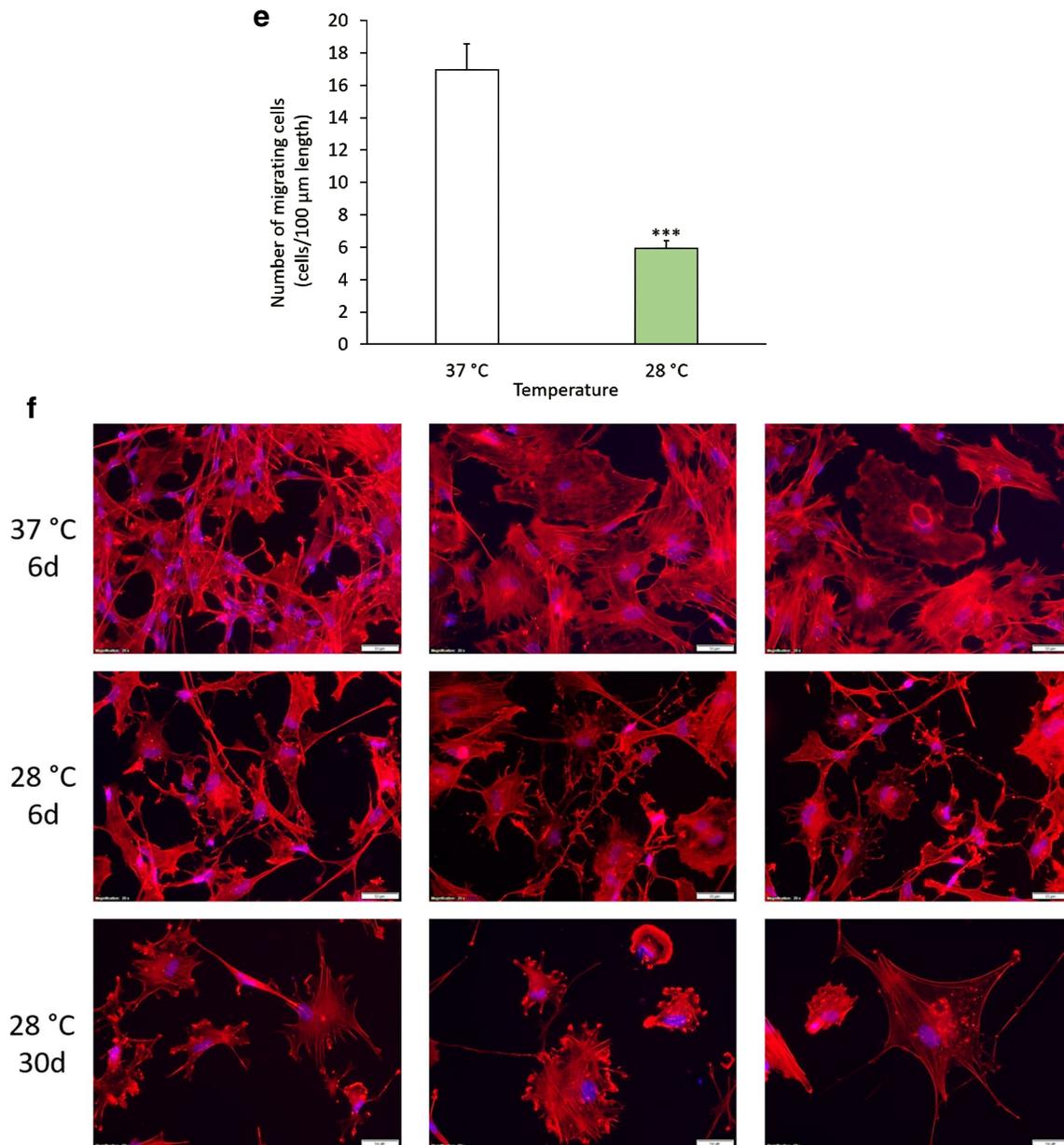
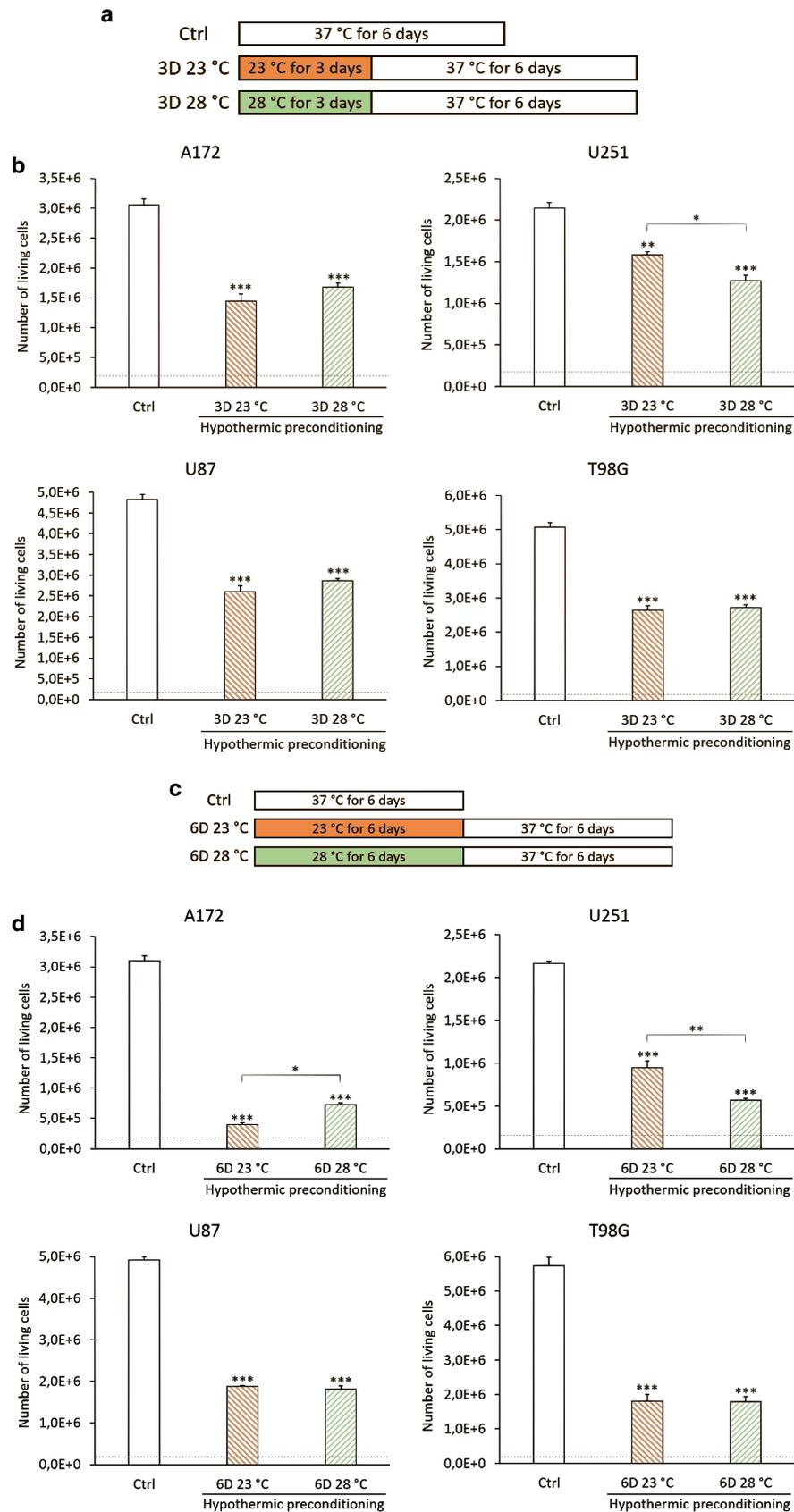


Fig. 1 (continued)

number of hypothermia-treated cells migrated into the lesion (Fig. 1d). Indeed, moderate hypothermia inhibited astrocyte migration by 65% (Fig. 1e; $p < 0.001$).

Finally, we fixed and stained astrocytes with phalloidin and DAPI to study their morphology after either 6 or 30 days at 28 °C (Fig. 1f). This analysis revealed several hypothermia-induced alterations in astrocytes, including difficulties connecting with each other, membrane irregularities, and altered adhesion properties, which tended to be more pronounced after 30 days.

Fig. 2 Both moderate and severe hypothermia followed by normo-► thermia inhibit proliferation of glioblastoma cells. (a and c) Moderate (28 °C) and severe (23 °C) hypothermia were initiated for 3 or 6 days and followed by normothermia for 6 days as indicated in the experimental schemes. Normothermic control corresponds to 6 days at 37 °C (Ctrl). (b and d) Moderate and severe hypothermic preconditioning inhibit normothermic proliferation of glioblastoma cells to a similar extent. A172, U251, U87, and T98G cells were counted, bar graphs represent numbers of adherent living cells, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Dashed line is the number of seeded cells per condition, which is 1.8×10^5



Moderate and severe hypothermic preconditioning have similar inhibitory effects on glioblastoma cell proliferation

To study the impact of hypothermic preconditioning on glioblastoma cell proliferation, we grew four different glioblastoma cell lines (A172, U87, U251, T98G) for either 3 (Fig. 2a) or 6 days (Fig. 2c) under moderate (28 °C) or severe (23 °C) hypothermia, and subsequently allowed them to proliferate in normothermic conditions for 6 days. Proliferation of all four cell lines was significantly inhibited by both moderate and severe hypothermic preconditioning (Fig. 2b, d; $p < 0.001$ for all except for U251 after 3 days at 23 °C: $p = 0.0016$), with greater effect after 6 days compared to 3 days. After 3 days of preconditioning, there was no significant difference between the two temperatures for A172, U87, and T98G cells ($p > 0.05$). For U251 cells, preconditioning with severe hypothermia inhibited cell proliferation slightly less effectively than moderate hypothermia ($p = 0.030$). After 6 days of preconditioning, there was no difference between the two temperatures for U87 and T98G cells ($p > 0.05$). For A172 cells, severe hypothermia inhibited cell proliferation slightly more effectively than moderate hypothermia ($p = 0.015$), whereas for U251 cells, moderate hypothermia showed greater inhibitory effects ($p = 0.0065$). Thus, moderate hypothermic preconditioning can inhibit proliferation of glioblastoma cells, and reducing the temperature to 23 °C does not enhance the inhibitory effects.

