Sensibilisation des glioblastomes au Témozolomide par des siRNA transportés par des nanocapsules lipidiques

Khaled Messaoudi

▶ **To cite this version:**

Khaled Messaoudi. Sensibilisation des glioblastomes au Témozolomide par des siRNA transportés par des nanocapsules lipidiques. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2014. Français. NNT : 2014ANGE0049 . tel-03357661

HAL Id: tel-03357661

https://theses.hal.science/tel-03357661v1

Submitted on 28 Sep 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.

l'université nantes angers le mans
PÔLE DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR

université angers

Thèse de Doctorat

Khaled MESSAOUDI

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

École doctorale : *Biologie santé*

Discipline : *Sciences pharmaceutiques*
Spécialité : *Pharmacologie expérimentale et clinique*
Unité de recherche : *INSERM U1066, MINT, 4 Rue Larrey, 49933 Angers cedex 3*

Soutenue le *14 Novembre 2014*
Thèse N° : *1451*

Sensibilisation des glioblastomes au Témozolomide par des siRNA transportés par des nanocapsules lipidiques

JURY

Rapporteurs :	**Dr Sylvie CRAUSTE-MANCIET**, Maitre de conférences, Université de Bordeaux **Dr Christine VAUTHIER**, Directeur de Recherche, Université Paris-Sud 11
Examinateur :	**Pr Alf LAMPRECHT,** Professeur d'Université, Université de Franche-Comté - Besançon
Directeur de Thèse :	**Pr Frédéric LAGARCE**, Professeur d'Université, Université d'Angers
Co-directeur de Thèse :	**Pr Patrick SAULNIER**, Professeur d'Université, Université d'Angers

2013-2014
Thèse de Doctorat
Spécialité : Neurosciences
Ecole doctorale biologie santé

Sensibilisation des glioblastomes au Témozolomide par des siRNA transportés par des nanocapsules lipidiques

Khaled MESSAOUDI

Sous la direction des Professeurs
Frédéric LAGARCE et Patrick SAULNIER

Membres du jury
Dr Sylvie CRAUSTE-MANCIET | Rapporteur
Dr Christine VAUTHIER | Rapporteur
Pr Alf LAMPRECHT | Examinateur

Soutenu publiquement le :
14 Novembre 2014

université angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :

- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à présenter mes sincères remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Pierre Benoit, directeur de l'unité INSERM 1066, pour son accueil, sa disponibilité et les conseils qu'il m'a donnés pour faire ce travail.

A Monsieur le Professeur Fréderic Lagarce, directeur de cette thèse, pour son encadrement, la confiance qu'il m'a accordée pour la réalisation de ce travail ainsi que pour sa sympathie envers moi.

A Monsieur le Professeur Patrick Saulnier, co-directeur de thèse pour les conseils qu'il m'a donnés pour l'avancement de ma thèse, pour son enthousiasme, son optimisme et sa sympathie.

A Madame le Docteur Christine Vauthier et à Madame le Docteur Sylvie Crauste-Manciet d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et de consacrer du temps à l'évaluation de ce travail en qualité de rapporteurs.

A Monsieur le Professeur Alf Lamprecht, de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury

Je tiens aussi à remercier chaleureusement les Professeurs Bruno Chauffert et Arnaud Beduneau pour leurs conseils prodigués lors des comités de suivi de thèse qui m'ont permis d'avancer ce travail.

Je tiens aussi à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude envers la Ligue contre le cancer pour le financement de ce travail

Je remercie toute l'équipe de l'unité INSERM 1066 et les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, particulièrement :

Anne Clavreul pour les conseils avisés et l'aide précieuse que j'ai pu obtenir de ta part tout au long de cette thèse ce qui a permis à ce travail d'aboutir.

Nolwenn pour ta sympathie, ton dynamisme et ton aide précieuse notamment pour la partie HPLC et pour avoir réparé à deux reprises mes ordinateurs.

Florian pour les bonnes soirées, pour les musiques que tu publiais régulièrement et pour ton style inimitable, tes fouchinades, ne changes rien.

Jérôme, tu es quelqu'un de bien, merci pour ta sympathie, ta disponibilité, tu mérites d'être heureux je te souhaite que du bonheur avec Céline.

JP, merci pour tout ce que t'as fait pour moi mon ami, les soirées chez toi sur un fond latino me manqueront.

Emmanuel, merci pour tes encouragements et tes conseils scientifiques très utiles pour l'avancement de ce travail.

Edith, notre secrétaire, merci pour ta gentillesse et merci de m'avoir aidé à passer mes commandes, parfois urgentes…

Nathalie, Sylvie, Laurence, Laurent, Guillaume et Emilie, merci pour votre sympathie, votre gentillesse et votre écoute.

Clément, merci pour ton aide précieuse, notamment en immuno-marquage, je te souhaite plein de réussite.

Un grand merci à l'équipe de mon bureau :

Anne-Claire, t'es vraiment cool comme fille, merci de m'avoir soutenu et de m'avoir remonté le moral pendant ces 3 années de thèse. Je me souviendrai de tes retards légendaires et ta phrase qui tue (tu m'attends j'en ai pour 30 secondes). J'attends mon invitation au mariage avec Mr Leybros pour le voir en costume blanc.

Angélique alias Suppo, ton arrivée au bureau nous a permis de retrouver la bonne humeur, tes discussions de très haut niveau sur Etam, l'épilation, les régimes vont me manquer. T'as transformé notre bureau en standard téléphonique. T'as beaucoup de qualités mais tu n'es pas sortable on est grillé dans tous les restaurants d'Angers. T'inquiètes pas l'année prochaine ça sera ton tours, je serai là pour ta thèse qui sera de bonne qualité j'en suis sûr.

Audrey, t'es une fille géniale j'ai mis du temps à m'habituer à ton départ du laboratoire. T'as beaucoup de qualités notamment ta générosité et ta volonté sans limites d'aider les gens. Ton énergie me surprendra toujours surtout quand tu lançais une machine à 4h du matin après un boléro.

Pauline, tes qualités humaines et professionnelles t'ont permis de surmonter les obstacles même quand les stagiaires étaient mous !!!! Je te souhaite plein de bonnes choses dans ta vie professionnelle et personnelle. J'espère que tu réaliseras ton rêve de devenir médecin.

REMERCIEMENTS

Claire, on n'a pas perdu au change lorsque t'as pris la place de Dédé, ta disponibilité, tes conseils et ta sympathie ne sont plus à prouver. J'espère qu'un jour je pourrais voir PIPOU en vrai car pour l'instant il reste un mythe pour moi.

Je tiens à remercier également :

Gaël, mon co-interne, grâce à toi, on a été deux IPR au labo ! Le centre antipoison a gagné un assistant de qualité. Je suis certain que ta thèse sera à la hauteur de ta thèse d'exercice. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Delphine, ton rire légendaire qui faisait trembler l'IRIS me manquera, ta volonté et ta détermination t'ont permis de mener à bien ton travail. Bon courage pour cette dernière ligne droite, je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Amine, mon ami Syrien, les longues discussions qu'on a eues ensemble sur notre future conversion dans la chanson Rai me font encore rire. Tu m'as converti à la nourriture syrienne. J'espère que la situation s'améliorera en Syrie et que tu pourras fêter la fin de ta thèse avec tes proches.

Fabien, merci pour ta disponibilité et ta volonté d'aider quand on a besoin de toi. Bon courage pour ta fin de thèse et j'espère être là pour ta soutenance.

Leila, les soirées passées au laboratoire à faire et à refaire tes manips t'ont permis de faire l'une des meilleures thèses du laboratoire. Tu as apporté une touche féminine au groupe du CO_2. Merci pour les discussions sur la fac centrale et les discussions d'Algériens qu'on a eu durant tes années de thèse.

Gabi, dommage que tu ne sois pas là pour ma soutenance. Merci pour les fous rires qu'on a eu ensemble pendant tes deux stages au laboratoire. Tu as gagné en maturité au fur à mesure de la thèse. Je te promets de passer te voir en Argentine si j'ai l'occasion d'y aller un jour.

Un grand merci à Giovanna, Hélène, Marion, Swan, Emilie, Thomas pour votre sympathie et votre gentillesse

Un grand merci aussi à mes stagiaires Kim et Guillaume pour leur patience et leur curiosité qui ont été nécessaires au début de cette thèse.

Je tiens à remercier Fabienne pour l'aide précieuse que tu m'as apportée lors de la partie *vivo*, même si ce n'était pas gagné au départ à cause du timing serré.

Mes amis internes en pharmacie en particulier :

Clément, tu es mon ami depuis le début de l'internat (enfin depuis qu'on s'est posé la question : mais que fait Jacky?), merci pour les bons moments passés ensemble. Ta phrase culte « je suis quelqu'un de très important » résonnera longtemps dans ma tête.

Amandine, Aurélien, Geoffrey, Ingrid, Hélène, Lucile, Guillaume, Marie, merci pour tous les bons moments passés ensemble.

Mes parents, ma famille et ma belle-famille pour leur soutien inconditionnel.

Le dernier remerciement est pour toi, Caroline, merci d'être à mes côtés tous les jours, merci pour ton soutien et pour tes conseils précieux qui m'ont permis de tenir bon et de venir à bout de cette thèse.

Liste des principales abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago-2	Endonucléase Argonaute-2
AIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide
5-ALA	acide 5-aminolévulinique
APE 1 et 2	Endonucléase AP
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interference
ARNm	ARN messager
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	barrière hématoencéphalique
CED	Convection-Enhanced Delivery
CRD	Carbohydrate-Recognition-Domain
DAG	Diacylglycerol
DexAMs	cyclodextrin-modified dendritic polyamines
DID	1,1′-Dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
dRPase	DNA-deoxyribophosphodiesterase
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPR	Enhanced Permeability and Retention
ERK1 et ERK2	Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FEN1	Flap endonuclease 1
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GBM	Glioblastome
GDP	Guanosine Di-Phosphate
GTP	Guanosine Tri-Phosphate
GRAS	Generally Recognized as Safe
HER	Human EGF Receptor related
HIF-1	Hypoxia Inductible Factor 1
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IDH-1	Isocitrate Déshydrodenase-1
IL-6	Interleukine 6
IP3	Inositol triphosphate

IP	Intrapéritonéale
ITK	Inhibiteur des Tyrosines kinases
IV	Intraveineuse
JAK	Janus kinases
LCR	liquide céphalorachidien
LNA	Locked Nucleic Acids
LNCs	nanocapsules lipidiques
LMC	leucémie myéloïde chronique
LOH	Loss of Heterozygosity
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinases
Mdm2	Murine double minute 2
MEK1 et MEK2	MAPK-ERK-Kinases 1 et 2
MGMT	O6 méthyl guanine DNA méthyl transférase
miRNA	micro-RNA
MMR	DNA Mismatch Repair
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MTIC	3-methyl-(triazen-1-yl) imidazole-4-carboxamide
m-TOR	mammalian-Target Of Rapamycine
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazo-lium bromide
NAD+	nicotinamide adénine dinucléotide
O6-BG	O6-benzyl guanine
O6-MeG	O6 méthyl guanine
2'-OMe	Groupement 2'-O-méthyl
OGM	Organismes Génétiquement Modifiés
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPA	O-Phthalaldehyde
ORP 150	Oxygen Regulated Protein
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase-1
PAR	Poly (ADP-ribose)
PDK1	Phosphatidylinositol-3-Dependent protein Kinase 1
PEG	Polyéthylène glycol
PEI	Polyéthylène imine
P-gp	P-glycoprotéine
PI3K	PhosphatidylInositol-3-Kinase
PIP2	PhosphatitylIinositol-4,5-biPhosphate
PIP3	PhosphatidylInositol-3,4,5-triPhosphate
PKC	Protéine kinase-C
PLC	Phospholipase C

pré-miRNA	precursor miRNA
pri-miRNA	transcrits primaires
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PTB	Phosphotyrosine Binding
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
RISC	RNA induced silencing complex
RT	Radiothérapie
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
siRNA	Small Interfering RNA
SRE	système réticulo-endothélial
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	Sérum de veau fœtal
TGFα	Transforming Growth Factor alpha
TLRs	Toll-like receptors
TMZ	Témozolomide
TNFα	tumor necrosis factor α
3' UTR	3' Untranslated Region
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Altérations génétiques et moléculaires dans les GBMs primaires et secondaires 3
Figure 2: Structure de la carmustine 4
Figure 3: Structure et mécanisme d'action du TMZ 5
Figure 4: Mécanisme de réparation de l'ADN par le système MMR 6
Figure 5: Les voies de signalisation de l'EGFR 9
Figure 6: Implication de la galectine-1 dans la pathogénie des gliomes 12
Figure 7: Mécanisme de l'ARNi 15
Figure 8: Modifications chimiques apportées à la structure des ARN interférents 19
Figure 9: Exemple de quelques vecteurs utilisés pour la délivrance des ARN interférents 21
Figure 10: Schéma représentatif de l'effet EPR dans les vaisseaux sanguins tumoraux 22
Figure 11: A- procédé d'inversion de phase, B- structure des nanocapsules lipidiques (LNCs) 23
Figure 12: Time schedule of combined treatments and MRI. 68
Figure 13: Orthotopic U87MG tumor growth.. 70
Figure 14: Kaplan-Meier survival rates of U87MG tumor-bearing mice. 71
Figure 15: Evaluation by immunofluorescence of EGFR production decrease in U87MG tumor-bearing mice after siRNA treatment 72
Figure 16: Evaluation by immunofluorescence of Galectin-1 production decrease in U87MG tumor-bearing mice after siRNA treatment 73
Figure 17: Images en microscopie à fluorescence des cellules U87MG traitées par des chitosan-LNCs-DID pendant 6 h (A) et 96 h (B) 78
Figure 18: Images en microscopie à fluorescence des cellules U87MG traitées pendant 48 h par des chitosan-LNCs (A) et chitosan-LNCs/siRNA-FITC (B). 78
Figure 19: Stabilité des complexes siRNA/chitosan-LNCs dans l'eau RNAse free et le DMEM 82
Figure 20: Pic de dosage du TMZ par HPLC, obtenu dans le surnageant de la suspension de LNCs. 85
Figure 21: Injection stéréotaxique des cellules tumorales dans le cerveau de souris *Swiss Nude* 86
Figure 22: Injection par CED des traitements par siRNA à des souris *Swiss Nude* 88

Tableau 1: Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 1
Tableau 2: Essais cliniques utilisant la technologie d'ARNi dans les cancers 17
Tableau 3: Anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNA sequences 67
Tableau 4: Physico-chemical characterization of siRNA/chitosan-LNCs complexes 70

SOMMAIRE

INTRODUCTION **1**

1. GLIOMES 1

1.1. Classification des gliomes *1*

1.2. Glioblastomes (GBMs) *2*

1.2.1. Caractéristiques génétiques et moléculaires des GBMs 2

1.2.2. Traitement des GBMs 3

a) La chirurgie 3

b) La radiothérapie 3

c) La chimiothérapie 4

Les nitroso-urées 4

Les dérivés des imidazotétrazines 4

2. CAUSES DE RESISTANCE DES CELLULES TUMORALES GLIALES AU TEMOZOLOMIDE 5

2.1. Mécanismes de réparation de l'ADN *5*

2.1.1. O-6 méthyl guanine méthyl transférase (MGMT) 5

2.1.2. Système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) 6

2.1.3. Système de réparation par excision de bases (BER) 7

2.2. Molécules impliquées dans l'inhibition de l'autophagie cellulaire *7*

2.2.1. Récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) 7

a) Structure de l'EGFR 7

b) Mode d'action et transduction du signal 7

Voie Ras/Raf/MAPK 8

Voie PI3K/Akt/m-TOR 8

Voie JAK/STAT 8

Voie de la PLC 9

2.2.2. p53 et Mdm2 9

2.2.3. Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) 10

2.2.4. La galectine-1 10

a) La migration cellulaire 10

b) L'angiogenèse 11

c) La résistance aux chimio- et radiothérapies 11

d) L'échappement au système immunitaire 12

2.3. Mécanismes de résistance par les miRNA *12*

3. MOLECULES TESTEES EN ESSAIS CLINIQUES AVEC LE TMZ POUR LE TRAITEMENT DES GBMS 13
4. INTERFERENCE ARN (ARNI) 14
4.1. Utilisation de l'ARNi dans les cancers 16
4.2. Limites à l'utilisation des ARNi en clinique 17
4.2.1. Effet Off-Target 17
4.2.2. Stimulation de la réponse immunitaire 18
4.2.3. Saturation de la machinerie enzymatique cellulaire 18
4.2.4. Problème de délivrance des ARN interférents 18
4.3. Délivrance des ARN interférents 18
4.3.1. Modifications chimiques des ARN interférents 18
a) Les modifications chimiques sur les nucléotides 19
b) Les modifications qui affectent les parties terminales des ARN interférents 20
4.3.2. Vecteurs utilisés pour le transport des ARN interférents 20
a) Les vecteurs viraux 20
b) Les vecteurs non viraux 20
4.3.3. Le vecteur étudié : les nanocapsules lipidiques (LNCs) 22

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 24

OBJECTIFS GENERAUX DU TRAVAIL EXPERIMENTAL 37

CHAPITRE 1 :

CONCEPTION D'UN VECTEUR DE SIRNA 38

CHAPITRE 2 :

EFFET DE LA COMBINAISON DES SIRNAS SUR LA SENSIBILITE DES CELLULES TUMORALES AU TMZ 52

CHAPITRE 3 :

EVALUATION DE L'EFFICACITE *IN VIVO* DES SIRNA ANTI-EGFR ET ANTI-GALECTINE-1 TRANSPORTES PAR LES CHITOSAN-LNCS 62

DISCUSSION GENERALE ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES 75

1. CONCEPTION DES NANOCAPSULES LIPIDIQUES TRANSACYLEES AU CHITOSAN POUR LE TRANSPORT DES SIRNA 76
1.1. Formulation et caractérisation physicochimique 76
1.2. Capacité de pénétration cellulaire 77
2. CHOIX DU MODELE CELLULAIRE 79

3. ESSAIS *IN VITRO* 80
3.1. Efficacité de transfection des siRNA *80*
3.2. Détermination des doses de TMZ à tester *82*
3.3. Effet du traitement des cellules U87MG par siRNA sur leur sensibilité au TMZ *82*
3.4. Encapsulation du TMZ *83*
3.4.1. Analyse de l'encapsulation du TMZ dans les LNCs de plurol 84
3.4.2. Modification de la surface des LNCs de plurol chargées en TMZ par transacyltion 85
4. ESSAIS *IN VIVO* 85
4.1. Implantation stéréotaxique des tumeurs *86*
4.2. Choix de la voie d'administration des complexes siRNA/ chitosan-LNCs *87*
4.3. Choix du schéma de traitement *88*
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES **91**
BIBLIOGRAPHIE **94**

INTRODUCTION

1. Gliomes

Les gliomes représentent plus de 50 % des tumeurs cérébrales primitives et sont de loin les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte (Lefranc et al., 2005; Lefranc et al., 2006). Ces tumeurs touchent les cellules gliales qui jouent de nombreux rôles en particulier le soutien, l'apport des nutriments aux neurones ainsi que le maintien de l'homéostasie cérébrale. Il existe trois types de cellules gliales: les astrocytes, les oligodendrocytes et les épendymocytes. Selon le type de cellules gliales qui prolifèrent, les gliomes peuvent être des astrocytomes, des oligodendrogliomes ou des épendymomes (Louis et al., 2007). Des gliomes mixtes résultent de la prolifération tumorale de plusieurs types de cellules gliales (oligoastrocytomes) (Louis et al., 2007).

1.1. Classification des gliomes

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé les gliomes en quatre grades de I à IV sur la base des critères histologiques tels que l'atypie cytologique, l'anaplasie, l'activité mitotique, la prolifération micro-vasculaire et la nécrose (Louis et al., 2007) (Tableau 1).

Les tumeurs gliales de grade I sont des astrocytomes pilocytiques bien délimités et sont considérées comme bénignes car curables par chirurgie. Les tumeurs appartenant aux grades II à IV sont diffuses et capables d'envahir le parenchyme cérébral et sont considérées, de ce fait, comme des tumeurs malignes. Les gliomes de grade II, fréquents chez l'adulte jeune, regroupent les oligoastrocytomes, les oligodendrogliomes ainsi que des astrocytomes. Ils présentent une faible activité mitotique et une tendance à l'infiltration et évoluent lentement vers les astrocytomes anaplasiques puis vers les glioblastomes multiformes. Les gliomes de grade III regroupent les oligodendrogliomes anaplasiques, les oligoastrocytomes anaplasiques et les astrocytomes anaplasiques. Ils ont une forte activité mitotique et un caractère infiltrant important. Les gliomes de grade IV regroupent les glioblastomes multiformes qui se caractérisent par la présence de zones nécrotiques, une grande activité mitotique et une angiogenèse importante.

Tableau 1: Classification des gliomes selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)

Gliomes	Grade	Caractéristique	Type de gliomes
Astrocytomes pilocytiques	I	Bénins	❖ Astrocytomes
Bas grade	II	Malins	❖ Oligoastrocytomes ❖ Oligodendrogliomes ❖ Astrocytomes
Haut grade	III	Malins	❖ Oligodendrogliomes anaplasiques ❖ Oligoastrocytomes anaplasiques ❖ Astrocytomes anaplasiques
Haut grade	IV	Malins	❖ Glioblastome multiforme

1.2. Glioblastomes (GBMs)

Les GBMs sont les tumeurs gliales les plus indifférenciées, les plus fréquentes (représentent 60 % des gliomes) et les plus agressives (Stupp et al., 2009). Elles présentent le plus mauvais pronostic avec une survie moyenne d'environ 14 mois (Lefranc et al., 2006). De plus, la survie à 5 ans chez les patients atteints de cette pathologie est inférieure à 10 % (Stupp et al., 2009).

Les cellules de GBM ont une capacité d'infiltration importante au sein du tissu cérébral ce qui provoque une réaction inflammatoire qui engendre un œdème qui aboutit à une hypertension intracrânienne. Les GBMs peuvent naitre spontanément et se développer rapidement et sont dits primaires (de novo) ou bien progressent depuis des gliomes de bas grades et sont dits secondaires (Ohgaki and Kleihues, 2007).

Histologiquement les GBMs primaires et secondaires sont en grande partie indiscernables, mais ils diffèrent dans leur profil génétique et épigénétique (Ohgaki and Kleihues, 2007).

1.2.1. Caractéristiques génétiques et moléculaires des GBMs

Les GBMs sont caractérisés par de nombreuses altérations génomiques, en particulier les pertes d'hétérozygotie (LOH) (Loss of Heterozygosity) ou les gains chromosomiques. La délétion la plus fréquente concerne le chromosome 10 qui peut toucher la totalité du chromosome ou seulement le bras court 10p ou le bras long 10q (Ohgaki and Kleihues, 2007).

L'amplification du gène de l'EGFR est l'anomalie génétique la plus présente dans les GBMs primaires avec une fréquence d'environ 40 à 60% (Ekstrand et al., 1991; Gan et al., 2009). De plus, des réarrangements de ce gène sont présents dans plus de 50% de ces tumeurs surexprimant l'EGFR (Ekstrand et al., 1992; Gan et al., 2009). Ceci entraine la présence concomitante au sein de ces cellules de GBMs de la forme sauvage et de la forme mutée de l'EGFR (Ekstrand et al., 1992; Gan et al., 2009). La mutation la plus fréquente est liée à la perte des exons 2 à 7 du gène de l'EGFR, ce qui aboutit à une délétion de 267 acides aminés du domaine extracellulaire du récepteur. Cette forme mutée de l'EGFR nommée variant III de l'EGFR (EGFRvIII) échappe à tout contrôle de la part des ligands tels que l'EGF et possède la capacité de s'activer par autophosphorylation et de stimuler les voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (Lo, 2010).

Des mutations de gènes suppresseurs de tumeurs tels que le *TP53* qui joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire sont décrites dans les GBMs et sont plus fréquentes dans les formes secondaires (Ohgaki and Kleihues, 2007; Zheng et al., 2008) (Figure 1). Les mutations du gène *PTEN* qui produit l'enzyme PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) et qui est un inhibiteur de la voie des PI3K/Akt/m-TOR, sont plus fréquentes dans les GBMs primaires (Kato et al., 2000; Knobbe et al., 2002) (Figure 1).

La mutation du gène de l'IDH-1 (Isocitrate Déshydrodenase-1) qui catalyse la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α-cétoglutarate est une autre mutation présente dans les GBMs, elle est peu fréquente dans les GBMs primaires et est présente dans environ 50% des GBMs secondaires (Ichimura et al., 2009). Cette mutation est associée à une augmentation de la survie des patients atteints de GBMs primaires par rapport à ceux qui ne présentent pas cette mutation (Hartmann et al., 2013; Stupp et al., 2014).

Des altérations génétiques concernent aussi le gène $p16^{INK4a}$ impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. Il s'agit de délétions homozygotes fréquentes dans les GBMs primaires (Ohgaki and Kleihues, 2007) (Figure 1).

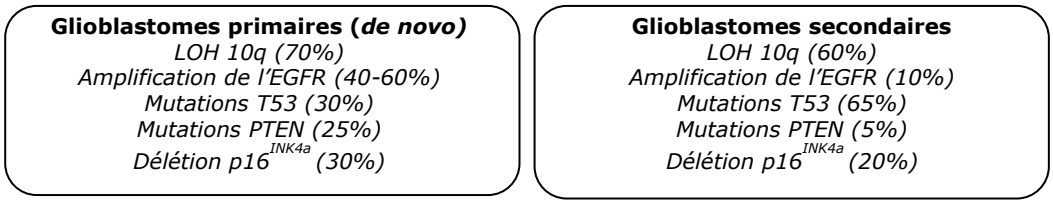

Figure 1: Altérations génétiques et moléculaires dans les GBMs primaires et secondaires (Ohgaki and Kleihues, 2007)

1.2.2. Traitement des GBMs

a) La chirurgie

Le traitement de ces tumeurs malignes repose en première intention sur l'exérèse chirurgicale (Weller et al., 2014). La décision de réaliser cet acte est prise en tenant compte de plusieurs facteurs tels que l'âge du patient, son état général, ainsi que la localisation de la tumeur. Les propriétés d'invasion diffuse des GBMs rendent impossible leur résection chirurgicale totale, ce qui rend indispensable l'utilisation d'autres thérapies associées afin de limiter le développement tumoral. La précision de la résection tumorale est d'une importance capitale pour le patient afin d'éviter l'apparition de troubles neurologiques souvent irréversibles (troubles de la parole, paralysies, troubles de la vision,… etc.), notamment lorsque la tumeur est située dans ces centres vitaux. L'apparition de nouvelles techniques chirurgicales telles que la neuronavigation a permis aux neurochirurgiens de réaliser des résections tumorales guidées par imagerie avec un taux minimum de morbidité neurologique post-opératoire (Weller et al., 2014). D'autre part, l'utilisation de traceurs fluorescents tels que l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), capté par les cellules tumorales et transformé en composé fluorescent (protoporphyrine IX) visualisé en utilisant un système d'observation approprié, permet de délimiter les marges de la tumeur (Stummer et al., 2006). L'utilisation du 5-ALA a augmenté la survie sans progression des patients atteints de GBMs et est devenu de ce fait un outil indispensable pour le traitement de ces tumeurs malignes (Stummer et al., 2006; Weller et al., 2014).

b) La radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional qui utilise des rayonnements ionisants tels que les rayons X pour causer des dommages au niveau de l'ADN des cellules cancéreuses, ce qui perturbe leur division.

Le cerveau est un organe radiosensible qui ne peut supporter des doses supérieures à 60 Gy. Cependant, les GBMs sont des tumeurs hautement résistantes à la radiothérapie en raison de la mise en place au sein des cellules tumorales gliales de mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que l'altération très fréquente des voies de l'apoptose. Il faut noter aussi que l'hypoxie qui règne au sein du foyer tumoral entraine l'apparition d'une nécrose qui joue un rôle majeur dans cette radiorésistance. L'enjeu dans le traitement de ces tumeurs est d'augmenter l'efficacité des radiothérapies tout en limitant la toxicité vis-à-vis du parenchyme cérébral sain.

Les effets secondaires causés par cette thérapie sont variés (fatigue, perte d'appétit nausées, vomissements, réactions cutanées et chute de cheveux).

La radiothérapie est post-chirurgicale (quand l'exérèse tumorale est possible), exclusive ou associée à la chimiothérapie. La dose de radiothérapie atteint 60 Gy et est souvent fractionnée sur 6 semaines (5 jours de traitement par semaine) à raison de 2 Gy par jour (Weller et al., 2014).

c) La chimiothérapie

Les drogues anticancéreuses sont utilisées en association à la radiothérapie dans le but d'obtenir une synergie d'action et de réduire le risque d'émergence de clones cellulaires résistants à une des deux modalités. Les molécules les plus utilisées dans le traitement des GBMs appartiennent à la famille des nitroso-urées et aux imidazotétrazines.

Les nitroso-urées

Les drogues de cette famille sont parmi les plus utilisées dans la prise en charge des gliomes de haut grade en association avec la radiothérapie. La 1,3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourée (Carmustine ou BICNU®) est le représentant principal de cette famille, elle agit par alkylation de l'ADN (Figure 2). Elle est administrée par voie intraveineuse à une posologie de 150 à 200 mg/m^2 de surface corporelle toutes les 6 semaines et traverse facilement la barrière hémato-encéphalique en raison de sa grande liposolubilité. Dans le GBM, la Carmustine est utilisée sous forme d'implants (Gliadel®), qui sont placés à l'intérieur de la cavité formée suite à la résection de la masse tumorale et vont diffuser de la Carmustine dans le tissu cérébral environnant et produire ainsi un effet antinéoplasique (Bock et al., 2010; Westphal et al., 2003). Le Gliadel® peut être utilisé en première intention ou en deuxième ligne suite à une récidive. Son association à la radiothérapie a montré une efficacité supérieure à la radiothérapie seule (Ramirez et al., 2013; Weller et al., 2014). Le Gliadel® a été aussi associé au témozolomide (TMZ) (McGirt et al., 2009; Salmaggi et al., 2011) pour le traitement des GBMs. Cependant, la survie des patients n'a pas été significativement augmentée par rapport à l'association du TMZ à la radiothérapie (Ramirez et al., 2013; Weller et al., 2014).

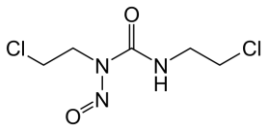

Figure 2: Structure de la carmustine

Les dérivés des imidazotétrazines

Le TMZ est, à l'heure actuelle, considéré comme la molécule de référence dans le traitement du GBM. Cet agent alkylant est une prodrogue stable à pH acide (Pletsas et al., 2013), il subit une hydrolyse chimique rapide au pH physiologique et donne un composé actif qui est le 3-methyl-(triazen-1-yl) imidazole-4-carboxamide (MTIC) qui va réagir avec l'eau pour donner le 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) et un cation methyldiazonium très instable (t½ = 0.4 s) et hautement réactif (Figure 3). Ce composé agit par méthylation des bases puriques de l'ADN en positions O^6 et N^7 pour les guanines et en N^3 pour les adénines (Denny et al., 1994; Friedman et al., 2000).

Les méthylations en O^6 représentent environ 5% du total des lésions causées par le TMZ (Friedman et al., 2000). Les méthylations en N^7 et N^3 représentent respectivement 80-85 % et 8-18 % du total des alkylations (Zhang et al., 2012). Cependant, malgré leur faible taux, les méthylations en O^6 sont les plus toxiques (Drablos et al., 2004).

L'utilisation du TMZ en association à la radiothérapie a augmenté significativement la durée de vie des patients atteints de GBM (Stupp et al., 2009; Weller et al., 2014). En effet, le taux de survie à 2 ans des patients traités par la radiothérapie seule est de 10 % alors que ce taux dépasse 25 % lorsque le TMZ est administré dès le début de la radiothérapie. Cet agent alkylant pro-autophagique est utilisé dès le début de la radiothérapie à la posologie de 75 mg/m^2 de surface corporelle de façon quotidienne pendant 6 semaines. A la fin de cette période, il sera utilisé seul à la posologie de 150 à 200 mg/m^2 sur 5 jours tous les 28 jours. Le nombre de cycles de traitement par TMZ seul peut atteindre 6 cycles en fonction de la réponse thérapeutique et de la toxicité hématologique observées (Omar and Mason, 2009).

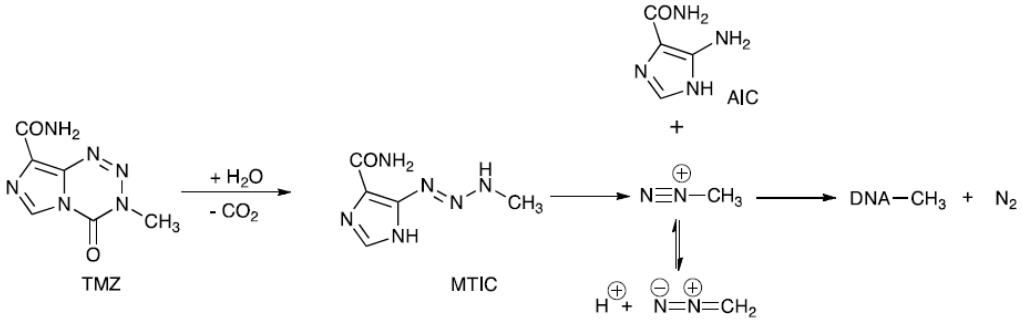

Figure 3: Structure et mécanisme d'action du TMZ (Ramirez et al., 2013).

2. Causes de résistance des cellules tumorales gliales au témozolomide

La résistance des GBMs au TMZ est fréquente, ce qui explique le mauvais pronostic de ces tumeurs. Les causes de cette résistance sont variées. Elles regroupent notamment des mécanismes de réparation de l'ADN, des mécanismes d'inhibition de l'autophagie cellulaire nécessaire à l'activité du TMZ et des mécanismes de résistance liés à l'activité des micro-RNA (miRNA).

2.1. Mécanismes de réparation de l'ADN

2.1.1. O-6 méthyl guanine méthyl transférase (MGMT)

Cette enzyme de réparation de l'ADN est le principal mécanisme de résistance des cellules tumorales gliales au TMZ (Silber et al., 2012). En effet, cette enzyme est capable de retirer directement le groupement méthyl fixé sur les guanines en O^6, ce qui restaure le brin d'ADN et rend le TMZ inefficace (Park et al., 2012). La MGMT agit comme une enzyme suicide qui fixe le groupement méthyl dans la poche catalytique sur la cystéine en position 145 ce qui cause son inactivation (Tubbs et al., 2007). L'expression de cette enzyme est corrélée au degré de méthylation du promoteur du gène de la MGMT. En effet, l'hyper-méthylation de ce promoteur rend le gène de la MGMT silencieux, ce qui permet d'obtenir une meilleure réponse au TMZ et offre ainsi un meilleur pronostic aux patients par rapport à ceux qui ne possèdent pas ce profil de méthylation (Bhakat and Mitra, 2003; Silber

et al., 2012). La méthylation du promoteur MGMT peut être considérée comme un facteur prédictif important de réponse au traitement standard des GBMs nouvellement diagnostiqués. Cependant, certains patients n'exprimant pas la MGMT sont de mauvais répondeurs au TMZ tandis que d'autres exprimant la MGMT répondent mieux au TMZ et survivent plus longtemps. Ceci indique que d'autres mécanismes de contrôle de l'effet TMZ existent (Blough et al., 2011).

2.1.2. Système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR)

Le MMR est un système qui corrige les erreurs de mésappariements des bases nucléotidiques générées lors de la synthèse de l'ADN (Zhang et al., 2012). Dans ce système, il y a deux complexes qui sont le résultat des gènes *MSH* reconnaissant les mésappariements. Il s'agit de MutSα qui regroupe MSH2 à MSH6 et de MutSβ qui regroupe MSH2 et MSH3 (Zhang et al., 2012). Le complexe MutSα reconnait le mésappariement d'une base avec une autre et peut réparer les boucles de mésappariements qui concernent une ou deux bases alors que MutSβ reconnait et répare des boucles de mésappariements allant jusqu'à 16 nucléotides (Bignami et al., 2003; Christmann et al., 2003) (Figure 4). L'implication de ce système dans la résistance des cellules tumorales au TMZ a été abordée dans la revue bibliographique (voir page 25 du manuscrit).

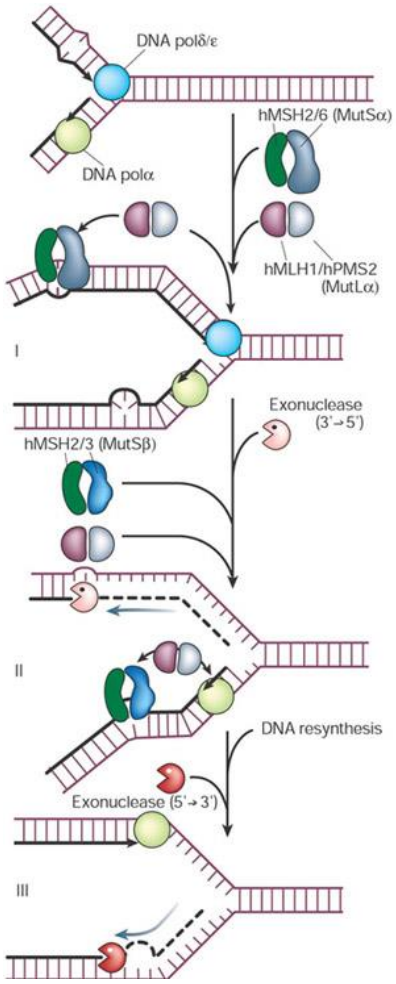

Figure 4: Mécanisme de réparation de l'ADN par le système MMR (Hoeijmakers, 2001)

2.1.3. Système de réparation par excision de bases (BER)

Ce système intervient dans la réparation des lésions de l'ADN causées par des agents oxydants, des radiations ionisantes et des agents alkylants (Almeida and Sobol, 2007; Wilson and Bohr, 2007; Wood et al., 2001). Son implication dans la résistance au TMZ est discutée dans la revue bibliographique (voir page 25 du manuscrit).

2.2. Molécules impliquées dans l'inhibition de l'autophagie cellulaire

2.2.1. Récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR)

a) Structure de l'EGFR

L'EGFR est un récepteur de 170 KDa à activité tyrosine kinase. Il appartient à la famille des HER (Human EGF Receptor related), ses ligands préférentiels sont l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGFα (Transforming Growth Factor alpha)(Nyati et al., 2006). Il est composé de trois domaines: extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire, ce dernier exerce l'activité tyrosine kinase (Yarden, 2001).