Moderate hypothermia has duration-dependent inhibitory effects on normothermic glioblastoma cell proliferation

To investigate the impact of the duration of hypothermic preconditioning on glioblastoma cell proliferation, we grew cells for between 3 and 30 days at 28 °C, and then allowed them to proliferate in normothermic conditions for 6 days (Fig. 3a). Moderate hypothermic preconditioning significantly inhibited cell proliferation for all four cell lines (Fig. 3b; $p < 0.001$), and the effect was strongly dependent on the duration of preconditioning. Thus, 3 days' hypothermic preconditioning induced moderate inhibition from 35% to 54% depending on the cell line. In addition, for A172, U251 and U87 cells, inhibition exceeded 80% after 6 days; 90% after 9 days; and 95% after 12 days. For T98G cells, hypothermia-induced inhibition was 69% after 6 days, 80% after 9 days, and 89% after 12 days. Finally, for all four cell lines, preconditioning for 30 days led to complete inhibition of normothermic cell proliferation over the subsequent 6 days at 37 °C, and significantly reduced cell viability (Fig. 3c; $p < 0.001$).

Long-lasting hypothermic preconditioning alters glioblastoma cell proliferation and morphology

As a complement to the previous results, we extended the normothermic period from 6 to 20 days following the 30-day hypothermic preconditioning (Fig. 3d). A172 cells failed to proliferate even after 20 days (Fig. 3e; $p > 0.05$ versus 6 normothermic days) and showed a constant near-total mortality (Fig. 3f; $p < 0.001$). In contrast, U251, U87, and T98G cells gradually resumed proliferation, albeit at a slower rate than control cultures (Fig. 3e; $p < 0.001$). After 20 days, the number of living cells exceeded the number initially seeded (Fig. 3e; $p < 0.001$ versus 6 normothermic days), and cell death decreased as proliferation resumed (Fig. 3f; $p < 0.001$ for 20 days versus 6 days). Microscopic observation of cells stained with phalloidin and DAPI revealed hypothermia-induced alterations after 13 days, which were even more pronounced after 20 days (Fig. 3g, h). These alterations included modifications of cell adhesion, with cells spreading on culture dishes, cytoplasmic irregularities, nuclear clusters, and deterioration of both cell membrane and nuclear integrity.

Continuous moderate hypothermia inhibits glioblastoma cell proliferation more efficiently than intermittent hypothermia

As inhibitory effects were not limited to direct conditioning, we tested the impact of several cycles of intermittent hypothermia. In total, cells were incubated under normothermia for 6 days, and under moderate hypothermia for 7 days. Hypothermia consisted in a single application (long cycle), or was divided into two (medium cycle) or five sessions (short cycle) (Fig. 4a). A single long cycle of hypothermia was more efficient than short intermittent cycles in terms of inhibiting glioblastoma cell proliferation (Fig. 4b; $p < 0.001$). For A172, U87, and T98G cells, there was no significant difference between long and medium cycles ($p > 0.05$), but short cycles inhibited glioblastoma cell proliferation significantly less efficiently ($p < 0.001$). For U251 cells, all three cycles were significantly different, with inhibitory effects increasing as the cycles lengthened ($p < 0.001$).

Moderate hypothermia has stronger inhibitory effects on glioblastoma cell proliferation than temozolomide-based chemotherapy

To compare the effects of hypothermia to those of chemotherapy, cells were incubated for 6 days at 37 °C with an initial dose of temozolomide or directly at 28 °C (Fig. 5a). As above, hypothermia inhibited glioblastoma cell proliferation

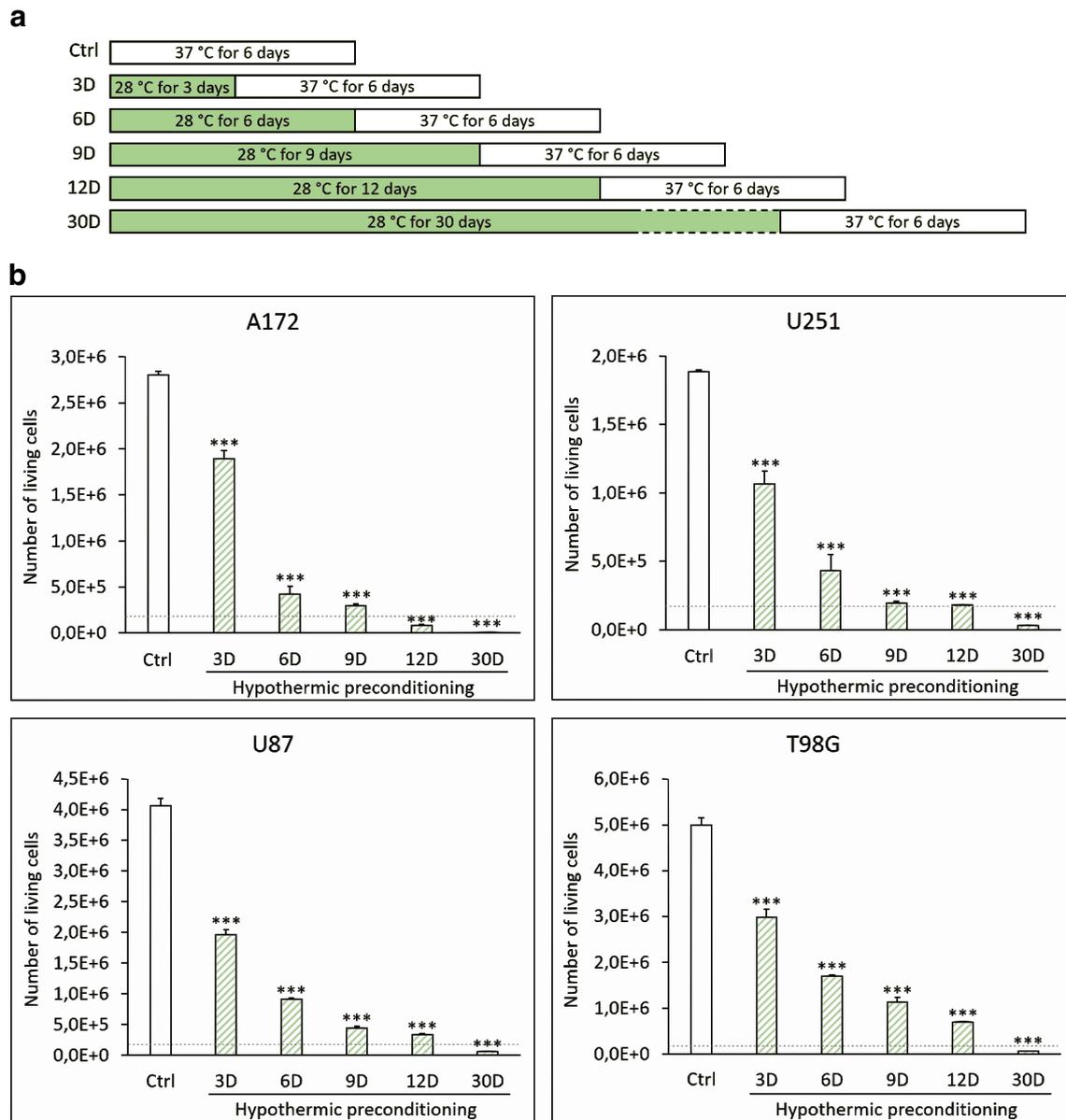


Fig. 3 Moderate hypothermic preconditioning has duration-dependent inhibitory effects on glioblastoma cell growth. **(a)** Moderate hypothermia (28 °C) was initiated for 3 to 30 days and followed by normothermia for 6 days, as indicated in the experimental scheme. Normothermic control corresponds to 6 days at 37 °C (Ctrl). **(b)** The duration of hypothermic preconditioning significantly influences normothermic glioblastoma cell proliferation. A172, U251, U87, and T98G cells were counted, bar graphs represent numbers of adherent living cells, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus normothermic control. Dashed line is the number of seeded cells per condition (1.8×10^5). **(c)** Rewarming induces cell death after long-lasting hypothermic preconditioning. Glioblastoma cells were counted, bar graphs represent percentage of dead cells measured by trypan blue exclusion assay, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus normothermic control. **(d)** Moderate hypothermia (28 °C) was maintained for 30 days

and followed by normothermia for 6 to 20 days, as indicated in the experimental scheme. Normothermic control corresponds to 6 days at 37 °C (Ctrl). **(e)** Hypothermic preconditioning for 30 days strongly inhibits glioblastoma cell proliferation, which resumes after 20 days of normothermia. Cells were counted, bar graphs represent numbers of adherent living cells, *** $p < 0.001$ versus normothermic control. Dashed line is the number of seeded cells per condition (1.8×10^5). **(f)** After 30 days' hypothermic preconditioning, cell death decreases over rewarming duration. Cells were counted, bar graphs represent percentage of dead cells measured by trypan blue exclusion assay, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(g, h)** Fluorescence microscopy observation of cells stained with phalloidin TRITC and DAPI after 30 days at 28 °C followed by 13 days at 37 °C **(g)** or 20 days at 37 °C **(h)** reveals morphological alterations. Scale bar, 100 μM

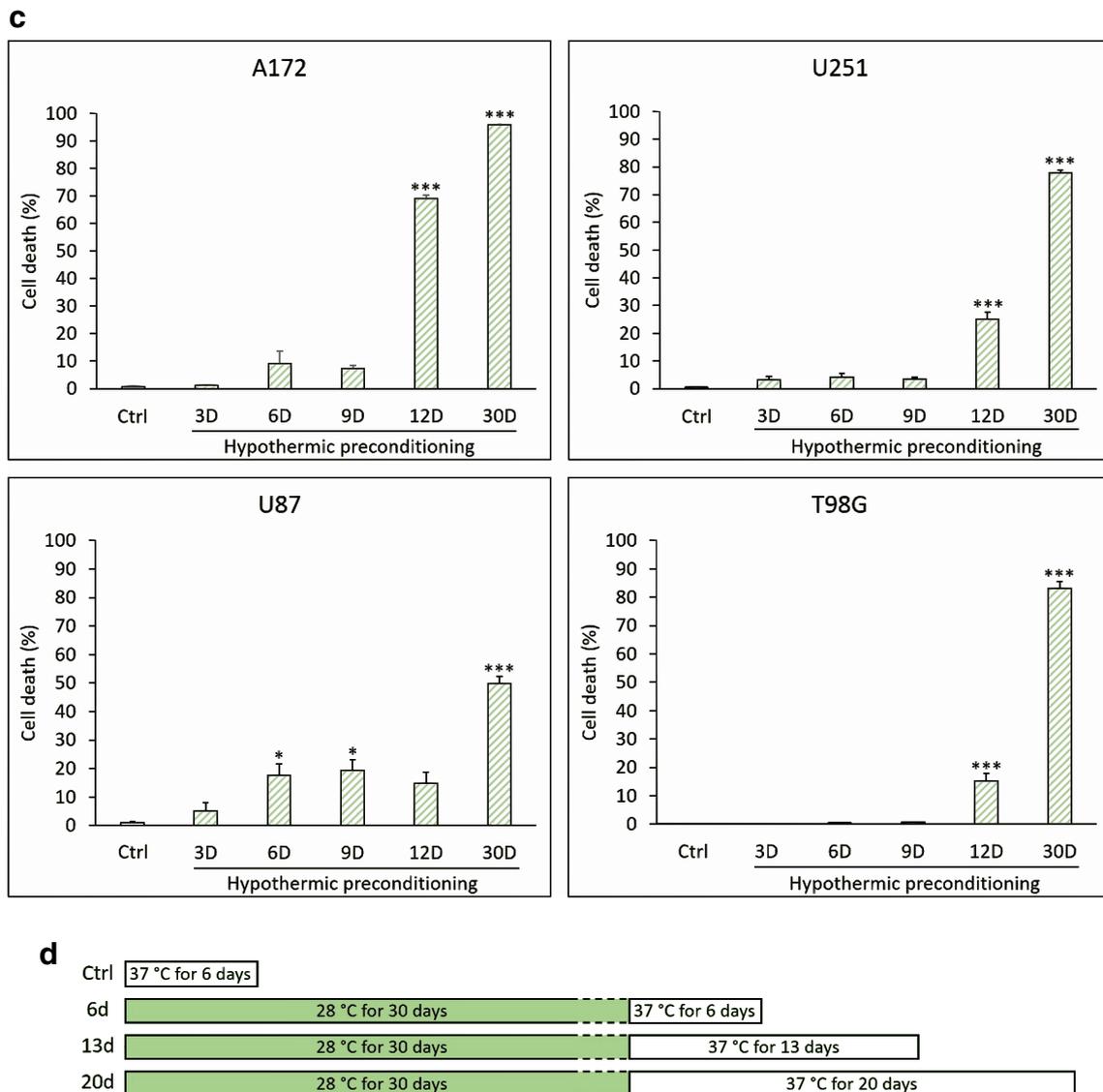


Fig. 3 (continued)

to a significant degree (> 99%) for all four cell lines (Fig. 5b; $p < 0.001$). In contrast, temozolomide reduced cell proliferation by about 95% for A172 and U87 cells ($p < 0.001$), 53% for U251 cells ($p = 0.0087$), and 15% for T98G cells ($p > 0.05$). Thus, for U251 and T98G cells, moderate hypothermia had a significantly more powerful effect than temozolomide in terms of inhibiting glioblastoma cell proliferation ($p = 0.015$ for U251 and $p < 0.001$ for T98G), whereas the two treatments induced similar results with A172 and U87 cells ($p > 0.05$).

Hypothermia and chemotherapy have adjuvant inhibitory effects on glioblastoma cell proliferation

We next tested a combination of both treatments, by adding temozolomide to an intermittent hypothermic cycle. In order to better assess the potential therapeutic effects of the combined treatment, we preferentially selected intermittent hypothermia rather than continuous hypothermia, which already induced complete glioblastoma growth arrest. Cells were grown for 6 days at 28 °C followed by 6 days at 37 °C and temozolomide was either added after 5 days, during the hypothermic preconditioning, or after 9 days, during the

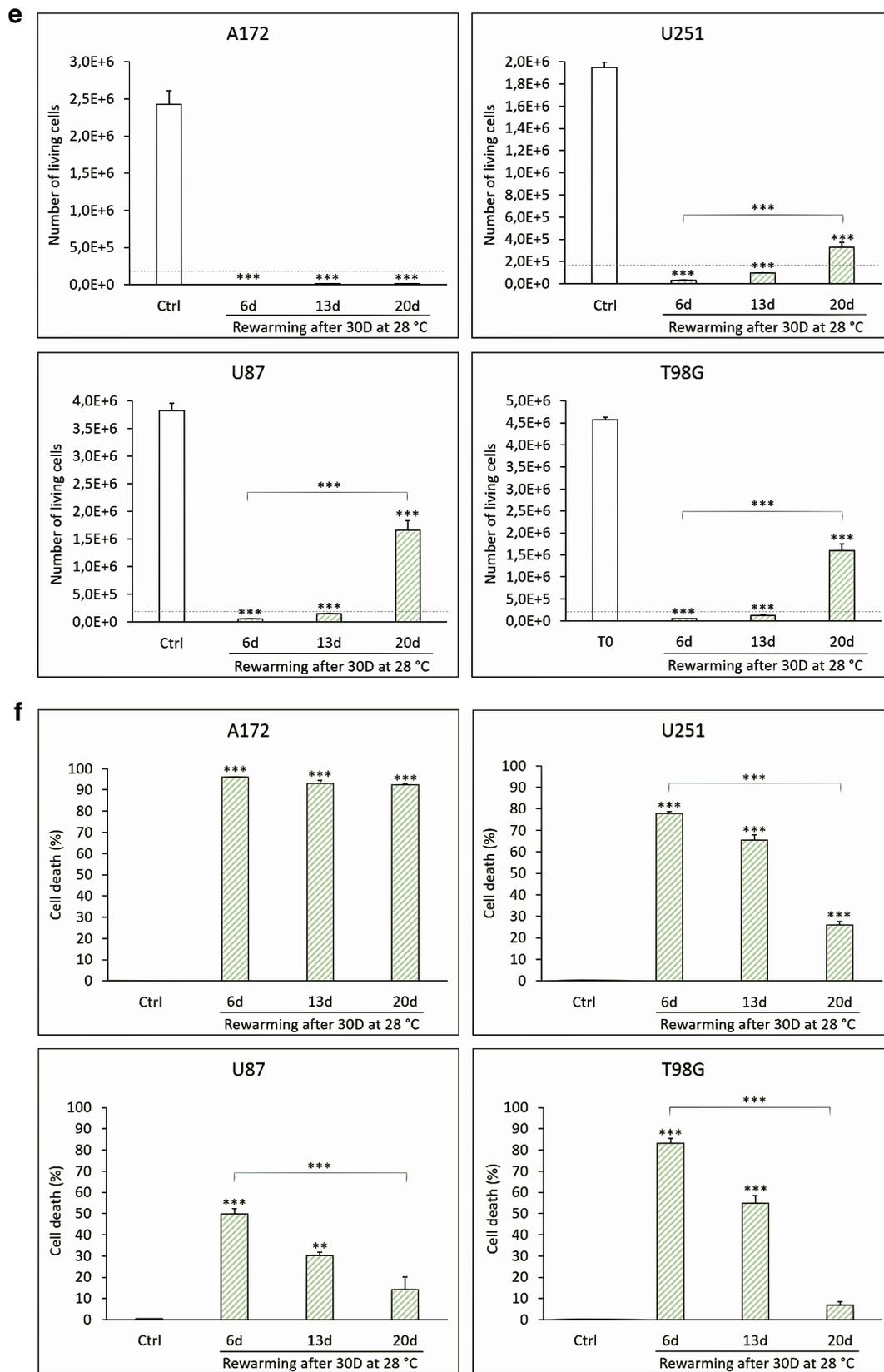


Fig. 3 (continued)

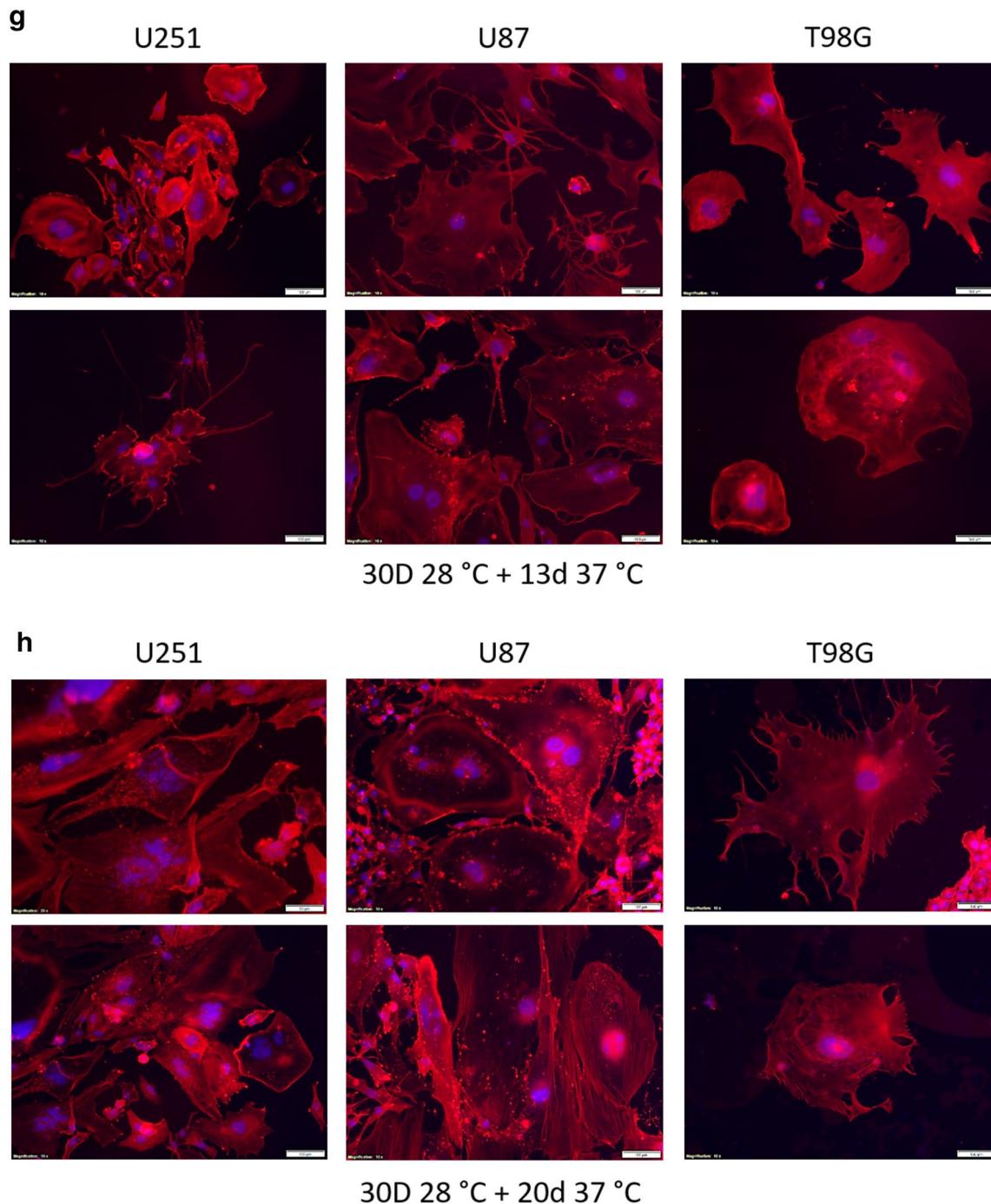


Fig. 3 (continued)

normothermic period (Fig. 5c). For A172 and U87 cells, temozolomide addition enhanced the inhibitory effects of hypothermic preconditioning, increasing respectively from 81% and 84% to 100% when added after 5 days, and to 92% and 95% when added after 9 days (Fig. 5d; A172: $p < 0.001$ for all comparisons; U87: $p < 0.001$ versus hypothermic preconditioning, and $p = 0.027$ for 5 days versus 9 days). For U251 cells, beneficial effects were also observed, with an

increase in inhibition from 88% to 96% after 5 days, and to 93% after 9 days ($p = 0.0022$ after 5 days and $p = 0.021$ after 9 days versus hypothermic preconditioning; $p > 0.05$ for 5 days versus 9 days). For T98G cells, temozolomide addition enhanced inhibitory effects of hypothermic preconditioning in a non-significant way, from 63% to 72% after 5 days and 66% after 9 days ($p > 0.05$ for all comparisons).