Le domaine N-terminal extracellulaire de l'EGFR est constitué de 621 acides aminés (Nyati et al., 2006), il est divisé en quatre sites (I, II, III, IV) (Normanno et al., 2006). Les parties I et III sont les sites de liaison avec les ligands, le domaine II contient un bras de dimérisation qui permet grâce à des interactions récepteurs-récepteurs de dimériser l'EGFR suite à la fixation d'un ligand sur le récepteur. Le domaine transmembranaire est constitué de 23 acides aminés qui permettent l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique de la cellule. La région intra-cytoplasmique est constituée de 542 acides aminés et est divisée en trois parties : la partie juxtaposée à la membrane plasmique, la partie centrale contenant le domaine à activité tyrosine kinase responsable de la transphosphorylation des 6 résidus tyrosyls situés dans la partie carboxy-terminale. Le domaine C-terminal est le siège de la phosphorylation des sites tyrosyls nécessaires au recrutement des protéines adaptatrices ou effectrices possédant le domaine SH2 (Src Homology Domain 2) ou PTB (Phosphotyrosine Binding) dont le rôle est la transduction du signal au noyau cellulaire, via une série de phosphorylations, suite à la fixation du ligand sur l'EGFR, ce qui conduit à l'activation de certains gènes impliqués notamment dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose et de l'autophagie cellulaires (Normanno et al., 2006).

b) Mode d'action et transduction du signal

Avant la liaison du ligand sur son site de fixation, le récepteur est à l'état monomérique, le site d'activation situé au sein du domaine intra-cytoplasmique à activité tyrosine kinase adopte une conformation qui empêche la fixation de l'ATP. La modification conformationelle engendrée par la fixation du ligand dévoile le site de fixation de l'ATP et permet la dimérisation du récepteur (Normanno et al., 2006). La dimérisation du domaine cytoplasmique est nécessaire à l'activité catalytique et permet de stimuler une phosphorylation croisée entre les deux récepteurs au niveau de 3 à 6 résidus tyrosyls spécifiques du domaine C-terminal. Cette dimérisation peut se dérouler entre deux récepteurs identiques donnant lieu à des homodimères ou entre un EGFR et un autre récepteur de la famille des HER, ce qui aboutit à des hétérodimères (Normanno et al., 2006). L'internalisation des récepteurs dimérisés après fixation du ligand se fait par endocytose et va entraîner leur dégradation ou leur recyclage (Madshus and Stang, 2009).

La transduction du signal au noyau se fait par activation des voies de signalisation Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt/m-TOR, JAK/STAT et la voie de Phospholipase C (PLC) (Figure 5).

Voie Ras/Raf/MAPK

Les protéines Ras appartiennent à la famille des protéines G (Vigil et al., 2010). Ces protéines sont membranaires et se retrouvent ancrées à la face interne de la membrane plasmique par leur extrémité C-terminale. Elles existent sous deux formes : inactives liées au GDP (Guanosine Di-Phosphate) et actives liées au GTP (Guanosine Tri-Phosphate) (Vigil et al., 2010). La phosphorylation du GDP fait suite à l'activation de l'EGFR par l'un de ses ligands. La protéine Ras va activer par phosphorylation la protéine kinase Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) qui va phosphoryler à son tour de multiples résidus sérine sur les MAPK-ERK-Kinases 1 et 2 (MEK1 et MEK2) qui activent à leur tour par phosphorylation les MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases) ERK1 et ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2) (Lièvre and Laurent-Puig, 2010).
Les MAPKs activées vont continuer la cascade de phosphorylation des protéines cytoplasmiques et nucléaires induisant ainsi l'expression de certains proto-oncogènes impliqués dans l'inhibition de l'apoptose et de l'autophagie, la prolifération cellulaire et la migration cellulaire et l'angiogenèse.

Voie PI3K/Akt/m-TOR

Les PI3Ks (PhosphatidylInositol-3-Kinase) sont des sérine/thréonine kinases qui, suite à leur activation par la fixation d'un ligand sur l'EGFR, vont former le PhosphatidylInositol-3,4,5-triPhosphate (PIP3) à partir du PhosphatitylIinositol-4,5- bi Phosphate (PIP2) (Coutte et al., 2012). Une fois formé, le PIP3 qui est lié à la membrane plasmique attire la protéine Akt qui va être activée par phosphorylation par la PDK1 (Phosphatidylinositol-3-Dependent protein Kinase 1). La protéine Akt pourra ainsi activer directement ou indirectement d'autres protéines et facteurs de transcription impliqués essentiellement dans la survie cellulaire tels que la protéine BAD de la famille Bcl-2 qui suite à sa phosphorylation se sépare du complexe Bcl-2/Bcl-X et perd son effet pro-apoptotique. L'enzyme à activité sérine thréonine kinase m-TOR (mammalian-Target Of Rapamycine) peut aussi être la cible d'activation de la protéine Akt, ce qui stimule l'angiogenèse via le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Il existe une interconnexion entre la voie Ras/Raf/MAPK et la voie des PI3K/Akt/m-TOR par le biais de Ras qui peut activer directement la voie des PI3K/Akt/m-TOR.

Voie JAK/STAT

Suite à l'activation cellulaire par une cytokine ou un facteur de croissance tel que l'EGF, la voie de signalisation JAK (Janus kinases)/STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) peut être activée. Ainsi, les protéines JAKs qui possèdent une activité tyrosine kinase vont se fixer à des récepteurs de cytokines et vont entrainer la phosphorylation des résidus tyrosine présents sur ces récepteurs. Ceci permet de créer au sein de ces récepteurs des sites d'interaction avec des protéines renfermant des domaines SH2, telles que les protéines STATS. Ces dernières vont se dimériser et activer par la suite au niveau du noyau cellulaire la transcription de certains gènes impliqués dans la prolifération et la différentiation cellulaires ainsi que dans les mécanismes de l'apoptose (Swiatek-Machado et al., 2012).

Voie de la PLC

Grace à son domaine SH2, la PLC se lie au domaine intracellulaire de l'EGFR et devient ainsi active. Cette enzyme va hydrolyser le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en diacylglycerol (DAG) et en inositol triphosphate (IP3). Le DAG est un cofacteur qui entraine l'activation de la serine/thréonine kinase protéine kinase-C (PKC). Ceci entraine sa migration du cytoplasme vers la membrane plasmique à laquelle elle se lie grâce à des protéines d'ancrage lui permettant d'acquérir sa capacité catalytique, ce qui aboutit à une progression du cycle cellulaire, une transformation et différenciation cellulaires et une inhibition de la mort cellulaire (Nyati et al., 2006; Oliva et al., 2005).

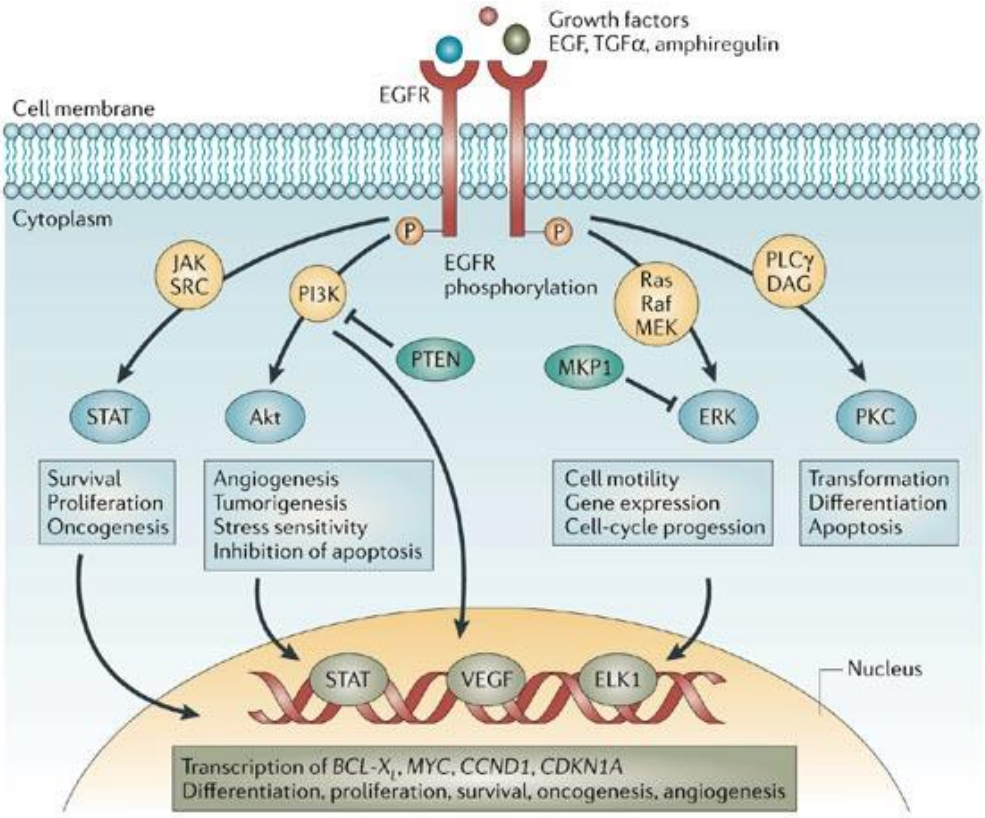

Figure 5: Les voies de signalisation de l'EGFR (Nyati et al., 2006)

2.2.2. p53 et Mdm2

La protéine p53 est un facteur de transcription codé par le gène *TP53* qui agit comme suppresseur de tumeur en contrôlant le cycle cellulaire (Fridman and Lowe, 2003; Shangary and Wang, 2009). En effet, p53 est capable d'arrêter temporairement pour réparation ou définitivement le cycle cellulaire suite à un dommage causé sur l'ADN par une radiation ou un agent chimique tel que le TMZ (Fridman and Lowe, 2003; Shangary and Wang, 2009). Dans les GBMs, le gène *TP53* est souvent muté, ce qui entraine une expression concomitante de la forme sauvage et mutée du p53. Dans les conditions normales, p53 a une courte demi vie en raison de sa rapide inactivation par la Mdm2 (Murine double minute 2) (Shangary and Wang, 2009), alors que la forme mutée n'est pas sensible à l'action de la Mdm2 et présente de ce fait une demi de vie plus longue et s'accumule

en grande quantité dans les cellules tumorales (Petitjean et al., 2007). Le gène de la Mdm2 est fréquemment amplifié dans les GBMs (Shchors et al., 2013). La surexpression de la protéine Mdm2 qui en résulte accroit la croissance tumorale et affecte la réponse aux chimiothérapies anti-cancéreuses par diminution de l'effet du p53. Diverses stratégies de restauration de l'effet du p53 sont discutées dans la revue bibliographique (voir page 25 du manuscrit).

2.2.3. Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)

PTEN est une phosphatase antagoniste des PI3Ks qui agit en bloquant la transformation de PIP2 en PIP3 (Georgescu, 2010; Maehama and Dixon, 1998). Elle empêche ainsi, le recrutement de la protéine kinase Akt au niveau de la membrane plasmique, ce qui bloque la cascade des phosphorylations nécessaires à la transduction du signal par l'Akt (Georgescu, 2010). Dans les GBMs, *PTEN* perd souvent sa fonction de suppresseur de tumeur par mutation (Kato et al., 2000; Knobbe et al., 2002), ce qui entraine une accumulation des produits de la PI3K et accroit considérablement la prolifération et la croissance tumorales et inhibe les voies de l'apoptose et de l'autophagie cellulaires. Ceci aboutit à une résistance aux anticancéreux notamment au TMZ. Des études ont montré l'intérêt de réactiver PTEN par thérapie génique dans la réduction de la prolifération cellulaire et le rétablissement de la mort cellulaire (Chen et al., 2010; Han et al., 2010).

2.2.4. La galectine-1

La galectine-1 est une protéine de 14 KDa, appartenant à la famille des lectines qui possèdent une forte affinité pour les β-galactosides grâce à un domaine de 135 acides aminés appelé Carbohydrate-Recognition-Domain (CRD) (Camby et al., 2006; Lefranc et al., 2006; Liu and Rabinovich, 2005). Elle est de localisation intra- et extracellulaire et peut être biologiquement active en formant des homodimères. Elle interagit avec les composants du milieu extracellulaire (surface cellulaire et matrice extracellulaire) en créant des interactions avec les β-galactosides et avec le milieu intracellulaire via des interactions type protéine/protéine (Camby et al., 2006; Lefranc et al., 2011). Elle joue ainsi un rôle majeur dans divers processus cellulaires tels que l'adhésion cellulaire, la régulation de la croissance cellulaire, l'apoptose, le développement embryonnaire et les mécanismes immunitaires tels que l'inflammation.

La galectine-1 est également impliquée dans la biologie des cancers, en particulier les GBMs. Cette protéine est surexprimée dans les tumeurs gliales avec un taux plus élevé dans les astrocytomes malins (Verschuere et al., 2011). Il existe une relation entre le taux d'expression de la galectine-1 et le degré de malignité des gliomes astrocytaires. De plus, cette expression élevée est corrélée au pronostic des patients (Rorive et al., 2001; Verschuere et al., 2011). D'autre part, la galectine-1 est impliquée dans d'autres processus tumoraux tels que la migration cellulaire qui aboutit à la formation de métastases, l'angiogenèse, la résistance aux chimio- et radiothérapies et l'échappement au système immunitaire (Figure 6).

a) La migration cellulaire

La galectine-1 est impliquée dans la migration des cellules tumorales. En effet, elle a la capacité d'interagir avec les sous-unités β des intégrines membranaires et permet l'augmentation du nombre de sous-unités β fixées à la surface des cellules sans favoriser leur fixation avec les sous-unités α. La fixation des homodimères de galectine-1 aux sous-unités β des intégrines va permettre aux cellules de se fixer aux constituants de la matrice

extracellulaire tels que la laminine et la fibronectine. En plus de l'adhésion aux composants de la matrice extracellulaire, la migration cellulaire nécessite la participation active de l'actine du cytosquelette qui permet la motilité cellulaire ainsi que la participation des enzymes protéolytiques qui vont dégrader les composants protéiques de la matrice extracellulaire et permettre ainsi aux cellules d'envahir les tissus environnants.

b) L'angiogenèse

Il est reconnu que la capacité des tumeurs à s'approprier une néo-vascularisation est la clé de leur développement et leur persistance. En effet, dans un foyer tumoral, la prolifération des cellules s'effectue à une vitesse qui dépasse celle de la formation du réseau vasculaire, ce qui limite les apports en oxygène et en nutriments nécessaires à ces cellules. Le GBM est une tumeur invasive et diffuse, qui renferme des zones de nécrose dues à l'hypoxie sévère qui s'installe, en raison de l'incapacité du réseau vasculaire à subvenir aux besoins des cellules en oxygène et en nutriments. Il faut noter que les tumeurs soumises à l'hypoxie développent un phénotype agressif qui résiste fortement aux traitements par chimio- et radiothérapies. Les zones de nécrose sont entourées d'une région de cellules en « pseudo-palissade », qui vont secréter en excès des facteurs impliqués dans l'angiogenèse tels que l'Hypoxia Inductible Factor 1 (HIF-1) et le VEGF. La galectine-1 est une protéine inductible par l'hypoxie, ce qui explique sa surproduction dans les GBMs. Elle joue un rôle majeur dans l'angiogenèse en régulant l'expression de la 150 kDa Oxygen Regulated Protein (ORP 150) qui contrôle la maturation et la sécrétion du VEGF (Lefranc et al., 2011).

c) La résistance aux chimio- et radiothérapies

L'hypoxie qui règne au sein du foyer tumoral du GBM est un facteur stimulant de la production excessive de la galectine-1, ce qui entraine la sélection de souches cellulaires très agressives et qui développent des résistances aux chimio- et radiothérapies (Lefranc et al., 2011).

Grace à sa capacité de liaison avec les protéines intracellulaires, la galectine-1 interagit avec la protéine RAS et permet ainsi une activation de la voie de signalisation Raf/MAPK. Afin d'exercer son activité, Ras doit se lier à la membrane plasmique sous sa forme associée au GTP, activant ainsi par phosphorylation la protéine kinase Raf et permettant la transduction du signal vers le noyau (Paz et al., 2001). Cependant, des études récentes ont montré que la galectine-1 interagit avec le complexe Ras-GTP et permet sa fixation à la membrane plasmique, ce qui permet son activation. De ce fait, et étant donné la production accrue de la galectine-1 dans les cellules tumorales gliales et l'activation importante de la voie de Ras/Raf/MAPK impliquée dans l'inhibition de l'autophagie cellulaire, il est évident que l'une des raisons de la résistance au TMZ réside dans cette coopération entre Ras et la galectine-1.

D'autre part, le facteur de transcription p53 joue un rôle important dans les processus d'apoptose et d'autophagie cellulaires. En effet, en absence de stress cellulaire (privation de nutriments, hypoxie, activation d'oncogènes...), la quantité de p53 dans la cellule reste à l'état basal. En présence d'un stress, p53 est stabilisé et son activité se trouve alors augmentée. Il migre vers le noyau où il exerce son rôle de facteur de transcription de plusieurs gènes cibles impliqués notamment dans le blocage du cycle cellulaire, l'apoptose ou l'autophagie. Des études ont suggéré le rôle de la galectine-1 dans le trafic vers le noyau cellulaire du p53. En effet, la réduction prolongée de la production de la galectine-1 dans certaines lignées cellulaires entraine une

accumulation du p53 au niveau du noyau ce qui lui permet d'activer la transcription de ses gènes cibles et déclenche les mécanismes de l'autophagie ou de l'apoptose (Le Mercier et al., 2008a).

d) L'échappement au système immunitaire

Le système immunitaire permet à l'organisme de lutter contre les agressions extérieures dues à des microorganismes bactériens, fongiques, viraux et parasites. Il permet aussi de reconnaitre les cellules présentant des anomalies et de les éliminer. Cependant, les tumeurs malignes ont développé la capacité d'échapper au contrôle du système immunitaire, ce qui leur permet de proliférer et d'envahir les tissus environnants (Lefranc et al., 2011). Grace à sa capacité à se lier aux β galactosides, la galectine-1 permet aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire en se fixant sur les groupements glycosylés des récepteurs CD3, CD7 et CD45 des cellules T activées. En se fixant sur ces récepteurs, la galectine-1 induit l'apoptose des cellules T, ce qui permet à la tumeur de continuer son développement (Lefranc et al., 2011).

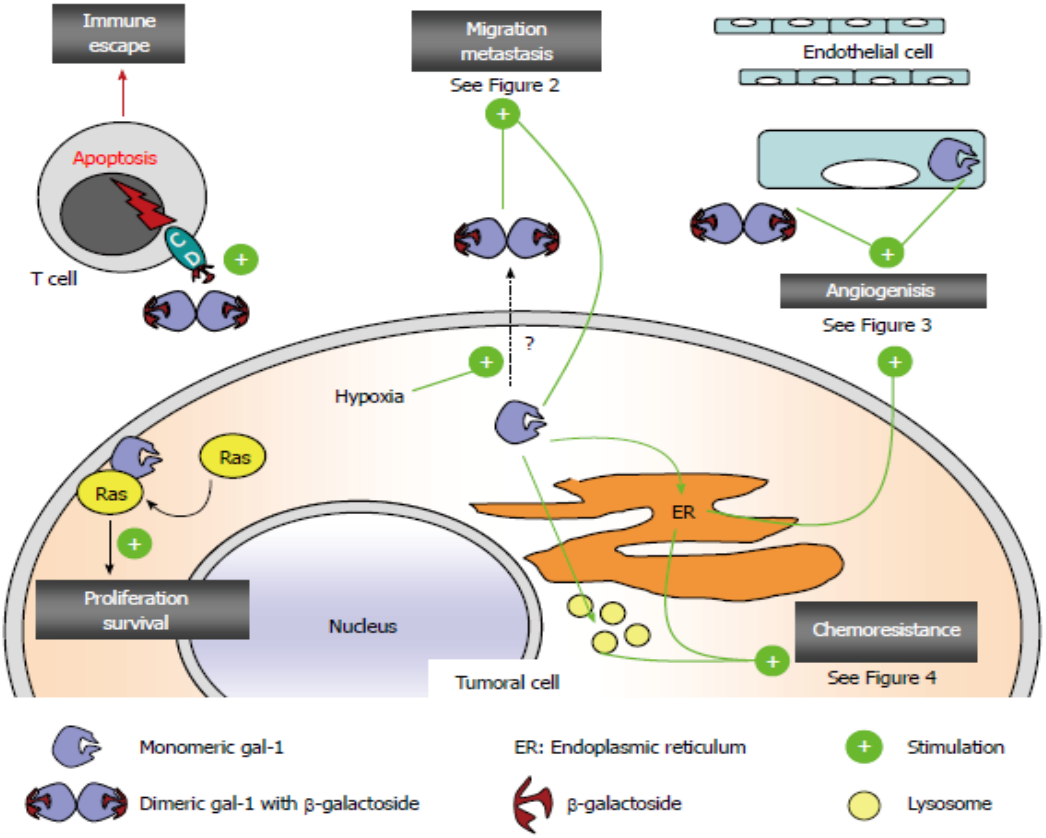

Figure 6: Implication de la galectine-1 dans la pathogénie des gliomes (Lefranc et al., 2011).

2.3. Mécanismes de résistance par les miRNA

Les miRNA jouent un rôle important en tant qu'oncogènes ou suppresseurs de tumeurs (Babashah and Soleimani, 2011). Leur implication dans la résistance des cellules tumorales au TMZ a été abordée dans la revue bibliographique (voir page 25 du manuscrit).

3. Molécules testées en essais cliniques avec le TMZ pour le traitement des GBMs

Le traitement de référence des GBMs nouvellement diagnostiqués a été redéfini en 2005 après la mise en évidence de l'efficacité supérieure de la combinaison du TMZ/RT par rapport à la RT seule. Cependant, malgré une médiane de survie et une survie à 2 ans augmentées de 2,5 mois et de 16,1 %, respectivement, cet effet reste néanmoins insuffisant. C'est pour cette raison que de nombreuses molécules ont été associées au TMZ et à la RT dans le but de potentialiser leurs effets et d'augmenter la survie des patients tout en garantissant une sécurité d'emploi.

Parmi ces molécules, le Bevacizumab est un anticorps monoclonal qui inhibe l'angiogenèse en reconnaissant spécifiquement le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Ferrara et al., 2004). Le Bavacizumab a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) en 2009 pour le traitement des GBMs récurrents (Cohen et al., 2009). Son effet chez les patients atteints de GBMs nouvellement diagnostiqués a été évalué dans deux essais cliniques de phase III. L'essai **RTOG 0825** mis en place par le groupe RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) aux Etats-Unis (Gilbert et al., 2014) et l'essai **AVAglio** mis en place en Europe par un groupe pharmaceutique (Chinot et al., 2011). Ces deux essais comparaient l'association du Bevacizumab au TMZ et RT par rapport au traitement de référence. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de la survie sans progression dans le groupe traité par le Bevacizumab avec une meilleure préservation de la qualité de vie dans l'essai **AVAglio** (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). La survie globale n'a pas été augmentée par rapport au traitement de référence (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014). Néanmoins, la tolérance et la sécurité d'emploi étaient acceptables dans les deux essais.

Afin de réduire l'activité de la MGMT et d'améliorer ainsi l'efficacité du TMZ, certaines molécules inhibitrices ont été développées. Il s'agit notamment de l'O^6-benzyl guanine (O^6-BG) et le O^6-4-bromothenyl guanine qui sont des pseudo-substrats de la MGMT et qui agissent par transfert du groupement benzyl ou bromothenyl sur la cystéine active de la MGMT, ce qui induit une inactivation irréversible de cette enzyme. Ces molécules ont été testées dans des essais cliniques en association avec le TMZ et ont donné des résultats intéressants en augmentant l'efficacité du TMZ sur des tumeurs possédant des taux élevés de MGMT (Kaina et al., 2007; Verbeek et al., 2008; Zhang et al., 2012). Malgré leur efficacité en association avec le TMZ, ces molécules présentent une toxicité sur les cellules saines, en particulier les cellules de la moelle osseuse qui ont une sensibilité élevée au TMZ en raison de la très faible activité de la MGMT par rapport aux cellules tumorales (Hansen and Kelley, 2000).

Le Cilengitide est un pentapeptide cyclique inhibiteur des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ qui sont impliquées dans le processus d'angiogenèse et sont surexprimées dans les gliomes (Stupp and Ruegg, 2007). Cette drogue a été associée à la radio-chimiothérapie conventionnelle dans un essai de phase I/II. La médiane de survie était de 16,1 mois et une survie sans progression de 6 mois a été observée chez 69 % des patients (Stupp et al., 2010). Dans un essai de phase III, l'association du Cilengitide à la RT et au TMZ chez des patients atteints de

GBMs nouvellement diagnostiqués et possédant un promoteur de MGMT méthylé n'a pas augmenté la survie globale des patients par rapport au traitement de référence (Scaringi et al., 2013).

De nombreux inhibiteurs de l'EGFR ont été développés pour réduire ses effets de stimulation des voies de signalisation qui causent l'inhibition des voies de l'apoptose et de l'autophagie cellulaires, ce qui réduit l'efficacité des drogues pro-autophagiques telles que le TMZ. Parmi ces molécules inhibitrices, on trouve des anticorps monoclonaux et les inhibiteurs des tyrosines kinases (ITK).

Le Cetuximab® est un anticorps qui reconnait l'EGFR sous ses deux formes sauvage et mutée (EGFR vIII) (Weiner et al., 2010). Cet anticorps a montré des résultats encourageants *in vitro* en inhibant la prolifération cellulaire. Cependant, son utilisation *in vivo* a donné malheureusement des résultats décevants avec une survie médiane de 5 mois (Neyns et al., 2009). Un essai clinique phase I/II est en cours pour étudier l'effet de la combinaison du Cetuximab® avec le TMZ et la RT chez des patients atteints de GBMs primaires (Combs et al., 2006).

Le Gefitinib® et l'Erlotinib® sont des molécules qui appartiennent à la famille des ITK. Ces molécules se lient à la poche de fixation de l'ATP située dans le domaine intracellulaire du récepteur à l'EGF, ce qui bloque les cascades de phosphorylation déclenchées par la fixation du ligand sur l'EGFR (Brandes et al., 2008). Ces molécules ont été testées en essais cliniques (phases I et II) chez des patients atteints de GBMs (Brown et al., 2008; Prados et al., 2009; Rich et al., 2004). Leur association avec la radiothérapie a montré une amélioration modeste de la survie des patients par rapport à ceux recevant la radiothérapie seule (Chakravarti et al., 2013; Uhm et al., 2011). L'association des ITK au TMZ a également été évaluée et a montré une augmentation de la survie des patients en comparaison à ceux recevant le TMZ et la RT (Neyns et al., 2009). Cependant, la réponse des patients était corrélée à la présence d'un PTEN non muté et une méthylation du promoteur de la MGMT (Prados et al., 2009).

4. INTERFERENCE ARN (ARNi)

La découverte de cette stratégie à la fin des années 90 a révolutionné le monde de la biologie en permettant une meilleure compréhension du fonctionnement des gènes et a ouvert ainsi de nouvelles perspectives dans différents domaines de la médecine. Son principe est basé sur la régulation post-transcriptionelle des gènes en utilisant des ARN non codants ce qui induit une réduction de l'expression d'un ARN messager (ARNm) cible.

Grace aux progrès de la biologie moléculaire et de la bio-informatique, l'ARN interférence a été identifiée et décrite chez de nombreuses espèces notamment le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998), les eucaryotes unicellulaires comme *Trypanosoma brucei* (Ngo et al., 1998), ainsi que chez les eucaryotes pluricellulaires comme la drosophile (Kennerdell and Carthew, 1998), les plantes (Waterhouse and Helliwell, 2003) et les mammifères (McManus and Sharp, 2002; Shi, 2003). Ces ARN interférents ont été testés dans de nombreuses pathologies qui surexpriment des protéines impliquées dans le développement de maladies telles que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les cancers, les infections virales…etc.

Chez les eucaryotes, la régulation post-transcriptionnelle des ARNm est assurée par différents types de petits ARN non codants et principalement par deux classes: les Small Interfering RNA (siRNA) et les micros-RNA (miRNA).

Les siRNA sont de petits ARN double brin de 21 à 23 paires de bases qui agissent en réduisant l'expression d'un ARN-messager (ARNm) cible par reconnaissance spécifique de leur séquence (Figure 7). En effet, au niveau du cytoplasme des cellules eucaryotes, le siRNA se lie au complexe RISC (RNA induced silencing complex), qui contient l'endonucléase Argonaute-2 (Ago-2). Cette enzyme active le complexe RISC/siRNA double brin par ouverture du siRNA et libération du brin sens tout en laissant le brin anti-sens lié au complexe RISC. Ce brin anti-sens sert de "guide" et dirige la spécificité de la reconnaissance de la cible par appariement des bases. Les ARNm possédant une complémentarité avec le brin guide sont reconnus et clivés par Ago-2 (Aagaard and Rossi, 2007; Kim and Rossi, 2007).

Les gènes codant pour les miRNA sont transcrits en longs transcrits primaires (pri-miRNA) qui vont être clivés par la RNAse III Drosha pour donner des pré-miRNA (precursor miRNA) au niveau du noyau cellulaire (Guo et al., 2010; Lee et al., 2003) (Figure 7). Les pré-miRNA vont ensuite être exportés vers le cytoplasme via l'Exportine-5 et subissent un clivage de la part de la RNAse III Dicer, donnant naissance à un miRNA mature d'environ 22 nucléotides (Guo et al., 2010). Les miRNA sont donc incorporés dans le complexe RISC et se lient d'une manière imparfaite à la région 3' UTR de son ARNm cible. Cette action entrainera une inhibition de la traduction ou une dégradation de l'ARNm cible dans le cas d'une complémentarité parfaite des séquences (Peterson et al., 2014). Un miRNA peut, de ce fait, réguler l'expression de plusieurs ARNm et un ARNm peut être régulé par plusieurs miRNA.

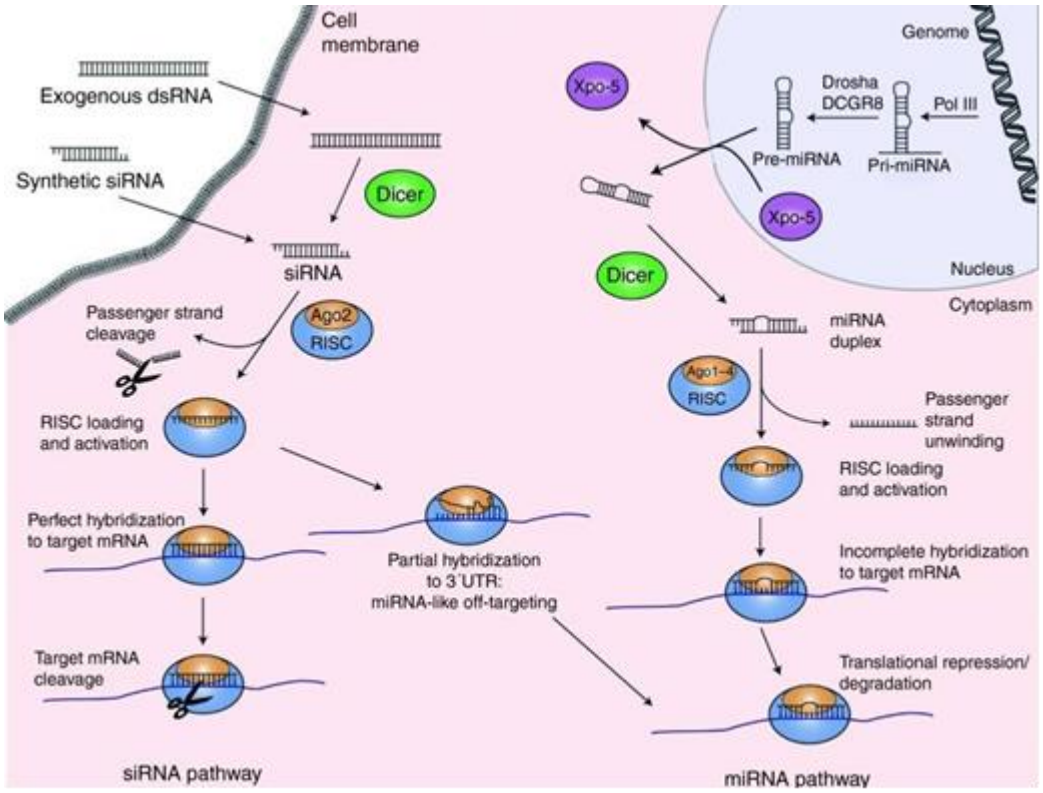

Figure 7: Mécanisme de l'ARNi (Kanasty et al., 2012)

4.1. Utilisation de l'ARNi dans les cancers

Les cancers sont des pathologies résultant de modifications d'expression génique qui aboutissent à une surexpression d'oncogènes ou à une inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs. L'ARNi a été utilisée comme un nouvel outil d'identification des gènes impliqués dans l'initiation des cancers et a permis ainsi de définir des cibles potentielles à inhiber *in vitro* et *in vivo* pour une transposition éventuelle en clinique. Ainsi, de nombreuses cibles impliquées dans divers tumeurs ont été choisies comme cibles pour les ARN interférents. Il s'agit notamment de l'oncoprotéine Bcr-Abl impliquée dans le développement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) et dont la réduction de sa production cellulaire par un siRNA entraine un effet apoptotique comparable à celui obtenu avec l'Imatinib (Wilda et al., 2002). La P-glycoprotéine (P-gp) est une autre cible potentielle, car cette protéine transmembranaire est impliquée dans l'efflux de certaines drogues anticancéreuses telles que le paclitaxel et la doxorubicine ce qui entraine une résistance des cellules tumorales à ces molécules (Gottesman et al., 2002). L'inhibition de l'expression de la P-gp, par un siRNA spécifique, dans des cellules multi-résistantes issues d'un cancer du sein les a rendues sensibles aux anticancéreux classiques (Wu et al., 2003).

Après avoir montré leur efficacité *in vitro*, de nombreuses études *in vivo* ont été menées sur des cibles telles que la protéine Raf (Pal et al., 2005), la Mdm2 (Yu et al., 2013), le bcl2 (Ocker et al., 2005) dans des modèles animaux dans le but d'inhiber la croissance tumorale et d'augmenter la survie des animaux traités par les ARN interférents. Les tumeurs sont d'implantation sous-cutanée ou orthotopique et les ARN interférents sont administrés par voie locale ou par voie intraveineuse.

Dans les GBMs, cette stratégie d'ARNi a été aussi testée *in vitro* et *in vivo* contre diverses cibles impliquées notamment dans la prolifération cellulaire (Grzelinski et al., 2006), l'inhibition de l'apoptose (Zhang et al., 2004), l'angiogenèse (Yang et al., 2014) et contre des mécanismes de résistance aux anticancéreux (Viel et al., 2013; Yang et al., 2012). Cependant, les GBMs sont des tumeurs protégées par la barrière hématoencéphalique (BHE) qui rend difficile l'arrivée des ARN interférents au niveau des cellules tumorales pour agir au niveau de leurs cibles cellulaires (Mathupala, 2009). C'est pour cette raison que certaines solutions ont été apportées pour résoudre ce problème, en particulier l'utilisation de vecteurs fonctionnalisés avec des ligands à leur surface qui reconnaissent des récepteurs membranaires pour une meilleure internalisation cellulaire (Zhang et al., 2004). Une autre solution qui a prouvé son efficacité consiste en une administration intra-tumorale des ARN interférents ce qui évite le passage par la BHE (Tsujiuchi et al., 2014).

Actuellement, certains essais cliniques de phase I, utilisant cette technologie d'ARNi sont en cours, ils évaluent la sécurité et l'efficacité de ces traitements dans les cancers (Tableau 2).

Tableau 2: Essais cliniques utilisant la technologie d'ARNi dans les cancers, adapté d'après (Lee et al., 2013) et clinicaltrial.gov.

Drug	Company	Vehicle	Target	Disease	Delivery route	Phase	Stage
CALAA-01	Calando Pharma	Cyclodextrin nanoparticle, Transferrin, PEG	M2 subunit of ribonucleotide reductase	Solid tumors	IV	I	Terminated
Atu027	Silence Therapeutics	Liposomes (Lipoplexes, Cationic lipid)	Protein kinase N3	Advanced Solid tumors	IV	I	Completed
ALN-VSP02	Alnylam Pharma	SNALP	VEGF and KSP	Solid tumors with liver involvement	IV	I	Completed
				Solid tumors	IV	I	Completed
TKM 080301	Tekmira Pharma	SNALP	Polo-kinase-1	Solid tumors	IV	I	Recruiting
				Solid tumors with liver involvement	IV	I	Completed
siRNA-EphA2-DOPC	M.D. Anderson Cancer Center	Liposomes (neutral liposomes)	EphA2	Advanced Solid tumors	IV	I	Not yet recruting
siG12D LODER	Silenseed Ltd	Polymer matrix (LODER polymer)	KRASG12D	Pancreatic ductal adenocarcinoma	EUS biopsy needle	I	Ongoing, recruiting
						II	Not yet recruiting
EZN2968	Enzon	Naked	HIF-1α	Solid tumors or lymphoma	IV	I	Completed
EZN3042	Enzon	Naked	Survivin	Acute Lymphoblastic Leukemia (children)	IV	I	Terminated
APN401	Comprehensive Cancer Center of Wake Forest University	Not mentionned	blood mononuclear cells APN401	Melanoma, Kidney Cancer, Pancreatic Cancer, or Other Solid Tumors	IV	I	Not yet recruiting
NCT00672542	Scott Pruitt	Not mentionned	inducible immune-proteasome beta subunits LMP2, LMP7, and MECL1	Metastatic Melanoma	Intradermal	I	Completed
NCT02110563	Dicerna Pharmaceutical, Inc.	Lipid Nanoparticle	MYC	Solid Tumors, Multiple Myeloma, or Lymphoma	IV	I	Recruiting

4.2. Limites à l'utilisation des ARNi en clinique

La stratégie d'ARNi est très attractive en raison de son efficacité. Cependant, un certain nombre d'obstacles doivent être franchis pour une utilisation en clinique.

4.2.1. Effet Off-Target

L'effet Off-Target est dû à une complémentarité imparfaite entre l'ARN interférant et la région 3' Untranslated Region (3' UTR) des transcrits ARNm. Ceci est responsable de l'inhibition de l'effet de gènes autres que les

gènes cibles, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur le fonctionnement cellulaire (Deng et al., 2014). Afin de limiter ou de supprimer cet effet, des modifications chimiques de ces acides nucléiques ont permis d'éviter la complémentarité avec des d'autres ARNm autres que ceux ciblés (Birmingham et al., 2006; Deng et al., 2014).

4.2.2. Stimulation de la réponse immunitaire

Les ARN doubles brins, en particulier les siRNA, sont de potentiels activateurs de la réponse immunitaire innée grâce à leur interaction avec les RNA-binding proteins telles que les Toll-like receptors (TLRs) (Deng et al., 2014). Cette réponse immune se caractérise par une libération d'interféron de type I, de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6) et le tumor necrosis factor α (TNFα). La stimulation de cette réponse immune peut dépendre de la séquence du siRNA. En effet, le TLR7 est activé par la séquence 5'-GUCCUUCAA-3' ou par la présence d'une séquence riche en motif GU (Deng et al., 2014; Hornung et al., 2005). De plus, la longueur du double brin peut aussi augmenter la production des cytokines pro-inflammatoires. C'est pour cela qu'une attention particulière doit être portée à la séquence des siRNA afin d'éviter l'activation des TLRs (Deng et al., 2014).

4.2.3. Saturation de la machinerie enzymatique cellulaire

La saturation de la machinerie enzymatique cellulaire par les ARN interférents exogènes peut causer une perturbation des fonctions cellulaires contrôlées par les petits ARN endogènes tels que les miRNA. En effet, l'Exportin-5 qui est une protéine clé de la voie des miRNA peut être saturée par des miRNA exogènes (Deng et al., 2014; Wang et al., 2011). D'autre part, la compétition est aussi présente pour l'incorporation des ARN interférents au complexe RISC. Cette compétition est problématique car les miRNA endogènes présentent une cinétique d'incorporation au complexe RISC plus lente que celle des ARN exogènes (Castanotto et al., 2007).