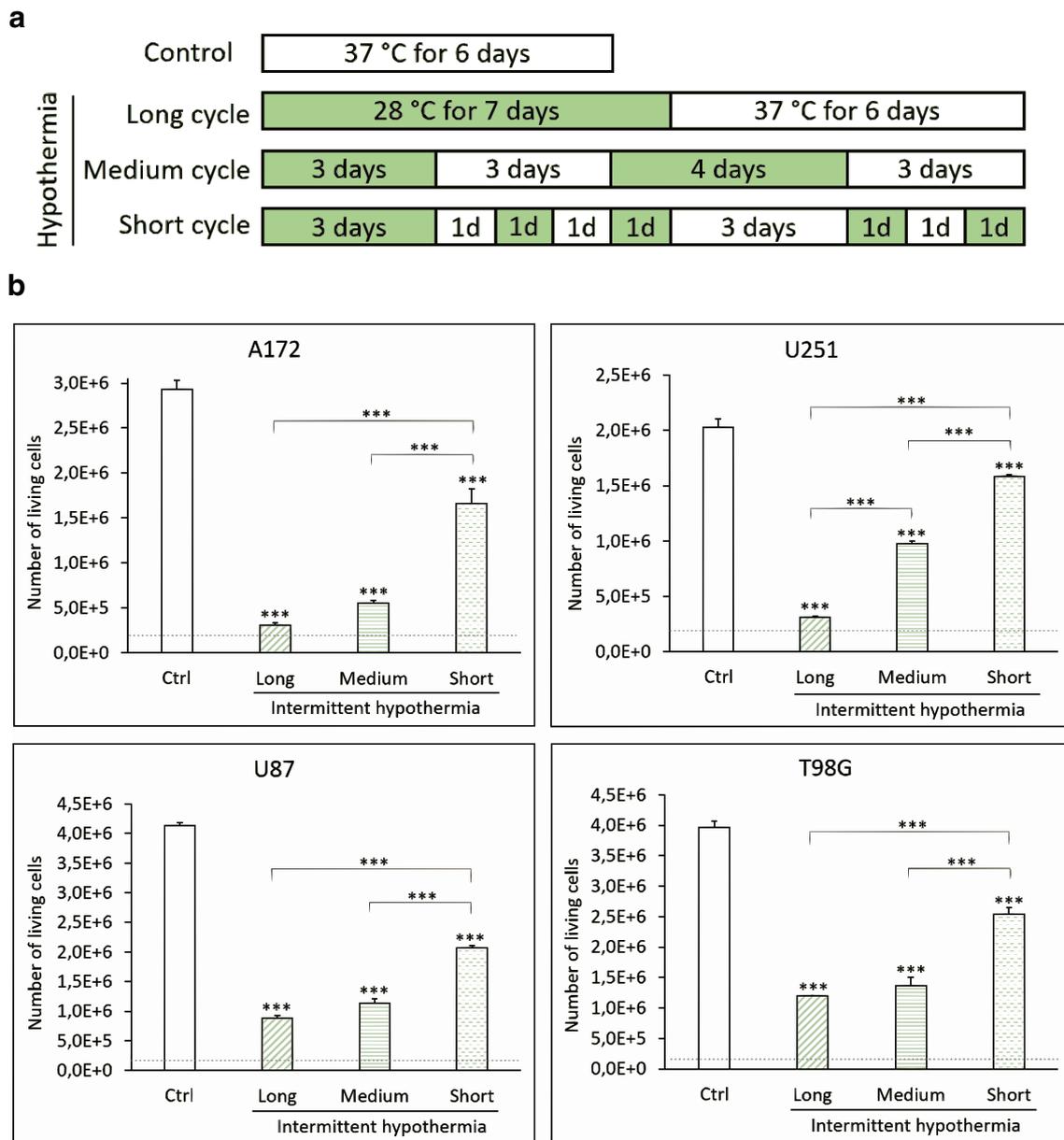


Fig. 4 Intermittent hypothermia has inhibitory effects on glioblastoma cell proliferation that depend on cycles duration. **(a)** Intermittent hypothermic sequences were performed with a total of 7 days under moderate hypothermia (28 °C) and 6 days under normothermia (37 °C). As indicated in the experimental scheme, moderate hypothermia was applied in a continuous period (long cycle), or divided into two (medium cycle), or either five sessions (short cycle). Normo-

thermic control corresponds to 6 days at 37 °C (Ctrl). **(b)** Cycles of continuous hypothermia inhibit glioblastoma cell proliferation more efficiently than short intermittent ones. A172, U251, U87, and T98G cells were counted, bar graphs represent numbers of adherent living cells, *** $p < 0.001$. Dashed line is the number of seeded cells per condition (1.8×10^5)

Discussion

The neuroprotective effects of therapeutic hypothermia have been experimentally demonstrated, including reduction of intracranial pressure, brain edema, lesions, neuronal death and inflammatory responses, but also improvement of neurological and behavioral performance [22–26]. Moderate

hypothermia has been reported to reduce the number and size of metastases from epithelial tumors in rabbits [27] and to slow tumor growth, but not to eliminate existing tumors [28, 29]. The adjuvant therapeutic potential of hypothermia has been considered as a means to increase tumor oxygenation, and thus enhance the response to radiotherapy, which can be adversely affected by hypoxia [30, 31]. Previous

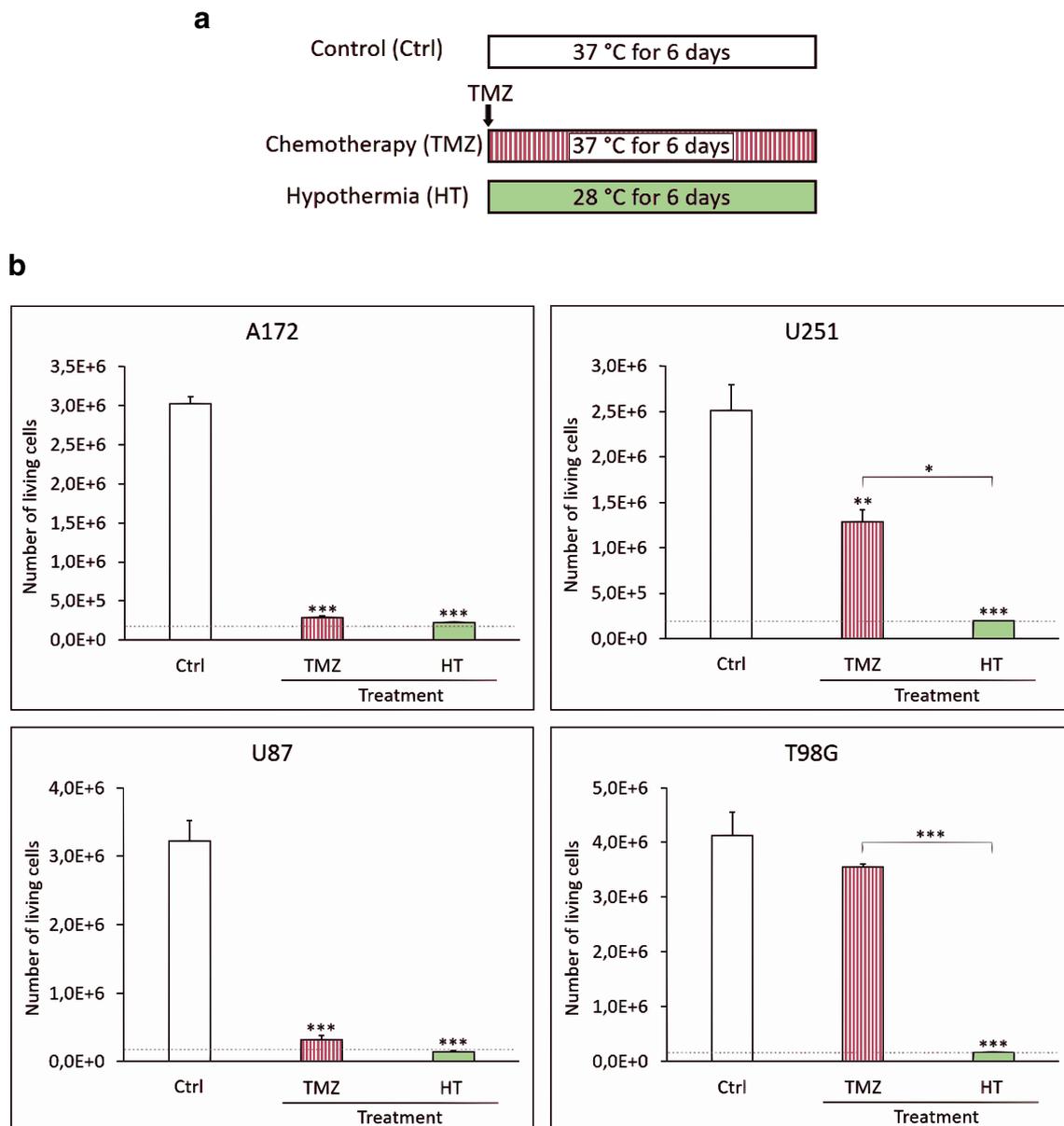


Fig. 5 Moderate hypothermia has a beneficial effect on glioblastoma cell proliferation when combined with temozolomide chemotherapy. **(a)** The two treatments were applied individually for 6 days, with hypothermia administered continuously. Chemotherapy consisted in a single dose of temozolomide at the start of the test, as summarized in the experimental scheme. Normothermic control corresponds to 6 days at 37 °C (Ctrl). **(b)** Moderate hypothermia inhibits glioblastoma cell proliferation more uniformly and efficiently than chemotherapy. A172, U251, U87, and T98G cells were counted, bar graphs represent numbers of adherent living cells, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, TMZ = temozolomide, HT = hypothermia. Dashed line

is the number of seeded cells per condition (1.8×10^5). **(c)** Moderate hypothermia was initiated for 6 days, followed by 6 days of normothermia, and chemotherapy was either applied during the hypothermic period (on day 5) or the normothermic period (on day 9), as summarized in the experimental scheme. **(d)** Combining chemotherapy with hypothermia inhibits glioblastoma cell proliferation far more when applied early during the hypothermic period. A172, U251, U87, and T98G cells were counted, bar graphs represent numbers of adherent living cells, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Dashed line is the number of seeded cells per condition (1.8×10^5)

experiments demonstrated that tumors in mice treated with moderate hypothermia showed reduced oxygen consumption, and a subsequent delay in recurrence [32]. Hypothermia has also been shown to potentiate the effects of

photodynamic therapy, and to increase survival in rats with gliomas [33]. Previous results from our laboratory demonstrated that hypothermia reduces glioblastoma cell proliferation and non-oriented migration in a temperature-dependent

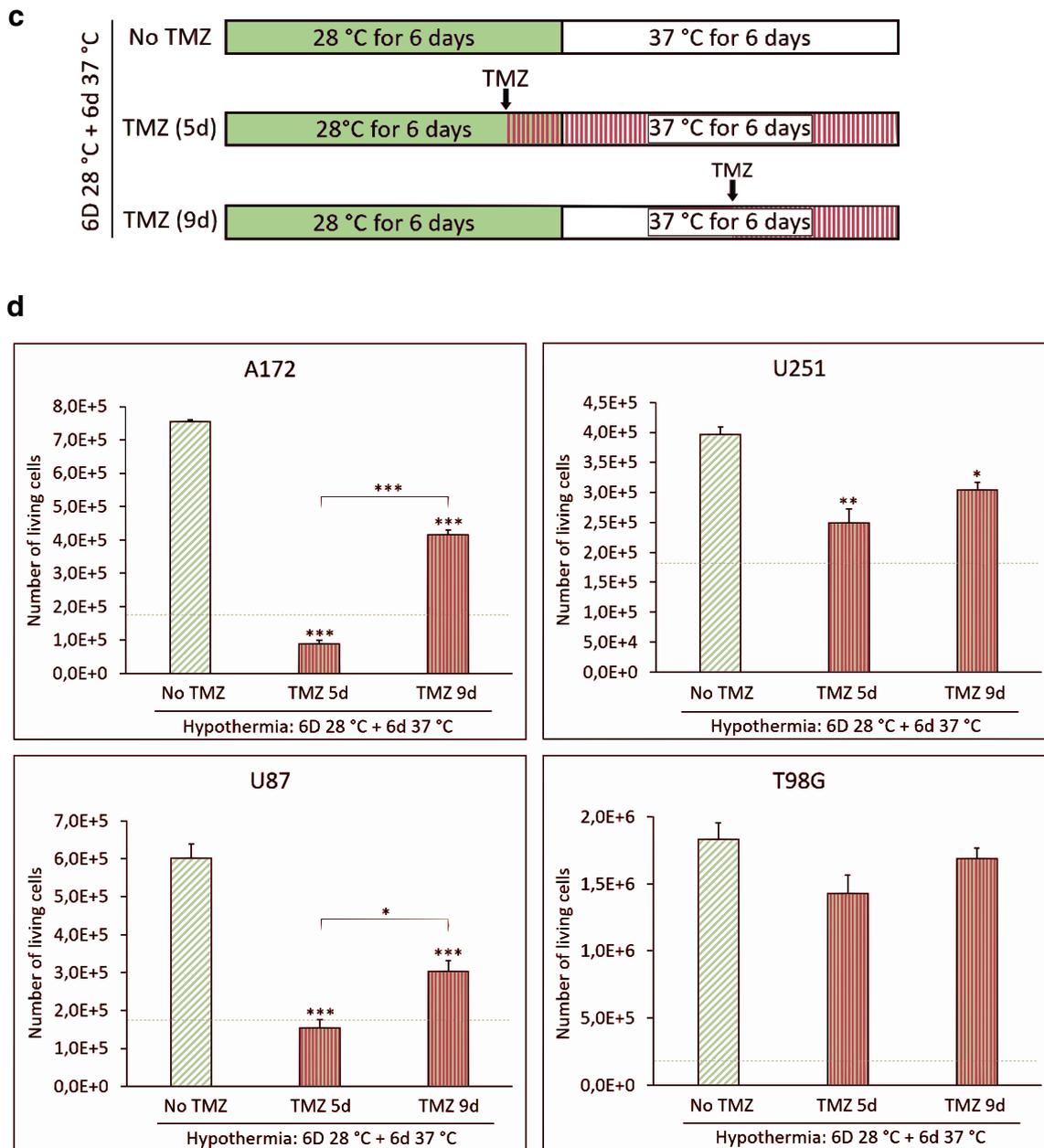


Fig. 5 (continued)

manner. We also showed that moderate hypothermia at 28 °C induces long-lasting proliferation arrest, alters morphology, reduces oriented migration and induces cell cycle arrest in glioblastoma cells [21].

The results presented here demonstrate that moderate hypothermia also arrested proliferation and reduced migration in human primary astrocyte cultures, to a similar extent to that reported for glioblastoma cell lines [21]. Some morphological alterations and reduced cell viability over time were also observed, suggesting that hypothermia affects both healthy and tumor cells. These observations corroborate

those of two other studies demonstrating that normal human fibroblasts entered into cell cycle arrest at 28 °C [34], and that rat primary astrocytes underwent similar swelling to that observed for C6 glioma cells when incubated at 32 °C [35].

As it would be impossible to maintain tumor resection margins indefinitely in a hypothermic state, we investigated the adjuvant therapeutic potential of hypothermia by testing various temperature sequences, including rewarming and intermittent hypothermia. These experiments allowed us to determine whether the inhibitory effects of hypothermia were reversible, and demonstrated that they were not limited

to direct conditioning. Our results indicated that moderate (28 °C) and severe (23 °C) hypothermic preconditioning had similar inhibitory effects on glioblastoma cell proliferation following rewarming. These data suggest that it is not necessary to cool below 28 °C to reduce normothermic proliferation. Based on this result, we focused the rest of our study on moderate hypothermia at 28 °C. From a longer-term point of view, for possible in vivo experiments, this result is promising as it reduces both the constraints and the potential for adverse effects.

We next investigated the required duration of hypothermic preconditioning, and found that 3 days were sufficient to significantly reduce glioblastoma cell proliferation. Then, we showed that the inhibitory effects of hypothermic preconditioning increased in proportion to its duration, with total proliferation arrest and cell death observed after 30 days. Neutelings and others [17] previously reported that severe (25 °C) hypothermic preconditioning could stop proliferation of a human osteosarcoma cell line, and that rewarming affected cell viability and induced apoptosis, reactive oxygen species and DNA damage. They hypothesized that it induced an oxidative burst that triggered tumor cell apoptosis rather than hypothermia itself, which is supported by our data and the observed increase in cell death subsequent to rewarming. Additional molecular characterization of cell lines should be performed in order to study genetic alterations potentially induced by hypothermia and rewarming.

As proliferation seemed arrested after 30 days of hypothermia, we maintained glioblastoma cell cultures for longer durations at 37 °C after this preconditioning. In these experiments, A172 cells never resumed proliferation, whereas U251, U87, and T98G cells started to proliferate again after 20 days at 37 °C, but at a much slower rate. We also observed an increase in cell viability as proliferation resumed, suggesting that some of the effects of hypothermia could be reversible. Finally, we investigated three different intermittent hypothermic and normothermic sequences, and demonstrated that long cycles inhibited glioblastoma cell proliferation more efficiently than short ones.

To further investigate the potential of moderate hypothermia as an adjuvant therapy, we compared its inhibitory effects to those of temozolomide and found them to be stronger and more uniform. In fact, all four glioblastoma cell lines were affected by hypothermia to a similar extent, whereas temozolomide induced different responses that could be attributed to genetic alterations to cell lines. We found that A172 and U87 cells were chemosensitive, that U251 cells only responded partially to temozolomide and that T98G cells were chemoresistant. In order to explain the different sensitivity to chemotherapy, we remind here that A172 and U87 cells have a methylated *MGMT* promoter and wild-type *TP53*, U251 cells have a methylated *MGMT* promoter and *TP53* mutations and T98G cells have wild-type

MGMT promoter and *TP53* mutations. In fact, the cytotoxic alkylation induced by temozolomide can be repaired by O6-methylguanine DNA methyltransferase (*MGMT*) [6, 36], which explains the strong correlation between TMZ resistance and *MGMT* overexpression, conferred by the demethylation of its promoter [37]. Moreover, some authors reported that functional *TP53* is necessary for *MGMT* action, resulting in an association between *TP53* mutations and chemoresistance [38, 39]. Based on our results, we suppose that the sensitivity to temozolomide of the four glioblastoma cell lines is influenced by both *TP53* mutations and the status of *MGMT* promoter methylation, but in-depth analyses would be further required to confirm this statement.

Matijasevic [18, 34] and Neutelings [17] investigated the role of *TP53* mutations in cold-induced inhibition of tumor cell growth, and reported conflicting results. Matijasevic established that cold-induced inhibition of proliferation was due to p53 protein activation. In contrast, Neutelings reported similar results for *TP53*-deficient and wild-type *TP53* cells, and demonstrated a reduction in p53 phosphorylation at 25 °C and a subsequent increase after rewarming. We confirmed the latter results by demonstrating that exposure to 28 °C caused total proliferation arrest for cell lines expressing a wild-type *TP53* (A172, U87), as well as for cell lines bearing mutant forms of *TP53* (U251, T98G).