4.2.4. Problème de délivrance des ARN interférents

Malgré leur potentiel thérapeutique important, les ARN interférents ne peuvent être utilisés seuls en thérapeutique en raison de leur incapacité à traverser la membrane plasmique à cause de leur charge négative au pH physiologique (Aagaard and Rossi, 2007; Reischl and Zimmer, 2009). De plus, ils subissent une dégradation rapide par les nucléases plasmatiques et cellulaires (Volkov et al., 2009), ainsi qu'une forte élimination rénale en raison de leur faible poids moléculaire (Aagaard and Rossi, 2007). Enfin, la réponse immunitaire qu'ils déclenchent lors de leur injection dans la circulation générale provoque leur dégradation rapide et leur inactivation (Volkov et al., 2009). Afin de surmonter ces obstacles, des modifications chimiques des ARN interférents pour les rendre plus stables et résistants à l'action des nucléases ou l'utilisation d'un vecteur pour les transporter et les délivrer au niveau de leur site d'action cellulaire sont indispensables.

4.3. Délivrance des ARN interférents

4.3.1. Modifications chimiques des ARN interférents

Les modifications chimiques des ARN interférents touchent souvent le brin sens car l'activité est assurée par le brin anti-sens. Ces modifications ont souvent lieu sur les nucléotides ou les régions terminales des ARN interférents.

a) Les modifications chimiques sur les nucléotides

Au niveau des nucléotides, les modifications les plus fréquentes ont lieu au niveau du ribose. Le groupement 2'-OH du ribose est sensible à l'action des nucléases. La protection de cette fonction semble être une stratégie efficace pour protéger les siRNA de la dégradation. L'addition d'un groupement 2'-O-méthyl (2'-OMe) ou d'un groupement 2'-deoxy-2'-fluoro sont les plus utilisés pour cet effet (Gavrilov and Saltzman, 2012)(Figure 8). De plus, l'addition du 2'-OMe en seconde position sur le brin sens ou anti-sens réduit l'effet Off-Target.

Un pont méthylène entre la fonction OH en 2' et le carbone en 4' du ribose est à l'origine des Locked Nucleic Acids (LNA)(Gavrilov and Saltzman, 2012)(Figure 8). L'introduction de ces LNA d'une manière appropriée dans la structure des oligonucléotides stabilise le duplexe sans altération de sa fonction (Elmen et al., 2005). De plus, l'incorporation des LNA et l'addition du groupement 2'-deoxy-2'-fluoro peuvent augmenter significativement l'affinité des siRNA à leur ARNm cible (Manoharan, 2004).

La stabilisation des groupements phosphates inter-nucléotides est une autre stratégie utilisée pour protéger les siRNA des nucléases. En effet, la formation d'un lien borano-phosphate sur le brin sens a montré une capacité de protection contre les nucléases 10 fois plus importante que celle des siRNA non modifiés (Gavrilov and Saltzman, 2012)(Figure 8). La création d'un lien phosphorothiolate peut entrainer une augmentation de la stabilité et de capture cellulaire des siRNA (Gavrilov and Saltzman, 2012). Cependant, ce lien peut causer une cytotoxicité (Gavrilov and Saltzman, 2012) (Figue 8).

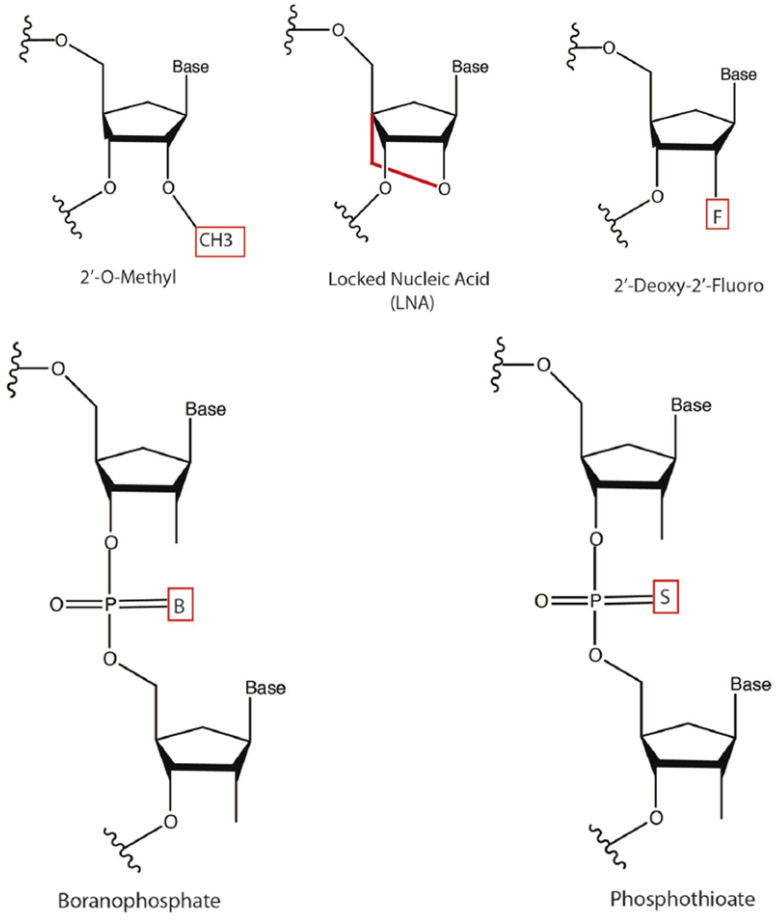

Figure 8: Modifications chimiques apportées à la structure des ARN interférents, d'après (Gavrilov and Saltzman, 2012)

b) Les modifications qui affectent les parties terminales des ARN interférents

En raison de l'importance de la partie 5'- phosphate pour l'activité des ARN interférents, les modifications terminales ont lieu sur le brin sens ou du coté 3' du brin anti-sens. Ces modifications sont réalisées en créant des liens clivables avec des substrats tels que le cholestérol, l'acide folique, l'α-tocophérol, des peptides comme le peptide TAT (Jeong et al., 2009). Ces combinaisons permettent d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques des ARN interférents, en particulier leur temps de demi-vie plasmatique. De plus, ces liens permettent leur internalisation au niveau cellulaire et leur libération au niveau du cytoplasme (Gavrilov and Saltzman, 2012).

4.3.2. Vecteurs utilisés pour le transport des ARN interférents

Deux grands types de vecteurs sont utilisés pour le transport et la délivrance des ARN interférents au niveau de leur site d'action cellulaire. Il s'agit des vecteurs viraux et des vecteurs non viraux.

a) Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux les plus utilisés pour le transport des ARN interférents appartiennent à la famille des adénovirus, des virus adéno-associés et des rétrovirus (Kurreck, 2009). Ces virus ont la particularité d'être modifié de manière à réduire considérablement leur pouvoir pathogène et leur virulence. Malgré leur efficacité, il est impossible de s'affranchir totalement du caractère pathogène des vecteurs viraux qui constitue un risque potentiel pour les patients. D'autre part, au cours de certains essais cliniques utilisant ce type de vecteurs, il a été noté l'apparition de leucémies chez quelques patients (Hacein-Bey-Abina et al., 2008).

b) Les vecteurs non viraux

Différents systèmes colloïdaux ont été développés pour le transport des ARN interférents, ils différent entre eux de par leur composition chimique, leur procédé d'obtention ainsi que par leur efficacité de transfection des acides nucléiques. Cependant, ces vecteurs sont conçus dans le but de transporter les ARN interférents jusqu'à leur site d'action cellulaire sans modifier leur activité. La conception de ces vecteurs doit répondre à plusieurs exigences notamment en termes de biocompatibilité, de biodégradabilité, et de non toxicité afin de pouvoir les utiliser en clinique.

Parmi les vecteurs utilisés pour le transport des ARN interférents, on trouve principalement :

- Les liposomes : vésicule formée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques entourant un réservoir aqueux (Pinto-Alphandary et al., 2000)(Figure 9)
- Les nanoparticules à cœur lipidique solide et les nanocapsules lipidiques
- Les nanoparticules polymères : regroupent les nanocapsules et les nanosphères (Figure 9)
- Les dendrimères : macromolécules nanométriques formées de plusieurs séries de branchements organisés autour d'un cœur central plurifonctionnel (Sahoo and Labhasetwar, 2003)(Figure 9)
- Les nanoparticules inorganiques : regroupent les nanotubes de carbone, les nanoparticules métalliques et les nanoparticules d'or (Figure 9)

Cette partie est détaillée dans la revue bibliographique (voir page 25 du manuscrit).

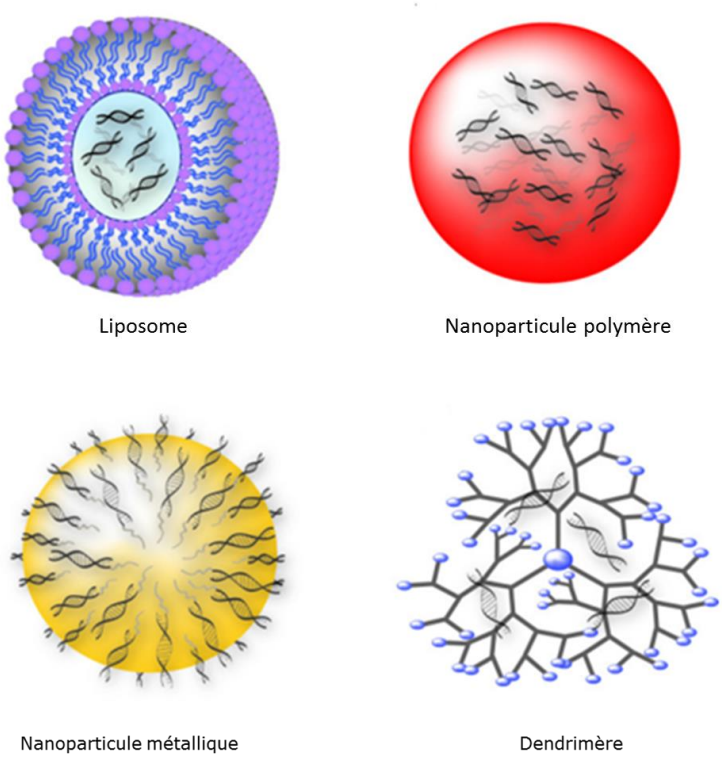

Figure 9: Exemple de quelques vecteurs utilisés pour la délivrance des ARN interférents (Gavrilov and Saltzman, 2012)

Les propriétés physico-chimiques de ces vecteurs conditionnent leur devenir dans l'organisme. En effet, afin d'éviter une élimination rénale, ces particules doivent avoir une taille supérieure au seuil rénal fixé à 10 nm de taille et 48 kDa de poids moléculaire (Elsabahy and Wooley, 2012). Les particules dont la taille est supérieure à 200 nm ne sont pas éliminées par le filtre rénal. Cependant, elles sont reconnues par les cellules du système réticulo-endothélial (SRE) en raison de l'adsorption massive des opsonines plasmatiques à la surface de ces particules (Ishida et al., 2002; Sriraman et al., 2014). De plus, la surface de ces particules conditionne leur capture par les cellules du SRE. En effet, une surface hydrophobe favorise l'adsorption des opsonines plasmatiques à la surface de ces particules grâce à des interactions hydrophobes, ce qui engendre une phagocytose des particules opsonisées par les cellules de Küpffer et les phagocytes circulants. La modification de la surface de ces nanoparticules par des polymères hydrophiles ou neutres tels que le polyéthylène glycol (PEG) permet de minimiser l'opsonisation et la capture par les cellules du SRE. Ceci permet donc aux nanoparticules de circuler plus longtemps dans le sang et d'atteindre le tissu tumoral de manière plus efficace (Elsabahy and Wooley, 2012; Fukukawa et al., 2008). Cette pegylation leur permet, de plus, de s'accumuler dans les tumeurs qui possèdent un réseau vasculaire important et perméable grâce à des fenestrations. Cette accumulation des particules est aussi liée à un faible drainage lymphatique dans les tumeurs (Sriraman et al., 2014). L'association de ces deux effets est à l'origine de l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) qui permet une diffusion passive des particules dans les tumeurs (Mitragotri et al., 2014; Sriraman et al., 2014) (Figure 10).

L'ajout de ligands à la surface de ces nanoparticules reconnaissant spécifiquement des récepteurs membranaires des cellules cancéreuses permettrait une délivrance des agents thérapeutiques à l'intérieur ces cellules cibles. Cette stratégie appelée ciblage actif permet d'améliorer l'entrée des particules dans les cellules cancéreuses et une meilleure accumulation des agents thérapeutiques dans la tumeur par rapport au ciblage passif (Sriraman et al., 2014).

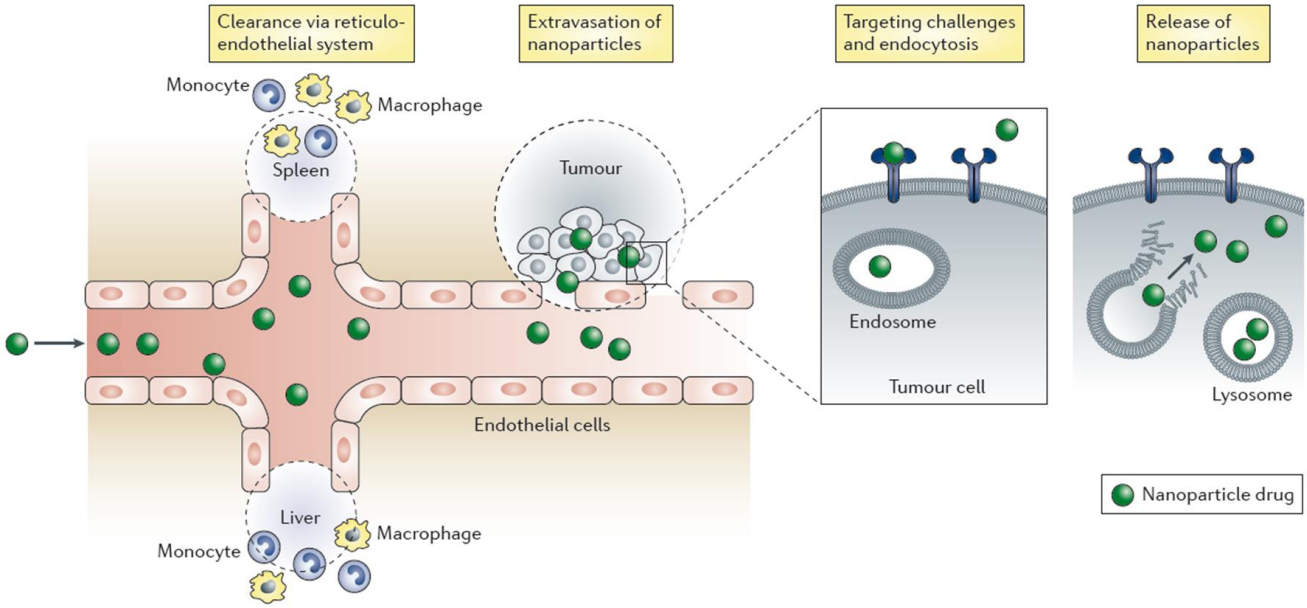

Figure 10: Schéma représentatif de l'effet EPR dans les vaisseaux sanguins tumoraux (Mitragotri et al., 2014)

4.3.3. Le vecteur étudié : les nanocapsules lipidiques (LNCs)

Implanté au cœur du CHU d'Angers, notre laboratoire s'est spécialisé dans la conception de nanovecteurs thérapeutiques. Il détient notamment un brevet international (N°W001/64328) pour la préparation de nanocapsules lipidiques (LNCs) par le procédé d'inversion de phase qui est un procédé de basse énergie et sans solvants organiques (Heurtault et al., 2002a) (Figure 11A). Ce procédé consiste à faire des cycles de chauffage/refroidissement entre 60 et 85°C pour transformer une émulsion huile dans eau (H/E) en une émulsion eau dans huile (E/H) et inversement (Heurtault et al., 2002a). Il s'agit de former une microémulsion et de la déstructurer sous l'effet de la température pour former les LNCs. Ensuite, le système doit être stabilisé par refroidissement brutal en le diluant dans un grand volume d'eau à +4°C (Beduneau et al., 2006; Heurtault et al., 2002a; Lamprecht et al., 2002). Ces LNCs sont constituées d'excipients approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) et exemptés d'OGM (Organismes Génétiquement Modifiés) (Hureaux et al., 2009). Les LNCs possèdent une structure composée d'un cœur huileux de Labrafac® (triglycéride d'acides caprique et caprylique) et d'une couronne de tensioactifs composée de Solutol HS 15® (mélange de polyéthylène glycol libre 660 et d'hydroxystéarate de polyéthylène glycol 660) et de Lipoïd S75-3® (lécithines de soja) (Figure 11B). En fonction de la proportion de ces constituants, différentes tailles de LNCs peuvent être obtenues. Ces LNCs ont permis grâce à leur cœur huileux d'encapsuler des drogues lipophiles telles que le Paclitaxel très utilisé en oncologie (Hureaux et al., 2010).

Le Solutol HS15® joue un rôle primordial dans la formation et la stabilité des LNCs alors que le Lipoïd S75-3® augmente cette stabilité (Anton et al., 2007a; Heurtault et al., 2002b, 2003). Les températures d'inversion de phase sont affectées par le degré de salinité du milieu. En effet, une forte concentration en NaCL, augmente la conductivité du milieu et modifie la solubilité de l'hydroxystéarate de PEG (Anton et al., 2007b). Ceci permet de baisser la température d'inversion de phase qui est un facteur important lors de l'encapsulation de drogues thermosensibles (Lamprecht and Benoit, 2006). Les LNCs présentent une stabilité physique supérieure à 18 mois. Au cours de cette période, aucun phénomène de coalescence ou de murissement d'Ostwald ne se produit (Heurtault et al., 2002a).

Ces LNCs ont montré leur aptitude à encapsuler des siRNA dans leur cœur huileux constitué de Labrafac®. En effet, en utilisant la capacité des siRNA à se lier à des lipides cationiques par interaction électrostatique pour former des lipoplexes, il a été possible d'encapsuler ces siRNA au sein des LNCs en utilisant le procédé d'inversion de phase (David et al., 2012). Ceci permet de protéger les siRNA de la dégradation des nucléases. Cependant, la libération des siRNA encapsulés nécessite une cassure de la coque des LNCs au niveau cellulaire.

Nous avons donc au cours de ce travail, voulu fixer les siRNA par attraction électrostatique à la surface des LNCs. Cependant, en raison de leur potentiel zêta négatif, les LNCs ne peuvent pas fixer les siRNAs (chargés négativement au pH physiologique) à leur surface par attraction électrostatique. Une modification de la surface des LNCs par greffage d'un polymère cationique comme le chitosan a été donc nécessaire afin d'obtenir un nano-vecteur cationique capable de fixer à sa surface des siRNAs par simple attraction électrostatique. Cette modification de surface a été réalisée grâce à la réaction de transacylation qui se déroule en milieu alcalin entre la fonction carbonyle de l'hydroxystéarate de polyéthylène glycol contenu dans le Solutol HS 15® et la fonction amine du polymère.

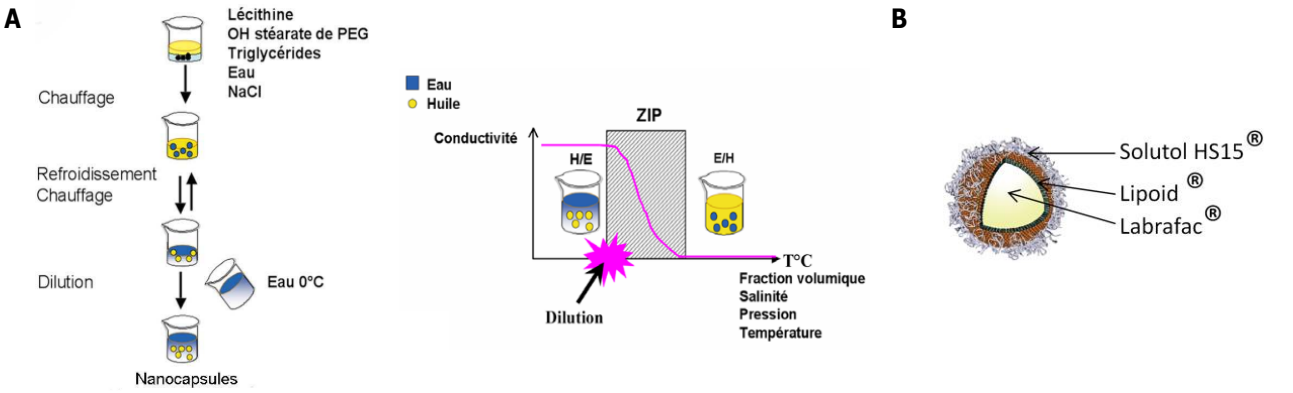

Figure 11: A- procédé d'inversion de phase, B- structure des nanocapsules lipidiques (LNCs)

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

RNA interference potential for enhancing glioblastoma sensitivity to temozolomide

K. Messaoudi[1], A. Clavreul[1], F. Lagarce*[1, 2]

[1]*LUNAM Université, Angers, France; Inserm U1066, Micro et Nanomedecines Biomimétiques, IBS, Angers Cedex 9, France.* [2]*Service Pharmacie, CHU Angers, France.*
(*): Corresponding Author: Email: frederic.lagarce@univ-angers.fr
Tel: +33 244 688568 Fax: +33 244 688546

Abstract

RNA interference (RNAi) is a strategy of gene regulation that has opened up many opportunities for the treatment of cancers especially glioblastomas (GBMs). This strategy reduced the expression of many proteins involved in the resistance of these tumors to anticancer drugs particularly to temozolomide (TMZ). Much research effort has gone into RNAi delivery and target selection for clinical application of this new discovery in the treatment of GBMs. However, some limitations must be resolved to enhance the safety of RNAi-based therapeutics and to reduce their immune response.
In this review, the main mechanisms of resistance of GBMs to TMZ are described. Moreover, the opportunities offered by RNAi strategy to reverse the phenotype of these tumor cells as well as prospects and challenges ahead in the RNAi-based therapy are discussed.
***Key words**: Glioblastoma, temozolomide, RNAi.*

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and the most aggressive primary brain tumor in adults (1).Median survival is 14.6 months (2) and the percentage of patients living for 5 years or more is less than 10 % (3). Despite the advances made during the last few years in brain tumor therapy, the prognosis of this disease has not improved due to tumor resistance. Current therapy includes surgical intervention, radiotherapy and chemotherapy with Temozolomide (TMZ) (4). TMZ is used at the beginning of GBM treatment at the dose of 75 mg/m^2 of body surface area by day in association with radiotherapy for 6 weeks followed by six cycles of TMZ alone at the dose of 150-200 mg/m^2 for 5 days every 28 days. With this association (TMZ + radiotherapy), the median survival reached 14.6 months against 12 months for patients treated by radiotherapy alone (4). The inefficacy of TMZ for treating GBM is very limited; this is partly due to the high levels of enzyme activity of DNA repair O^6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) in tumor cells, which reduces the effect of the alkylating agent and make an resistant phenotype. On the other hand, other mechanisms contribute significantly to the resistance to TMZ such as overexpression of EGFR, Galectin-1 and Mdm2 and P53 gene mutation. Different therapeutic molecules have been developed to reduce the effect of these various targets such as O 6-benzyl-guanine which inhibits the MGMT, tyrosine kinase inhibitors that act on EGFR, Nutiline-3 that inhibits Mdm2 which contributes to the restoration of the activity of p53. Despite their effectiveness; these molecules do not seem to be able to heal GBMs. The considerable development of RNA interference (RNAi) based therapy seems to give hope to patients with GBMs.

In this review, the main mechanisms of resistance of GBMs to TMZ and strategies that have been developed to overcome this resistance are described. Following this, an overview of the mechanism of RNAi strategy, focusing on its applications on increasing the sensitivity of GBMs to TMZ is given. Finally, we provide a critical evaluation of future prospects and challenges for RNAi-based therapy in the treatment of GBMs.

2. Temozolomide and glioblastomas

2.1 Structure and mechanism of action of temozolomide

TMZ is an alkylating agent from the imidazotetrazine family, it is stable at acidic pH values (5). This prodrug undergoes rapid chemical conversion in the systemic circulation at physiological pH to the active compound, 3-methyl-(triazen-1-yl) imidazole-4-carboxamide (MTIC), then it will react with a water to give 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AIC) and the highly reactive methyldiazonium cation (half-life = 0.4 s). This unstable cation transfers a methyl group to DNA causing the cytotoxic effect of TMZ (6, 7) (Fig. 1). The methylation occurs at purine bases of DNA at the O^6 *and* N^7 positions of guanine and the N^3 position of adenine.
The O^6 methylation accounts for 5 % of the total lesions caused by TMZ in DNA but it is the main cause of the TMZ toxicity (7, 8). The N^7 and N^3 methylations are very frequent and represent respectively 80-85 % and 8-18 % of total alkylations (9).

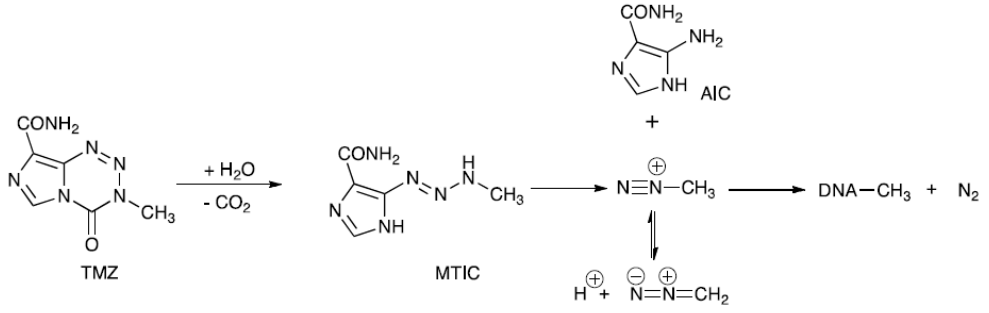

Figure 1: Structure and activation of temozolomide (5)

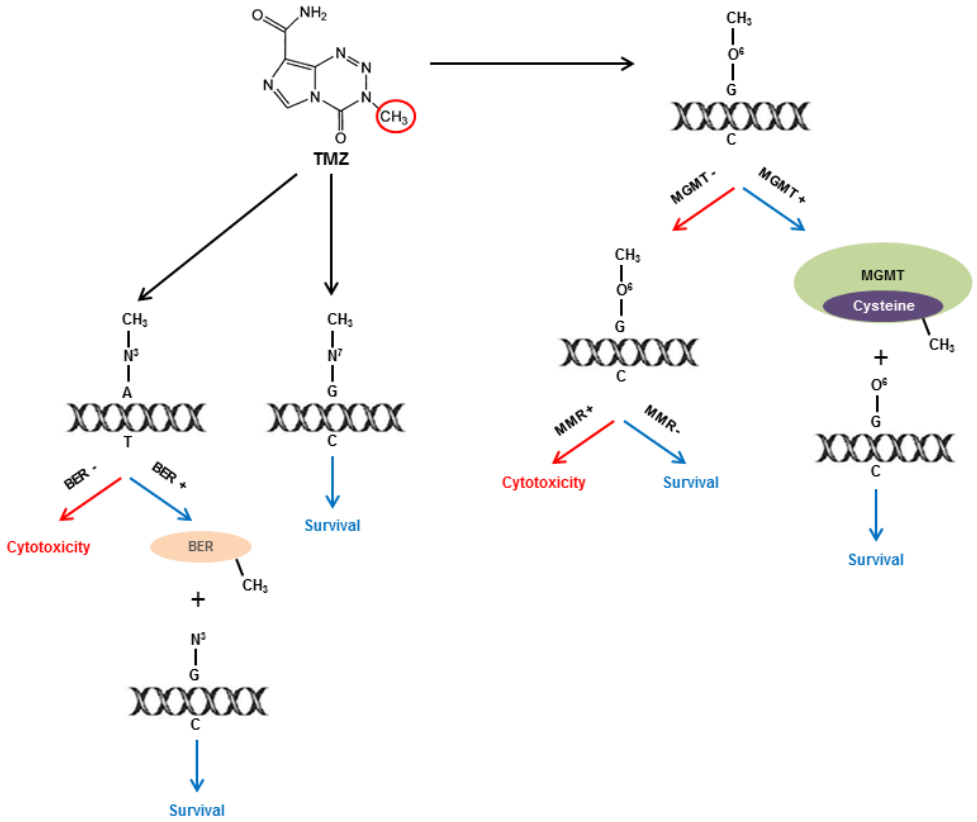

Figure 2: TMZ interaction with DNA repair mechanisms

2.2. Mechanisms of GBM resistance to TMZ

GBM cells are resistant to damage caused by alkylating agents of DNA such as TMZ. This resistance is related to the implementation of several mechanisms such as DNA repair mechanisms, the overexpression of *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), Galectin-1 and *murine double minute 2* (Mdm2) and the mutation of p53 and Phosphatase and tensin (PTEN). In addition, some microRNA (miRNA) expression profiles are altered in GBM with overexpression of some and a significant reduction in the production of others.

2.2.1. DNA repair mechanisms.

O-6 methylguanine DNA methyl transferase (MGMT)

The main mechanism of GBM resistance is the DNA enzyme repair MGMT. It is a 22 kDa protein, capable of removing not only the methyl groups attached to the O^6 position in guanines but also other alkyl groups such as ethyl, isopropyl and butyl (10). However, MGMT removes methyl groups much faster than other alkyls (10). It allows a direct repair of the lesion caused by TMZ by removing the methyl group in position O^6 of guanine (11) (Fig. 3). It acts as suicide enzyme because the fixing of the methyl group on the cysteine residue 145 located in its catalytic pocket, causes its inactivation (12) (Fig. 2). MGMT is not recycled and undergoes degradation by the proteasome (13). The levels of MGMT vary widely according to the type of tumor and vary on the tumor of the same type (14). The MGMT gene is not commonly mutated or deleted (14). The MGMT expression is correlated to the methylation profile of the MGMT promoter. Some studies have shown that the level of MGMT is inversely related to the density of the CpG methylation (15). The MGMT gene silencing is ensured by hypermethylation of promoter CPG islands (16). Approximately, 45 % of patients with newly diagnosed GBM present methylation of MGMT promoter and respond better to TMZ (17). Therapeutic molecules that inhibit MGMT such as O^6-benzyl guanine (O^6-BG) and O^6-(4-bromothenyl) guanine have been used in clinical trials before the treatment with TMZ (9, 18, 19) (Table 1). These pseudosubtrates gived promising results by enhancing TMZ activity *in vitro* and *in vivo* in tumor cells possessing high levels of MGMT. They react with MGMT by covalent transfer of benzyl group or bromothenyl group to the active cysteine residue of MGMT and cause an irreversible inactivation of this enzyme. Despite the effectiveness of the association of these molecules with TMZ, the high toxicity against normal cells especially bone marrow cells is an obstacle to the use of these molecules (20).

DNA mismatch repair (MMR)

MMR is a system that corrects errors of nucleotide base mismatches generated during DNA synthesis (9). In the absence of MGMT, the O^6-MG persists and it can pair with thymine. The resulting O^6-MG/T is recognized by DNA mismatch repair (MMR) and only newly synthetized strand are excised, keeping O^6-MG intact. This repair cycle is repeated when another strand is generated. These futile cycles of insertion, excision of thymine occur and lead to cell cycle arrest and apoptosis (9, 21). Impaired MMR pathway caused by mutations in MMR proteins complex, causes a failure to recognize and repair O^6-MG adducts produced by TMZ. This causes DNA replication and allows the cell cycle to continue and thereby makes the least effective TMZ (22).

Base excision repair (BER)

This system is involved in the repair of DNA damage caused by oxidizing agents, ionizing radiation and alkylating agents (23, 24). BER system is composed by proteins and enzymes. Among them, the poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is an enzyme activated in

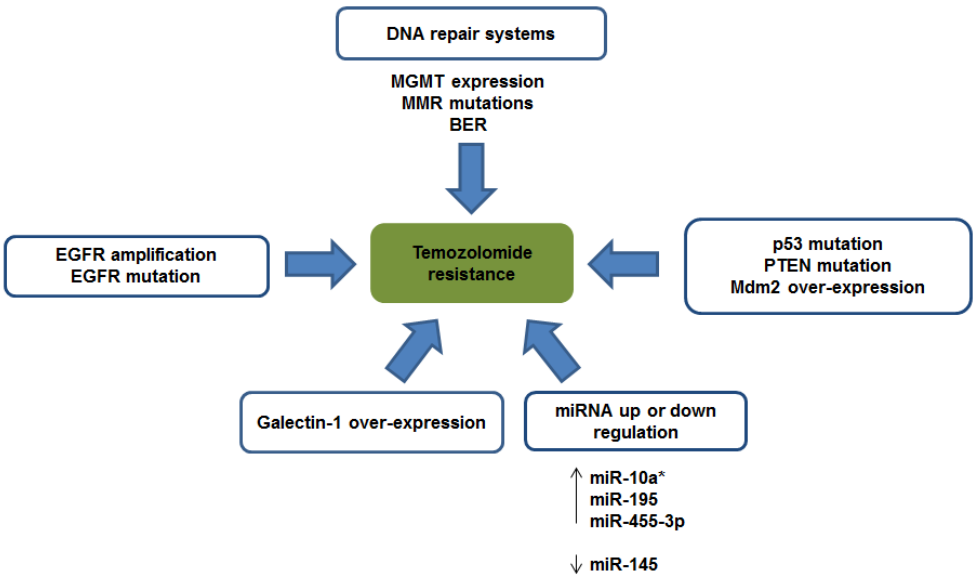

Figure 3: Different actors involved in the resistance of glioma tumor cells to TMZ

response to DNA damage and plays an important role in BER system. This enzyme binds to DNA and begins the synthesis of a poly (ADP-ribose) (PAR) from nicotinamide adenine dinucleotide (NAD +), which allows the recruitment of BER complex proteins (XRCC1, DNA polymerase, ligase, FEN-1) and the DNA repair (25).
The BER pathway is involved in repair of N^3 and N^7 methylations caused by TMZ (6, 9, 21). The N^3 lesions are lethal if not repaired contrary to N^7 lesions (9, 26).These methylations that represent more than 90% methylation caused by TMZ, are rapidly repaired by BER. However, TMZ become toxic when one or more components of BER have mutations. Thus, the development of PARP inhibitors, limiting BER activity, seems to be a promising strategy for enhancing effect of TMZ (27, 28). However, despite the high rate of methylation at N^7 and N^3 compared to O^6 methylation, the role of the BER in TMZ resistance is less important than the MMR and MGMT.

2.2.2. Over-expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Galectin-1

EGFR
EGFR (170 kDa) is one of the receptors that plays an important role in tumor development by stimulating cell proliferation, migration, angiogenesis and cell resistance to chemotherapy (29). Ligand binding to wild type EGFR will result in the activation of one of the following signaling pathways: Ras/Raf /MAPK (30), PI3K/AKT/m-TOR (31). These signaling pathways are activated strongly in GBMs which cause an inhibition of cell autophagy and apoptosis responsible of the decrease of TMZ efficiency (32) (Fig. 3).
EGFR gene amplification is the most frequent genetic alteration in primary GBMs with frequency of 40% (33), and approximately, half of these tumors carry the rearranged EGFR gene resulting in tumours expressing both wild-type EGFR as well as a mutated EGFR (34). EGFR variant III (EGFR vIII) is the most common variant of EGFR in GBMs, it is characterized by a deletion of 267 amino acids in the extracellular domain, which leads to the formation of a receptor unable to bind a ligand and which has a constitutive tyrosine kinase activity.

Therapeutic molecules have been developed to inhibit the EGFR signaling pathway. For example, Cetuximab®, a monoclonal antibody binding specifically to EGFR inhibits downstream signal transduction pathways (35) (Table 1). Cetuximab is able to recognize the wild EGFR and EGFRvIII leading to an inhibition of cell proliferation *in vitro*. However, its use *in vivo* unfortunately gives disappointing results with a median survival of 5 months (36). Currently, a phase I/II clinical trial is ongoing to study the efficacy of combining radiotherapy, TMZ and Cetuximab® for treatment of patients with primary GBM (37). Gefitinib® and Erlotinib® that belong to the family of tyrosine kinase inhibitors (TKIs) are other therapeutic molecules used to inhibit EGFR signaling pathways (Table 1). They act by binding to the cytoplasmic ATP pocket domain blocking EGFR phosphorylations and, thereby, EGFR-mediated activation of downstream pathways (38). These molecules have been tested in clinical trials (phases I and II) in patients with GBM (39, 40) and disappointing results were obtained. Indeed, the use of Gefitinb® or Erlotinb® in association to radiotherapy has shown a modest improvement in survival patients with GBM (41, 42). The association of TKIs and TMZ have been evaluated and showed an improvement of survival median compared to the combination TMZ + radiotherapy but only a small subpopulation experienced sustainable disease control. Indeed, the response of GBM patients was correlated with the presence of intact PTEN (36). In addition, patients with MGMT promoter methylation and intact PTEN had a significant survival advantage (40).

Galectin-1
This protein belongs to the lectin family containing a carbohydrate recognition domain (CRD) with a high affinity for β-galactosides (2, 43).Galectin-1 is present both inside and outside cells, and has both intracellular and extracellular functions. The intracellular activity of Galectin-1 is dependent on protein-protein interaction,
while its extracellular activity is dependent on its lectin activity (44). In astrocytomas, there is a relationship between the expression levels of Galectin-1 and the grade of malignancy (45).
Galectin-1 is a hypoxia-regulated protein; its production and secretion are stimulated by hypoxia. (46).Galectin-1

has been shown to play important functions in several aspects of cancer biology implicating cell migration by interaction with integrins and components of the extracellular matrix (47), metastasis formation (48), stimulation of angiogenesis by regulating the ORP150 that controls the maturation and secretion of VEGF (49), chemo- and radio-resistance by interaction with Ras protein (50, 51) and modulation of P53 migration in nucleus (50) (Fig. 3). In addition, Galectin-1 inhibits T cell effector function by promoting apoptosis, allowing tumors to evade the immune system (46, 52). In view of its important role in the chemo- and radio-resistance, targeting Galectin-1 by different strategies was considered. Among them, the use of synthetic lactulose as β-galactoside which has an affinity for the CRD of Galectin-1 (53)(Table 1) and the use of galactomannan Davanat® which binds Galectin-1 at a site distinct from the CRD (54)(Table 1).Davanat® was approved by FDA for treatment of colorectal cancers and gives promising results. However, investigations must be done for evaluation of its effect on GBM.

2.2.3 P53, Mdm2 and PTEN

p53 and Mdm2

In humans, p53 is a tumor suppressor protein encoded by the TP53 gene that can induce a temporary cessation of cell growth to repair or permanent cessation of growth in response to cellular stress such as DNA damage (55, 56). Certain frequent TP53 mutations lead to both the loss of function of tumor suppressor p53 and a p53 mutant protein accumulation. Unlike the wild-type p53, which under normal conditions has a short half-life due to the inhibitory action of Mdm2 (murine double minute 2) (56), the mutated p53 does not undergo this inhibition and accumulates to high levels in cancer cells (57). The Mdm2 is a frequently amplified gene in GBM (58). Its overexpression causes a loss of function of p53, in addition to mutation of the TP53 gene (59, 60) leading to the promotion of tumor cell growth and a resistance to chemo-radiotherapy (61) (Fig. 3).