To date, a few experimental studies have attempted to combine the effects of different degrees of hypothermia with chemotherapy and showed adjuvant effects [40, 41], but this is the first study experimenting currently used temozolomide. Our results from experiments combining chemotherapy with intermittent hypothermia showed that temozolomide increases the inhibitory effects induced by intermittent hypothermia, especially on chemosensitive cell lines. Through timed additions, we also demonstrated that temozolomide was more efficient when added early, when glioblastoma cells had not yet resumed proliferation.

In conclusion, the results presented in this article demonstrate that moderate hypothermia potentiates the effects of chemotherapy and inhibits cell growth beyond direct conditioning. These promising results suggest that hypothermia could maintain tumor cells in a dormant state and potentiate the effects of other therapies, while also possibly reducing variability of treatment sensitivity. Further in vivo experiments will be required to confirm these in vitro results, with intermittent sequences based on 30-day hypothermia in combination with chemotherapy. If the latter corroborate our findings, moderate hypothermia could be a suitable adjuvant treatment for glioblastoma when applied locally at the resection margins.

Acknowledgments We thank Maighread Gallagher-Gambarelli from TWS Editing for providing linguistic support and suggestions on language usage for the manuscript.

Authors' contributions All authors contributed to the study conception. Methodology, material preparation, data collection and data analysis were performed by Clémentine Fulbert. The first draft of the manuscript was written by Clémentine Fulbert and David Ratel commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding No funds, grants, or other support was received for conducting this study.

Availability of data and material The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

References

- Louis DN et al (2016) The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol (Berl)* 131(6):803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- Ostrom QT et al (2019) CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2012–2016. *Neuro-Oncol* 21(Suppl 5):v1–v100. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz150>
- Stupp R et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352(10):987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043330>
- Stupp R et al (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10(5):459–466. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(09\)70025-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(09)70025-7)
- Stupp R, Brada M, van den Bent MJ, Tonn J-C, Pentheroudakis G, ESMO Guidelines Working Group (2014) High-grade glioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 25(Suppl 3):iii93–iii101. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu050>
- Lee SY (2016) Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis* 3(3):198–210. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.04.007>
- Zhang X, Ding K, Wang J, Li X, Zhao P (2019) Chemoresistance caused by the microenvironment of glioblastoma and the corresponding solutions. *Biomed Pharmacother* 109:39–46. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.063>
- L. Hamard, D. Ratel, L. Sele, F. Berger, B. van der Sanden, et D. Wion, The brain tissue response to surgical injury and its possible contribution to glioma recurrence, *J Neuro-Oncol*, vol. 128, n° 1, p. 1–8, mai 2016, doi: <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2096-y>.
- O. Okolie et al., Reactive astrocytes potentiate tumor aggressiveness in a murine glioma resection and recurrence model, *Neuro-Oncol*, vol. 18, n° 12, p. 1622–1633, déc. 2016, doi: <https://doi.org/10.1093/neuonc/now117>.
- Lemée J-M, Clavreul A, Menei P (2015) Intratumoral heterogeneity in glioblastoma: don't forget the peritumoral brain zone. *Neuro-Oncol* 17(10):1322–1332. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov119>.
- Stupp R et al (2017) Effect of tumor-treating fields plus maintenance Temozolomide vs maintenance Temozolomide alone on survival in patients with glioblastoma: a randomized clinical trial. *JAMA* 318(23):2306–2316. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.18718>
- Saigal S, Sharma JP, Dhurwe R, Kumar S, Gurjar M (2015) Targeted temperature management: current evidence and practices in critical care. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med* 19(9):537–546. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.164806>.
- Dietrich WD, Bramlett HM (2016) Therapeutic hypothermia and targeted temperature management in traumatic brain injury: clinical challenges for successful translation. *Brain Res* 1640(Part A):94–103. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.034>
- Gunn AJ et al (2017) Therapeutic hypothermia translates from ancient history in to practice. *Pediatr Res* 81(1–2):202–209. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.198>
- Nolan JP et al (2003) Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the international liaison committee on resuscitation. *Circulation* 108(1):118–121. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000079019.02601.90>
- Richmond S, Wyllie J (2010) European resuscitation council guidelines for resuscitation 2010: Section 7. Resuscitation of babies at birth. *Resuscitation* 81(10):1389–1399. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2010.08.018>
- Neutelings T, Lambert CA, Nusgens BV, Colige e AC (2013) Effects of mild cold shock (25°C) followed by warming up at 37°C on the cellular stress response. *PLoS One* 8(7):e69687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069687>
- Matijasevic Z (2002) Selective protection of non-cancer cells by hypothermia. *Anticancer Res* 22(6A):3267–3272
- Zhang X et al (2012) Effect of mild hypothermia on breast cancer cells adhesion and migration. *Biosci Trends*. <https://doi.org/10.5582/bst.2012.v6.6.313>
- Kalamida D, Karagounis IV, Mitrakas A, Kalamida S, Giatromanolaki A, Koukourakis MI (2015) Fever-range hyperthermia vs. hypothermia effect on Cancer cell viability, proliferation and HSP90 expression. *PLoS One* 10(1):e0116021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116021>
- Fulbert C, Gaude C, Sulpice E, Chabardès S, Ratel D (2019) Moderate hypothermia inhibits both proliferation and migration of human glioblastoma cells. *J Neuro-Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03263-3>
- Jackson TC, Kochanek PM (2019) A new vision for therapeutic hypothermia in the era of targeted temperature management: a speculative synthesis. *Ther Hypothermia Temp Manag* 9(1):13–47. <https://doi.org/10.1089/ther.2019.0001>
- Karnatovskaia LV, Wartenberg KE, Freeman WD (2014) Therapeutic hypothermia for neuroprotection: history, mechanisms, risks, and clinical applications. *The Neurohospitalist* 4(3):153–163. <https://doi.org/10.1177/1941874413519802>
- Lee JH et al (2016) Improved therapeutic benefits by combining physical cooling with pharmacological hypothermia after severe stroke in rats. *Stroke* 47(7):1907–1913. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.013061>
- Park J, Kim J-H, Suk K, Han HS, Ohk B, Kim DG (2019) Selective brain hypothermia augmenting neuroprotective effects of decompressive Craniectomy for permanent middle cerebral artery infarction in a rat model. *World Neurosurg* 121:e181–e190. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.09.073>
- W. Jiang, P. Desjardins, et R. F. Butterworth, Direct evidence for central Proinflammatory mechanisms in rats with experimental acute liver failure: protective effect of hypothermia, *J Cereb Blood*

- Flow Metab, vol. 29, n° 5, p. 944–952, mai 2009, doi: <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.18>.
27. Mandrik ÉV (1959) The effect of hypothermia on metastasis of Brown-Pearce tumors. *Bull Exp Biol Med* 47(1):66–70. <https://doi.org/10.1007/BF00781021>
 28. Popovic VP, Masironi R (1966) Disappearance of normothermic tumors in shallow (30° C) hypothermia. *Cancer Res* 26(5):863–864
 29. Popovic VP, Masironi R (1965) Disappearance of euthermic tumors after 10-hour generalized hypothermia. *Life Sci* 1962 4:533–543. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(65\)90262-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(65)90262-6)
 30. Kelleher DK, Nauth C, Thews O, Krueger W, Vaupel P (1998) Localized hypothermia: impact on oxygenation, microregional perfusion, metabolic and bioenergetic status of subcutaneous rat tumours. *Br J Cancer* 78(1):56–61. <https://doi.org/10.1038/bjc.1998.442>
 31. Neveu M-A, Joudiou N, Preter GD, Dehoux J-P, Jordan BF, Gallez e B (2017) 17O MRS assesses the effect of mild hypothermia on oxygen consumption rate in tumors. *NMR Biomed* 30(8):e3726. <https://doi.org/10.1002/nbm.3726>
 32. Nias AH, Perry PM, Photiou AR (1988) Modulating the oxygen tension in tumours by hypothermia and hyperbaric oxygen. *J R Soc Med* 81(11):633–636
 33. Fisher CJ et al (2017) ALA-PpIX mediated photodynamic therapy of malignant gliomas augmented by hypothermia. *PLoS One* 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181654>
 34. Matijasevic Z, Snyder JE, Ludlum DB (1998) Hypothermia causes a reversible, p53-mediated cell cycle arrest in cultured fibroblasts. *Oncol Res* 10(11–12):605–610
 35. Plesnila N, Müller E, Guretzki S, Ringel F, Staub F, Baethmann e A (2000) Effect of hypothermia on the volume of rat glial cells. *J Physiol* 523(1):155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00155.x>
 36. J. Zhang, M. F. G. Stevens, et T. D. Bradshaw, Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance, *Curr Mol Pharmacol*, vol. 5, n° 1, p. 102–114, 2012, doi: <https://doi.org/10.2174/1874467211205010102>.
 37. Perazzoli G et al (2015) Temozolomide resistance in glioblastoma cell lines: implication of MGMT, MMR, P-glycoprotein and CD133 expression. *PLoS One* 10(10):e0140131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140131>
 38. Hientz K, Mohr A, Bhakta-Guha D, Efferth T (2017) The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 8(5):8921–8946. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13475>
 39. Wang X, Chen J, Liu Y, You C, Mao Q (2013) Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. *Neurol Sci* 34(8):1421–1428. <https://doi.org/10.1007/s10072-012-1257-9>
 40. Austin JP, Glaser EM (1969) Enhancement of anti-tumour effect by cooling. *Int J Biometeorol* 13(2):183–187. <https://doi.org/10.1007/bf01552739>
 41. Hultborn R, Lundgren-Eriksson L, Ottosson-Lönn S, Ryd W, Weiss e L (1990) Chlorpromazine-induced hypothermia in tumour-bearing mice, acute cytotoxic drug lethality and long-term survival. *Acta Oncol Stockh Swed* 29(7):941–944. <https://doi.org/10.3109/02841869009096394>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Clémentine Fulbert¹, Christophe Gaude¹, Eric Sulpice², Stéphan Chabardès^{1,3}, David Ratef¹

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI, Clinatec, F-38000 Grenoble, France, **contact : clementine.fulbert@cea.fr**

² Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, IRIG-BGE U1038, F-38000 Grenoble, France; ³ CHU Grenoble Alpes, F-38000, Grenoble, France

Introduction

Glioblastoma is defined by the WHO classification as a high-grade glioma, more specifically as a grade IV astrocytoma, the most aggressive malignant brain tumor in adults [1]. Current treatments consist in surgical resection followed by postoperative radiotherapy combined with chemotherapy (temozolomide) [2]. In spite of these intensive treatments, tumor recurs in the resection margins for more than 90% of patients, resulting in a poor prognosis with a median survival below 15 months [3].

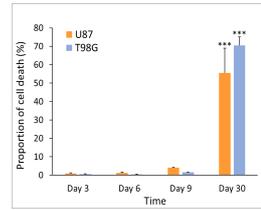
To handle this issue, we propose **therapeutic hypothermia** as an adjuvant treatment, in order to place the resection margin in a state of hibernation. Hypothermia was introduced as a promising therapeutic approach in various medical applications like cardiac arrest [4], but very few studies explored its effects on cancer cells, in particular glioblastoma ones [5]-[7].

In this work, we performed **in vitro** experiments on human glioblastoma cell lines U87 and T98G in order to study the therapeutic potential of hypothermia. We investigated the effect of hypothermia on cell proliferation and migration, two key processes involved in cancer progression and recurrence, but also on cell viability and cell cycle distribution, in order to better understand the mechanisms of action.

Cell viability

Method: Evaluate cell death after different periods of 28°C hypothermia with a trypan blue exclusion assay

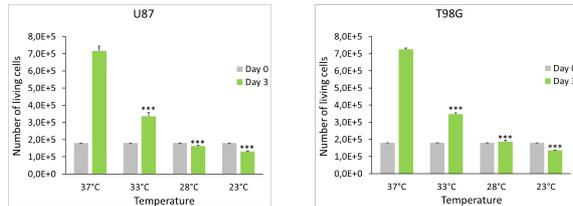
Statistics: Results presented as mean ± SEM. Threshold for statistical significance set at p-value below 0.05. ** p < 0.01, *** p < 0.001



→ A 28°C hypothermia reduces glioblastoma cell viability over time

3-day proliferation

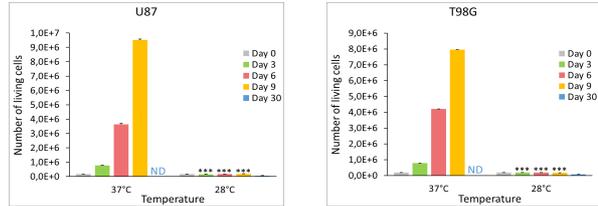
Method: Count the number of viable cells after 3 days at different temperatures



→ Hypothermia inhibits glioblastoma cell proliferation in a dose-dependent manner – A 28°C hypothermia is sufficient to induce proliferation arrest

Proliferation over time

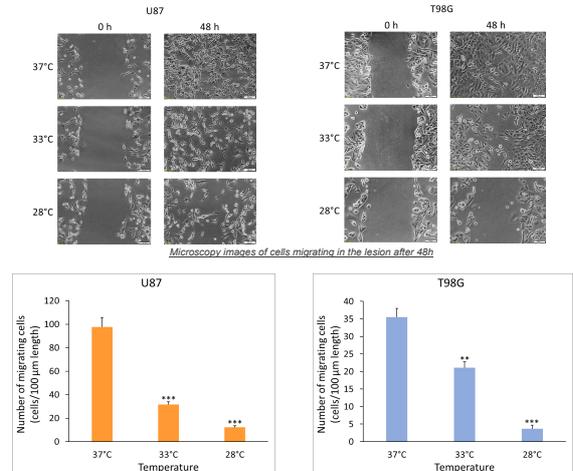
Method: Count the number of viable cells grown at either 28°C or 37°C up to 30 days



→ A 28°C hypothermia induces a long-lasting glioblastoma cell proliferation arrest

Non-oriented migration

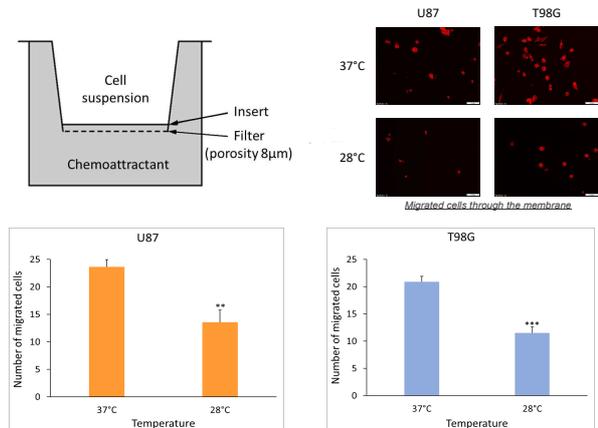
Method: Assess the number of cells that recolonize a lesion by microscopy



→ Hypothermia reduces non-oriented glioblastoma cell migration in a dose-dependent manner

Oriented migration

Method: Assess the number of cells that migrate through a porous membrane

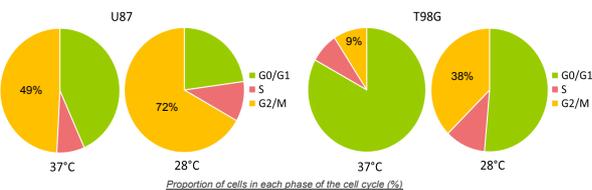


→ A 28°C hypothermia significantly inhibits oriented glioblastoma cell migration

Cell cycle

Method: Evaluate cell distribution in each phase of the cell cycle

- DNA staining (propidium iodide)
- Cell passage through a laser light beam
- Measurement of forward scattered light (size) and side scattered light (granularity)



→ A 28°C hypothermia induces cell cycle arrest with an accumulation of glioblastoma cells in the G2/M phase

Conclusions

Our results were similar for U87 and T98G human glioblastoma cell lines, and showed that hypothermia impairs cell viability over time. We also demonstrated that **hypothermia significantly inhibits both cell proliferation and migration**, two key processes involved in tumor development. We finally showed that moderate hypothermia alters cell distribution in the cell cycle phases, inducing an accumulation of cells in the G2/M phase, what could explain proliferation arrest.

Additional experiments performed with A172 and U251 human glioblastoma cell lines resulted in similar conclusions, demonstrating a **consistent and universal effect of hypothermia**. Thus, this study supports a therapeutic role for hypothermia as an adjuvant therapy for patients with glioblastoma, if *in vivo* results corroborate our findings. **Further studies** will focus on in-depth analysis of molecular mechanisms, comparison between hypothermia and chemotherapy and *in vivo* preclinical studies.

References

- D. N. Louis et al., *Acta Neuropathol.*, vol. 131, no 6, p. 803-820, 2016.
- R. Stupp et al., *Lancet Oncol.*, vol. 10, no 5, p. 459-466, mai 2009.
- X. Zhang et al., *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, p. 39-46, 2019.
- Writing Group et al., *Circulation*, vol. 108, no 1, p. 118-121, juill. 2003.
- X. Zhang et al., *Biosci. Trends*, 2012 Dec; 6(6): 313-324.
- D. Kalamida et al., *PLOS ONE*, vol. 10, no 1, p. e0116021, janv. 2015.
- Z. Matijasevic et al., *Anticancer Res.*, vol. 22, no 6A, p. 3267-3272, déc. 2002.

Acknowledgments

This work received financial support through grants from the Groupement des Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble – Dauphiné – Savoie) and the Fonds de dotation Clinatec.

Clémentine Fulbert¹, Christophe Gaude¹, Stéphan Chabardès^{1,2}, David Rate¹ | **contact: clémentine.fulbert@cea.fr**

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI, Cinatec, F-38000 Grenoble, France, ² CHU Grenoble Alpes, F-38000, Grenoble, France

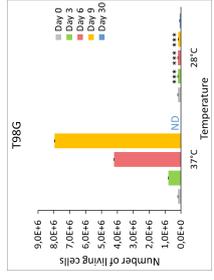
Introduction

Glioblastoma is the most **aggressive malignant brain tumor** in adults [1], defined by the WHO classification as a high-grade glioma, more specifically as a grade IV astrocytoma. This infiltrative brain tumor has an annual incidence of three per 100,000 adults worldwide. Current treatments consist in surgical resection followed by postoperative radiotherapy combined with temozolomide-based chemotherapy [2]. In spite of these intensive multimodal treatments, patients have a **poor prognosis** with a median survival below 15 months [3]. Indeed, **tumor recurs in the resection margins** in over 90% of patients due to the activation of residual glioblastoma cells. Hence, there is a need for developing novel therapies that improve survival outcome.

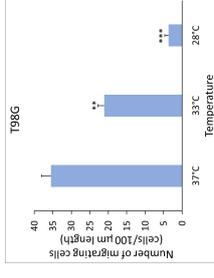
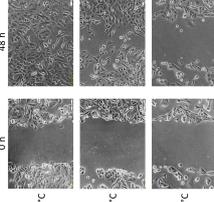
To handle this issue, we propose **moderate hypothermia** as an adjuvant treatment. Our aim is to place **tumor cells** at the resection margin in a **dormant state**. We previously demonstrated that continuous moderate hypothermia at 28 °C is able to significantly inhibit both cell proliferation and migration [4]. Here, we performed additional *in vitro* experiments on human glioblastoma cell lines A172 (wild-type p53) and T98G (mutant p53). We evaluated the **adjuvant therapeutic potential** of moderate hypothermia by exploring the impact of hypothermic preconditioning on cell proliferation after rewarming to 37 °C, and also comparing and combining the inhibitory effects of moderate hypothermia with current chemotherapy protocols.