Because of the critical role of p53 deficiency in glioma development and resistance to anticancer drugs, many strategies were developed to restore the effect of p53. Among the most important: gene therapy to restore p53 function and inhibitors of p53-Mdm2 interaction (62). Indeed, gene therapy provides the direct delivery of wild p53 in cancer cells. The adenoviral delivery of p53 was tested and has shown that it can improve the life quality and the prognosis in patients with recurrent malignant gliomas (63). Targeting the interaction of Mdm2 with p53 is also a potential cancer therapeutic strategy because of Mdm2 overexpression in gliomas (64). The treatment of cells with an inhibitor of p53-Mdm2 binding should result in stabilization and accumulation of the wild p53 protein (65). The Nutilin-3 is one of the molecules that have been developed for this purpose and has yielded interesting results in preclinical studies. Its action is related to its binding to Mdm2 in the p53 binding pocket and activates the p53 pathway (62, 65) (Table 1). The main limitation of inhibitors of p53-Mdm2 interaction is that they are effective only in cancer cells expressing wild-type p53, and have no effect in cells expressing mutant p53. Moreover, it is important to consider the toxic effect that can cause overexpression of p53 on normal cells expressing wild-type p53 (66).

Table 1: Different strategies tested *in vitro*, in preclinical and in clinical trials for inhibition of molecules involved in TMZ resistance of GBM

Molecule	Target	Mechanism of action	Effect	Limitations to use in clinical	Refs
O6-benzyl guanine (O6-BG) and O6-(4-bromothenyl) guanine	MGMT	Irreversible inactivation of MGMT by covalent link of benzyl or bromothenyl groups to the active cysteine residue of MGMT	Enhancing TMZ activity *in vitro* and *in vivo* in tumor cells possessing high levels of MGMT	High toxicity against normal cells especially bone marrow cells	(9, 18-20)
Cetuximab®	EGFR	monoclonal antibody binding specifically to EGFR	It specifically recognizes the wild EGFR and EGFRvIII *in vitro* which causes an inhibition of cell proliferation	Disappointing results *in vivo*	(36)
Gefitinib® and Erlotinib®		Tyrosine-kinase inhibitors (TKIs)	The association of TKIs and TMZ showed an improvement of survival median compared to the combination TMZ + radiotherapy	Effective only on subpopulation of patients with intact PTEN and MGMT promoter methylation	(36, 40)
Nutilin-3	Mdm2	Binding to Mdm2 and activation of the p53 pathway	Activation of the p53 pathway in cancer cells, leading to cell cycle arrest, apoptosis, and growth inhibition of human tumor xenografts in nude mice	- Effective only in cancer cells expressing wild-type p53. - Potential toxic effect by p53 accumulation	(62, 65, 66)
Synthetic lactulose amines	Galectin-1	β-galactoside which has an affinity for the CRD of Galectin-1	Tumor-cell apoptosis and suppression of tumor growth and metastasis	Potential gastro intestinal side effects	(53, 54, 80)
Galactomannan Davanat®		Binds Galectin-1 at a site distinct from the CRD	Davanat® increased by 46% the longevity of patients with colorectal cancer compared with the Best Standard of Care, and reduced by 41% the serious adverse effects compared to the Best Standard of Care	Not yet tested in GBM	

PTEN

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) is a tumor suppressor enzyme; frequently mutated in GBM leading to an enhancement of tumor cell proliferation (67, 68). PTEN protects wild type p53 from inactivation and degradation through the inhibition of PI3K and inhibition of Mdm2 transcription (69). In the other hand, p53 is able to increase the PTEN activity by enhancing PTEN gene transcription by binding to PTEN promoter (70). p53 can be stabilized by binding with PTEN who can also enhance the transcriptional activity of TP53 gene (71). This indicates that the association of wild type PTEN and wild type P53 can enhance the sensitivity of tumor cells to anticancer drugs especially to TMZ (Fig. 3).

2.2.4 miRNAs

miRNAs play a critical role as a novel class of oncogenes or tumor suppressor genes (72). Some studies have shown that aberrant miRNA expression could affect GBM sensitivity to TMZ (73). For example, miR-21, miR-195, miR-455-3p and miR-10a* are up-regulated in a TMZ-resistant cell line (74, 75). In the other hand, miR-145 is down-regulated in GBM tumor cells which enhance TMZ resistance (76) (Fig. 3). Concerning miRNAs, they may be exploited for development of new therapeutic strategy. Indeed, the oncogenic miRNAs can be downregulated using antisense oligonucleotides or miRNA sponge (77, 78), whereas tumor-suppressive miRNAs may be replaced with miRNA mimetics (79).

3. RNA Interference (RNAi): the new promising strategy to sensibilize GBM to TMZ

3.1. siRNA and miRNA

In recent years, the strategy of RNA interference (RNAi) whose principle is based on inhibition of protein synthesis by targeting a specific messenger RNA (mRNA) for degradation, was discovered and has opened up new perspectives in human diseases treatment. RNAi is an intrinsically cellular pathway discovered in 1998 (81, 82). Two classes of small RNAs have been identified to mediate RNAi, small interfering RNA (siRNA) and micro-RNA (miRNA).

For siRNA-mediated RNAi, the cellular process begins with long double-stranded RNAs (dsRNAs) cleaved in the cytoplasm by the enzyme Dicer to generate mature siRNAs of about 21–23 bp. The resulting siRNAs are incorporated into RNA-induced silencing complex (RISC) which becomes active. Following that, the antisense strand remains in the RISC complex and guides the RNAi enzymatic machinery while the sense strand is eliminated from the RISC complex. The RISC containing guide stand binds to complementary mRNA which causes its degradation by the enzyme Argonaute 2 (Ago-2) (83, 84) (Fig. 4).

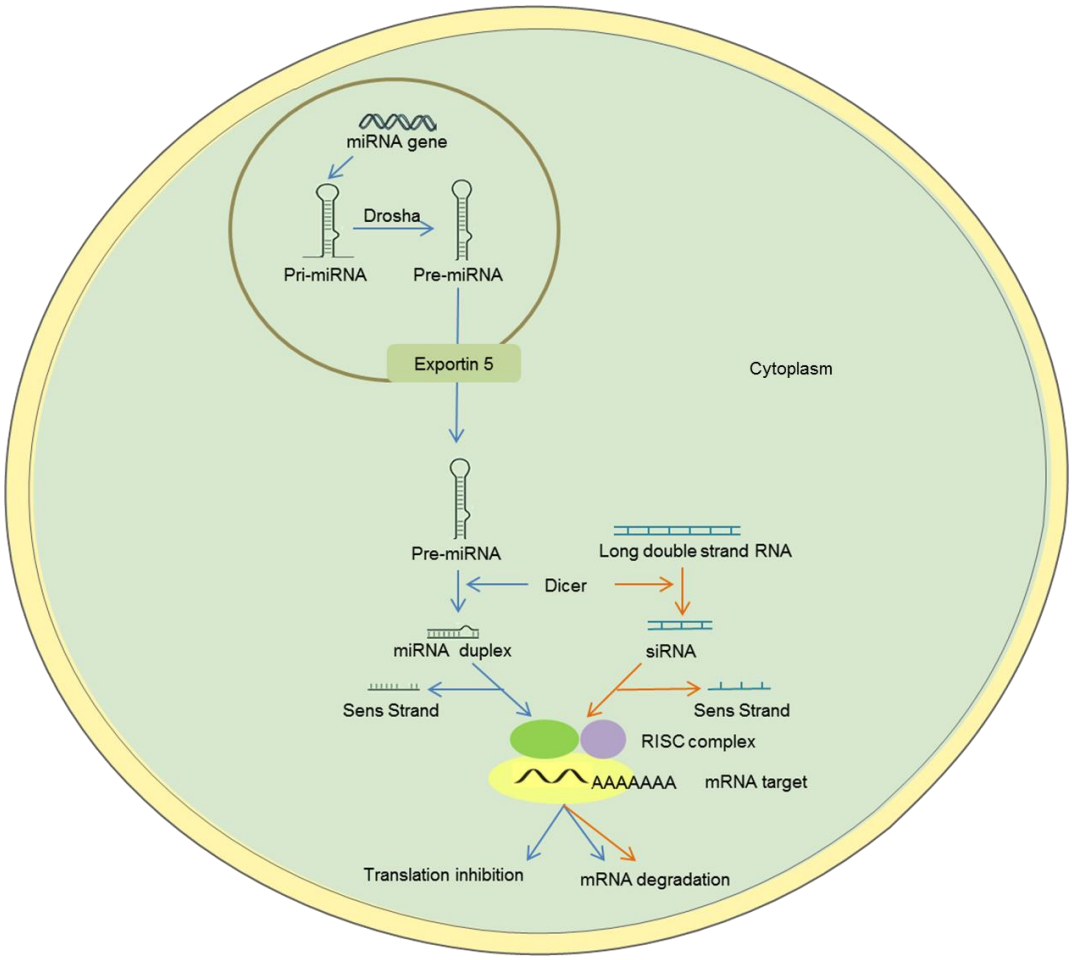

Figure 4: Mechanism of action of RNAi (siRNA and miRNA) in mammalian cells

Concerning miRNA-mediated RNAi, genes encoding miRNAs are transcripted into long primary transcripts (pri-miRNAs) that are cleaved by RNAse III Drosha to generate precursor miRNAs (pre-miRNAs) in the nucleus (85, 86). Pre-miRNAs are transported from the nucleus to the cytoplasm by the Exportin-5 and then processed by RNAse III Dicer to generate mature miRNAs of about 22 nucleotides (85). miRNAs are then incorporated into the RISC complex and bind through imperfect complementarity to the 3' untranslated region (UTR) of its mRNA target, leading to translational repression or mRNA degradation (85, 87). A single miRNA molecule is probably capable of regulating multiples mRNAs, and conversely one mRNA can be regulated by multiples miRNAs (Fig. 4).

3.2. RNAi delivery

The use of these small RNA molecules alones in therapeutic is not possible for several reasons, among these their negative charge that prevents them from crossing the plasma membrane to reach their target in the cytoplasm (83, 88). On the other hand, the presence of nucleases in plasma and in the cytoplasm are likely to deteriorate them rapidly after their injection into the blood (89), not to mention the immune response that can be triggered by their presence in the blood (89). These reasons emphasize the need for a suitable vector able to deliver these small RNA molecules into the desired cells.
Viral and non-viral vectors (90, 91) were developed to carry siRNAs to their site of action located in the cytoplasm. The RNAi induced by viral delivery was demonstrated using different viruses particularly adeno-associated virus (AAV), herpes simplex virus (HSV) and lentiviral vectors (85, 92).
Despite their efficiency, viral vectors have some limitations such as their residual pathogenic effect, which represents a potential risk to patients (93). Moreover, mutagenesis effect was observed in some clinical trials using these vectors. This is why non-viral vectors have been considerably developed. An ideal non-viral vector has certain attributes which are: i) to be biocompatible and biodegradable, ii) to be able to protect nucleic acids against nuclease degradation in plasma and avoid their renal clearance, iii) to allow a reversible binding of nucleic acids which triggers their release at the site of cellular action.
Different carriers of siRNAs and miRNAs were developed and described in the literature; most of them are positively charged to allow attachment of nucleic acids that are negatively charged and to allow a better interaction with the cell membrane and improves the cellular uptake (94). Among these vectors, there are polymeric nanoparticles, lipid based systems and inorganic nanoparticles.

3.2.1. Polymeric nanoparticles

Cationic polymers are able to interact with the negatively charged phosphate groups of nucleic acids which create complexes called polyplexes. Natural and synthetic polymers are used for RNAi delivery in mammalian cells (95).

Polyethyleneimine (PEI)
Polyethyleneimine (PEI) is a synthetic polymer considered to be the most effective polymer for siRNA delivery. Indeed, the high density of positive charge provided by this polymer leads to create strong links with nucleic acids thereby protecting them from enzymatic degradation by nucleases.
Factors such as molecular weight (MW) and degree of branching of PEI affect the efficiency and the toxicity of the polymer (96). Indeed, the high MW chains are more effective for siRNA delivery compared to the low MW chains. Similarly, the branched PEI is more efficient for siRNA binding than the linear form. However, the high MW chains and branched chains are the most toxic (96, 97) (Fig. 5).
PEI-siRNA complexes are internalized by endocytosis in various cells. This pathway is composed of vesicles known as endosomes with an internal pH around 5 that mature from early endosomes to late endosomes before fusing with lysosomes which contain digestive enzymes (98). The acidic lysosomal environment causes the protonation of the amine groups of PEI, that thanks to the proton sponge effect due to its high buffering capacity, induces osmotic swelling of the endocytosis vesicle until vesicle rupture, leading to the release of polyplexes in the cytoplasm (99). The ability of PEI to escape lysozomale degradation leads to the release of intact siRNA and miRNA in the cytoplasm and thus provides a high efficiency of gene silencing (98-100).

Chitosan
Chitosan is another polymer used for RNAi delivery. This natural polysaccharide consists of repeating D-glucosamine and N-acetyl D-glucosamine units linked by β(1-4) glycosidic bonds (101). It is obtained by deacetylation of chitin; it is considered to be a non-toxic and biocompatible polymer (102).
Chitosan MW, degree of deacetylation (DDA) and N/P ratio are factors that greatly influence siRNA transfection efficiency (102, 103). Indeed, higher MW chains are flexible allowing them to wrap the siRNAs in stable complexes and protect them from nucleases degradation. However, this stability can be an obstacle to the release of siRNAs in the cytoplasm. In addition, high MW chitosan showed drawbacks such as aggregation and low solubility at neutral pH. Low MW chains allow for more efficient intracellular release but low complexation (103).

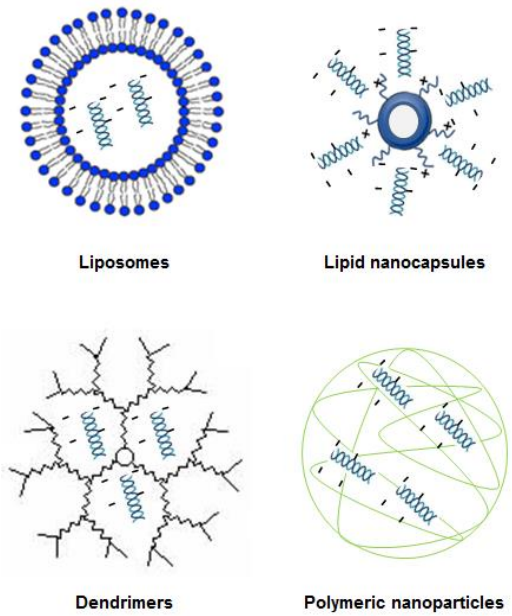

Figure 5: Different types of nanocarriers for RNAi delivery

Higher DDA enhances electrostatic interaction with siRNAs which leads to a greater stability of the complexes formed with siRNAs (104) (Fig. 5).
N/P ratio is defined as the ratio of the protonated amine groups of chitosan on the phosphate groups of the siRNA. The excess of positive charges in comparison to the negative charges increases the stability of the chitosan-siRNA complexes and increases uptake across anionic cell surface (104).

Dendrimers
Dendrimers are synthetic macromolecules; their structure is composed of a central core, branches of repeating units and terminal groups which can interact with charged molecules such as nucleic acids, imaging agents and anticancer drugs (105, 106). In addition, the internal hydrophobic cavities of dendrimers are able to encapsulate hydrophobic anticancer drugs (107) (Fig. 5).
Dendrimers with positively charged surface groups are used for RNAi delivery (108-110). Poly (amidoamine) dendrimers (PAMAM) is the most important type in dendrimer family (111). The PAMAM possess tertiary amine functions in their structure, which can be protonated in acidic medium and thus confer a “proton sponge” effect (112) which allows a release of siRNA and miRNA on cell level while preventing degradation in the endo- lysosomal compartment (111, 113). Some studies showed that PAMAM dendrimers are excellent non-viral vectors for siRNA and miRNA delivery thereby producing a powerful gene silencing *in vitro* and *in vivo* (114-118).
Despite their transfection efficiency, cationic and higher generations dendrimers have the disadvantage of interacting with blood components, destabilize cell membranes and cause cell lysis (119, 120).

3.2.2. Lipid based systems

Liposomes
Liposomes are efficient vectors for the delivery of drugs and nucleic acids (121). Liposomal forms of doxorubicin and amphotericin B obtained FDA approval for the treatment of Kaposi's sarcoma and fungal infections respectively (122). Liposomes are formed by unilamelar or multilamelar phospholipid bilayers. Three classes of phospholipids are used in the formulation of liposomes, they are anionic, cationic and neutral phospholipids (95, 122) (Fig. 5).
Due to their hydrophilic nature, the nucleic acids can be encapsulated in the core of liposomes. Conversely, cationic lipids are the most efficient for the transport of nucleic acids, because they are able to interact in the same way that the cationic polymers which create lipoplexes (99, 123). In addition to their ability to encapsulate drugs, the liposome surface can be functionalized to permit, firstly, an exhaust to the immune system by pegylation increasing the plasma half-life (124) and, secondly, to allow specific targeting tumor cells through the use of various ligands such as specific antibodies (125). Despite their transfection efficiency of nucleic acids, cationic liposomes have the drawback of being toxic which severely limits their clinical use (126).

Lipid nanoparticles
Various types of lipids nanoparticles have been developed. Among them, the lipid nanocapsules (LNCs) have a structure which is a hybrid between polymeric nanocapsules and liposomes because of their oily core which is surrounded by a tensioactive rigid membrane. LNCs have many advantages such as increased safety, high stability and the possibility of lipophilic drugs encapsulation such as paclitaxel (127). They can be produced without organic solvents by phase inversion process and with excipients Generally Recognized as Safe (GRAS) and Genetically Modified Organisms (GMO) free (128). The concept of this process uses the specific ability of some polyethoxylated surfactants such as polyethylene glycol (PEG) to modify their affinities for water and oil as a function of the temperature (129). These nanocapsules have shown their efficiency for nucleic acids delivery. Indeed, siRNA can be entrapped into LNCs after formation of lipoplexes with cationic liposomes(130). Another strategy consist on surface modification of LNCs by grafting cationic polymer such as chitosan to obtain a cationic vector capable of fixing nucleic acids by electrostatic attraction (131) (Fig. 5).

3.2.3. Inorganic nanoparticles

A number of inorganic nanoparticles have been developed for gene therapy. Carbon nanotubes, magnetic nanoparticles and gold nanoparticles are a part of inorganic nanoparticles (132). These systems are different from one another because of their composition and by the methods of formulation used.

Carbon nanotubes
Some studies have shown that carbon nanotubes easily cross the plasma membrane using an endocytosis-independent mechanism (132, 133). Several functionalized carbon nanotubes have been designed and tested for siRNA and miRNA delivery (134-137). The most effective formulations of carbon nanotubes were that functionalized with amino groups (138). Despite, their efficiency in the transport of nucleic acids, their toxicity profile causes problem for their use in clinical (139, 140).

Magnetic nanoparticles
Magnetic nanoparticles were developed for tumor imaging and drug delivery. siRNA delivery was tested with different magnetic nanoparticles such as iron oxide nanoparticles and have shown promising results (132). The advantage of the use of these nanoparticles is the possibility to deliver siRNA in desired tissue by applying an external magnetic field (141).

Gold nanoparticles
Gold nanoparticles are also used as non-viral vectors and present several opportunities for RNAi delivery because of their interesting properties, in particular their biocompatibility and low toxicity (142-144). Their stability allows avoiding interactions with serum ionic compounds in particular proteins (145). Gold nanoparticles possess photo thermal properties which can be exploited for cancer therapy (145). In addition their surface can be functionalized with specific ligands to allow easy fixation of small RNA molecules for gene therapy (145, 146).

3.3 RNAi delivery system used to sensitize GBM cells to TMZ

Studies that used RNAi to sensitize GBM cells to TMZ are synthetized in Table 2. The results obtained in these studies are very promising.
Despite this, only a few non-viral vectors are approved by FDA and are in clinical trials which show that there are

Table 2: RNAi delivery system used to sensitize GBM to TMZ

Delivery system	RNAi used	Targeted gene	*In vitro* model	Efficacy *in vitro*	Animal model	Route	Efficacy *in vivo*	Refs
Viral vectors								
Lentiviral vector	shRNA	MGMT	LN18 and T98 GBM cell lines	Inhibition of 80 % of the MGMT protein and increase of TMZ sensitivity in both cells	Subcutaneous tumors in Nude mice	Intratumoral	Tumor size was reduced to 46% of that at day 0 in combination with TMZ	(152)
Plasmid	Anti-EGFR shRNA + wild-type PTEN cDNA	EGFR and PTEN	U251 Glioma cells	The down-regulation of EGFR expression and up-regulation of PTEN expression resulted in the suppression of cell proliferation, arrest of cell cycle, and promotion of cell apoptosis	Subcutaneous tumors in Nude mice	Intratumoral	The growth of the subcutaneous tumor was significantly inhibited	(153)
Plasmid	siRNA	Mdm2		/	Nude mice	Intratumoral	Suppression of the HepG2 xenografted tumor growth remarkably and reduction of 60 % of the Mdm2 protein expression and increase by 45.9 % of p53 expression	(154)
Non-viral vectors								
LipoTrust liposome	siRNA	MGMT	T98G and U251 GBM cell lines	99 % of MGMT knockdown	Intracranial tumors in NOD/SCID mice	Intratumoral	Response to TMZ significantly increased	(155)
Profection Mammalian Transfection System®	siRNA	Galectin-1	HS683 GBM cells	Inhibition of 60 % of the Galectin-1 and increase of cytotoxic effect of TMZ in these cells	Nude mice	Intratumoral	Galectin-1 knockdown in orthotopic xenograft-Hs683 enhanced the TMZ effect and increased the survival of mice compared to controls	(156)
Lipofectamine	siRNA	Mutant p53	T98G and U138 GBM cells	p53 knockdown led to a fivefold increase in chemosensitivity to TMZ	/		/	(157)
Chitosan transacylated lipid nanocapsules	siRNA	EGFR	U87MG GBM cell line	Inhibition of 51.9 % of EGFR production on U87MG cells and increase of TMZ sensitivity	/		/	(131)
Polyurethane-short branch polyethylenimine	miRNA-145	Oct4 and Sox2	GBM-CD133+ cells	Increase the sensitivity of treated cells to radiation and TMZ	Intracranial tumors in Nude mice	Intratumoral	Delivery of PU-PEI-miR145 in orthotopic GBM-CD133+ improved the survival rate in combination with radiotherapy and TMZ	(76)

still some barriers to overcome, particularly in terms of selectivity, efficacy and toxicity.

Indeed, for the clinical application, RNAi-based cancer therapeutics should specifically recognize cancer cells without affecting normal cells. The selectivity of nanocarriers was improved by their conjugation to specific ligands which can bind the tumor cells receptors. However, in order to reach their target in cancer cells, it is necessary to increase the circulation time of these particles in plasma by protecting them against a capture by the reticulo-endothelial cell system (RES). This protection can be efficiently achieved through a PEG coating that also has the drawback of reducing the cancer cells uptake of these particles (132).

Safety vectors are crucial to improve because even though many vectors have proven their efficiency in the transport and delivery of drugs and nucleic acids, they often cause a stimulation of the immune response and cytotoxicity that does not allow them clinical use. The improved safety profile of vectors through the use of biocompatible, biodegradable and non-toxic compounds (132).

In addition to efficacy, selectivity and safety, vectors must be produced on a large scale to allow their use in clinical trials. However, the production of non-viral vectors at large scale has only been demonstrated with a limited number of drug delivery systems, this impairs the use of these promising formulations in clinical trials (147).

In GBMs, to be effective a vector must cross the blood-brain barrier (BBB) to release the interfering RNA in the tumor which is difficult to achieve when the administration is done by intravenous way. Indeed, this barrier protects the brain from toxins and drugs presented in the circulation; this protection is ensured in particular by the tight junctions and efflux pumps such as the P-glycoprotein (P-gp) which .actively remove these molecules to the circulation which explains the failure of some chemotherapy(148). In addition, this barrier seem to be seem to be somewhat disrupted in the abnormal vascular networks characterizing GBMs, but it frequently remains intact along the infiltrating area where the plurality of recurrences tend to occur (149).

The local administration of nanocarriers avoids crossing the BBB and deliver drugs directly in the brain parenchyma. The major drawback of this technique is poor diffusion of particles in the tumor which does not allow the drug to reach the area of the recurrence of GBMs located a few centimeters from the tumor area (150). Moreover, problems of particles reflux from tumor area are often encountered which reduces the effectiveness of treatment. This is partly solved by the development of the Convection - Enhanced Delivery (CED) which allows injecting the particles under pressure gradient for more homogeneous distribution in the tumor (151).

Secondly, GBMs are very heterogeneous tumors characterized by that overexpression of multiple proteins in the same time that are involved in resistance to TMZ. This implies that, for effective treatment by RNAi, it is necessary to adapt the therapy to each patient based on their molecular characteristics. In addition, GBMs resistance to TMZ can be innate or acquired, which can cause a rapid recurrence of tumor after initial remission. This illustrate that, the successful of RNAi based treatment requires a simultaneous targeting of the multiples implicated pathways simultaneously (149).

4. Conclusion

Concomitant administration of TMZ and radiotherapy improved prognosis of patients with GBM by increasing median survival, but this effect remains modest. The development of molecular biology has allowed us to understand the involvement of certain genes in cancer resistance and allowed to define the molecular profile of each tumor. RNAi is one of the most promising strategies to overcome cancer resistance. Indeed, this strategy can be applied to achieve different targets involved in GBM resistance to TMZ. These targets could be identified by genetic screening to find individual out of control genes. This allows adapting this strategy for each patient, which is an advantage given the heterogeneity of GBMs. In addition, the development of nanocarriers able to transport drugs and nucleic acids provides a synergistic effect with lower effective doses of these drugs and side effects. Further investigations are still being carried out to improve the safety of these nanocarriers and their effectiveness for clinical application.

References

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):987-96.
2. Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. Expert Rev Anticancer Ther. 2006;6(5):719-32.
3. Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic drugs: a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. Oncologist. 2007;12(12):1395-403.
4. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. 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. 2009;10(5):459-66.
5. Pletsas D, Garelnabi EA, Li L, Phillips RM, Wheelhouse RT. Synthesis and quantitative structure-activity relationship of imidazotetrazine prodrugs with activity independent of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, DNA mismatch repair, and p53. J Med Chem. 2013;56(17):7120-32.
6. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. Biochemistry. 1994;33(31):9045-51.
7. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. Clin Cancer Res. 2000;6(7):2585-97.
8. Drablos F, Feyzi E, Aas PA, Vaagbo CB, Kavli B, Bratlie MS, et al. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. DNA Repair (Amst). 2004;3(11):1389-407.
9. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Current molecular pharmacology. 2012;5(1):102-14.
10. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair (Amst). 2007;6(8):1079-99.
11. Park CK, Kim JE, Kim JY, Song SW, Kim JW, Choi SH, et al. The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. Translational oncology. 2012;5(5):393-7.
12. Tubbs JL, Pegg AE, Tainer JA. DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. DNA Repair (Amst). 2007;6(8):1100-15.
13. Xu-Welliver M, Pegg AE. Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Carcinogenesis. 2002;23(5):823-30.
14. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N Engl J Med. 2000;343(19):1350-4.
15. Bhakat KK, Mitra S. CpG methylation-dependent repression of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. Carcinogenesis. 2003;24(8):1337-45.
16. Silber JR, Bobola MS, Blank A, Chamberlain MC. O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. Biochim Biophys Acta. 2012;1826(1):71-82.
17. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352(10):997-1003.

18. Kaina B, Margison GP, Christmann M. Targeting O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase with specific inhibitors as a strategy in cancer therapy. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2010;67(21):3663-81.
19. Verbeek B, Southgate TD, Gilham DE, Margison GP. O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. British medical bulletin. 2008;85:17-33.
20. Hansen WK, Kelley MR. Review of mammalian DNA repair and translational implications. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 2000;295(1):1-9.
21. Fu D, Calvo JA, Samson LD. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Nature reviews Cancer. 2012;12(2):104-20.
22. Liu L, Markowitz S, Gerson SL. Mismatch repair mutations override alkyltransferase in conferring resistance to temozolomide but not to 1,3-bis(2-chloroethyl)nitrosourea. Cancer Res. 1996;56(23):5375-9.
23. Almeida KH, Sobol RW. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. DNA Repair (Amst). 2007;6(6):695-711.
24. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. Science. 2001;291(5507):1284-9.
25. Malanga M, Althaus FR. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire. 2005;83(3):354-64.
26. Horton JK, Wilson SH. Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency. DNA Repair (Amst). 2007;6(4):530-43.
27. Munoz-Gamez JA, Lopez Viota J, Barrientos A, Carazo A, Sanjuan-Nunez L, Quiles-Perez R, et al. Synergistic cytotoxicity of the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 and temozolomide in dual-drug targeted magnetic nanoparticles. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 2014.
28. Tentori L, Graziani G. Recent approaches to improve the antitumor efficacy of temozolomide. Curr Med Chem. 2009;16(2):245-57.
29. Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. Sci Signal. 2009;2(87).
30. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. Oncogene. 1997;15(23):2755-65.
31. Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, Cavenee WK. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. Cancer Res. 2002;62(22):6764-9.
32. Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. Oncogene. 2004;23(22):3898-904.
33. Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. Cancer Res. 1991;51(8):2164-72.
34. Lo HW. EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. Current molecular pharmacology. 2010;3(1):37-52.
35. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nature reviews Immunology. 2010;10(5):317-27.
36. Neyns B, Sadones J, Joosens E, Bouttens F, Verbeke L, Baurain JF, et al. Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 2009;20(9):1596-603.
37. Combs SE, Heeger S, Haselmann R, Edler L, Debus J, Schulz-Ertner D. Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. BMC cancer. 2006;6:133.
38. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Hegi ME, Stupp R. Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. Clin Cancer Res. 2008;14(4):957-60.
39. Brown PD, Krishnan S, Sarkaria JN, Wu W, Jaeckle KA, Uhm JH, et al. Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. J Clin Oncol. 2008;26(34):5603-9.
40. Prados MD, Chang SM, Butowski N, DeBoer R, Parvataneni R, Carliner H, et al. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. J Clin Oncol. 2009;27(4):579-84.
41. Chakravarti A, Wang M, Robins HI, Lautenschlaeger T, Curran WJ, Brachman DG, et al. RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2013;85(5):1206-11.
42. Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC, et al. Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. International journal of radiation oncology, biology, physics. 2011;80(2):347-53.
43. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. Nature reviews Cancer. 2005;5(1):29-41.
44. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. Glycobiology. 2006;16(11):137R-57R.
45. Verschuere T, De Vleeschouwer S, Lefranc F, Kiss R, Van Gool SW. Galectin-1 and immunotherapy for brain cancer. Expert Rev Neurother. 2011;11(4):533-43.
46. Le QT, Shi G, Cao H, Nelson DW, Wang Y, Chen EY, et al. Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. J Clin Oncol. 2005;23(35):8932-41.
47. Camby I, Decaestecker C, Lefranc F, Kaltner H, Gabius HJ, Kiss R. Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern. Biochem Biophys Res Commun. 2005;335(1):27-35.
48. Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, et al. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Trends in immunology. 2002;23(6):313-20.
49. Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Kiss R, Lefranc F. Galectins and gliomas. Brain Pathol. 2010;20(1):17-27.
50. Le Mercier M, Lefranc F, Mijatovic T, Debeir O, Haibe-Kains B, Bontempi G, et al. Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. Toxicol Appl Pharmacol. 2008;229(2):172-83.
51. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Ballan E, Kloog Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. Oncogene. 2001;20(51):7486-93.
52. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. Cancer Cell. 2004;5(3):241-51.
53. Rabinovich GA, Cumashi A, Bianco GA, Ciavardelli D, Iurisci I, D'Egidio M, et al. Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. Glycobiology. 2006;16(3):210-20.
54. Miller MC, Klyosov A, Mayo KH. The alpha-galactomannan Davanat binds galectin-1 at a site different from the conventional galectin carbohydrate binding domain. Glycobiology. 2009;19(9):1034-45.
55. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. Oncogene. 2003;22(56):9030-40.
56. Shangary S, Wang S. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. Annual review of pharmacology and toxicology. 2009;49:223-41.
57. Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene. 2007;26(15):2157-65.
58. Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 1999;55(1):96-107.
59. Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol. 1997;56(2):180-5.
60. Burton EC, Lamborn KR, Forsyth P, Scott J, O'Campo J, Uyehara-Lock J, et al. Aberrant p53, mdm2, and proliferation differ in glioblastomas from long-term compared with typical survivors. Clin Cancer Res. 2002;8(1):180-7.
61. Shchors K, Persson AI, Rostker F, Tihan T, Lyubynska N, Li N, et al. Using a preclinical mouse model of high-grade astrocytoma to optimize p53 restoration therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(16):E1480-9.
62. Hong B, van den Heuvel AP, Prabhu VV, Zhang S, El-Deiry WS. Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities. Current drug targets. 2014;15(1):80-9.
63. Zhu JX, Li ZM, Geng FY, Fu Q, Guo CJ, Xiao YL, et al. [Treatment of recurrent malignant gliomas by surgery combined with recombinant adenovirus-p53 injection]. Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology]. 2010;32(9):709-12.
64. Wang AL, Liu ZX, Li G, Zhang LW. Expression and significance of P53 protein and MDM-2 protein in human gliomas. Chinese medical journal. 2011;124(16):2530-3.
65. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science. 2004;303(5659):844-8.
66. Ringshausen I, O'Shea CC, Finch AJ, Swigart LB, Evan GI. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. Cancer Cell. 2006;10(6):501-14.
67. Kato H, Kato S, Kumabe T, Sonoda Y, Yoshimoto T, Kato S, et al. Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. Clin Cancer Res. 2000;6(10):3937-43.
68. Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. Pten signaling in gliomas. Neuro Oncol. 2002;4(3):196-211.
69. Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. J Biol Chem. 2002;277(7):5484-9.

70. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, et al. Regulation of PTEN transcription by p53. Molecular cell. 2001;8(2):317-25.
71. Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. Cancer cell. 2003;3(2):117-30.
72. Babashah S, Soleimani M. The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. Eur J Cancer. 2011;47(8):1127-37.
73. Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N, Amano T, Nakamizo A, et al. Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. Frontiers in oncology. 2013;3:19.
74. Shi L, Chen J, Yang J, Pan T, Zhang S, Wang Z. MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. Brain research. 2010;1352:255-64.
75. Ujifuku K, Mitsutake N, Takakura S, Matsuse M, Saenko V, Suzuki K, et al. miR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells. Cancer letters. 2010;296(2):241-8.
76. Yang YP, Chien Y, Chiou GY, Cherng JY, Wang ML, Lo WL, et al. Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI. Biomaterials. 2012;33(5):1462-76.
77. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. Nature methods. 2007;4(9):721-6.
78. Esau CC. Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides. Methods. 2008;44(1):55-60.
79. Pang JC, Kwok WK, Chen Z, Ng HK. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. Acta neuropathologica. 2009;117(6):599-611.
80. Anatole K, Eliezer Z, David P. DAVANAT® (GM-CT-01) and Colon Cancer: Preclinical and Clinical (Phase I and II) Studies. Glycobiology and Drug Design. ACS Symposium Series. 1102: American Chemical Society; 2012. p. 89-130.
81. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998;391(6669):806-11.
82. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 2002;3(10):737-47.
83. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. Adv Drug Deliv Rev. 2007;59(2-3):75-86.
84. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet. 2007;8(3):173-84.
85. Guo D, Wang B, Han F, Lei T. RNA interference therapy for glioblastoma. Expert Opin Biol Ther. 2010;10(6):927-36.
86. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature. 2003;425(6956):415-9.
87. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. Frontiers in genetics. 2014;5:23.
88. Reischl D, Zimmer A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. Nanomedicine. 2009;5(1):8-20.
89. Volkov AA, Kruglova NS, Meschaninova MI, Venyaminova AG, Zenkova MA, Vlassov VV, et al. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. Oligonucleotides. 2009;19(2):191-202.
90. David S, Pitard B, Benoit JP, Passirani C. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. Pharmacol Res. 2010;62(2):100-14.
91. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. Cell Cycle. 2006;5(18):2103-9.
92. Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. Cell. 2009;137(6):1005-17.
93. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, Soulier J, Lim A, Morillon E, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest. 2008;118(9):3132-42.
94. Kim SS, Garg H, Joshi A, Manjunath N. Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo. Trends in molecular medicine. 2009;15(11):491-500.
95. Nikitenko NA, Prassolov VS. Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. Acta naturae. 2013;5(3):35-53.
96. Lungwitz U, Breunig M, Blunk T, Gopferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. Eur J Pharm Biopharm. 2005;60(2):247-66.
97. Kircheis R, Wightman L, Wagner E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. Adv Drug Deliv Rev. 2001;53(3):341-58.
98. Varkouhi AK, Scholte M, Storm G, Haisma HJ. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2011;151(3):220-8.
99. Zhou J, Shum KT, Burnett JC, Rossi JJ. Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges. Pharmaceuticals. 2013;6(1):85-107.
100. Ibrahim AF, Weirauch U, Thomas M, Grunweller A, Hartmann RK, Aigner A. MicroRNA replacement therapy for miR-145 and miR-33a is efficacious in a model of colon carcinoma. Cancer research. 2011;71(15):5214-24.
101. Buschmann MD, Merzouki A, Lavertu M, Thibault M, Jean M, Darras V. Chitosans for delivery of nucleic acids. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(9):1234-70.
102. Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(1):12-27.
103. Jin L, Zeng X, Liu M, Deng Y, He N. Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers. Theranostics. 2014;4(3):240-55.
104. Liu X, Howard KA, Dong M, Andersen MO, Rahbek UL, Johnsen MG, et al. The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. Biomaterials. 2007;28(6):1280-8.
105. Biswas S, Torchilin VP. Dendrimers for siRNA Delivery. Pharmaceuticals. 2013;6(2):161-83.
106. Menjoge AR, Kannan RM, Tomalia DA. Dendrimer-based drug and imaging conjugates: design considerations for nanomedical applications. Drug discovery today. 2010;15(5-6):171-85.
107. Zhang M, Guo R, Wang Y, Cao X, Shen M, Shi X. Multifunctional dendrimer/combretastatin A4 inclusion complexes enable in vitro targeted cancer therapy. International journal of nanomedicine. 2011;6:2337-49.
108. Inoue Y, Kurihara R, Tsuchida A, Hasegawa M, Nagashima T, Mori T, et al. Efficient delivery of siRNA using dendritic poly(L-lysine) for loss-of-function analysis. J Control Release. 2008;126(1):59-66.
109. Perez AP, Romero EL, Morilla MJ. Ethylendiamine core PAMAM dendrimers/siRNA complexes as in vitro silencing agents. Int J Pharm. 2009;380(1-2):189-200.
110. Taratula O, Garbuzenko OB, Kirkpatrick P, Pandya I, Savla R, Pozharov VP, et al. Surface-engineered targeted PPI dendrimer for efficient intracellular and intratumoral siRNA delivery. J Control Release. 2009;140(3):284-93.
111. Wu J, Huang W, He Z. Dendrimers as carriers for siRNA delivery and gene silencing: a review. TheScientificWorldJournal. 2013;2013:630654.
112. Kukowska-Latallo JF, Bielinska AU, Johnson J, Spindler R, Tomalia DA, Baker JR, Jr. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93(10):4897-902.
113. Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2013;172(3):962-74.
114. Liu X, Liu C, Catapano CV, Peng L, Zhou J, Rocchi P. Structurally flexible triethanolamine-core poly(amidoamine) dendrimers as effective nanovectors to deliver RNAi-based therapeutics. Biotechnology advances. 2013.
115. Liu X, Liu C, Laurini E, Posocco P, Pricl S, Qu F, et al. Efficient delivery of sticky siRNA and potent gene silencing in a prostate cancer model using a generation 5 triethanolamine-core PAMAM dendrimer. Mol Pharm. 2012;9(3):470-81.
116. Liu XX, Rocchi P, Qu FQ, Zheng SQ, Liang ZC, Gleave M, et al. PAMAM dendrimers mediate siRNA delivery to target Hsp27 and produce potent antiproliferative effects on prostate cancer cells. ChemMedChem. 2009;4(8):1302-10.
117. Zhou J, Wu J, Hafdi N, Behr JP, Erbacher P, Peng L. PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing. Chemical communications. 2006(22):2362-4.
118. Liu X, Li G, Su Z, Jiang Z, Chen L, Wang J, et al. Poly(amido amine) is an ideal carrier of miR-7 for enhancing gene silencing effects on the EGFR pathway in U251 glioma cells. Oncology reports. 2013;29(4):1387-94.
119. Aillon KL, Xie Y, El-Gendy N, Berkland CJ, Forrest ML. Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. Adv Drug Deliv Rev. 2009;61(6):457-66.
120. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, et al. Interaction of poly(amidoamine) dendrimers with supported lipid bilayers and cells: hole formation and the relation to transport. Bioconjugate chemistry. 2004;15(4):774-82.
121. Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. J Clin Invest. 2007;117(12):3623-32.
122. Ozpolat B, Sood AK, Lopez-Berestein G. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev. 2014;66:110-6.
123. Rai K, Takigawa N, Ito S, Kashihara H, Ichihara E, Yasuda T, et al. Liposomal delivery of MicroRNA-7-expressing plasmid overcomes epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistance in lung cancer cells. Molecular cancer therapeutics. 2011;10(9):1720-7.
124. Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, Rodrigues CM. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. Drug discovery today. 2013;18(5-6):282-9.

125. Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. Clin Cancer Res. 2004;10(11):3667-77.
126. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2006;114(1):100-9.
127. Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Rousselet MC, Moal V, Urban T, et al. Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice. Pharm Res. 2010;27(3):421-30.
128. Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, Vecellio L, Clavreul A, Roger E, et al. Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. Eur J Pharm Biopharm. 2009;73(2):239-46.
129. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. Pharm Res. 2002;19(6):875-80.
130. Resnier P, David S, Lautram N, Delcroix GJ, Clavreul A, Benoit JP, et al. EGFR siRNA lipid nanocapsules efficiently transfect glioma cells in vitro. Int J Pharm. 2013;454(2):748-55.
131. Messaoudi K, Saulnier P, Boesen K, Benoit JP, Lagarce F. Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. Int J Nanomedicine. 2014;9:1479-90.
132. Lee JM, Yoon TJ, Cho YS. Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. BioMed research international. 2013;2013:782041.
133. Cai D, Mataraza JM, Qin ZH, Huang Z, Huang J, Chiles TC, et al. Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing. Nature methods. 2005;2(6):449-54.
134. Bates K, Kostarelos K. Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: past achievements, present challenges and future goals. Adv Drug Deliv Rev. 2013;65(15):2023-33.
135. Wang X, Ren J, Qu X. Targeted RNA interference of cyclin A2 mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes induces proliferation arrest and apoptosis in chronic myelogenous leukemia K562 cells. ChemMedChem. 2008;3(6):940-5.
136. Chen H, Ma X, Li Z, Shi Q, Zheng W, Liu Y, et al. Functionalization of single-walled carbon nanotubes enables efficient intracellular delivery of siRNA targeting MDM2 to inhibit breast cancer cells growth. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2012;66(5):334-8.
137. Kam NW, Liu Z, Dai H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. J Am Chem Soc. 2005;127(36):12492-3.
138. Zhang Z, Yang X, Zhang Y, Zeng B, Wang S, Zhu T, et al. Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2006;12(16):4933-9.
139. Firme CP, 3rd, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. Nanomedicine. 2010;6(2):245-56.
140. Zhang L, Alizadeh D, Badie B. Carbon nanotube uptake and toxicity in the brain. Methods in molecular biology. 2010;625:55-65.
141. Wu Y, Chu M, Shi B, Li Z. A novel magneto-fluorescent nano-bioprobe for cancer cell targeting, imaging and collection. Applied biochemistry and biotechnology. 2011;163(7):813-25.
142. Daniel MC, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. Chemical reviews. 2004;104(1):293-346.
143. Sonavane G, Tomoda K, Makino K. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. Colloids and surfaces B, Biointerfaces. 2008;66(2):274-80.
144. Zhao E, Zhao Z, Wang J, Yang C, Chen C, Gao L, et al. Surface engineering of gold nanoparticles for in vitro siRNA delivery. Nanoscale. 2012;4(16):5102-9.
145. Dreaden EC, Mackey MA, Huang X, Kang B, El-Sayed MA. Beating cancer in multiple ways using nanogold. Chemical Society reviews. 2011;40(7):3391-404.
146. Giljohann DA, Seferos DS, Prigodich AE, Patel PC, Mirkin CA. Gene regulation with polyvalent siRNA-nanoparticle conjugates. J Am Chem Soc. 2009;131(6):2072-3.
147. Thomas O, Lagarce F. Lipid nanocapsules: a nanocarrier suitable for scale-up process. J Drug Del Sci Tech 2013;23(6):555-9.
148. Loscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. Progress in neurobiology. 2005;76(1):22-76.
149. Huse JT, Holland EC. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. Nature reviews Cancer. 2010;10(5):319-31.
150. Tzeng SY, Green JJ. Therapeutic nanomedicine for brain cancer. Therapeutic delivery. 2013;4(6):687-704.
151. Zhang R, Saito R, Mano Y, Kanamori M, Sonoda Y, Kumabe T, et al. Concentration rather than dose defines the local brain toxicity of agents that are effectively distributed by convection-enhanced delivery. Journal of neuroscience methods. 2014;222:131-7.
152. Viel T, Monfared P, Schelhaas S, Fricke IB, Kuhlmann MT, Fraefel C, et al. Optimizing glioblastoma temozolomide chemotherapy employing lentiviral-based anti-MGMT shRNA technology. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. 2013;21(3):570-9.
153. Han L, Zhang AL, Xu P, Yue X, Yang Y, Wang GX, et al. Combination gene therapy with PTEN and EGFR siRNA suppresses U251 malignant glioma cell growth in vitro and in vivo. Med Oncol. 2010;27(3):843-52.
154. Zhao YY, Li YG, Sun YJ, Liu HP, Yang ZC, Zhang DD, et al. [ShRNA-mediated silencing of MDM2 inhibits growth of HepG2 hepatocellular carcinoma cells xenografted in nude mice]. Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology. 2013;21(3):213-7.
155. Kato T, Natsume A, Toda H, Iwamizu H, Sugita T, Hachisu R, et al. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxity of temozolomide in GBM-initiating cells. Gene Ther. 2010;17(11):1363-71.
156. Le Mercier M, Mathieu V, Haibe-Kains B, Bontempi G, Mijatovic T, Decaestecker C, et al. Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. J Neuropathol Exp Neurol. 2008;67(5):456-69.
157. Wang X, Chen JX, Liu YH, You C, Mao Q. Mutant TP53 enhances the resistance of glioblastoma cells to temozolomide by up-regulating O(6)-methylguanine DNA-methyltransferase. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology. 2013;34(8):1421-8.

Objectifs généraux du travail expérimental

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre d'une stratégie de sensibilisation des GBMs au TMZ par l'utilisation de siRNA ciblant les protéines impliquées dans la résistance de ces tumeurs à cet anticancéreux.

Dans un premier temps, ce travail a consisté à concevoir un vecteur cationique à partir de LNCs qui ont subi une modification de surface par greffage de chitosan grâce au procédé de transacylation. Ceci a permis une fixation des siRNA à la surface de ces particules par simple attraction électrostatique. Après purification et caractérisation physico-chimique des LNCs transacylées au chitosan, une évaluation de l'efficacité de traitement de cellules de GBMs par un siRNA anti-EGFR transporté par ces particules cationiques a été réalisée par quantification du taux de réduction de l'EGFR surexprimé dans ces cellules. Ensuite, une évaluation de l'effet de cette inhibition de l'expression de l'EGFR dans ces cellules sur leur sensibilité au TMZ a été réalisée.

Dans un deuxième temps, connaissant l'implication de l'EGFR, de la galectine-1 et de la MGMT dans la résistance des GBMs au TMZ, nous avons combiné l'effet de ces siRNA deux à deux et l'effet des trois dans le but de réduire la production cellulaire des protéines cibles et de potentialiser encore plus l'effet du TMZ.

Enfin, la dernière partie est consacrée aux études *in vivo.* Ces études ont été réalisées pour confirmer les résultats des études *in vitro* et de faire une preuve de concept de l'efficacité de traitement.

CHAPITRE 1 :

CONCEPTION D'UN VECTEUR de siRNA

CONCEPTION D'UN VECTEUR de siRNA

RATIONNEL

L'amplification de l'*EGFR* est associée à une mauvaise réponse aux traitements anticancéreux en particulier le TMZ ce qui aboutit à un mauvais pronostique.

Le ciblage de ce récepteur par un siRNA spécifique afin de réduire son expression dans les cellules tumorales gliales pourrait améliorer la sensibilité de celles-ci au TMZ.

OBJECTIF

L'objectif de ce travail a été de cibler l'*EGFR* par un siRNA spécifique transporté par des nanocapusles transacylées au chitosan (chitosan-LNCs) dans les cellules U87MG qui sont issues de GBM humain afin de réduire sa production cellulaire. Une évaluation de l'effet sur la sensibilité de ces cellules tumorales au TMZ a été ensuite évaluée.

RESULTATS

Au cours de ce travail, nous avons montré que la modification de surface des LNCs était effective suite à la réaction de transacylation. De plus, les nanocapsules transacylées au chitosan (chitosan-LNCs) obtenues étaient stables et capables de fixer les siRNAs à leur surface par attraction électrostatique.

Le ciblage de l'EGFR dans les cellules U87MG par un siRNA anti-EGFR transporté par les chitosan-LNCs s'est avéré efficace et a entrainé une diminution significative de la production de ce récepteur. Ceci a permis d'augmenter significativement l'effet du TMZ.

Ces résultats publiés dans *International Journal of Nanomedecin*e confirment l'efficacité de ce vecteur et permettent de valider ce concept *in vitro*.

International Journal of Nanomedicine

Dovepress
open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine
24 March 2014
Number of times this article has been viewed

Khaled Messaoudi[1]
Patrick Saulnier[1]
Kim Boesen[1]
Jean-Pierre Benoit[1,2]
Frederic Lagarce[1,2]

[1]L'Université Nantes Angers Le Mans, INSERM U1066, Micro et nanomédecines biomimétiques, Angers, France; [2]Pharmacy Department, Angers University Hospital, Angers, France

Abstract: Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a crucial protein that plays an important role in the maintenance and development of glioblastomas. The silencing or knockdown of *EGFR* is possible by administering a small interfering ribonucleic acid (siRNA). Lipid nanocapsules (LNCs) covered by chitosan were developed in our laboratory by a transacylation process. The resulting nanocapsules have a positive zeta potential that enables electrostatic interactions with the negatively-charged siRNA. Prior to transfection, the cytotoxicity of the nanocapsules by (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) test was performed on the U87MG cell line to determine non-toxic levels of the LNCs to avoid cell mortality. Treatment of the U87MG cells with the chitosan-transacylated LNCs/anti-EGFR siRNA complex resulted in a reduction of EGFR expression by 51.95%±6.03% ($P \leq 0.05$) after 96 hours of incubation. It also increased the cellular sensitivity to temozolomide in comparison to untreated cells with siRNA. The largest increase in mortality was 62.55%±3.55% ($P < 0.05$). This successful knockdown provides proof for the concept of surface grafting of siRNA onto LNCs to modify cell sensitivity to temozolomide. The method could be implemented in future clinical models regarding the experimental treatment of glioblastoma cancer.

Keywords: EGFR, glioblastoma, siRNA, lipid nanocapsules, chitosan, temozolomide

Introduction

Glioblastoma is the most common primary brain tumor in adults.[1,2] Median survival is 14 months and the percentage of patients living for 5 years or more is lower than 10%.[3] Despite the advances made during the last few years in brain tumor therapy, the prognosis of this disease has not improved. Current therapy includes surgical intervention, radiotherapy, and chemotherapy with temozolomide.[3]

Glioblastoma cells overexpress many kinds of proteins, growth factors, and receptors.[4–6] Epidermal growth factor receptor (EGFR) is one of the receptors that play an important role in tumor development by stimulating cell proliferation and cell resistance to apoptosis and autophagy and hence contributes to a malignant phenotype.[7] It also plays an important role in anticancer drug resistance by stimulation of the Ras/Raf/ERK[8] and PI3K/Akt/m-TOR[9] signaling pathways implicated in the inhibition of cell autophagy and apoptosis.[10] Some studies have shown that the inhibition of *EGFR* may have clinical importance for patients with glioblastoma.[11]

In recent years, the strategy of ribonucleic acid interference (RNAi), whose principle process is to reduce the expression of target messenger RNA (mRNA), was discovered,

Correspondence: Frederic Lagarce
L'Université Nantes Angers Le Mans, L'unité Micro et Nanomédecines Biomimétiques, bâtiment IBS (Institut de Biologie en Santé) regroupant l'IRIS (Institut de recherche et d'ingénierie en santé), 4 rue Larrey, F-49933 Angers, France
Tel +33 244 688 568
Fax +33 244 688 546
Email frederic.lagarce@univ-angers.fr

© 2014 Messaoudi et al. This work is published by Dove Medical Press Limited, and licensed under Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License. The full terms of the License are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. Permissions beyond the scope of the License are administered by Dove Medical Press Limited. Information on how to request permission may be found at: http://www.dovepress.com/permissions.php

opening up new perspectives in different areas of medicine. RNAi is an intrinsically cellular pathway discovered in 1998.[12–14] This pathway can be initiated by introducing small interfering RNA (siRNA) consisting of double-stranded RNA of 21–23 nucleotides. In the cytoplasm, these siRNA molecules are incorporated into a nuclease-containing multi-protein complex called RNA-induced silencing complex (RISC). Following that, the antisense strand remains in the RISC complex and guides the RNAi enzymatic machinery while the sense strand of the RISC complex is eliminated. Degradation of the complementary mRNA is provided by nuclease argonaute-2.

The use of therapeutic siRNAs alone is not possible for several reasons, including their negative charge; this charge prevents them from crossing the plasma membrane to reach their target in the cytoplasm.[15–17] On the other hand, the presence of nucleases in plasma and the cytoplasm are likely to deteriorate siRNAs rapidly after their injection into the blood; additionally, the immune response that can be triggered by their presence in the blood may also lead to their degradation.[18] These reasons emphasize the need for a suitable vector able to deliver the siRNA into the desired cells.

The vectors used thus far include viral vectors[19] (adenovirus, adeno-associated virus [AAV], retroviral vectors derived from murine leukemia virus [MLV], or lentiviruses) and non-viral vectors (eg, liposomes, cationic polymers, polymeric micelles).[20] Despite their efficiency, viral vectors have some limitations, including their residual pathogenic effect, which represents a potential risk to patients. Moreover, a mutagenesis effect was observed in some clinical trials using these vectors.[21] Regarding non-viral vectors, the drawbacks are related to the high toxicity of their compounds, especially organic solvents and some cationic polymers.[22]

Nanoparticles can be loaded by various therapeutic agents that can protect against degradation and ensure their controlled release.[23] In addition, their surface may be functionalized with specific ligands which can increase penetration into the tumor. However, poor intratumoral distribution and failure to target a disseminated tumor mass are still a great challenge for clinical application.[24]

In our laboratory, we prepared lipid nanocapsules (LNCs) by using a phase-inversion process.[25] This has the advantage of using no organic solvents and only GRAS (generally recognized as safe) excipients and GMO (genetically modified organisms)-free products.[26] The obtained nanocapsules have a structure consisting of an oily core of Labrafac® WL 1349 (Gattefossé Group, Saint-Priest, France), and a crown of surfectants (Solutol® HS 15 [BASF, Ludwigshafen, Germany] and Lipoïd® S75-3 [Lipoïd GmbH, Ludwigshafen, Germany]). The oily core could be used to encapsulate lipophilic drugs such as paclitaxel, a drug that is widely used in oncology.[27]

The siRNAs are insoluble in Labrafac®, a quality that prevents their encapsulation in nanocapsules. For this reason, we chose to attach them to the surface of nanocapsules by electrostatic attraction. However, due to the negative charge on the surface of blank LNCs (zeta potential =−6.4±0.4 mV), the setting of siRNA (also negatively charged) can only be obtained after modifying the surface of the LNCs by grafting positively-charged polymers (chitosan). Grafting chitosan is carried out by a transacylation reaction. This polymer was chosen as a transacylation polymer because of its interesting properties, including its low toxicity and its biocompatibility.[28]

The objectives of this work were therefore to graft an anti-EGFR siRNA to nanocapsules, then to study the knockdown of EGFR and to verify if this modification of protein production induced an increased sensitivity to temozolomide in U87MG glioblastoma cells.

Material and methods

Materials

Solutol® HS 15 (BASF, Ludwigshafen, Germany) is a mixture of free polyethylene glycol 660 and polyethylene glycol 660 hydroxystearate. Labrafac® WL 1349 (Gattefossé Group, Saint-Priest, France) is a mixture of capric and caprylic acid triglycerides. NaCl was purchased from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Lipoïd® S75-3 (Lipoïd GmbH, Ludwigshafen, Germany) is a soybean lecithin made of 69% phosphatidylcholine, 10% phosphatidylethanolamine, and other phospholipids. Milli-Q water was obtained from a Milli-Q-plus® system (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Chitosan oligosaccharide lactate 5,000 Da with a degree of deacetylation ≥75% was purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). The dialysis membrane was purchased from Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA) and had a molecular weight cut-off point equal to 50,000 Da. O-Phthalaldehyde (OPA) was purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) and MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assays (Cell Titer 96® kit) were purchased from Promega Corporation (Fitchburg, WI, USA).

Preparation and characterization of chitosan-transacylated LNCs

Formulation of LNCs

In this study, LNCs with a diameter of 50 nm were prepared according to a phase-inversion process described by Heurtault et al.[25]

In brief, Solutol® HS15, Lipoïd® S75-3, NaCl, Labrafac®, and water (0.846 g, 0.075 g, 0.089 g, 1.028 g, 2.962 g, respectively) were mixed and warmed up to 85°C under magnetic stirring. This was followed by cooling down the formulation to 60°C; this cycle was repeated three times. During the last cycle, 12.5 mL of water at 4°C was added to the formulation. With this phase-inversion method, LNCs with an oily core consisting of triglycerides (Labrafac®) and a surface consisting of Solutol® HS15 and Lipoïd® S75-3 were obtained.

Surface modification of LNCs by a transacylation reaction

A transacylation reaction was obtained between the pegylated hydroxystearate and a functional amino group of a polymer (Figure 1). To perform a transacylation reaction, 20 mL of the previously-made LNCs were used. This quantity was mixed with 1 mL of NaOH 10 M and different amounts of chitosan. The reaction took place at 25°C in a water bath for 15 minutes and afterwards the reaction was stopped by adding 20 mL of a glycine buffer. The pH was adjusted to around 5.5±0.5 to ensure a correct ionization of the chitosan before adding siRNA. Finally purification was performed by dialysis with membranes having a molecular weight cut-off of 50 K Daltons. This allowed transacylated nanoparticles to stay inside the dialysis membrane while the free chitosan diffused in the dialysis water. Dialysis was performed for 24 hours with Milli-Q water under magnetic stirring.

Determination of sizes and zeta potentials of chitosan-transacylated LNCs

The average hydrodynamic diameter, polydispersity index and zeta potential of all particles were measured by dynamic light scattering (DLS) using NanoZS® (Malvern Instruments, Malvern, UK). Measurements were performed at a 90° angle after dispersion of 50 µL of the LNC suspension in 2.95 mL of Milli-Q water. Measurements were performed in triplicate at 25°C with comparable conductivity values for zeta potentials determination.

Quantification of bound chitosan on the LNC surface

To quantify the amount of bound chitosan on the surface of the transacylated particles, the o-Phthalaldehyde (OPA) quantification method was used. Dialyzed transacylated LNCs (20 µL) were placed in a black, 96-well plate. OPA (280 µL) was added to each sample and the fluorescence was recorded with a Fluoroskan (Thermo Fisher Scientific) with an excitation wavelength of 355 nm and an emission wavelength of 460 nm.[29] A calibration curve ranging from 0.013–0.83 mg/mL of chitosan was obtained.

Characterization of grafted siRNA onto chitosan-transacylated LNCs

The characterization of grafted siRNA serves two purposes: first to determine the ability of the LNCs to graft siRNA; second, to correlate the amount of grafted siRNA onto the LNCs to the knockdown of the target gene in vitro.

In order to facilitate the quantification of the siRNA fixed to the surface of chitosan-transacylated nanocapsules, the fluorescence quenching of a suspension of fluorescein-labeled siRNA was used. A suspension containing an anti-EGFR siRNA labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) at a concentration of 19.2 µM was prepared. Five microliters of this suspension was added to volumes of LNCs from 0 µL to 50 µL and supplemented with RNase free water up to one final volume of 300 µL. The fluorescence was measured immediately by Fluoroskan at wavelengths of 485 nm excitation and 520 nm emission.

Stability of chitosan-transacylated LNCs

The stability of nanocapsules transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan was evaluated at 4°C and 25°C for 30 days. For this purpose, measurements of hydrodynamic diameter, polydispersity index, and zeta potential of nanocapsules transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan were made by NanoZS®. Moreover, the visual aspect of the formulation was analyzed at both temperatures.

Sizes and zeta potentials of chitosan-transacylated LNCs/anti-EGFR siRNA complexes

The average hydrodynamic diameter, polydispersity index, and zeta potential of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/anti-EGFR siRNA complexes were measured by DLS using NanoZS®. The mixture of transacylated LNCs and anti-EGFR siRNA was performed so as to have a final concentration of LNCs of about 100 µg/mL and concentrations of anti-EGFR siRNA of 10, 20, 30,

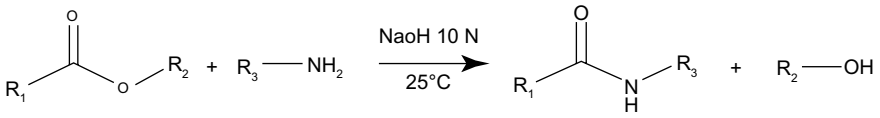

Figure 1 Transacylation reaction between the pegylated hydroxystearate contained in the Solutol® HS 15 and a polyamine.
Notes: R_1, 12-hydroxystearic acid; R_2, polyethylene glycol; R_3, chitosan. Solutol® HS 15 (BASF, Ludwigshafen, Germany).

and 40 nM. Measurements were performed in RNase-free water. Measurements were performed in triplicate at 25°C with comparable conductivity values for zeta potentials determination.

MTS cytotoxicity test on U87MG cells

An MTS cytotoxicity test was performed to determine the maximal nontoxic concentration of transacylated LNCs. The MTS assay depends on the reduction of tetrazolium salt into formazan by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase. The reaction takes place only in living cells and the quantity of produced formazan is proportional to cell viability. Fluorescence was measured by Multiskan Ascent® (Labsystems, Haverhill, MA, USA) at a wavelength of 492 nm. The effect of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan on the U87MG (American Type Culture Collection) cell line was investigated. In a 96-well plate, 5,000 cells were incubated in each well for 48 hours in 100 µL of culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM] with 1 g/L of glucose and supplemented with 10% of fetal calf serum [FCS] and 1% of antibiotics). After 48 hours, 20 µL of sample was added. The final concentrations of the LNCs in the wells were 15, 50, 75, 100, 150, and 200 µg/mL. After 24 hours of incubation, the medium was removed and the cells were washed with 120 µL of phosphate-buffered saline (PBS). MTS reagent was added to each well and then stored in the dark for 2 hours at 37°C. Finally, a reading was carried out at 492 nm.

Calculating the percentage of living cells by MTS test was done by the following report:

$$\%\ \text{of living cells} = \frac{\text{Absorbance of samples at 492 nm}}{\text{Absorbance of control cells at 492 nm}} \times 100. \quad [1]$$

siRNA transfection and determination of EGFR expression by fluorescence-activated cell sorting

Twenty-five thousand cells were incubated in 500 µL of DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics. The U87MG cells were treated with five concentrations of anti-EGFR siRNA from 10–50 nM. The anti-EGFR siRNA was carried by LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan at a concentration of 100 µg/mL.

These cells were incubated for 72 hours and 96 hours, then analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The anti-EGFR siRNA sequence used was: sens, 5′CACAGUGGAGCGAAUUCCUdTdT 3′; anti-sens, 3′dTdTGUGUCACCUCGCUUAAGGA 5′.

The siRNA negative control sequence used was a scrambled sequence carried by chitosan-transacylated LNCs.

After the incubation period, U87MG cells were detached from the bottom of the plate by Versene® (EDTA) 0.02% (Lonza, Verviers, Belgium) and then recovered in PBS/FCS/azide (0.02%). The cells were then placed in a 96-well plate and incubated with the anti-EGFR and isotype (IgG2bk) antibodies (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). After 1 hour of incubation at 4°C, washes with PBS/FCS/azide (0.02%) were made to remove unbound antibodies. Following this, an incubation with a secondary antibody labeled with FITC (polyclonal goat anti-mouse Ig/FITC Goat F(ab′)2) (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) was then performed for 30 minutes at 4°C in the shelter of light. After the incubation period with the secondary antibody, washes with PBS/FCS/azide (0.02%) were made to remove unbound secondary antibody. A 50 µL of PBS/azide (0.02%) solution was added to each cell pellet. Each cell suspension was then placed in a volume of 250 mL PBS/azide (0.02%)/formaldehyde (1%). The analyses were performed by FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

The calculation of the percentage of EGFR expression in each sample was performed by comparing the geometric mean of the samples and the control cells according to the formula:

$$\frac{\left(\frac{\text{Geo}_{\text{mean}}}{\text{Geo}_{\text{mean isotype}}}\right)_{\text{Sample}}}{\left(\frac{\text{Geo}_{\text{mean}}}{\text{Geo}_{\text{mean isotype}}}\right)_{\text{Control}}} \times 100. \quad [2]$$

Evaluation of chitosan transacylated LNCs/anti-EGFR siRNA effect on proliferation of U87MG cells

The objective of this part was to evaluate the effect on the proliferation of U87MG cells after treatment with LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/anti-EGFR siRNA; in a 24-well plate, 25,000 cells were incubated with 500 µL of medium culture in each well, for 48 hours. After that, these cells were treated for 72 hours with complex LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/anti-EGFR siRNA. The final concentration of anti-EGFR siRNA tested was 40 nM and the concentration of chitosan-transacylated LNCs was 100 µg/mL. Cell proliferation was then assessed by MTT assay whose principle is based on the reduction of a tetrazolium salt (bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium) to formazan by succinate dehydrogenase, a mitochondrial enzyme only active in living cells.

The amount of precipitate formed is proportional to the percentage of living cells.

Calculating the percentage of living cells by MTT test was done by the following report:

$$\%\ \text{of living cells} = \frac{\text{Absorbance of samples at 580 nm}}{\text{Absorbance of control cells at 580 nm}} \times 100. \quad [3]$$

Evaluation of the increased sensitivity of U87MG cells to temozolomide after siRNA treatment by MTT assay

In a 24-well plate, 25,000 cells were incubated with 500 µL of culture medium in each well, for 48 hours. The cells were then treated and incubated for 72 hours with the anti-EGFR siRNA at a concentration of 40 nM. At the end of the incubation period, the culture medium was changed and the cells were treated with increasing concentrations of temozolomide (0.06, 0.125, 0.25, and 0.5 mg/mL) for 24 hours. At the end of the incubation period with temozolomide, the culture medium was changed in each well and a volume of 40 µL of the MTT reagent was added and incubated for 4 hours in the dark at 37°C. The supernatant was then aspirated and a volume of 400 µL of acidic isopropanol was added to each well to dissolve the previously-obtained formazan crystals. The plate was left under mechanical stirring and the contents of each well were transferred to a 96-well plate to perform the Multiskan Ascent® reading at 580 nm.

Statistical analysis

Results were expressed as mean values ± standard error of the mean (SEM). Mann–Whitney *U* test was used for statistical comparison between controls and other groups.

Results

Characterization of chitosan-transacylated LNCs

Size and zeta potential of chitosan-transacylated LNCs

LNCs were obtained and chitosan was successfully grafted to their surfaces. The sizes and zeta potentials of blank nanocapsules and four formulations of LNCs transacylated with different amounts of chitosan are reported in Table 1. These results show an increase of about 19 nm in the size of transacylated LNCs compared to the blank nanocapsules. On the other hand, the zeta potential of these formulations became positive and increased with the amount of chitosan.

Table 1 Sizes and zeta potentials of different LNC formulations

Formulation	Size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
Blank LNCs	52.6±0.6	0.02	−6.4±0.4
LNC 50 nm + 0.6 mg/mL chitosan	70.6±1.5	0.23	17.4±0.5
LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan	71.6±1.1	0.22	24.7±2.1
LNC 50 nm + 1.8 mg/mL chitosan	70.6±0.7	0.24	31.4±0.6
LNC 50 nm + 2.4 mg/mL chitosan	72.2±0.6	0.25	36.0±0.7

Note: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3).
Abbreviation: LNC, lipid nanocapsules.

Quantification of bound chitosan onto the surface of the LNCs

The evolution of yield of transacylation depending on the amount of chitosan is shown in Figure 2. Indeed, the graph shows a decrease in the yield of transacylation of 20.11% to 6.5% after addition of increasing amounts of chitosan.

The yield of transacylation is the percentage of polymer (chitosan) remaining on the surface of nanocapsules after purification. It is determined by the following formula:

$$Y\,(\%) = \frac{(\text{IF460 sample} - \text{IF460 blank})}{[\text{chitosan}]\,\text{theoretical} \times D} \times F \times 100. \quad [4]$$

where IF460 sample is the fluorescence intensity of the sample at 460 nm; IF460 blank is the fluorescence intensity of reference sample at 460 nm; [chitosan] theoretical is the concentration of chitosan in mg/mL inside the LNC samples before purification; F is the dilution factor used for the preparation of samples; *D* is the coefficient of calibration curve; and Y is the yield of transacylation.

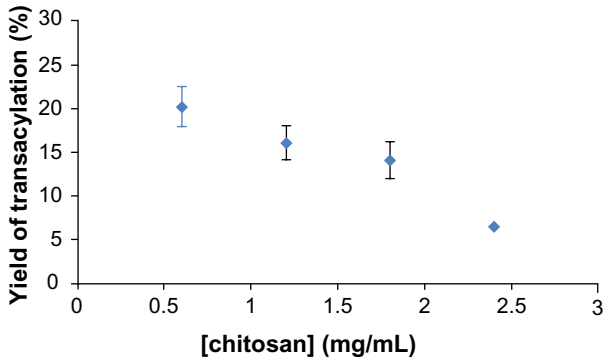

Figure 2 Yield of transacylation measured by OPA reaction related to amounts of chitosan used in the reaction.
Note: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3).
Abbreviation: OPA, o-Phthalaldehyde.

Determination of quantity of siRNA grafted onto chitosan-transacylated LNCs

In this part of the study, two formulations of transacylated LNCs (with 0.6 mg/mL and 1.2 mg/mL of chitosan) were studied. The results showed a decrease in fluorescence intensity of anti-EGFR siRNA suspensions following the addition of chitosan-transacylated LNCs in the medium (Figure 3). This indicates that these siRNAs were grafted by electrostatic attraction to the surface of the nanocapsules. In addition, differences in the binding capacity of the siRNA appear between the two formulations. Indeed, the ratio of 95.43%±0.05% fixation of siRNA was obtained with a volume of 15 µL of LNCs transacylated with 0.6 mg/mL of chitosan, whereas 93.12%±0.25% fixation was obtained with 6 µL of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan.

Determination of sizes and zeta potentials of chitosan-transacylated LNCs/anti-EGFR siRNA complexes

Table 2 indicates the sizes and zeta potentials of complexes formed by the association of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan and anti-EGFR siRNA. These results indicate an average 24 nM size increase of these complexes compared to LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan. The polydispersity index remained constant compared to that of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan. On the other hand, the zeta potential of the LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan decreased from 24.7 mV to 15.2 mV with the addition of 40 nM of anti-EGFR siRNA.

Stability of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan

The results showed that there was no significant variation of the hydrodynamic diameter, polydispersity index, and zeta potential of the formulations tested until day 30 at 4°C and 25°C (Table 3). The visual appearance of the dispersion at 4°C was identical to that of the dispersion left to 25°C.

MTS cytotoxicity test on U87MG cells

The results obtained with the LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan showed cell death at concentrations of 150 and 200 µg/mL (Figure 4). A concentration of 100 µg/mL of chitosan-transacylated LNCs was chosen as a safe concentration to avoid toxicity and cell death.

Determination of EGFR expression on U87MG cells after anti-EGFR siRNA treatment by FACS

The treatment of U87MG cells by the vector alone at the concentration of 100 µg/mL did not cause a significant decrease in production of EGFR after the two incubation periods. The same finding was observed with the complex formed by the association of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/siRNA negative control. Treatment of U87MG

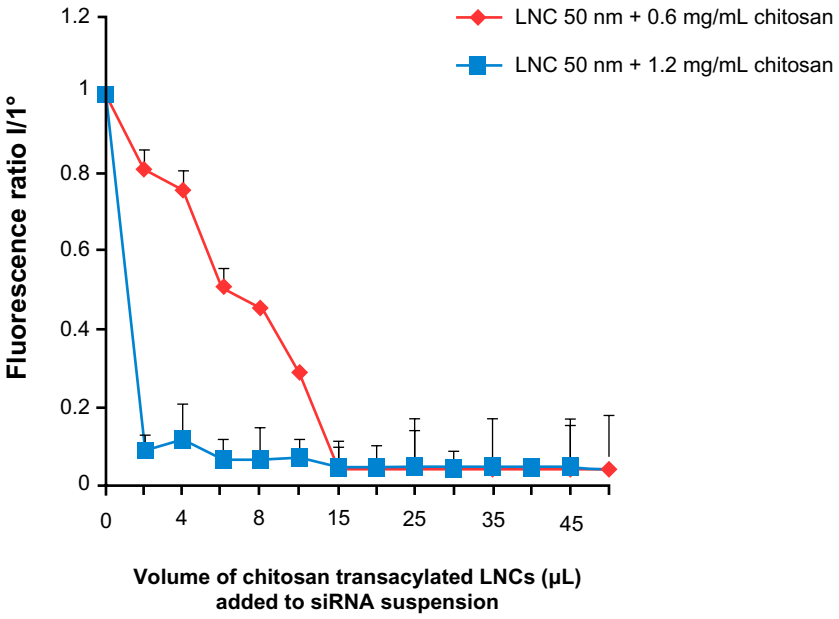

Figure 3 Amount of siRNA grafted to the surface of chitosan-transacylated LNCs determined by fluorescence quenching.
Notes: Fluorescence ratio I/I° corresponds to fluorescence of transacylated LNCs/siRNA over the fluorescence of siRNA suspension I° without transacylated LNCs. Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3).
Abbreviations: LNC, lipid nanocapsules; siRNA, small interfering ribonucleic acid.

Table 2 Sizes and zeta potentials of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/anti-EGFR siRNA complexes

Formulation	Size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mv)
LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 10 nM anti-EGFR siRNA	94.9±3.9	0.25	19.2±0.6
LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 20 nM anti-EGFR siRNA	93.7±0.8	0.23	18.9±1.1
LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 30 nM anti-EGFR siRNA	95.5±4.1	0.24	17.5±0.4
LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 40 nM anti-EGFR siRNA	96.4±1.0	0.23	15.2±0.9

Note: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3).
Abbreviations: LNC, lipid nanocapsules; anti-EGFR, anti-epidermal growth factor receptor; siRNA, small interfering ribonucleic acid.

cells by LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/anti-EGFR siRNA for 72 hours did not significantly reduce the rate of EGFR. The same treatment for 96 hours resulted in a significant decrease in the production of EGFR, with a maximum of 51.95%±6.03% obtained with 40 nM of anti-EGFR siRNA (Figure 5). A dose effect was observed between 20 and 40 nM of anti-EGFR siRNA.

Evaluation of chitosan-transacylated LNCs/anti-EGFR siRNA effect on proliferation of U87MG cells

The results obtained showed that the LNCs transacylated with 1.2 mg/mL chitosan at a concentration of 100 µg/mL had no effect on proliferation of U87MG cells. The same result was obtained with the association of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL chitosan/siRNA negative control. Regarding the treatment of the cells with anti-EGFR siRNA at the concentration of 40 nM carried by LNCs transacylated with 1.2 mg/mL chitosan, the result showed a 26.7%±3.81% ($P<0.05$) decrease in cell proliferation compared to untreated cells (Figure 6).

Table 3 Stability at 4°C and 25°C of LNC 50 nm + 1.2 mg/mL of chitosan

	Day	Size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
4°C	1	71.3±1.5	0.21	24.8±0.4
	30	70.9±0.7	0.22	23.5±0.7
25°C	1	71.3±1.5	0.21	24.8±0.4
	30	74.1±0.7	0.23	22.3±0.9

Note: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3).
Abbreviation: LNC, lipid nanocapsules.

Evaluation of the increased sensitivity in U87MG cells to temozolomide after siRNA treatment

The MTT assay performed in this section was used to assess the increased mortality of U87MG cells pretreated with anti-EGFR siRNA followed by treatment with temozolomide compared to cells treated with temozolomide alone.

The U87MG cells treatment by different concentrations of temozolomide alone showed significant resistance and an absence of dose effect. The same results were obtained after treatment of cells with LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/siRNA negative control and vector alone at the concentration of 100 µg/mL.

After 3 days of incubation with anti-EGFR siRNA at a concentration of 40 nM carried by LNCs transacylated with 1.2 mg/mL chitosan, treated U87MG cells showed increased sensitivity to temozolomide at all concentrations tested compared to cells not treated by siRNA. In addition, a dose effect was observed. The maximum increase in sensitivity was 62.55%±3.55% ($P<0.05$) and was obtained with a concentration of 0.5 mg/mL of temozolomide (Figure 7).

Temozolomide concentrations tested were chosen taking into account the sensitivity of U87MG cells and trying to get closer to the plasma concentrations described in the literature. The plasma concentration of temozolomide was determined for patients with high grades gliomas. The pharmacokinetics of temozolomide appeared linear, with the area under the curve (AUC) increasing proportionally to the dose after intravenous administration. For a dose of 250 mg/m^2, the C_{max} (maximum concentration) was 10 µg/mL. Measured in the cerebrospinal fluid, concentration was about 29% of the plasma concentration.[30]

Discussion

Glioblastoma cells are resistant to apoptosis and autophagy due to increased activation of signaling pathways related to cell death, these being controlled by proteins such as *EGFR*. Reducing the ability of tumor cells to proliferate and to restoring their capacity to die is one of the therapeutic strategies developed against cancer. To achieve this goal, targeting *EGFR* by RNA interference strategy has been sought to reduce *EGFR* expression and thus control its effects on tumor development. Indeed, in one study, anti-EGFR siRNA and a wild phosphatase and tensin homolog (*PTEN*) gene were introduced in U251 cells with a plasmid in order to assess the effect on the inhibition of

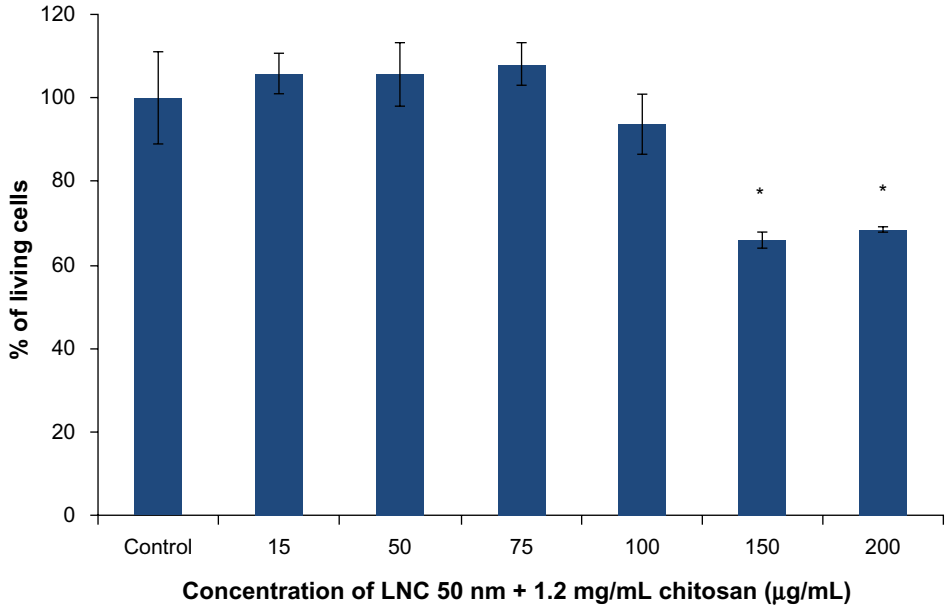

Figure 4 MTS cytotoxicity test on U87MG cells performed with LNC 50 nm + 1.2 mg/mL of chitosan.
Notes: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3). *Statistical difference compared to control was set at $P<0.05$ by Mann–Whitney *U* test.
Abbreviations: MTS, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium); LNC, lipid nanocapsules.

cell growth. Suppression of cell proliferation, cell cycle arrest, a reduced cell invasion, and promotion of cell apoptosis have all been observed in vitro and in vivo.[31]

In our study, we investigated the effect of *EGFR* knockdown on the sensitivity of the U87MG cell line to temozolomide by a using a specific siRNA carried by chitosan-transacylated LNCs. Chitosan was used for the transacylation reaction due to its high transfection efficiency and low toxicity[32] compared to other polymers such as polyethyleneimine (PEI); despite its potential for transfection

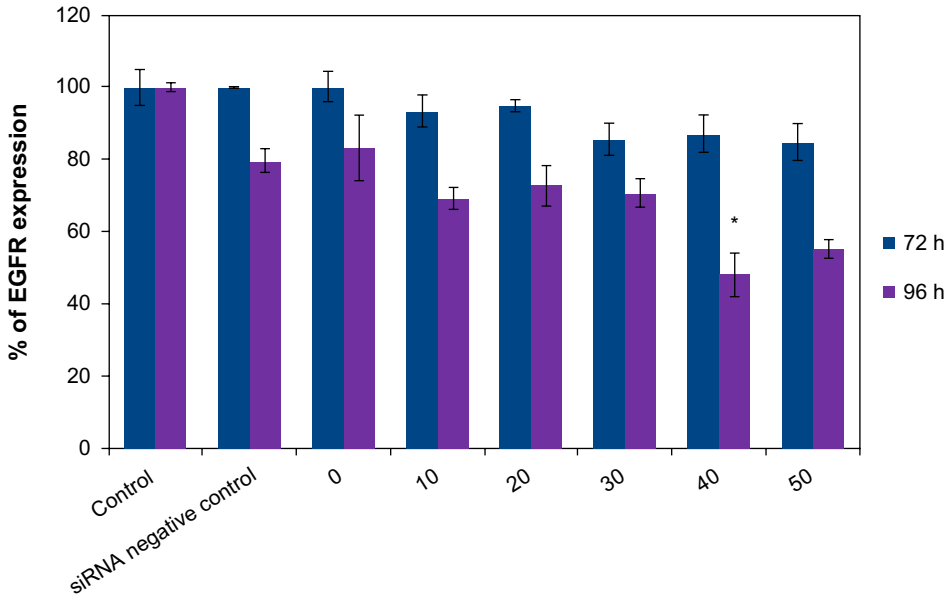

Figure 5 Determination of EGFR expression on U87MG cells by FACS after treatment by the anti-EGFR siRNA for 72 hours and 96 hours.
Notes: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3). *Statistical difference compared to control was set at $P<0.05$ by Mann–Whitney *U* test. siRNA negative control, LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + siRNA negative control; 0, LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan; 10, LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 10 nM anti-EGFR siRNA; 20, LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 20 nM anti-EGFR siRNA; 30, LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 30 nM anti-EGFR siRNA; 40, LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 40 nM anti-EGFR siRNA; 50, LNC 50 nm + 1.2 mg/mL chitosan + 50 nM anti-EGFR siRNA.
Abbreviations: LNC, lipid nanocapsules; EGFR, epidermal growth factor receptor; siRNA, small interfering ribonucleic acid; FACS, fluorescence-activated cell sorting; h, hours.

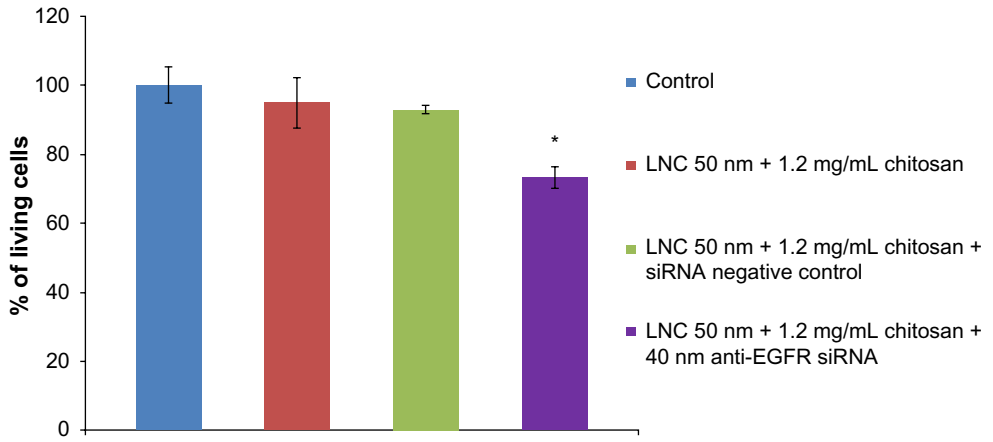

Figure 6 Evaluation of anti-EGFR siRNA/transacylated LNCs effect on proliferation of U87MG after 72 hours of incubation.
Notes: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3). *Statistical difference compared to control was set at $P<0.05$ by Mann–Whitney *U* test.
Abbreviations: LNC, lipid nanocapsules; EGFR, epidermal growth factor receptor; siRNA, small interfering ribonucleic acid.

of nucleic acids, PEI, particularly the branched form, has a high cell toxicity which limits its clinical use.[33,34] Different chitosan nanoparticles are described in the literature.[35–37] The high molecular weight and a high degree of deacetylation of the chitosan molecules are essential characteristics that allow for the obtaining of nanoparticles of small size with a large capacity to interact with siRNA.[37] However, due to its low solubility in water at physiological pH and low buffering capacity, the chitosan nanoparticles can dissociate and lose their positive charge which causes the premature release of siRNA and reduces its cellular effect. In this study, the chitosan used had a low molecular weight, allowing it to obtain nanoparticles with small size which form complexes with siRNA and dissociate at the cellular level to allow the action of siRNA. The chitosans with high molecular weights have the drawback of forming a very stable complex with siRNA that reduces the release of siRNA and causes a smaller effect on the target mRNA.[38]

Transacylation reaction was carried out using small amounts of chitosan, which avoided the problems of solubility of the polymer. Increasing the size of the nanoparticles observed after this reaction confirms the grafting of chitosan to the surface of the LNCs. The zeta potential became positive and increased with the amount of chitosan used in the reaction

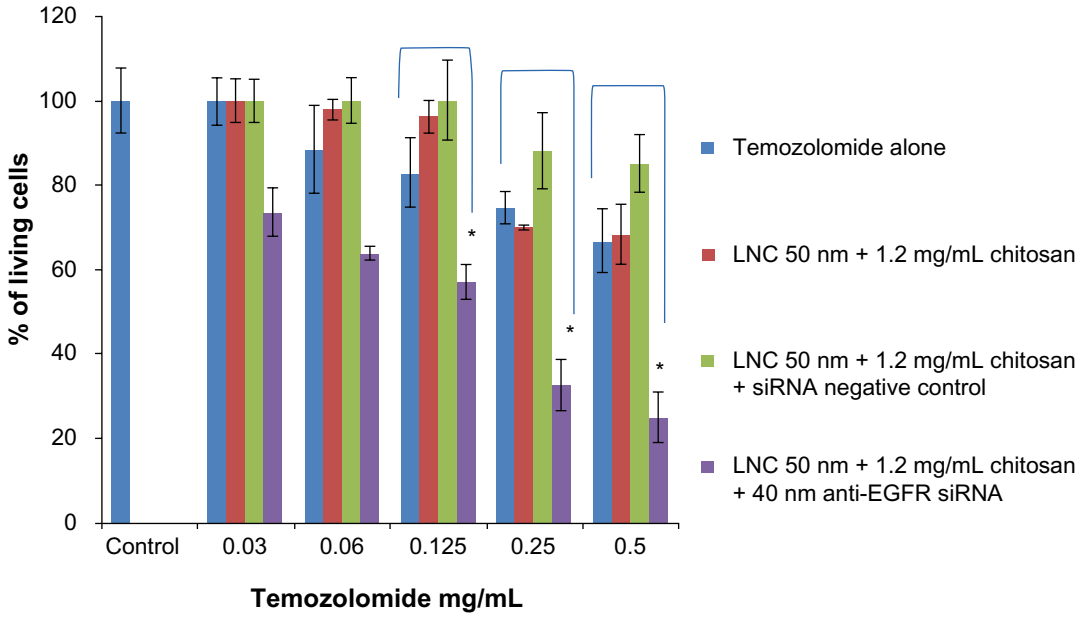

Figure 7 U87MG survival cells in function of temozolomide concentration after anti-EGFR siRNA treatment for 72 hours.
Notes: Data are shown as mean ± standard error of the mean (n=3). *Statistical difference compared to control was set at $P<0.05$ by Mann–Whitney *U* test.
Abbreviations: LNC, lipid nanocapsules; EGFR, epidermal growth factor receptor; siRNA, small interfering ribonucleic acid.

until a plateau, probably due to the saturation of the surface of the LNCs. In addition, a decreasing yield of transacylation was observed and probably related to the same effect.

The determination of the quantity of siRNA grafted onto the surface of LNCs showed differences in the binding capacity of the siRNA between the two formulations of transacylated LNCs tested. This effect was caused by the difference of zeta potentials between the formulations. Indeed, small quantities of LNCs with the highest zeta potential fixed the maximum content of siRNA. This indicates that the LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan were the most effective at fixing siRNA.

Regarding the hydrodynamic diameter of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan/anti-EGFR siRNA complexes, the results showed an increase compared to chitosan-transacylated LNCs, which indicates the fixation of siRNA on the surface of the transacylated LNCs. Given the small size of siRNA ~ 7 nM, it is conceivable that a multilayer of siRNA can be produced on the surface of LNCs. However, the grafting of siRNA to the transacylated LNCs is ensured by electrostatic attraction which excludes this hypothesis. The increase of 25 nM in the hydrodynamic diameter is related to siRNA and water molecules associated with siRNA that give a hydration layer detected by DLS.

The decrease in zeta potential of chitosan-transacylated LNCs/anti-EGFR siRNA complexes was the result of neutralization of positive charges of transacylated LNCs by the negatively charged siRNA. However, this charge neutralization was not complete with the amounts of siRNA tested, which allowed it to keep a positive zeta potential for better interaction with the plasma membrane.

Concerning the toxicity of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan on U87MG cells, cell mortality was observed with 150 μg/mL and 200 μg/mL of LNCs. This effect is due to the characteristics of cationic chitosan that allow binding to negatively-charged cellular components, thereby causing damage to the membrane and disrupting organelles and ultimately leading to cell death.[39]

Treatment of the cells with anti-EGFR siRNA carried by LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan for 3 days slowed cell proliferation, which confirms the involvement of the EGFR in the tumor cell proliferation.

The present study showed that with this strategy, it was possible to increase the sensitivity of glioma cells to temozolomide using small quantities of anti-EGFR siRNA. Similar results have been found with anti-Galectin-1 siRNA and temozolomide.[40] However, these results had been obtained with ProFection® Mammalian Transfection Systems (Promega) which is not suitable for human injection.

Other nanocarriers were used for siRNA-targeting EGFR, including the dendriworms developed by Agrawal et al,[41] which come from the combination of PAMAM dendrimers (polyamidoamine) and magnetic nanoworms; dendriworms have demonstrated their efficiency in transfection of siRNA in glioblastoma cells. However, the production of this nanocarrier is achieved by a long process using many reagents and requires multiple purifications to obtain a good final quality. In comparison, our vector is produced by a simple process without solvents and is simply purified by dialysis. Moreover, LNCs have proved their very good toxicity profile in mice.[27] It is also interesting to note that the maximum effect of dendriworms was obtained with 100 nM of anti-EGFR siRNA, whereas in our study, we obtained a reduction of 51.95% with 2.5 times less anti-EGFR siRNA.

In another study, Michiue et al[42] associated a peptide transduction domain delivery (PTD) (TAT peptide) with a dsRNA binding domain (DRBD) used for its high affinity to siRNA, in order to obtain a PTD-DRBD vector. This team associated anti-EGFR and anti-Akt siRNAs to PTD-DRBD. Transfections were performed on U87MG cells that were injected into the brains of mice that were then sacrificed 48 hours after injection. Although the authors obtained good results, the proposed vector was made by genetic engineering of *Escherichia coli*, which is a cost in terms of production and purification. In our case, chitosan-transacylated nanocapsules are produced by a low cost process which is a considerable advantage for a possible large-scale production.

Targeting EGFR is a promising strategy to reduce the resistance of malignant gliomas to anticancer drugs. However, the amplification of *EGFR* affects 40%[43] of patients, implying that targeting EGFR alone cannot solve the problem of resistance to temozolomide. Therefore, simultaneous targeting of other proteins involved in tumor resistance (taking into account the genetic profile of each patient) could improve the treatment of the glioblastoma.

Our vector has been designed for intracerebral injection, a strategy which offers two advantages. First, it limits the interaction with plasma proteins observed with the intravenous route. This is why a noncovalent link between siRNA and LNCs seems adequate for transfection efficiency. Second, this approach solves the issue of crossing the blood–brain barrier. In vivo, the formulation is better adapted to injection during tumor resection or can be injected in the tumor by stereotactic procedure.

Conclusion

Chitosan-transacylated nanocapsules have shown both their ability to bind siRNA by electrostatic attraction and their capacity to deliver it at the cellular level; in this way they have a biological effect and are able to increase the sensitivity of glioma cells to anticancer drugs such as temozolomide. The main advantages of these new carriers are their low toxicity and injectability. Moreover, other siRNAs can be fixed in the same way in similar experimental conditions due to the homogeneous structure of these biomolecules. This will allow us to consider the use of two messenger RNA targets, which will in turn increase the possibilities of enhancing the sensitivity of cancer cells to chemotherapy. The effectiveness of these siRNA carriers remains to be studied in animal models in combination with chemotherapy.

Acknowledgments

The authors are very grateful to the "Comité interrégional de la Ligue contre le Cancer, région Maine et Loire [Inter-Regional Committee, League against Cancer, Pays de la Loire region]" for providing financial support for this work. The authors also wish to thank Thomas Perrier for his help with the chemistry in this study.

Author contributions

Substantial contributions to the conception or design of the work or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work: KM, KB, FL, PS, JPB. Drafting the work or revising it critically for important intellectual content: KM, KB, FL, PS, JPB. Final approval of the version to be published: KM, KB, FL, PS, JPB. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved: KM, KB, FL, PS, JPB.

Disclosure

Khaled Messaoudi is supported by the Centre Hospitalier Universitaire d'Angers. The other authors report no conflicts of interest in this work.

References

1. Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2006;6(5):719–732.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987–996.
3. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. 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*. 2009;10(5):459–466.
4. Le Mercier M, Fortin S, Mathieu V, Kiss R, Lefranc F. Galectins and gliomas. *Brain Pathol*. 2010;20(1):17–27.
5. Mao XG, Yan M, Xue XY, et al. Overexpression of ZNF217 in glioblastoma contributes to the maintenance of glioma stem cells regulated by hypoxia-inducible factors. *Lab Invest*. 2011;91(7):1068–1078.
6. Zhu D, Hunter SB, Vertino PM, Van Meir EG. Overexpression of MBD2 in glioblastoma maintains epigenetic silencing and inhibits the antiangiogenic function of the tumor suppressor gene BAI1. *Cancer Res*. 2011;71(17):5859–5870.
7. Huang PH, Xu AM, White FM. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci Signal*. 2009;2(87):re6.
8. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene*. 1997;15(23):2755–2765.
9. Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, Cavenee WK. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res*. 2002;62(22):6764–6769.
10. Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene*. 2004;23(22):3898–3904.
11. Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, et al. Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(12):880–887.
12. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*. 1998;391(6669):806–811.
13. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. 2002;3(10):737–747.
14. Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in Trypanosoma brucei. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14687–14692.
15. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(2–3):75–86.
16. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet*. 2007;8(3):173–184.
17. Reischl D, Zimmer A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine*. 2009;5(1):8–20.
18. Volkov AA, Kruglova NS, Meschaninova MI, et al. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. *Oligonucleotides*. 2009;19(2):191–202.
19. Li CX, Parker A, Menocal E, Xiang S, Borodyansky L, Fruehauf JH. Delivery of RNA interference. *Cell Cycle*. 2006;5(18):2103–2109.
20. David S, Pitard B, Benoit JP, Passirani C. Non-viral nanosystems for systemic siRNA delivery. *Pharmacol Res*. 2010;62(2):100–114.
21. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3132–3142.
22. Kakizawa Y, Furukawa S, Ishii A, Kataoka K. Organic-inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block aniomer. *J Control Release*. 2006;111(3):368–370.
23. Ambruosi A, Khalansky AS, Yamamoto H, Gelperina SE, Begley DJ, Kreuter J. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]-poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. *Journal of Drug Targeting*. 2006;14(2):97–105.

24. Auffinger B, Morshed R, Tobias A, Cheng Y, Ahmed AU, Lesniak MS. Drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells: a potential marriage for the treatment of malignant glioma? *Oncotarget*. 2013;4(3):378–396.
25. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res*. 2002;19(6):875–880.
26. Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, et al. Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009;73(2):239–246.
27. Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, et al. Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after iv administration in mice. *Pharm Res*. 2010;27(3):421–430.
28. Saranya N, Moorthi A, Saravanan S, Devi MP, Selvamurugan N. Chitosan and its derivatives for gene delivery. *Int J Biol Macromol*. 2011;48(2):234–238.
29. Perrier T, Fouchet F, Bastiat G, Saulnier P, Benoit JP. OPA quantification of amino groups at the surface of lipidic nanocapsules (LNCs) for ligand coupling improvement. *Int J Pharm*. 2011;419(1–2):266–270.
30. Marzolini C, Decosterd LA, Shen F, et al. Pharmacokinetics of temozolomide in association with fotemustine in malignant melanoma and malignant glioma patients: comparison of oral, intravenous, and hepatic intra-arterial administration. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;42(6):433–440.
31. Han L, Zhang AL, Xu P, et al. Combination gene therapy with PTEN and EGFR siRNA suppresses U251 malignant glioma cell growth in vitro and in vivo. *Med Oncol*. 2010;27(3):843–852.
32. Rudzinski WE, Aminabhavi TM. Chitosan as a carrier for targeted delivery of small interfering RNA. *Int J Pharm*. 2010;399(1–2):1–11.
33. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res*. 1999;16(8):1273–1279.
34. Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*. 2006;114(1):100–109.
35. Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release*. 2006;115(2):216–225.
36. Katas H, Chen S, Osamuyimen AA, Cevher E, Oya Alpar H. Effect of preparative variables on small interfering RNA loaded Poly(D,L-lactide-co-glycolide)-chitosan submicron particles prepared by emulsification diffusion method. *J Microencapsul*. 2008;25(8):541–548.
37. Liu X, Howard KA, Dong M, et al. The influence of polymeric properties on chitosan/siRNA nanoparticle formulation and gene silencing. *Biomaterials*. 2007;28(6):1280–1288.
38. Techaarpornkul S, Wongkupasert S, Opanasopit P, Apirakaramwong A, Nunthanid J, Ruktanonchai U. Chitosan-mediated siRNA delivery in vitro: effect of polymer molecular weight, concentration and salt forms. *AAPS PharmSciTech*. 2010;11(1):64–72.
39. Qi LF, Xu ZR, Li Y, Jiang X, Han XY. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World J Gastroenterol*. 2005;11(33):5136–5141.
40. Le Mercier M, Mathieu V, Haibe-Kains B, et al. Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(5):456–469.
41. Agrawal A, Min DH, Singh N, et al. Functional delivery of siRNA in mice using dendriworms. *ACS Nano*. 2009;3(9):2495–2504.
42. Michiue H, Eguchi A, Scadeng M, Dowdy SF. Induction of in vivo synthetic lethal RNAi responses to treat glioblastoma. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(23):2306–2313.
43. Prados MD, Chang SM, Butowski N, et al. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(4):579–584.

International Journal of Nanomedicine Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit http://www.dovepress.com/testimonials.php to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal

<u>CHAPITRE 2</u> :

Effet de la combinaison des siRNAs sur la sensibilité des cellules tumorales au TMZ

Effet de la combinaison des siRNAs sur la sensibilité des cellules tumorales au TMZ

RATIONNEL

Les GBMs sont des tumeurs très hétérogènes du point de vue des profils d'expression protéique ce qui explique la variabilité de la réponse des patients aux anticancéreux en particulier au TMZ.

L'activité de l'enzyme de réparation de l'ADN : O^6 méthyl guanine DNA méthyl transférase (MGMT) est l'une des principales causes de résistance des cellules de GBMs au TMZ. De plus, la surexpresion de la galectine-1 dans ces cellules tumorales contribue fortement à cette résistance en bloquant notamment les voies de l'autophagie nécessaires à l'activité du TMZ.

OBJECTIF

L'objectif de ce travail a été d'évaluer dans un premier temps l'effet de la réduction de la production cellulaire de la MGMT et de la galectine-1 par des siRNAs spécifiques transportés par les chitosan-LNCs sur la sensibilité des cellules U87MG au TMZ.

Dans un second temps, il était question d'évaluer l'effet de la combinaison des siRNAs anti-EGFR, anti-MGMT et anti-galectine-1 (deux à deux ou tous les trois), avec la même quantité de nanoparticules pour éviter une toxicité liée au vecteur, sur la réduction de la production des protéines cibles et sur l'augmentation de l'effet du TMZ par rapport à l'utilisation des siRNAs séparément.

RESULTATS

Le ciblage de la MGMT et de la galectine-1 a entrainé une réduction significative de leur production dans les cellules U87MG et a donné un effet similaire à celui obtenu avec le siRNA anti-EGFR sur la sensibilité de ces cellules au TMZ.

La combinaison des siRNAs deux à deux s'est montrée aussi efficace du point de vue de la réduction des taux de protéines cibles. Par contre, l'effet du TMZ était plus puissant avec ces associations qu'avec les siRNAs utilisés séparément. Malheureusement, la combinaison des trois siRNAs simultanément n'a pas amélioré l'effet du TMZ par rapport à l'association des siRNAs deux à deux.

On a montré avec ce travail qu'il était possible de fixer différents siRNAs à la surface des chitosan-LNCs et d'atteindre ainsi n'importe quel ARN messager cible.

Combined silencing expression of MGMT with EGFR or Galectin-1 enhances the sensitivity of glioblastoma to temozolomide

K. Messaoudi[1], A. Clavreul[1], F. Danhier[2], P. Saulnier[1], J.P. Benoit[1, 3], F. Lagarce*[1, 3]

[1]LUNAM Université, Angers, France; Inserm U1066, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, IBS, Angers Cedex 9, France. [2]Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Advanced Drug Delivery and Biomaterials, Avenue Mounier 73 bte B1 73.12, B-1200 Brussels, Belgium. [3]Service Pharmacie, CHU Angers, France.

(*): Corresponding Author. Email: frederic.lagarce@univ-angers.fr

Tel: +33 244 688568 – Fax: +33 244 688546

Abstract

For several years, the first line of treatment of glioblastoma (GB) patients is based on surgical resection followed by fractioned radiotherapy with concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ). The effectiveness of this treatment is very limited due to the development by tumor cells of mechanisms of resistance to TMZ such as over-expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Galectin-1. In this study, we hypothesized that the targeting of MGMT, EGFR and Galectin-1 (alone or in combination) by specifics siRNAs carried by chitosan-lipid nanocapsules (chitosan-LNCs) could enhance the sensitivity of U87MG cells to TMZ. We showed *in vitro* that (i) anti-MGMT and (ii) anti-EGFR or anti-Galectin-1 siRNAs decreased significantly the expression of their corresponding proteins and increased the sensitivity of U87MG cells to TMZ. Additionally, the combination of anti-MGMT siRNA with either anti-EGFR or anti-Galectin-1 siRNAs enhanced the sensitivity of U87MG cells to TMZ in comparison to their separately use. These siRNA nanovectors represent a good alternative to enhance the effectiveness of the standard treatment of GB. This method could be implemented in future preclinical models for experimental cancer treatment of GB.

Keywords: Glioblastoma, MGMT, EGFR, Galectin-1, siRNA, temozolomide

Introduction

Glioblastoma (GB) is the most aggressive among brain tumors and the most resistant to current treatment combining surgery, radiation, and chemotherapy by oral Temozolomide (TMZ) [1,2]. Median survival is 14 months and the percentage of patients living for 5 years or more is less than 10 % [1,3]. TMZ is an alkylating agent from the imidazotetrazine family; it acts by methylation of purine bases of DNA (*O6*-guanine; *N7*-guanine and *N3*-adenine) [4]. The cytotoxicity of TMZ is mainly mediated by the formation of O-6 methyl guanine responsible of mispairment with thymine during DNA replication; this causes toxic lesions of DNA and cell cycle arrest [5,6].

The efficacy of TMZ for treating GB is very limited due to TMZ resistance. This is mainly due to high levels of enzyme activity of DNA repair O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expressed in glioma cells [7]. This enzyme acts by removing the methyl group from guanine and restores the DNA strand [8]. On the other hand, overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Galectin-1 by tumor cells significantly contributes to TMZ resistance [3,9]. EGFR gene amplification is the most frequent genetic alteration in primary GBs with a frequency of 40% [10], and approximately, half of these tumors carry the rearranged EGFR gene resulting in tumors expressing both wild-type EGFR as well as a mutated EGFR [11]. EGFRvIII is the most common variant of EGFR in GB in which the extracellular domain of the receptor is lacking, resulting in constitutive activation [12]. EGFR activates strongly Ras/Raf/MAPK [13] and PI3K/AKT/m-TOR [14] signaling pathways that cause an inhibition of cell autophagy and apoptosis responsible of the decrease of TMZ efficiency [15]. Galectin-1 belongs to lectin family containing a carbohydrate recognition domain (CRD) that confers to Galectin-1 a high affinity for β-galactosides [3,16]. It acts by stimulation of Ras/Raf/MAPK signaling pathway and by the inhibition of p53 transport to the nucleus that also contributes to TMZ resistance [17].

Given the involvement of MGMT, EGFR and Galectin-1 in the pathogenesis of GB, it seems very likely that reducing their cell expression and functionality will improve the sensitivity of GB to TMZ. Various strategies can be used to achieve this goal. Among them, small interfering RNAs (siRNAs) are very promising. They are small double-stranded RNAs of 21-23 bp that reduce the expression of specific genes with complementary nucleotide sequences [18,19]. They operate by specific incorporation into RNA induced silencing complex (RISC) that becomes active. Following that, the antisense strand remains in the RISC complex and guides the RNA interference enzymatic machinery while the sense strand of the RISC complex is eliminated. Degradation of the complementary mRNA is provided by nuclease Argonaute 2 [20,21] and leads to a reduced protein expression.

Unfortunately, the use of therapeutic siRNAs alone (i.e. directly injected as naked molecule without any adjuvant) is not possible for several reasons. Among these, (i) their negative charge that prevents them from crossing the plasma membrane to reach their target into the cytoplasm [20,22], (ii) their degradation after their injection into the blood by nucleases present in plasma and cytoplasm [23], and (iii) the immune response that can be triggered by their presence in the blood [23]. For these reasons the use of vectors that allow efficient siRNA delivery into the target cells is necessary.

Table 1: Anti-MGMT, anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNA sequences.

siRNA	Sequence	
Negative control	*sense*	5'-GGAAAUCCCCCAACAGUGAdTdT-3'
	antisense	5'-UCACUGUUGGGGGAUUUCCTdT-3'
Anti-MGMT	*sense*	5' GCUGGAGCUGUCUGGUUGUdTdT 3'
	antisense	3' dTdTCGACCUCGACAGACCAACA 5'
Anti-EGFR	*sense*	5' CACAGUGGAGCGAAUUCCUdTdT 3'
	antisense	3' dTdTGUGUCACCUCGCUUAAGGA 5'
Anti-Galectin-1	*sense*	5' GCUGCCAGAUGGAUACGAAdTdT 3'
	antisense	3' UUCGUAUCCAUCUGGCAGCdTdT 5'

Many non-viral vectors of siRNAs have been developed. They differ from each other by their composition and method of preparation [24,25]. Some of these vectors have been designed either to encapsulate siRNAs [26] or to attach them to their surface.

We chose to complex siRNAs to the surface of lipid nanocapsules (LNCs) because of their water-soluble nature and to allow them to be efficient without a need of release from the nanocapsule structure. Additionally, the oily core of these nanoparticles should allow us to consider the co-encapsulation of lipophilic anticancer drugs in the future. In this context, chitosan-transacylated lipid nanocapsules (chitosan-LNCs) have been previously developed for the transport of siRNAs [27]. This cationic vector was obtained after grafting chitosan at the surface of LNCs produced by a phase inversion method [28]. This process is green: no organic solvents are used. Moreover, only Generally Recognized as Safe (GRAS) and genetically modified organisms (GMO) free excipients are used [29]. The positive charge of chitosan allows for fixing the negatively charged siRNAs to the vector surface by electrostatic attraction. Chitosan was selected as the transacylation polymer for its interesting physicochemical properties in particular its non-toxicity and biocompatibility [30].

In a previous study, we highlighted the interest to use anti-EGFR siRNA-chitosan LNCs to increase the sensitivity of GB cells to TMZ [27]. Knowing that EGFR overexpression is not the only factor involved in the resistance of GB cells to TMZ, the aim of this work was (i) to produce and characterize siRNA-chitosan LNCs able to target several proteins that participate in TMZ resistance, in particular MGMT, EGFR and Galectin-1, and (ii) to study the sensitivity of human GB cells to TMZ after siRNA treatment alone or in combination.

Materials and methods

Materials

Solutol® HS 15 (BASF, Ludwigshafen, Germany) is a mixture of free polyethylene glycol 660 (PEG) and polyethylene glycol 660 hydroxystearate, Labrafac® WL 1349 (Gattefossé S.A., Saint-Priest, France) is a mixture of capric and caprylic acid triglycerides, NaCl was purchased from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France), Lipoïd® S75-3 (Lipoïd GmbH, Ludwigshafen, Germany) is a soybean lecithin made of 69 % of phosphatidylcholine, 10 % phosphatidylethanolamine and other phospholipids, Milli-Q water was obtained from a Milli-Q-plus® system (Millipore, Paris, France). Chitosan oligosaccharide lactate 5 kDa with a degree of deacetylation ≥ 75 % was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). The dialysis membrane was purchased from Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA) and has a molecular weight cut-off point equal to 50 kDa. *O*-Phthalaldehyde (OPA) was purchased from Thermo Scientific (Rockford, USA). The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Sigma Aldrich.

Methods

Cell line culture

Human GB U87MG/MGMT- cells were obtained from LGC (Molsheim, France). Human GB U87MG/MGMT+ cells were kindly provided by Professor Kaina Bernd (Mainz, Germany). These cells were cultured in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% of Fetal bovine serum (FBS) (Lonza, Verviers, Belgium) and 1 % of antibiotics (Sigma Aldrich) at 5% CO_2/37°C.

Formulation of siRNA/chitosan-LNCs complexes

As previously described [27], LNCs with a diameter of 50 nm were prepared according to a phase-inversion process [28], and the chitosan grafting on their surface was obtained by a transacylation reaction. The final concentration of chitosan in nanoparticles formulation was 1.2 mg/mL. Transacylated LNCs and siRNA were mixed in order to have a final concentration of chitosan-LNCs of 100 µg/mL and concentration of anti-EGFR and anti-Galectin-1-siRNAs of 40 nM. The anti-MGMT-siRNA concentration used was 5 nM. The siRNA sequences (Eurogentec, Angers, France) used are indicated in Table 1.

Characterization of siRNA/chitosan-LNCs complexes

The average hydrodynamic diameter, polydispersity index (PDI) and zeta potential of chitosan-LNCs and siRNA/chitosan-LNCs complexes were measured by DLS using NanoZS® (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Measurements were performed in RNAse free water in triplicate at 25°C with comparable conductivity values for zeta potential determination.

Stability of siRNA/chitosan-LNCs complexes

The stability of all siRNA/chitosan-LNCs complexes tested in this study was evaluated at 4 and 25°C in RNAse free water for 72 h. For this purpose, measurements of hydrodynamic diameter, PDI and zeta potential were performed using a NanoZS®.

siRNA transfection

U87MG/MGMT- or U87MG/MGMT+ were plated in 24-well plates at a density of $25x10^3$ cells/well. After 48 h, the culture medium was removed and cells were treated with siRNA/chitosan LNC complexes. The final concentration of chitosan-LNCs was 100 µg/mL. Anti-MGMT siRNA at the concentration of 5 nM was tested on U87MG/MGMT+ cells while anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs (40 nM) was tested on U87MG/MGMT- cells.

Moreover, combinations of these siRNAs were also evaluated: (i) the effect of the combination of anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs, on U87MG/MGMT- cells; and (ii) the combinations of anti-MGMT/anti-EGFR siRNAs, anti-

Table 2: Size and zeta potential of chitosan-LNCs and siRNA/chitosan-LNCs complexes (*n*=3).

Formulation	siRNA concentration (nM)	Size (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)
Blank LNCs	0	52.6 ± 0.6	0.02	-6.4 ± 0.4
Chitosan-LNCs	0	71.6 ± 1.1	0.22	24.7 ± 2.1
Chitosan-LNCs + siRNA:				
Anti-MGMT	5	85.0 ± 1.2	0.26	18.6 ± 0.7
Anti-EGFR	40	95.1 ± 2.45	0.24	15.2 ± 0.9
Anti-Galectin-1	40	92.9 ± 2.6	0.28	15.9 ± 0.6
Anti-EGFR + Anti-Galectin-1	40+40	94.2 ± 1.5	0.26	12.2 ± 2.6
Anti-MGMT + Anti-EGFR	5+40	96.0 ± 1.6	0.26	12.6 ± 0.9
Anti-MGMT + Anti-Galectin-1	5+40	99.2 ± 4.0	0.29	13.5 ± 1.2
Anti-MGMT + Anti-EGFR + Anti-Galectin-1	5+40+40	117.5 ± 1.3	0.28	6.2 ± 1.7

MGMT/anti-Galectin-1 siRNAs or anti-MGMT/anti-EGFR/anti-Galectin-1siRNAs, on U87MGMGMT+ cells. The negative control tested was a scramble siRNA carried by chitosan-LNCs (Eurogentec, Angers, France).

Flow cytometry

Four days after the siRNA transfection, cells were harvested from the bottom of the plate by the Versene® (EDTA) 0.02% (Lonza, Verviers, Belgium), re-suspended in PBS supplemented with 5% FBS and 0.02% NaN_3, and incubated on ice for 1 h with mouse anti-EGFR and anti-MGMT (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), and mouse anti-Galectin-1 (R&D systems, Abingdon, England) antibodies or isotype control antibodies.

For MGMT and Galectin-1, cells were permeabilized with the BD cytofix/cytoperm™ fixation/permeabilization kit (BD Biosciences) before addition of primary antibodies. Following incubation, cells were washed and further stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat $F(ab')_2$ anti-mouse immunoglobulin (Dako, Trappes, France) or anti-goat immunoglobulin (R&D systems) for 30 minutes on ice. Cells were then washed and fixed in 2% formaldehyde. The stained cells were analyzed in a FACScan flow cytometer with CellQuest Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Survival assay

As aforementioned, U87MG/MGMT- or U87MG/MGMT+ cells were plated for 48 h in 24-well plates and then treated for 72 h with siRNA/chitosan-LNCs complexes (siRNAs concentrations: 5 nM for anti-MGMT and 40 nM for anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs).

At the end of the incubation period, the culture medium from each well was changed and cells were treated with or without TMZ. Two concentrations of TMZ were tested: 0.03 and 0.50 mg/mL. After 24 h, the culture medium was changed in each well and a volume of 40 µL of the MTT reagent was added and incubated for 4 h in the dark at 37°C. The supernatant was then aspirated and a volume of 400 µL of acidic isopropanol was added to each well to dissolve the previously-obtained formazan crystals. The plate was left under mechanical stirring and the contents of each well was transferred to a 96-well plate to perform the reading Multiskan Ascent® (Labsystems, Haverhill, MA, USA) at 580 nm.

Survival percentages were determined when compared to untreated cells which were taken as control with a 100% survival rate.

Statistical analysis

All results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using Student t-test to identify significant differences between controls and other groups. Differences were considered significant if $p < 0.05$.