Major previous findings

Cell proliferation



Cell migration



> Long-lasting proliferation arrest at 28 °C

> Dose-dependent inhibition of migration

→ Moderate hypothermia at 28 °C inhibits both cell proliferation and migration [4]

Method

Experiments:

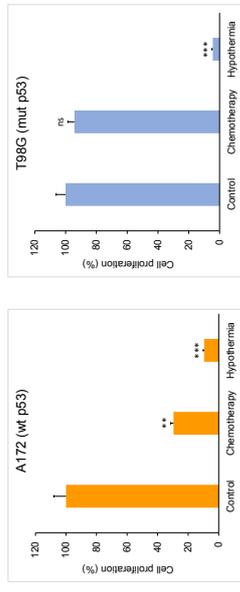
Evaluate the number of viable cells after 3 days under various treatments or 6 days at different temperature sequences

Statistics:

Results are presented as mean ± SEM. Threshold for statistical significance is set at p-value below 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

Comparison between chemotherapy and hypothermia

Comparison between chemotherapy and hypothermia

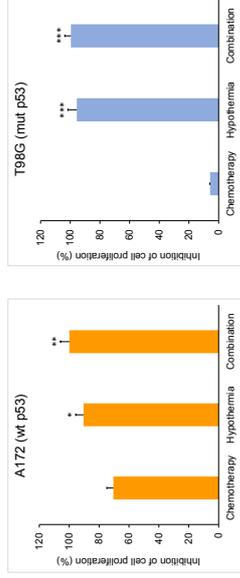


Results:

> Evidence of chemosensitive (A172) and chemoresistant (T98G) cell lines
> Both cell lines are highly sensitive to moderate hypothermia at 28 °C

→ Moderate hypothermia has a uniform and powerful inhibitory effect on glioblastoma cell lines, independently of their p53 status

Combination of chemotherapy and hypothermia

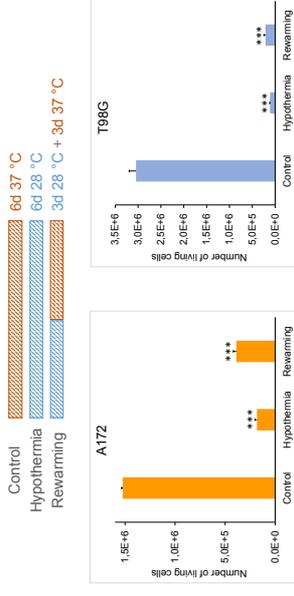


Results:

> Moderate hypothermia at 28 °C inhibits glioblastoma cell proliferation far more than temozolomide-based chemotherapy
> Hypothermia and chemotherapy have synergistic inhibitory effects

→ Moderate hypothermia has a strong adjuvant therapeutic potential

Hypothermia followed by rewarming to 37 °C



Results:

> Hypothermia inhibits glioblastoma cell proliferation even after rewarming to 37 °C

→ Inhibitory effects of moderate hypothermia are not limited to direct conditioning

Conclusions

Conclusions

Our results showed that responses to moderate hypothermia were similar for both glioblastoma cell lines whereas they presented different levels of sensitivity to chemotherapy, depending on their p53 status. In addition, **combining hypothermia with chemotherapy significantly improved this sensitivity** for both cell lines. Additional experiments performed with U251 (mutant p53) and U87 (wild-type p53) human glioblastoma cell lines resulted in similar conclusions. Together, these results support a clear correlation between p53 status and chemoresistance, and a consistent and **uniform effect of hypothermia**.

In addition, glioblastoma cell proliferation was not fully restored upon returning to 37 °C, suggesting that moderate hypothermia has long-lasting inhibitory effects on cell growth, which are **not limited to direct conditioning**. Finally, moderate hypothermia is able to **potentiate the therapeutic effects** of existing therapies, and the potential to **reduce inter-patient variability** of treatment efficiency.

Perspectives

Perspectives

If *in vivo* results corroborate our findings, moderate hypothermia seems to be a **relevant adjuvant therapy** for treating glioblastoma patients. **Further studies** will focus on intermittent hypothermia, in-depth analysis of molecular mechanisms and *ex vivo* preclinical proof of concept.

Acknowledgments

This work received financial support from the Groupement des Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble – Dauphiné – Savoie) and the Fonds de dotation Cinatec.

References

References

- [1] Louis et al., *Acta Neuropathol.*, vol. 131, n° 6, p. 803-820, 2016.
- [2] Stupp et al., *Lancet Oncol.*, vol. 10, n° 5, p. 459-466, may 2009.
- [3] Zhang et al., *Blomed. Pharmacother.*, vol. 109, p. 39-46, 2019.
- [4] Fulbert et al., *J. Neurooncol.*, vol. 144, p. 489-499, september 2019.

Contact

Contact

Clémentine Fulbert, PhD student
CEA, LETI, Cinatec – Grenoble, France
slemlentine.fulbert@cea.fr

References

References

- [1] Louis et al., *Acta Neuropathol.*, vol. 131, n° 6, p. 803-820, 2016.
- [2] Stupp et al., *Lancet Oncol.*, vol. 10, n° 5, p. 459-466, may 2009.
- [3] Zhang et al., *Blomed. Pharmacother.*, vol. 109, p. 39-46, 2019.
- [4] Fulbert et al., *J. Neurooncol.*, vol. 144, p. 489-499, september 2019.

Contact

Contact

Clémentine Fulbert, PhD student
CEA, LETI, Cinatec – Grenoble, France
slemlentine.fulbert@cea.fr

Acknowledgments

Acknowledgments

This work received financial support from the Groupement des Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble – Dauphiné – Savoie) and the Fonds de dotation Cinatec.

Acknowledgments

This work received financial support from the Groupement des Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble – Dauphiné – Savoie) and the Fonds de dotation Cinatec.

AACR 2020

AACR 2020

- [1] Louis et al., *Acta Neuropathol.*, vol. 131, n° 6, p. 803-820, 2016.
- [2] Stupp et al., *Lancet Oncol.*, vol. 10, n° 5, p. 459-466, may 2009.
- [3] Zhang et al., *Blomed. Pharmacother.*, vol. 109, p. 39-46, 2019.
- [4] Fulbert et al., *J. Neurooncol.*, vol. 144, p. 489-499, september 2019.

Contact

Contact

Clémentine Fulbert, PhD student
CEA, LETI, Cinatec – Grenoble, France
slemlentine.fulbert@cea.fr

Acknowledgments

Acknowledgments

This work received financial support from the Groupement des Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble – Dauphiné – Savoie) and the Fonds de dotation Cinatec.

Acknowledgments

This work received financial support from the Groupement des Entreprises Françaises de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble – Dauphiné – Savoie) and the Fonds de dotation Cinatec.

Résumé

Le glioblastome est une tumeur cérébrale maligne particulièrement agressive, dont les traitements actuels consistent en une exérèse chirurgicale suivie par une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie. Malgré l'ensemble des traitements, les patients ont une médiane de survie de seulement 16 mois après le diagnostic. En effet, la tumeur récidive localement dans les berges d'exérèse dans les mois suivant la chirurgie, en raison de l'activation de certaines cellules tumorales résiduelles restées jusqu'ici en dormance. Dans le cadre de cette thèse, nous proposons l'hypothermie thérapeutique comme thérapie adjuvante, permettant de maintenir ces cellules tumorales dans un état de dormance, et ainsi prévenir la récurrence du glioblastome.

Dans un premier temps, nous avons concentré nos travaux sur l'évaluation des effets de l'hypothermie sur quatre lignées cellulaires de glioblastome humain (A172, U251, U87 et T98G). Nous avons alors démontré que l'hypothermie inhibait la prolifération et la migration des cellules tumorales, induisait un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M, et altérait la morphologie des cellules de glioblastome. De plus, nous avons montré que ses effets étaient prolongés au-delà du conditionnement hypothermique, avec une réduction significative de la prolifération qui a persisté malgré un retour à 37°C. Nous avons également montré que l'hypothermie avait des effets plus uniformes que ceux de la chimiothérapie, et qu'une combinaison de ces deux traitements permettait d'inhiber davantage la prolifération des cellules tumorales. Dans un second temps, nous avons étudié les effets de l'hypothermie sur le contingent sain, avec l'utilisation d'astrocytes humains et la réalisation de cultures primaires de neurones à partir d'embryons de souris. Nous avons démontré des effets similaires – mais amoindris – par rapport à ceux observés sur les cellules tumorales, avec une inhibition de la prolifération et de la migration astrocytaire, ainsi qu'une bonne tolérance des neurones à l'hypothermie. Ensuite, nous avons réalisé une preuve de concept *ex vivo*, avec la mise en culture de cerveaux embryonnaires de souris. L'objectif était d'étudier les effets de l'hypothermie sur le tissu cérébral ainsi que sur la croissance tumorale dans un environnement complexe. Nous sommes parvenus à maintenir les cerveaux en culture pendant plusieurs jours, mais les analyses histologiques réalisées ne nous ont pas encore permis d'observer un effet thérapeutique significatif de l'hypothermie, et devront être complétées par d'autres études. Enfin, nous avons proposé une solution technologique, avec le développement d'un dispositif implantable de refroidissement localisé pour une application clinique.

En conclusion, nous avons démontré que l'hypothermie maintenait les cellules tumorales en dormance de manière durable, en bloquant leur prolifération sans induire de mort cellulaire. Ces travaux de thèse confirment l'intérêt thérapeutique de l'hypothermie dans le traitement du glioblastome et constituent une base solide pour la réalisation de futures études précliniques *in vivo*.

Mots-clés : Cancer, glioblastome, hypothermie thérapeutique, refroidissement localisé, thérapie innovante, thérapie adjuvante, dormance, culture cellulaire, astrocytes, culture *ex vivo*, dispositif médical, dispositif implantable, cerveau, neurosciences, système nerveux central (SNC)

Abstract

Glioblastoma is a particularly aggressive malignant brain tumor, currently treated by surgical removal followed by the combined use of radiotherapy and chemotherapy. Despite all treatments, patients have a median survival of only 16 months after diagnosis. Indeed, the tumor recurs locally in the resection margins in the months following surgery, due to the activation of residual tumor cells that were previously dormant. In this thesis, we suggest the use of therapeutic hypothermia as an adjuvant therapy to maintain residual tumor cells in a dormant state and thus prevent glioblastoma recurrence. First, we focused our work on evaluating the effects of hypothermia on four human glioblastoma cell lines (A172, U251, U87 and T98G). We demonstrated that hypothermia inhibited glioblastoma cell proliferation and migration, induced cell cycle arrest in the G2/M phase and altered cell morphology. In addition, we showed that its effects lasted beyond hypothermic conditioning, with a significant inhibition of proliferation despite returning to 37°C. We also showed that hypothermia had more consistent effects than chemotherapy, and that a combination of these two treatments further inhibited glioblastoma cell proliferation. Then, we studied the effects of hypothermia on healthy tissue, by using human astrocytes and performing primary neuronal cultures from mouse embryos. We demonstrated similar – but reduced – effects than those observed on tumor cells, with an inhibition of astrocyte proliferation and migration, as well as good tolerance of neurons to hypothermia. Then, we performed an *ex vivo* proof of concept by culturing mouse embryonic brains, in order to study the effects of hypothermia on tumor growth in a complex environment. We were able to maintain the brains in culture for several days, but histological analyses did not show a significant therapeutic effect of hypothermia yet, and have to be completed by further studies. Finally, we suggested a technological solution, with the development of an implantable cooling device for a clinical application. Ultimately, our work showed that hypothermia maintained tumor cells dormant in a durable manner, arresting their proliferation without inducing cell death. This thesis work confirms the therapeutic interest of hypothermia in the treatment of glioblastoma, and provides a solid basis for future preclinical *in vivo* studies.

Keywords: Cancer, glioblastoma, therapeutic hypothermia, local cooling, innovative therapy, adjuvant therapy, dormancy, cell culture, astrocytes, *ex vivo* culture, medical device, implantable device, brain, neurosciences, central nervous system (CNS)