Results

Size and zeta potential of chitosan-LNCs and siRNA/chitosan-LNCs

As previously described [27], an increase in the hydrodynamic diameter of the chitosan-LNCs compared to the LNCs was observed (71 nm and 52 nm, respectively), confirming attachment of chitosan onto the surface of LNCs by the transacylation process (Table 2). The zeta potential of these chitosan-LNCs became positive (-6 and 24 mV for blank LNCs and chitosan-LNCs, respectively), allowing the fixation of siRNA on their surface by electrostatic attraction (Table 2). Regarding the siRNA/chitosan-LNCs complex, an increase in the hydrodynamic diameter was observed compared to chitosan-LNCs (± 90 nm and 71 nm, respectively). The zeta potentials of siRNA/chitosan-LNCs decreased with the complexation of siRNA compared to chitosan LNCs (15 mV and 24 mv, respectively) (Table 2) [27].

Table 3: Stability at 4°C and 25°C of anti-EGFR/chitosan-LNCs complexes (40 nM) (*n*=3).

Storage temperature (°C)	Time (h)	Size (nm)	PDI	Zeta potential (mV)
4	0	95.1 ± 2.4	0.24	15.2 ± 0.9
	24	96.4 ± 1	0.23	16.4 ± 0.6
	48	95.8 ± 2.1	0.25	15.9 ± 0.7
	72	97.2 ± 1	0.3	15.8 ± 1.1
25	0	95.1 ± 2.4	0.24	15.2 ± 0.9
	24	95.7 ± 2.8	0.23	15.4 ± 1.6
	48	90.9 ± 0.1	0.26	16.0 ± 0.9
	72	95.9 ± 2.4	0.3	16.7 ± 1.3

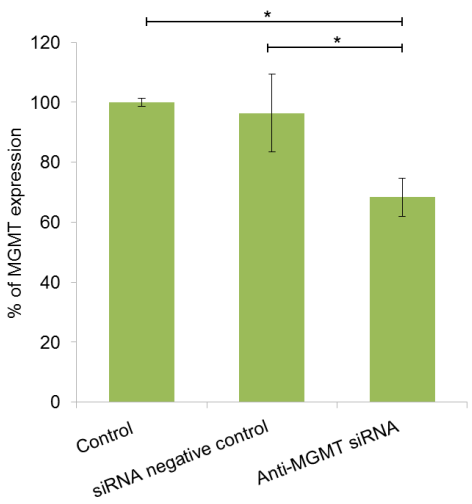

Figure 1: Effect of anti-MGMT siRNA (5 nM) carried by chitosan-LNCs on MGMT expression in U87MG/MGMT+ after siRNA treatment for 96h. Data are shown as mean ± SEM (*n*=3) (**p<0.05*).

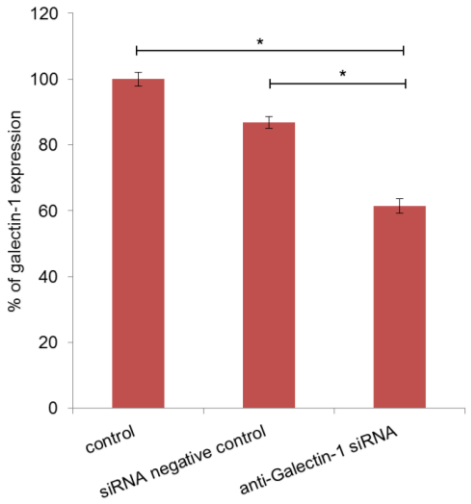

Figure 2: Effect of anti-Galectin-1siRNA carried by chitosan-LNCs (40 nM) on the Galectin-1 expression in U87MG/MGMT- after treatment for 96h. Data are shown as mean ± SEM (*n*=3) (**p<0.05*).

Stability of siRNA/chitosan-LNCs complexes

All complexes tested in this study were stable at 4°C and 25°C at least for 72 h, in terms of hydrodynamic diameter, PDI and zeta potential. Example of the stability of anti-EGFR/chitosan-LNCs (40 nM) is illustrated in Table 3. Additionally, the visual appearance of these formulations was identical at both temperatures. After this period, the PDI of the formulations increased and exceeded 0.3 indicating the heterogeneity of particles sizes.

Determination of protein expression by flow cytometry

Anti-MGMT siRNA

The effect of anti-MGMT siRNA carried by chitosan-LNCs was assessed on the MGMT expression. The treatment of U87MG/MGMT+ cells for 96 h, with anti-MGMT siRNA at the concentration of 5 nM carried by chitosan-LNCs resulted in a significant reduction of the target protein, corresponding to a production of 68.32 ± 2.93 % compared to the siRNA negative control (96.3 ± 6.31 %) (p<0.05) (Figure 1).

Anti-Galectin-1 and EGFR siRNAs

The effect of anti-Galectin-1 and anti-EGFR (alone or in combination) siRNAs carried by chitosan-LNCs was assessed on their respective protein expression. The treatment of U87MG/MGMT- cells for 96h with anti-Galectin-1 siRNA induced a significant decrease in the expression of Galectin-1 compared to siRNA negative control, corresponded to a production of 61.52 ± 2.17 % of the target protein when compared with 86.84 ± 1.71 % for the siRNA negative control (p<0.05) (Figure 2). In a previous study, we demonstrated similar results for anti-EGFR siRNA [27].

A similar production of Galectin-1 (58.80 ± 3.04 %) was obtained when the U87MG/MGMT- cells were treated with the combination of anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs at a concentration of 40 nM each one carried by the chitosan-LNCs when compared to the siRNA negative control (86.84 ± 1.71 %) (p<0.05) (Figure 3). In the same way, this combination induced a significant decrease of the EGFR expression, corresponding to a production of 54.12 ± 1.52 % compared to siRNA negative control (79.6 ± 3.20 %) (p<0.05) (Figure 3).

Combination of anti-MGMT with Galectin-1 and/or EGFR siRNAs

The MGMT protein expression was significantly reduced compared to siRNA negative control after treatment with the combination of anti-MGMT/anti-EGFR, anti-MGMT/anti-Galectin-1 and anti-MGMT/anti-EGFR/anti-Galectin-1 siRNAs for 96 h. The percentages of MGMT expression were 67.83 ± 4.6 %, 64.21 ± 2.34 % and 80.35 ± 1.72 %, respectively, when compared to 96.31 ± 6.31 % for siRNA negative control (p<0.05) (Figure 4).

The percentages of EGFR expression obtained after treatment of the same cells with the combination of anti-MGMT/anti-EGFR and anti-MGMT/anti-EGFR/anti-Galectin-1 siRNAs for 96 h were 62.61 ± 2.73 % and 74.67 ± 1.40 %, respectively, when compared to 90.94 ± 0.39 % for siRNA negative control (p<0.05) (Figure 4).

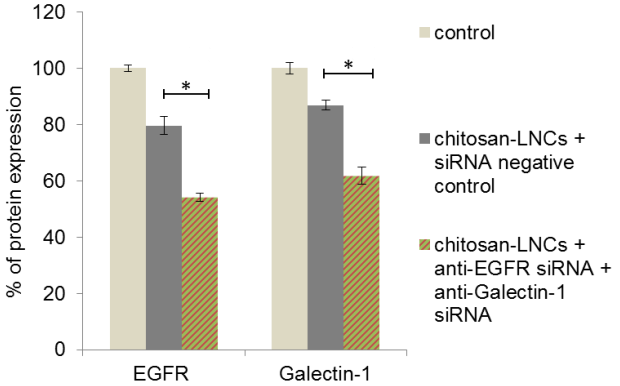

Figure 3: Effect of the combination of anti-EGFR (40 nM) and anti-Galectin-1 (40 nM) siRNAs carried by chitosan-LNCs on the EGFR and Galectin-1 expression in U87MG/MGMT- cells. Data are shown as mean ± SEM (*n*=3) (**p<0.05*).

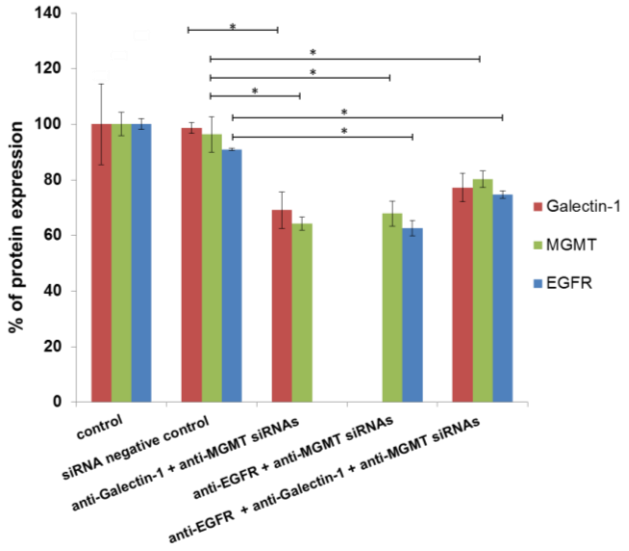

Figure 4: Effect on Galectin-1, MGMT and EGFR expression after treatment of U87MG/MGMT+ cells with the combination of siRNAs (anti-MGMT/anti-EGFR, anti-MGMT/anti-Galectin-1 and anti- MGMT/anti-EGFR/anti-Galectin-1) carried by the chitosan-LNCs. siRNAs concentrations were 40 nM for anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs and 5 nM for the anti-MGMT siRNA. Data are shown as mean ± SEM (n=3) (*p<0.05).

The expression of Galectin-1 was also reduced compared to siRNA negative control after 96 h of incubation of these cells with the combinations of anti-MGMT/anti-Galectin-1 and anti-MGMT/anti-EGFR/anti-Galectin-1 siRNAs. The percentages of Galectin-1 expression were 69.14 ± 6.54 % and 77.20 ± 5.17 %, respectively, when compared to 98.65 ± 1.89 % for siRNA negative control (p<0.05) (Figure 4).

These results showed that the co-complexation of two or three siRNA did not reduce their ability to decrease the expression of their respective target protein.

Evaluation of the sensitivity in U87MG cells to TMZ after siRNA treatment

Combination of Anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNAs

The treatment of U87MG/MGMT- cells with the anti-Galectin-1 siRNA carried by chitosan- LNCs at a concentration of 40nM resulted in significant reduction of the percentages of living cells compared to siRNA negative control. Indeed, without TMZ, treatment with anti-Galectin-1 siRNA allowed a percentage of living cells of 77.24 ± 1.16 % compared to 100 ± 6.11 % for siRNA negative control (p<0.05). This effect was more pronounced for the combination of anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNAs, reducing the percentage of living cells to 61.19 ± 1.48 % when compared with 77.24 ± 1.16 % (p<0.05) and 100 ± 6.11 % (p<0.01) for anti-Galectin-1 siRNA alone and siRNA negative control (Figure 5).

The effect of siRNA treatment was logically potentialized with the addition of TMZ. The percentage of living cells treated with anti-Galectin-1 siRNA and siRNA negative control was statistically different at 0.03 (p<0.01) and 0.5 mg/mL (p<0.01) of TMZ (Figure 5). For example, at 0.5 mg/mL of TMZ, the anti-Galectin-1 siRNA allowed a percentage of living cells of 40.67 ± 3.75 % when compared with 74.59 ± 8.36 % for siRNA negative control (p<0.05) (Figure 5). The sensitivity of these cells to TMZ was significantly increased when anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs were combined. At 0.5 mg/mL of TMZ, the percentage of living cells decreased from 40.67 ± 3.75 % to 17.81 ± 1.63 % for anti-Galectin-1 alone and the combination of anti-Galectin-1 and EGFR siRNAs, respectively (p<0.05). At 0.03 mg/mL of TMZ, the same conclusion can be observed (Figure 5).

Combination of anti-MGMT with anti-Galectin-1 and/or anti-EGFR siRNAs

The treatment of U87MG/MGMT+ cells with the anti-MGMT siRNA alone (at the concentration of 5 nM) carried by chitosan-LNCs did not increase the sensitivity of these cells to TMZ compared to siRNA negative control. By contrast, when one or two siRNA (anti-Galectin-1 or anti-EGFR) were combined to the anti-MGMT siRNA, the percentage of living cells (without TMZ treatment) decreased, suggesting the intrinsic cytotoxicity of these combinations (p<0.05). No difference was observed between the three combinations of siRNA (anti-MGMT/anti-EGFR; anti-MGMT/anti-Galectin-1 and anti-MGMT/anti-EGFR/anti-Galectin-1). Logically, the cytotoxicity of theses combinations of siRNAs was enhanced in the presence of TMZ, showing the sensitization of cells to TMZ due to siRNA treatment. At 0.5 mg/mL of TMZ, the percentage of living cells decreased from 55.18 ± 1.92 % to 36.04 ± 4.14 % for anti-MGMT alone and the combination of anti-MGMT/anti-Galectin-1/anti-EGFR siRNAs, respectively (p<0.05). At 0.03 mg/mL of TMZ, the same conclusion can be observed (Figure 6). Nevertheless, the combination of anti-MGMT with anti-Galectin-1 or with anti-EGFR or with these two last ones did not present any statistical difference.

Discussion

In recent years, various mechanisms involved in the resistance to TMZ in GB patients have been elucidated such as, on one side, the overexpression of MGMT and on the other side, the overexpression of Galectin-1 and EGFR [6,17,31]. Finding ways to counter the expression and functionality of these proteins is a real challenge to sensitize GB cells to the first line treatment, TMZ. The development of siRNA-based nanotechnologies is very promising. For example, EGFRvIII has been targeted by Kim's team in GB cells by specific siRNA transported by cyclodextrin-modified dendritic polyamines (DexAMs) loaded with an anticancer drug, Erlotinib [32]. The co-delivery of anti-EGFRvIII siRNA and Erlotinib in GB cells was found to significantly inhibit cell proliferation and induce apoptosis, as compared to the individual treatments. Kato *et al.*, have used a mixture of anti-MGMT siRNAs carried by ***LipoTrust***™ in GB cell lines, T98G and U251 which led to a significant increase in the sensitivity of these cell lines to TMZ compared with control [33]. In another study, Le Mercier *et al.*, have shown that reducing Galectin-1 expression in glioma cells by siRNA increases the anti-tumor effects of various chemotherapeutic agents, in particular TMZ, both *in vitro* and *in* vivo [17]. The main limitation of these studies consists is the use of vectors which are not easy to produce or which are not suitable for human injection. Furthermore, GBs are heterogeneous and highly proliferative tumors. Thus, targeting only one protein is not sufficient to increase significantly the sensitivity of the tumor to TMZ.

In this work, we used chitosan-LNCs as vector for the delivery of siRNAs to target MGMT, EGFR and Galectin-1. These particles have the advantages to be produced through a simple process without solvent and simply purified by dialysis. This process has been previously adapted to produce large scale batches adapted to preclinical studies [34]. Chitosan was used as polymer of transacylation, due to its interesting physicochemical properties, in particular, (i) its non-toxicity compared with other cationic polymers such as Polyethylene imine (PEI) [35], and (ii) its high capacity for transfection of nucleic acids in particular siRNAs [36,37]. The concentration of 100 µg/mL of LNCs transacylated with 1.2 mg/mL of chitosan was selected based on previous cytotoxicity assay on U87MG cells showing that cytotoxicity of LNCs appeared from 150 µg/mL of LNCs [27].

Previously, we showed that targeting EGFR by siRNA at the concentration of 40nM carried by chitosan-LNCs, reduced the production of this protein and increased the sensitivity of U87MG/MGMT- cells to TMZ [27]. Based on these encouraging results, we hypothesized that the targeting of MGMT, EGFR and Galectin-1 (alone or in combination) by specifics siRNAs carried by chitosan-lipid nanocapsules (chitosan-LNCs) could enhance the sensitivity of U87MG cells to TMZ.

In this study, we demonstrated that the treatment of U87MG cells by anti-MGMT siRNA associated with chitosan-LNCs decreased the cellular expression of MGMT but did not increase the cytotoxic effect of TMZ. By contrast, when anti-MGMT siRNA was combined with anti-Galectin-1 or anti-EGFR siRNAs, we observed a decrease of the cellular expression of MGMT (as well as those of Galectin-1 or EGFR) and an increase of the cytotoxic effect of TMZ.

We also demonstrated that the treatment of U87MG cells by anti-Galectin-1 or anti-EGFR siRNAs associated with chitosan-LNCs decreased the cellular expression of Galectin-1 or EGFR and increased the cytotoxic effect of TMZ. This effect was enhanced when anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNAs were combined. Indeed, using the same amount of nanoparticles to avoid any additional toxicity related to the vector, we showed that the combination of these two siRNAs significantly improved toxicity of TMZ on U87MG/MGMT- cells compared to the effect obtained with the siRNA used separately.

Two different concentrations of TMZ were tested: 0.03 and 0.5 mg/mL. These concentrations were chosen taking into account both the sensitivity of U87MG cells and the plasma concentrations described in the literature. The plasma concentration of TMZ was determined for patients with high grades gliomas. The pharmacokinetics of TMZ appeared linear, with the area under the curve (AUC) increasing proportionally to the dose after intravenous administration. For a dose of 250 mg/m^2, the C_{max} (maximum concentration) was 10 µg/mL. Measured in the cerebrospinal fluid, concentration was about 29 % of the plasma concentration [38]. As expected, in combination with siRNA treatment, the higher the TMZ concentration, the higher cytotoxicity.

Finally, we evaluated the effect of the combination of the three siRNAs. The combination of anti-MGMT with anti-Galectin-1 and anti-EGFR siRNAs (with the same amount of nanoparticles) did not provide any additional effect than the combination of anti-MGMT with anti-Galectin-1 or with anti-EGFR siRNAs, in terms of cellular expression of the target proteins and cellular sensitivity to TMZ. Additionally, no difference was observed between the combination of anti-MGMT/anti-Galectin-1 siRNAs and the combination of anti-MGMT/anti-EGFR siRNAs. These results highlighted the need to combine stategies of the two mains signaling pathways responsible of TMZ resistance.

siRNAs could be in competition with each other and also with endogenous miRNAs for the RISC complex incorporation, this may explain the effect obtained with three siRNAs [39]. Additionally, we observed that the zeta potential of the complex formed by the association of the three siRNAs with chitosan-LNCs was divided by 2 compared to that of the combination of two siRNAs with chitosan-LNCs. Several

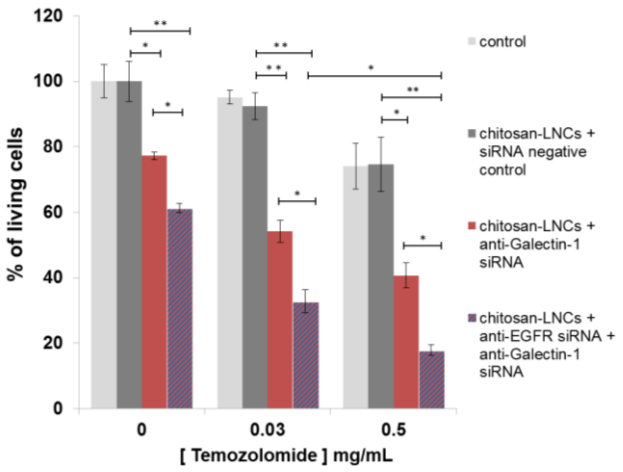

Figure 5: Evaluation of the sensitivity of U87MG/MGMT- cells to TMZ after siRNA treatment. siRNAs concentrations were 40 nM for anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs. Data are shown as mean ± SEM (*n*=3) (**p<0.05 and **p<0.01*).

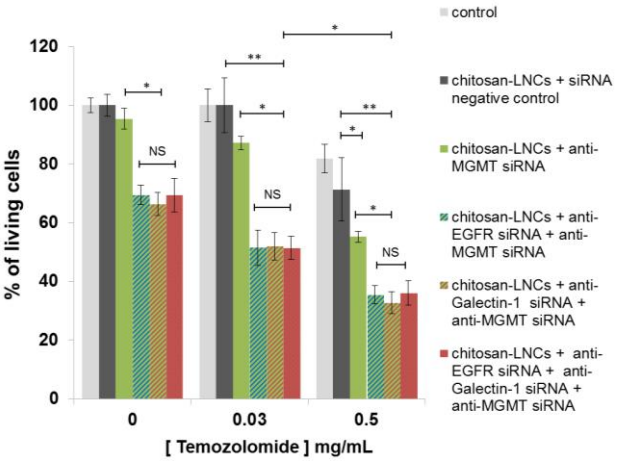

Figure 6: Evaluation of the sensitivity of U87MG/MGMT+ cells to TMZ after siRNA treatment. siRNAs concentrations were 40 nM for anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs and 5 nM for the anti-MGMT siRNA. Data are shown as mean ± SEM (*n*=3). (**p<0.05, **p<0.01*).

studies indicated that the intensity of the positive charge of the nanocarriers increases cellular uptake of the complexes formed with siRNAs and the inhibition efficiency of the target proteins [40,41]. This could explain why chitosan-LNCs associated with three siRNAs failed to be more effective than other associations.

To combine three siRNAs, the increase of the amount of nanoparticles can be proposed but that may exceed the amount of vector-tolerated by cells. Another alternative consists in the increase of the particle size carrying siRNAs. Additional studies are conducted to validate this alternative. Nevertheless, the current formulation of the combined anti-MGMT/anti-Galectin-1 or anti-MGMT/anti-EGFR should be further evaluated *in vivo*. Our vector has been designed for intracerebral injection, a strategy which offers two advantages. First, it limits the interaction with plasma proteins observed with the intravenous route. That is why a noncovalent link between siRNA and LNCs seems adequate for transfection efficiency. Second, this approach solves the issue of crossing the blood–brain barrier. *In vivo*, the formulation is better adapted to injection during tumor resection or can be injected in the tumor by the convection enhancement delivery (CED) using a stereotaxic procedure.

Conclusion

In this study, we showed *in vitro* that (i) anti-MGMT and (ii) anti-EGFR or anti-Galectin-1 siRNAs decreased significantly the expression of their corresponding proteins. Additionally, the combination of anti-MGMT siRNA with either anti-EGFR or anti-Galectin-1 siRNAs enhanced the sensitivity of U87MG cells to TMZ in comparison to their separately use. Interestingly, the association of the three siRNAs failed to be more effective than two siRNAs, showing that the properties of the vector have to be taken into account to optimize siRNA delivery and efficiency of their therapeutic activities.

These siRNA nanovectors due to their ease of preparation, the biocompatibility of their components and the possibility to encapsulate lipophilic drugs such as radio-sensitizing agents represent a potential tool to improve the efficacy of the first line treatment of GB patients.

Acknowledgements

The authors are very grateful to the “Inter-Regional Committee, League against Cancer, Pays de la Loire region” for providing financial support for this work.

References

1. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. 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.* 2009/05//undefined 2009;10(5):459-466.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005/03/10/ 2005;352(10):987-996.
3. Lefranc F, Sadeghi N, Camby I, Metens T, Dewitte O, Kiss R. Present and potential future issues in glioblastoma treatment. *Expert Rev Anticancer Ther.* May 2006;6(5):719-732.
4. Pletsas D, Garelnabi EA, Li L, Phillips RM, Wheelhouse RT. Synthesis and quantitative structure-activity relationship of imidazotetrazine prodrugs with activity independent of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, DNA mismatch repair, and p53. *J Med Chem.* Sep 12 2013;56(17):7120-7132.
5. Henry S. Friedman TK, and Hilary Calvert. Temozolomide and Treatment of Malignant Glioma. *Clinical Cancer Research.* 2000; 6; 2585.
6. Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Current molecular pharmacology.* Jan 2012;5(1):102-114.
7. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* Nov 9 2000;343(19):1350-1354.
8. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* Aug 1 2007;6(8):1079-1099.
9. Yang RYC. Targeting the dimerization of epidermal growth factor receptors with small-molecule inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 2010; 76, 1–9.
10. Ekstrand AJ, James CD, Cavenee WK, Seliger B, Pettersson RF, Collins VP. Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer Res.* Apr 15 1991;51(8):2164-2172.
11. Lo HW. EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. *Current molecular pharmacology.* Jan 2010;3(1):37-52.
12. Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, Zalutsky MR, Bigner DD. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *Journal of neurovirology.* Apr 1998;4(2):148-158.
13. Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene.* 1997/12/04/ 1997;15(23):2755-2765.
14. Narita Y, Nagane M, Mishima K, Huang HJ, Furnari FB, Cavenee WK. Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res.* 2002/11/15/ 2002;62(22):6764-6769.
15. Furuta S, Hidaka E, Ogata A, Yokota S, Kamata T. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene.* 2004/05/13/ 2004;23(22):3898-3904.
16. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature reviews. Cancer.* Jan 2005;5(1):29-41.
17. Le Mercier M, Lefranc F, Mijatovic T, et al. Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008/06/01/ 2008;229(2):172-183.
18. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature.* 1998/02/19/ 1998;391(6669):806-811.
19. McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet.* 2002/10//undefined 2002;3(10):737-747.
20. Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007/03/30/ 2007;59(2-3):75-86.
21. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet.* 2007/03//undefined 2007;8(3):173-184.
22. Reischl D, Zimmer A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine.* 2009/03//undefined 2009;5(1):8-20.
23. Volkov AA, Kruglova NS, Meschaninova MI, et al. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. *Oligonucleotides.* 2009/06//undefined 2009;19(2):191-202.
24. Fehring V, Schaeper U, Ahrens K, et al. Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel lipoplex formulation DACC. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* Jan 6 2014.
25. Katas H, Abdul Ghafoor Raja M, Ee LC. Comparative characterization and cytotoxicity study of TAT-peptide as potential vectors for siRNA and Dicer-substrate siRNA. *Drug development and industrial pharmacy.* Aug 21 2013.
26. Pantazis P, Dimas K, Wyche JH, et al. Preparation of siRNA-encapsulated PLGA nanoparticles for sustained release of siRNA and evaluation of encapsulation efficiency. *Methods in molecular biology.* 2012;906:311-319.
27. Messaoudi K, Saulnier P, Boesen K, Benoit JP, Lagarce F. Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. *Int J Nanomedicine.* 2014;9:1479-1490.
28. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res.* 2002/06//undefined 2002;19(6):875-880.
29. Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, et al. Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. *Eur J Pharm Biopharm.* 2009/10//undefined 2009;73(2):239-246.
30. Malmo J, Sorgard H, Varum KM, Strand SP. siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. *J Control Release.* Mar 10 2012;158(2):261-268.
31. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res.* Oct 15 2003;63(20):6962-6970.
32. Kim C, Shah BP, Subramaniam P, Lee KB. Synergistic induction of apoptosis in brain cancer cells by targeted codelivery of siRNA and anticancer drugs. *Mol Pharm.* Oct 3 2011;8(5):1955-1961.
33. Kato T, Natsume A, Toda H, et al. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Ther.* Nov 2010;17(11):1363-1371.
34. Thomas O, Lagarce F. Lipid nanocapsules: a nanocarrier suitable for scale-up process. *J. Drug Del. Sci. Tech.* . 2013;23(6):555-559.
35. Fischer D, Bieber T, Li Y, Elsasser HP, Kissel T. A novel non-viral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity. *Pharm Res.* 1999/08//undefined 1999;16(8):1273-1279.

36. Howard KA, Rahbek UL, Liu X, et al. RNA interference *in vitro* and *in vivo* using a novel chitosan/siRNA nanoparticle system. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* Oct 2006;14(4):476-484.
37. Katas H, Alpar HO. Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *J Control Release.* Oct 10 2006;115(2):216-225.
38. Gander M, Leyvraz S, Decosterd L, et al. Sequential administration of temozolomide and fotemustine: depletion of O6-alkyl guanine-DNA transferase in blood lymphocytes and in tumours. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* Jul 1999;10(7):831-838.
39. Castanotto D, Sakurai K, Lingeman R, et al. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(15):5154-5164.
40. Hattori Y, Yoshizawa T, Koga K, Maitani Y. NaCl induced high cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated synthetic small interfering RNA transfer into prostate carcinoma PC-3 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin.* Dec 2008;31(12):2294-2301.
41. Huang HY, Kuo WT, Chou MJ, Huang YY. Co-delivery of anti-vascular endothelial growth factor siRNA and doxorubicin by multifunctional polymeric micelle for tumor growth suppression. *J Biomed Mater Res A.* Jun 1 2011;97(3):330-338.

CHAPITRE 3 :

Evaluation de l'efficacité *in vivo* des siRNA anti-EGFR et anti-galectine-1 transportés par les chitosan-LNCs

Evaluation de l'efficacité *in vivo* des siRNA anti-EGFR et anti-galectine-1 transportés par les chitosan-LNCs

RATIONNEL

Après avoir montré l'efficacité de notre stratégie *in vitro* en réduisant la production des protéines cibles et en augmentant l'effet du TMZ sur les cellules U87MG, il était nécessaire d'évaluer l'effet des formulations siRNA/chitosan-LNCs *in vivo* sur un modèle de tumeur implantée dans le cerveau de souris *Swiss Nude* par stéréotaxie. L'administration de ces formulations s'est faite par Convection Enhanced Delivery (CED) afin de permettre une administration locale des complexes siRNA/chitosan-LNCs et une diffusion homogène dans le tissu tumoral.

OBJECTIF

L'objectif de cette partie était de cibler l'EGFR et la galectine-1 par des siRNA spécifiques transportés par des chitosan-LNCs dans des tumeurs implantées dans le cerveau des souris par stéréotaxie afin d'améliorer l'effet du TMZ et d'augmenter la survie des animaux par rapport aux contrôles. D'autre part, une évaluation de l'efficacité de la combinaison des deux siRNA par rapport à leur utilisation séparée a été réalisée.

RESULTATS

Plusieurs protocoles expérimentaux ont été réalisés afin de mettre au point les conditions optimales permettant d'évaluer l'efficacité des siRNA anti EGFR et anti-galectine-1.

Le traitement des souris à J6 par CED suivi d'un traitement par TMZ à J9, J16 et J23 a permis de guérir tous les animaux y compris les animaux contrôles, ce qui indique que le traitement est trop précoce.

Le traitement des animaux à J10 n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les siRNA anti-EGFR, anti-galectine-1 et l'association des deux siRNA.

Le traitement des tumeurs à J14 après implantation par l'association des siRNA (anti-EGFR et anti-galectine-1) a augmenté significativement la survie des animaux par rapport aux traitements par siRNA anti-EGFR ou anti-galectine-1. Ceci indique que notre stratégie de combinaison des siRNA s'est avérée efficace *in vivo*.

Ces travaux devraient faire l'objet d'une publication dont le manuscrit ci-après est en cours de préparation.

Combined inhibition of Galectin-1 and EGFR decreases temozolomide resistance in glioblastoma: *in vivo* evaluation

Khaled Messaoudi[1*], Fabienne Danhier[3*], Anne Clavreul[1], Laurent Lemaire[1], Jean-Pierre Benoit[1, 2], Frédéric Lagarce[1, 2**]

[1]L'Université Nantes Angers Le Mans, INSER M U1066, Micro et nanomédecines biomimétiques, IBS-CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers, Cedex 9, France
[2]Pharmacy department, Angers University Hospital, Angers, France
[3]Université catholique de Louvain, Louvain Drug Research Institute, Advanced Drug Delivery and Biomaterials, Avenue Mounier 73 bte B1 73.12, B-1200 Brussels, Belgium

* These two authors contribute equally to this work
**Corresponding author
E-mail address: frederic.lagarce@univ-angers.fr
Phone: +33 244 688 568; Fax: +33 244 688 546
E-mail address: frederic.lagarce@univ-angers.fr

Abstract

Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most frequent primary malignant brain tumor in adults. Despite treatments including surgery, radiotherapy and chemotherapy by oral Temozolomide (TMZ), the prognosis of patients with GBM remains very poor. This is partly due to the resistance of malignant cells to therapy particularly TMZ. Overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Galectin-1 by tumor cells significantly contributes to TMZ resistance. In a previous study we showed that targeting EGFR and Galectin-1 by specific siRNAs carried by lipid nanocapsules grafted by chitosan (chitosan-LNCs) increased the sensitivity of GBM cells to TMZ. In addition, we demonstrated the superiority of the effect obtained with the combination of these two siRNAs compared to the effect obtained with these siRNAs used separately.

The purpose of this study was to evaluate *in vivo*, the effect of local administration by convection enhanced delivery (CED) of the anti-EGFR and anti-galectin-1 siRNAs used separately or in combination on a sensitivity of GBM cells to TMZ and on survival of animals.

Preliminary results are very encouraging and in favor of a higher efficiency of the association of siRNAs compared to their separate use. Indeed, survival of mice treated by the combination of anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNAs was increased significantly compared to animals treated by anti-EGFR or anti-Galectin-1 siRNAs carried by chitosan-LNCs.

This study demonstrates the potential of our strategy in GBM therapy. Given the homogeneity of siRNA structure, it is possible with this system to reach any target implicated in the resistance of GBMs to TMZ and to adapt treatment to the individual patient profile.

Keywords

Galectin-1, EGFR, siRNA, Temozolomide, Glioblastoma, Lipid nanocapsules.

1. Introduction

Glioblastomas are brain tumors that arise from astrocytes or supportive tissue of the brain. These tumors are usually highly malignant. Glioblastoma multiform is the most common malignant tumor of the central nervous system in adults. These tumors show a high proliferation rate, variability in tumor histopathology and diffusely infiltrate adjacent brain tissue (Bernardi et al., 2009). The treatment of glioblastoma remains one of the most challenging cancer problems, as no curative treatment has yet been found (Stupp et al., 2009) Conventional therapeutic procedures focus on surgical resection combined with adjuvant radiotherapy and/or chemotherapy by oral Temozolomide (TMZ) (Stupp et al., 2005) However, tumor recurrences are common and median survival is 14 months and the percentage of patients living for 5 years or more is less than 10 % (Lefranc et al., 2006) TMZ is an alkylating agent from the imidazotetrazine family (Zhang et al., 2012) The efficacy of TMZ for treating glioblastoma is very limited. Indeed, among others, overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Galectin-1 by tumor cells significantly contributes to TMZ resistance (Friedman et al., 2000). EGFR overexpression or overactivaton is observed in 40 to 70 % of the patients. It has been demonstrated that the expression of a specific mutant form of EGFR (EGFRvIII) promotes tumor formation and growth (Hatanpaa et al., 2010; Verreault et al., 2013). The oncogenic properties of EGFR overexpression are suggested to be a consequence of the constitutive activation of downstream pathways such as PI3K/AKT (Moscatello et al., 1998) Galectin-1, which is a lectin with specificity for β-galactosides, significantly influences glioma cell migration. Galectin-1 positive patients survive for a significantly shorter period than individuals whose glioma expresses less Galectin-1 (Camby et al., 2002). Galectin-1 expression is increased under hypoxic conditions and radiotherapy stimulates Galectin-1 expression in glioma cells. Elsewhere, hypoxia also confers cellular resistance to conventional chemotherapy (Le Mercier et al., 2008a; Le et al., 2005). Galectin-1 is negatively regulated by p53, which triggers apoptosis response to cellular stress including chemotherapy, while loss of p53 functionality leads to chemoresistance (Camby et al., 2005; Le Mercier et al., 2008a).

In recent years, the strategy of ribonucleic acid interference (RNAi), whose principle process is to reduce the expression of target messenger RNA (mRNA), was discovered, opening up new perspectives in different areas of medicine. RNAi is an intrinsically cellular pathway discovered in 1998 (Fire et al., 1998; McManus and Sharp, 2002; Ngo et al., 1998) This pathway can be initiated by introducing small interfering RNA (siRNA) consisting of double-stranded RNA of 21–23 nucleotides. The use of therapeutic siRNA alone is not possible for several reasons, including (i) their negative charge, preventing them from crossing the plasma membrane to reach their target in the cytoplasm (Aagaard and Rossi, 2007; Kim and Rossi, 2007; Reischl and Zimmer, 2009); (ii) the presence of nucleases in plasma and the cytoplasm deteriorate siRNA rapidly after their injection into the blood; (iii) the immune response that can be triggered by their presence in the blood may also lead to their degradation (Volkov et al., 2009). These reasons emphasize the need for a suitable vector able to deliver the siRNA into the targeted cells.

Previously, we developed chitosan-grafted lipid nanocapsules (LNCs) for the delivery of both anti-EGFR (Messaoudi et al., 2014) and anti-Galectin-1 siRNA (Messaoudi et al., submitted). LNCs were prepared using a

phase-inversation process (Heurtault et al., 2002a). This process is green: no organic solvents are used. Moreover, only Generally Recognized as Safe (GRAS) and genetically modified organisms (GMO) free excipients are used (Hureaux et al., 2009). Chitosan was grafted at the LNCs surface by a transacylation reaction. The positive charge of chitosan allows for fixing the negatively charged siRNA to the vector surface by electrostatic attraction. Chitosan was selected as the transacylation polymer for its interesting physicochemical properties in particular its non-toxicity and biocompatibility (Malmo et al., 2012). We previously demonstrated *in vitro* that treatment of U87MG cells with anti-EGFR or anti-Galectin-1 siRNA/chitosan-LNCs complexes (siRNA concentration of 40 nM) resulted in a reduction of EGFR or Galectin-1 expression of 52% and 38%, respectively, after 96 h of incubation. We also observed a mortality reaching 82 % when these two siRNA were applied on U87MG cells 72 h before TMZ treatment at 0.5 mg/mL while TMZ alone induced a mortality of 26% and anti-EGFR or Galectin-1 siRNA alone induced a mortality of 67 % and 59 %, respectively. These results clearly demonstrated *in vitro* the rationale of combining the two anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNA to increase the sensitivity of U87MG cells to TMZ (Messaoudi et al., submitted; Messaoudi et al., 2014).

Hence, in this study, we aim to evaluate the preclinical relevance of the combination of these two anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNA to increase the sensitivity of glioblastoma. For this purpose, we administered siRNA/chitosan-LNCs complexes, by intracranial injection using a convection enhancement delivery (CED) procedure, three days before intraperitoneal injection of TMZ. The influence of the time schedule of administration after tumor implantation on the treatment efficacy was also evaluated. All experiments were performed on orthotopic human U87MG glioblastoma-bearing nude mice.

2. Material and methods

2.1 Preparation and characterization of siRNA/chitosan-LNCs complexes

2.1.1. Formulation of LNCs

LNCs were prepared according to a phase-inversion process as previously described (Heurtault et al., 2002a). Briefly, Solutol® H15, Lipoïd® S75-3, NaCl, Labrafac® and water (0.846 g, 0.075 g, 0.089 g, 1.028 g, 2.962 g, respectively) were mixed and warmed up to 85°C under magnetic stirring. The formulation was then cooled to 60°C; this cycle was repeated three times. During the last cycle, 12.5 mL of water at 4°C was added to the formulation.

2.1.2. Surface modification of LNCs

A transacylation reaction was obtained between the PEGylated hydroxystearate and a functional amino group of a polymer (Messaoudi et al., 2014). 20 mL of the previously-made LNCs was mixed with 1 mL of NaOH 10 M and 50 mg of chitosan oligosaccharide lactate 5,000 Da (Sigma Aldrich, St Louis, USA). The reaction was performed in a 25°C water bath for 15 minutes. The reaction was stopped by adding 20 mL of glycine buffer. The pH was adjusted to 5.5 ± 0.5 to ensure a correct ionization of the chitosan before adding siRNA. Finally, purification was performed by dialysis with membranes (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) having a molecular weight cut-off of 50 K Daltons. Chitosan nanoparticles were allowed for staying inside the

dialysis membrane while the free chitosan diffused in the dialysis water. Dialysis was performed for 24 hours with Milli-Q water under magnetic stirring.

2.1.3. Complexation of chitosan-LNCs with siRNA (siRNA/chitosan-LNCs)

The complexation of transacylated LNCs and anti-EGFR and/or and Galectin-1 siRNA (Eurogentec, Angers, France; sequences illustrated in Table 3) was performed as followed: 100 µL of LNCs and 2.32 µL siRNA (1000 µM) were mixed with RNAse-free water until a final volume of 500 µL. The solution was diluted two times in glucose 5 % to obtain a final concentration of LNCs of about 100 µg/mL and concentrations of siRNA of 40 nM.

Tableau 3: Anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNA sequences

siRNA	Sequence	
Negative control (scrambled)	sense antisense	5'-GGAAAUCCCCCAACAGUGAdTdT-3' 5'-UCACUGUUGGGGGAUUUCCTdT-3'
Anti-EGFR	sense antisense	5' CACAGUGGAGCGAAUUCCUdTdT 3' 3' dTdTGUGUCACCUCGCUUAAGGA 5'
Anti-Galectin-1	sense antisense	5' GCUGCCAGAUGGAUACGAAdTdT 3' 3' UUCGUAUCCAUCUGGCAGCdTdT 5'

2.1.4 Physico-chemical characterization of nanoparticles

LNCs, transacylated LNCS and siRNA/chitosan-LNCs were characterized in terms of size and zeta (ζ) potential. The average hydrodynamic diameter and polydispersity index of particles were determined by photon correlation spectroscopy, while ζ potential was determined by laser Doppler velocimetry, combined with phase analysis light scattering (PALS), both using a Zetasizer® Nano ZS (Malvern Instruments, UK). The instrument was calibrated with reference polystyrene nanoparticles (Malvern Instruments, UK). Measurements were performed after dispersion of 50 µL of particles in 2.95 mL of RNAse-free water. All assays were performed in triplicate.

2.2 TMZ formulation

TMZ was dissolved with the dissolution-enhancing agent L-histidine, which is an excipient approved by the Food and drug Administration (FDA, USA). TMZ (40 mg) and L-histidine (40 mg) were solubilized in phosphate buffer (10 mL, pH=5.0). The solution was filtered on 0.22 mm polyvinyl difluoride filter (Millipore, MA, USA) (Wauthoz et al., 2010).

2.3 *In vivo* anti-tumor efficacy

2.3.1. Cell culture

Human GB U87MG cells were obtained from LGC (Molsheim, France). These cells were cultured in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) with 1g/L of glucose supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Lonza, Verviers, Belgium) and 1% of antibiotics (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and incubated in 5 % CO_2 at 37°C (Messaoudi et al., 2014).

2.3.2. Tumor model: orthotopic U87 MG glioblastoma

Female athymic Swiss nude mice, aged 6 weeks, were obtained from Charles River (L'Arbresle, France). Experiments were conducted in accordance with the regulations of the French Ministry of Agriculture and the regional ethic committee. The animals were anaesthetized by an intraperitoneal injection of xylazine (13 mg/kg) and ketamine (100 mg/kg) and were positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, USA). On day zero, mice received an intracranial injection of 5 µL U87MG cells in HBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} (3×10^4 cells) into the right frontal lobe (striatum) (coordinates: 2.1 mm lateral from the bregma, 0.5 mm anterior and 3 mm deep from the outer border of the cranium), using a 5 µL Hamilton® syringe with a 26-G needle (Clavreul et al., 2014).

2.3.3. Convection enhancement delivery (CED) of siRNA/chitosan-LNCs and TMZ treatment

At different time after tumor implantation (day 6, 10 and 14), mice were randomly assigned to groups receiving intracranial injection of treatments. CED injection of siRNA/chitosan-LNCs was similar to tumor implantation, except that the 5 µL Hamilton® syringe with a 32-G needle was connected to an osmotic pump PHD 2000 infusion (Harvard Appartus, Les Ulis, France) by controlling 0.5 µL/min rate (Vanpouille-Box et al., 2011). Control groups consist in siRNA negative control. TMZ was intraperitonealy (IP) injected, at a dose of 20 or 40 mg/kg, 3 days after tumor implantation. Control group consists in intraperitoneal injection of HBSS with Ca^{2+} and Mg^{2+} (250 µL). The different time schedules that we studied are illustrated in Figure 12.

For each condition, mice were dived into 5 groups: **Group 1**: HBSS (CED) + HBSS (IP); **Group 2**: siRNA negative control (CED) + TMZ (IP); **Group 3**: anti-Galectin-1 siRNA/chitosan-LNCs (CED) + TMZ (IP); **Group 5**: anti-EGFR siRNA/chitosan-LNCs (CED) + TMZ (IP); **Group 6**: anti-Galectin-1+ anti-EGFR siRNA/chitosan-LNCs (CED) + TMZ (IP). Animals were sacrificed when they had lost more than 20 % of their body weight, which was directly attributed to the tumor development.

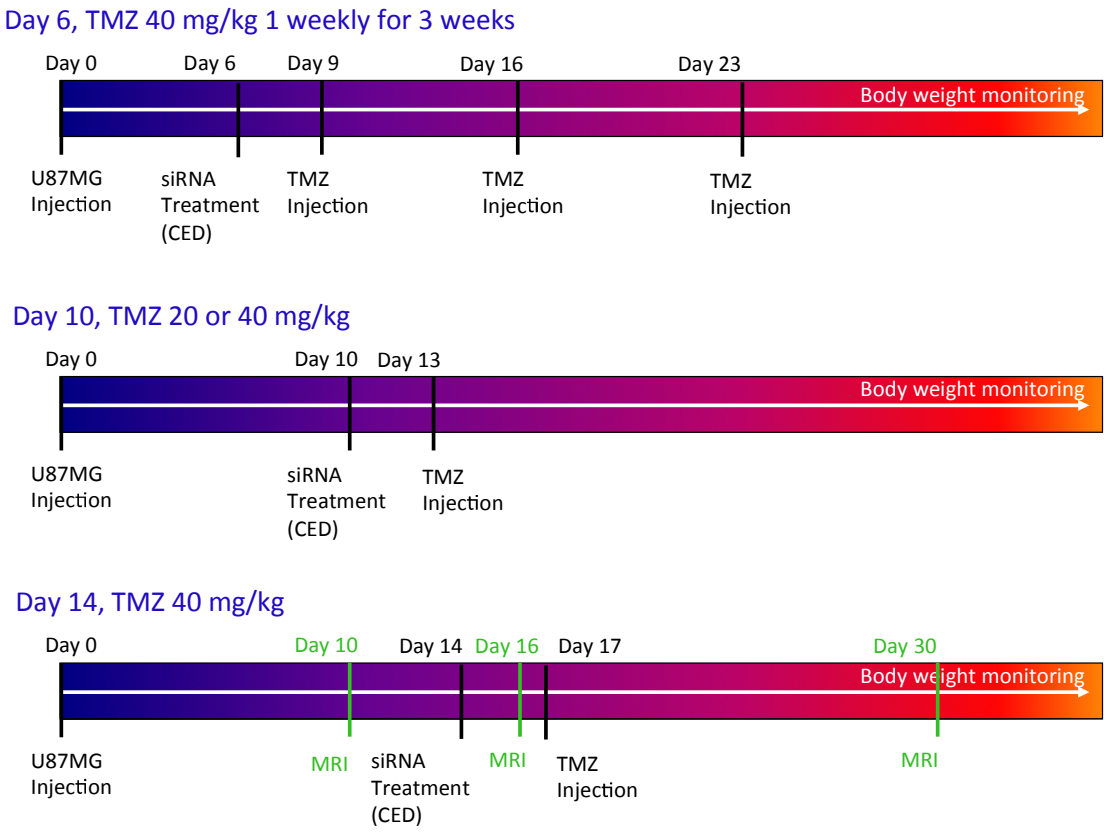

Figure 12: Time schedule of combined treatments and MRI.

2.4 MRI

2.4.1. Evaluation of orthotopic U87MG-tumor growth profile

The orthotopic U87MG tumor growth profile was determined by Magnetic Resonance Imaging (MRI). MRI was performed using a 7 T scanner (Biospec 70/20 Avance III, Bruker Wissembourg, France) equipped with BGA12S gradient system (675mT/m). Animal body temperature was maintained throughout the experiment by hot water circulation in the animal bed. During the MR protocol, mice were anesthetized with 0.5 % of isoflurane added to 0.4 L min^{-1} of pure O_2 and respiration was monitored. Tumor volume was assessed twice a week using a ^1H cryoprobe and a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) sequence (TR =3,200ms; effective echo time (TEeff)=21.3ms; acceleration factor=4; FOV=2×2cm; matrix 256×256; nine contiguous slices of 0.5mm, Number of excitations (Nex) = 1). Volumes were calculated from manually drawn ROI. These tumor volume growth curves are then fitted by the method of least squares with an exponential function.

2.4.2. Monitoring of U87MG-tumor growth before treatments

To check the tumor development and the localization in the right striatum, before treatments, brains of mice were imaged at day 10 with MRI.

2.5 Immunofluorescence

14 days after U87MG implantation, mice were dived into 3 groups (n=3): **Group 1**: HBSS (CED); **Group 2**: siRNA negative control (CED); **Group 3**: anti-Galectin-1 + anti-EGFR siRNA/chitosan-LNCs (CED). 8 after treatment, mice were killed. Brains were immediately placed in Tissue-Tek OCT embedding medium (Sakura Finetek, Tokyo, Japan), frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C. Brain coronal sections were cut (10 µm thick) and collected onto slides. Cryosections were air-dried, rehydrated in PBS and fixed for 2 min in ice-cold acetone, for EGFR staining, or in 4% PFA, pH 7.4, at 4°C, for Galectin-1 staining. To block non-specific binding, sections were incubated in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA) and 10% normal goat serum. Triton 0.25% was added to the medium for the galectin-1 staining. Sections were incubated overnight at 4°C with isotype controls and primary antibodies against EGFR (1/100) (Rat monoclonal anti-EGFR; Abcam) and against Galectin-1 (1/1000) (Rabbit polyconal anti-Galectin-1; Abcam). Primary anti-EGFR antibodies were detected using biotinylated anti-rat secondary antibody and the signal was amplified using streptavidin-FITC (Dako). Primary anti-Galectin-1 antibodies were detected using secondary antibody Oregon green 488 goat anti-rabbit; Life Technologies). Nuclei were counterstained with DAPI (1/1000) (Sigma). Cryosections from five mice of each group were analysed under a fluorescence microscope (Axioscope® 2 optical, Zeiss, Le Pecq, Germany).

2.6 Statistics

All results are represented as the mean ± standard deviation (SD). Survival curves were obtained by a Kaplan-Meier survival rate and tumor volumes were analyzed using two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test, using the software GraphPad Prism 6.2 for Mac. $p<0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results

3.1 Size and zeta potential of siRNA/chitosan-LNCs complexes

Physico-chemical characteristics of siRNA/chitosan-LNCs complexes are summarized in Table 4. After purification by dialysis, size, PDI index and (ζ) potential of anti-EGFR or anti-Galectin-1 siRNA/chitosan-LNCs complexes were about 94 nm, 0.26 and 15 mV respectively. As previously described (Messaoudi et al., submitted), the co-complexation of anti-EGFR and anti-Galectin-1 siRNA on the chitosan-LNCs did not modify the size of nanoparticles but led to a slight decrease of ζ potential (12 mV).

Tableau 4: Physico-chemical characterization of siRNA/chitosan-LNCs complexes (*n*=3)

siRNA/chitosan-LNCs complexes	Size (nm)	PDI	ζ potential (mV)
siRNA negative control	91.2 ± 2.7	0.28	20.0 ± 0.2
Anti-EGFR siRNA	95.1 ± 2.4	0.24	15.2 ± 0.9
Anti-Galectin-1 siRNA	92.9 ± 2.6	0.28	15.9 ± 0.6
Anti-EGFR+Galectin-1 siRNA	94.2 ± 1.5	0.26	12.2 ± 2.6

3.2 Evaluation of orthotopic U87MG-tumor growth profile

To choose the different time schedules for the administration of the combined therapy siRNA + TMZ, the U87MG tumor growth was evaluated by MRI. Using rapid anatomical proton images, tumor volumes were calculated. Figure 13A shows the orthotopic U87MG tumor growth in function of the time. The growth was found to be exponential with a time constant of 2.93 ± 0.77 days. Additionally, all mice of the study (*n*= 158) were imaged at least at day 10 to check the presence and the localization in the right striatum of the U87MG tumor. An example of the localization of the tumor in coronal and longitudinal sections is illustrated in Figure 13B. At day 10, U87MG volume was 0.88 ± 0.11 µL.

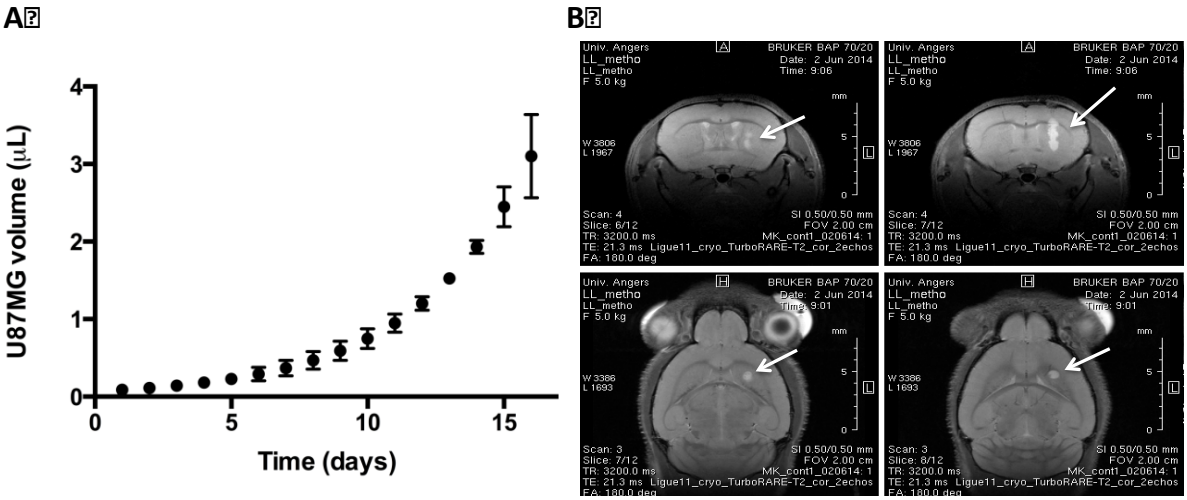

Figure 13: Orthotopic U87MG tumor growth. (A) U87 tumor growth monitored by MRI. Tumor volume was assessed twice a week using a ^{1}H cryoprobe and a rapid acquisition with relaxation enhancement (RARE) sequence (*n*=8). Volumes were calculated from manually drawn ROI. These tumor volume growth curves are then fitted by the method of least squares with an exponential function. (B) T_2-weighted images of U87MG 10 days after implantation. Lighter zones pointed by arrows are U87 tumor localized in the right striatum of mice. Coronal (above) and longitudinal (underneath) sections are illustrated.

3.3 Influence of the time schedule of administration on anti-tumor efficacy of the combined therapy

Survival rates of mice receiving the combined treatment of siRNA/chitosan LNCs and TMZ, at different time after tumor implantation, is illustrated in Figure 14. Figure 14A shows survival rates of mice treated 6 days after tumor implantation with siRNA/chitosan-LNCs + 40 mg/kg of TMZ 1 weekly for 3 weeks. At this dose of TMZ, most of the mice presented of 100% long-term survival, leading to an impossible discrimination between the different groups. Hence, we decided to test longer times after tumor implantation to administer treatment as well as a decreased dose of TMZ. Firstly, we administered treatments 10 days after tumor implantation. This time corresponds to the beginning of the exponential growth of tumors (Figure 13A). Two doses of TMZ were tested: 20 and 40 mg/kg (Figure 14 B and C, respectively). Although all mice died (no 100% long-term survival), no difference between treated groups was observed. Surprisingly, no significant difference was observed in term of survival rates for mice treated with 20 or 40 mg/kg. Anyway, TMZ treatment allows for 1.6-fold enhancement of the mean survival times of treated mice in comparison with untreated mice (32 *versus* ± 51 days). Finally, we administered treatments 14 days after tumor implantation (Figure 14D). At this stage, the tumor growth is very fast (exponential part of the curve). Untreated mice presented a mean survival rate of 32 days. The mean survival times of mice treated with siRNA negative control + TMZ, anti-EGFR siRNA + TMZ or anti-Galectin-1 siRNA + TMZ were 34 days for all the three groups (p>0.05). The mean survival time of mice treated with the combination of the two siRNA + TMZ was significantly enhanced to 39 days (p<0.01).

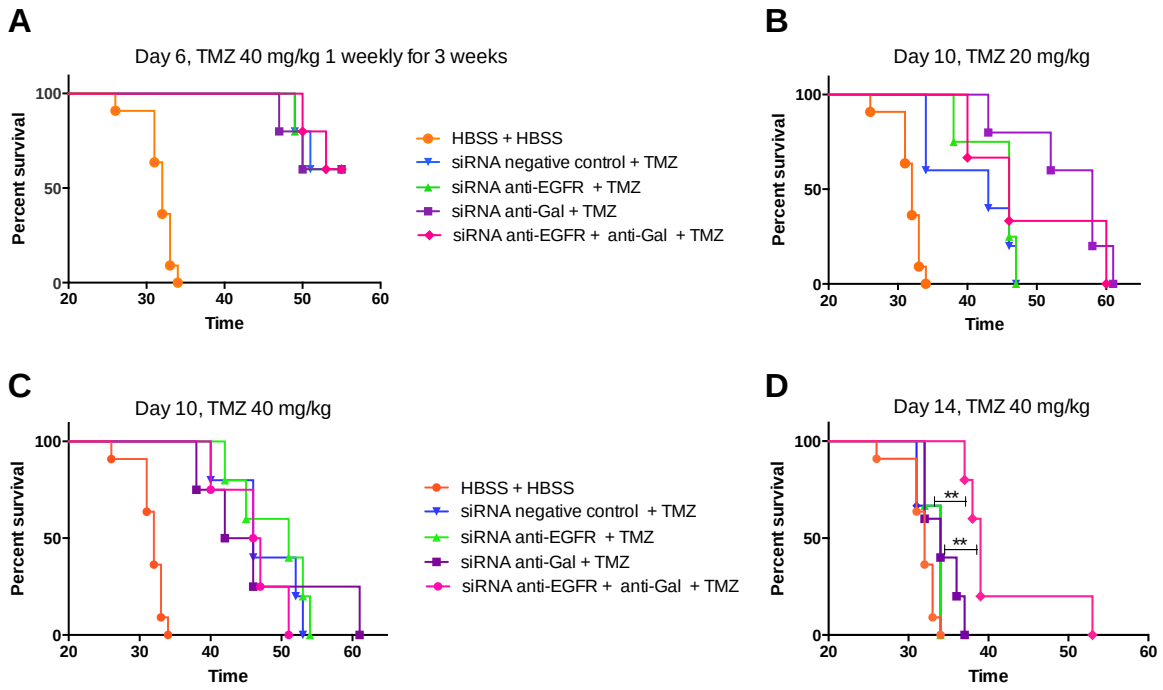

Figure 14: Kaplan-Meier survival rates of U87MG tumor-bearing mice treated with HBSS, siRNA negative control, anti-EGFR siRNA, anti-Galectin-1 siRNA (anti-Gal siRNA) or anti-EGFR + anti-Galectin-1 siRNA administered by CED followed 3 days later by a TMZ treatment administered intraperitonealy. siRNA treatments were administered at different times after the tumor implantation and the TMZ dose varied: (A) 6 days after tumor implantation; TMZ dose of 40 mg/kg 1 weekly for 3 consecutive weeks. (B) 10 days after tumor implantation; TMZ dose of 20 mg/kg. (C) 10 days after tumor implantation; TMZ dose of 40 mg/kg. (D) 14 days after tumor implantation; TMZ dose of 40 mg/kg.

3.4 *In vivo* gene silencing

To further evaluate if the tumor growth inhibition observed upon treatment with anti-EGFR/Galectin-1 siRNA/chitosan LNCs is related to EGFR and Galectin-1 gene silencing of cancer cells, we examined EGFR and Galectin-1 expression at the protein level in excised U87MG tumor tissue, 8 days post-transfection, by immunofluorescence. Anti-EGFR/Galectin-1 siRNA/chitosan LNCs showed significant EGFR (Figure 15) and Galectin-1 (Figure 16) silencing compared to siRNA negative control/chitosan LNCs. The mean fluorescence intensity of the EGFR protein level was significantly decreased when mice were treated with EGFR/Galectin-1 siRNA/chitosan LNCs, when compared to negative control siRNA (260 ± 23 *versus* 343 ± 15 arbitrary unit) (p<0.05) (Figure 15B). In the same way, the mean fluorescence intensity of the Galectin-1 protein level was significantly decreased when mice were treated with EGFR/Galectin-1 siRNA/chitosan LNCs, when compared to negative control siRNA (323 ± 18 *versus* 444 ± 23 arbitrary unit) (p<0.01) (Figure 16B).

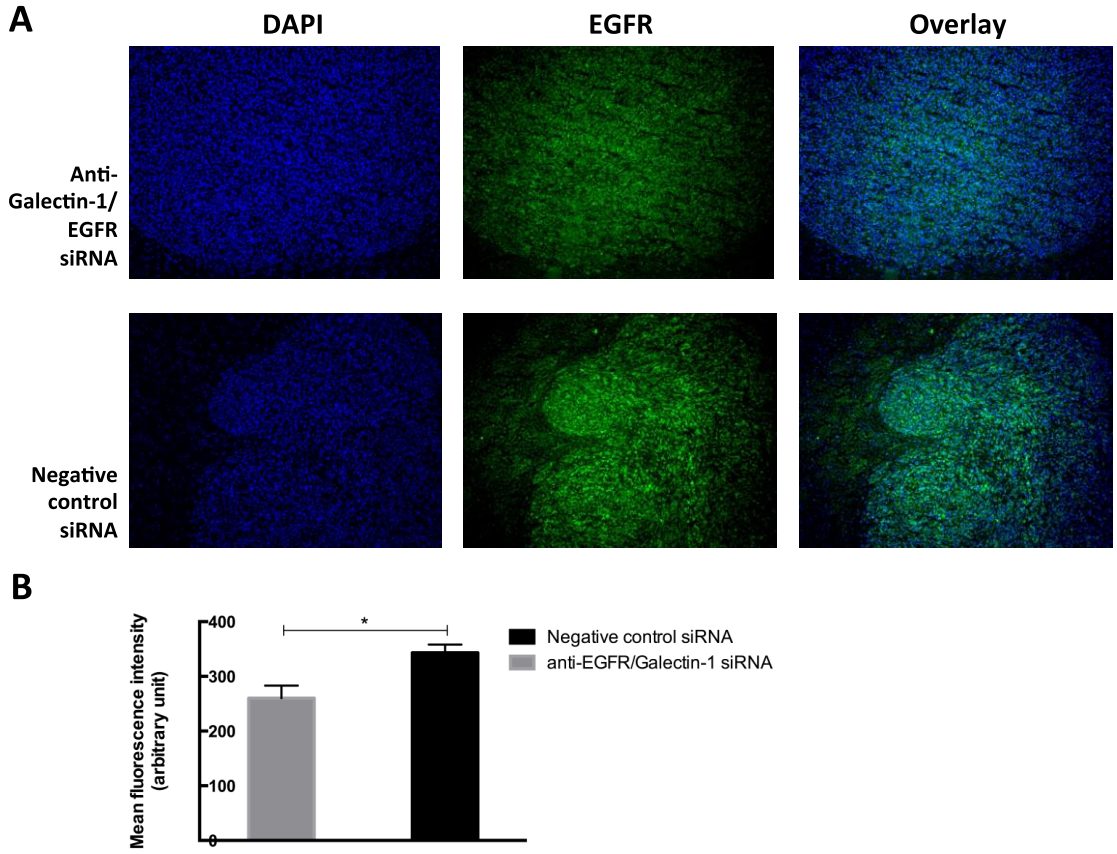

Figure 15: Evaluation by immunofluorescence of EGFR production decrease in U87MG tumor-bearing mice after siRNA treatment (A) Immunofluorescence detection of EGFR expression in U87MG tumor cryosections, 8 days post-transfection, of mice treated with anti-EGFR/Galectin-1 siRNA/chitosan LNCs and negative control siRNA/chitosan LNCs. Green color represents for EGFR binding with streptavidin-FITC-labeled antibody (green) and blue color represents for nuclei stained with DAPI. (B) Quantitative FITC immunofluorescence intensity. Results are expressed as the mean ± SD (n=3). *p<0.05

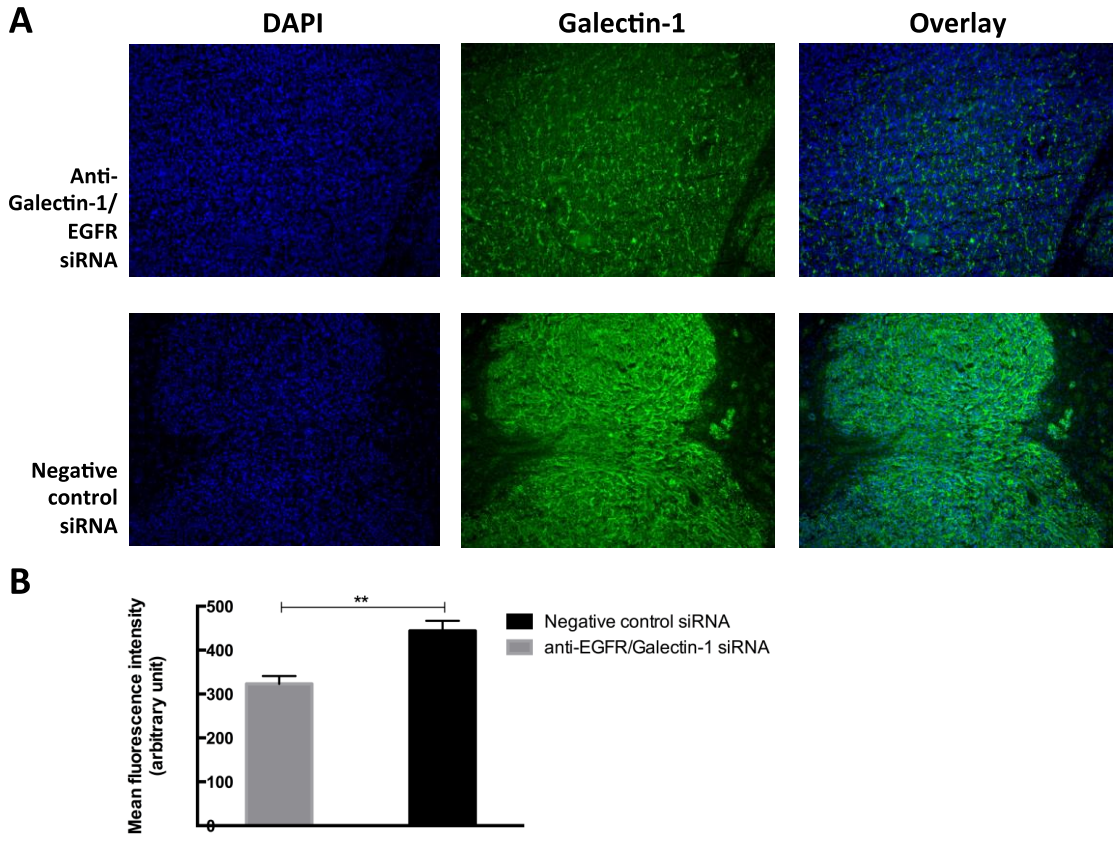

Figure 16: Evaluation by immunofluorescence of Galectin-1 production decrease in U87MG tumor-bearing mice after siRNA treatment (A) Immunofluorescence detection of Galectin-1 expression in U87MG tumor cryosections, 8 days post-transfection, of mice treated with anti-EGFR/Galectin-1 siRNA/chitosan LNCs and negative control siRNA/chitosan LNCs. Green color represents for Galectin-1 binding with Oregon green 488-labeled antibody (green) and blue color represents for nuclei stained with DAPI. (B) Quantitative FITC immunofluorescence intensity. Results are expressed as the mean ± SD (n=3). **p<0.01

4. DISCUSSION

In a previous study, we showed that targeting EGFR and Galectin-1 in U87MG cells by specific siRNAs carried by chitosan-LNCs, led to the significant reduction in cell production of these targeted proteins and increased U87MG sensitivity to TMZ (Messaoudi et al., submitted; Messaoudi et al., 2014). In this study, we wanted to test the effectiveness of this system on a tumor model implanted in the brains of nude mice. One of the limiting factors in the use of therapeutics for brain tumors is the presence of the Blood Brain barrier (BBB) that consists of a layer of tight conjunct endothelial cells and has strong efflux pumps, which actively remove toxic substances from the brain and reduce effective drug penetration (Abbott et al., 2010). Most drugs are inhibited transport to the brain, and even if drug transmission through the BBB is achieved, systemic complications may occur before the required drug concentration within the target brain tumor is obtained (Tsujiuchi et al., 2014). For our current study, we chose intratumoral administration of siRNA/chitosan-LNCs by CED which lead to an administration of drugs on a pressure gradient which allows a homogeneous distribution in the tumor. CED offers advantages in that it targets local areas of the brain, bypasses the blood-brain barrier

(BBB), minimizes systemic toxicity of the therapeutics, and allows for delivery of larger molecules that diffusion driven methods cannot achieve (Tsujiuchi et al., 2014).

In our study, we showed that the concentration of nanocapsules and effective siRNA were the same as those used *in vitro.* Moreover, it was confirmed the effectiveness of the combination of two siRNAs compared to their separately use in terms of increasing the survival of animals (Messaoudi et al., submitted). The results obtained at day 6, confirm that early treatment of tumors can cause healing. However, GBMs represent the most advanced stage and more aggressive gliomas and often their discovery is made when the tumor has reached a size consistent which makes them difficult to treat (Ahmed et al., 2014).

Other studies have shown that the combination of interfering RNA had a beneficial effect in reducing tumor growth. Indeed, *Verreault et al* have shown that targeting of EGFR and m-TOR by shRNA resulted in eradication of tumors implanted in the brains of mice which confirms the effectiveness of this strategy of treating GBM (Verreault et al., 2013). Indeed, GBMs are heterogeneous tumors that can develop resistance to TMZ in as treatments implying that the reduction in the production of a single target can be effective early in treatment and may be insufficient after treatment period. Different studies have used CED for siRNA delivery. For example Kato et al, showed that treatment of brain tumors by TMZ associated with anti-MGMT siRNA carried by LipoTrust increased the survival of mice by 5 weeks compared to mice treated by anti-MGMT siRNA and DMSO (Kato et al., 2010). However, siRNA treatment was carried out continuously at 0.5 ml/h for a week thanks to an osmotic pump and TMZ was injected daily at dose of 50 mg/kg for 5 days (Kato et al., 2010). Continuous treatment with siRNA can cause saturation of the RISC complex that is home to the recognition of target mRNAs by siRNAs (Castanotto et al., 2007).

The EGFR and Galectin-1 knockdown in tumors after siRNA treatment showed that the effect of siRNA *in vivo* extends to a week which confirms the transient nature of their activity (Xue et al., 2014).

LNCs have been loaded with rhenium-188 and administrated by CED in a rat orthotopic glioma model (Vanpouille-Box et al., 2011). The results obtained showed the very promising potential of LNCs in glioma treatment. This allows us to consider a possible combination of the effect of siRNA attached to the surface of LNCs and Rhenium encapsulated in particles for greater efficiency on GBMs.

5. CONCLUSION

EGFR and Galectin-1 targeting by specific siRNAs carried by chitosan-LNCs may represent a promising strategy to induce anti-tumor effects in GBM. The local administration of siRNA allowed their direct delivery to the tumor and prevented the interaction of siRNA/chitosan-LNCs with plasma proteins that can destabilize the complexes, thereby reducing the effectiveness of treatment. Given the simplicity of formation of siRNA/chitosan-LNCs complexes and the homogeneity of siRNAs structure, it is possible with our system to reach any target involved in the resistance of GBMs to anti-cancer drugs particularly TMZ and to adapt treatment to each patient profile.

DISCUSSION GENERALE ET RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Malgré les progrès réalisés dans la prise en charge des GBMs, en termes de diagnostic devenu de plus en plus précoce, associant l'imagerie à la recherche de marqueurs moléculaires, et de traitement avec le développement de la radiothérapie et la chimiothérapie en particulier le TMZ, le pronostic de ces tumeurs reste sévère à l'heure actuelle.

Depuis quelques années, la biologie moléculaire a connu un essor considérable, ce qui a permis un séquençage des gènes et une compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent le développement des tumeurs malignes. Ceci a permis l'émergence des thérapies ciblées qui ont pour objectif de contourner les mécanismes de résistance des cellules tumorales aux thérapies anticancéreuses conventionnelles.

Ces thérapies ciblées ont montré leur efficacité dans le traitement de certains cancers, comme le Cetuximab (Erbitux®) utilisé dans les cancers colorectaux ou le Bevacizumab (Avastin®) utilisé en première ligne dans le traitement des cancers ovariens, des cancers bronchiques non à petites cellules et des cancers du sein. Cependant, l'utilisation de ces thérapies chez les patients atteints de GBMs a montré une efficacité limitée et n'a pas amélioré leur pronostic. Ceci est lié aux mutations génétiques fréquentes dans ces tumeurs qui les rendent hétérogènes et résistantes à ces thérapies ciblées. De plus, la résistance des GBMs est multifactorielle, ce qui implique qu'une monothérapie ne suffira pas à les traiter. L'avènement de la stratégie d'ARNi a ouvert de nouvelles perspectives en permettant la réduction de l'expression de protéines cibles impliquées dans la pathogénie des GBMs en particulier leur résistance aux traitements anticancéreux tels que le TMZ.

Le but de mon travail a été d'utiliser cette stratégie dans le but de réduire l'expression de l'EGFR, la galectine-1 et la MGMT impliquées dans la résistance des cellules tumorales gliales au TMZ.

1. Conception des nanocapsules lipidiques transacylées au chitosan pour le transport des siRNA

1.1. Formulation et caractérisation physicochimique

L'objectif de cette partie du travail était la conception d'un vecteur capable de transporter des siRNA jusqu'à leur site d'action cellulaire. Nous aurions pu choisir une formulation à base d'hexadecyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) ou de stearylamine (SA) qui ont été produites dans notre laboratoire (Ramadan et al., 2011), cependant ces deux cations initialement associés à des formulations orales pouvaient se révéler toxiques par voie IV ou intracérébrale. C'est pourquoi, nous avons préféré utiliser du chitosan connu pour être moins toxique. En effet, connaissant la capacité des polymères cationiques à transporter les acides nucléiques (Hobel and Aigner, 2013; Ragelle et al., 2013; Singha et al., 2011), nous avons voulu au cours de ce travail les associer aux LNCs afin d'obtenir un vecteur cationique qui pourra fixer les siRNA par attraction électrostatique. De nombreux vecteurs dont la surface a été greffée par du chitosan ont été préparés pour transporter des siRNA et ont montré leur efficacité *in vitro* et *in vivo* (de Martimprey et al., 2008; de Martimprey et al., 2010).

Pour notre étude, des LNCs de 50 nm de diamètre hydrodynamique et de potentiel zêta de -6 mV ont donc été préparées. Afin de modifier leur surface et d'obtenir un vecteur cationique de diamètre hydrodynamique inférieur à 100 nm et de potentiel zêta suffisamment positif pour permettre une fixation des siRNA, nous avons opté pour un chitosan de faible poids moléculaire (5KDa) et de degré de déacetylation > 75%. De plus,

l'utilisation de faibles quantités de ces chaines de chitosan de faible poids moléculaire a permis d'éviter les problèmes de solubilité rencontrés avec les chaines de chitosan de haut poids moléculaire (S. Al-Qadi, 2012).

Les rendements de transacylation des formulations préparées sont tous faibles, ce qui montre que le chitosan utilisé dans les formulations n'a pas été greffé entièrement à la surface des LNCs. De plus, ces rendements diminuent avec l'augmentation de la quantité de chitosan ajoutée, ce qui témoigne d'une saturation de la surface des LNCs. D'autre part, au vu des indices de polydispersité obtenus qui sont de l'ordre de 0,23, il paraît évident qu'il y a une hétérogénéité dans la composition du milieu en nanoparticules, ce qui pourrait s'expliquer par une différence dans la quantité de polymère greffée à la surface de chaque nanoparticule. Toutefois, l'augmentation des indices de polydispersité des nanocapsules transacylées reste tout à fait acceptable pour un système nanoparticulaire (PDI < 0,3).
Du point de vu de la stabilité des formulations à +4°C et à 25°C, les deux formulations ayant plus de chitosan (1,8 et 2,4 mg/mL) ont changé d'aspect visuel et leur diamètre hydrodynamique a augmenté de manière importante en quelques jours seulement. Ceci a entrainé leur élimination du reste des essais. En ce qui concerne les deux autres formulations (0,6 et 1,2 mg/mL de chitosan), elles sont stables du point de vue de l'aspect visuel, du diamètre hydrodynamique et du potentiel zêta pendant 1 mois aux deux températures.

Afin d'évaluer la capacité des formulations de LNCs transacylées (avec 0,6 et 1,2 mg/mL de chitosan) à fixer les siRNA à leur surface, nous avons eu recours à la technique d'extinction de fluorescence d'une suspension de siRNA marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le principe de cette technique est basé sur la diminution de l'intensité de fluorescence d'une suspension de fluorophore (FITC fixé à la surface des siRNA) par l'addition d'un désactivateur photochimique appelé quencher (LNCs transacylées). Les résultats obtenus ont montré une diminution de l'intensité de fluorescence des suspensions de siRNA-FITC suite à l'addition de LNCs transacylées au chitosan dans le milieu, ce qui indique une fixation des siRNA à la surface des nanocapsules par attraction électrostatique. Cette chute de fluorescence est liée au fait que l'environnement chimique des sondes fluorescentes change lors de la fixation des siRNA à la surface des LNCs, ce qui réduit leur capacité de fluorescence aux longueurs d'ondes choisies. Les résultats obtenus indiquent également une différence dans la capacité de fixation des siRNA entre les deux types de formulations de chitosan-LNCs testées. En effet, les deux formulations font chuter la fluorescence du milieu sauf que, pour un taux de fixation maximum de siRNA identique, la concentration des LNCs transacylées avec 1,2 mg/mL de chitosan est la moitié de celle des LNCs transacylées avec 0,6 mg/mL de chitosan. Ceci est dû à la différence de potentiel zêta entre les deux formulations. Les LNCs possédant le potentiel zêta le plus élevé sont capables de fixer une quantité plus importante de siRNA. Les LNCs transacylées avec 1,2 mg/mL de chitosan sont, par conséquent, plus efficaces pour fixer les siRNA, c'est pourquoi ce vecteur désigné par « chitosan-LNCs » a été choisi pour le reste des essais.

1.2. Capacité de pénétration cellulaire

Un vecteur doit être capable de traverser la membrane plasmique des cellules pour pouvoir libérer les drogues transportées au niveau du cytoplasme. Afin d'évaluer la capacité des chitosan-LNCs à traverser la membrane

plasmique des cellules U87MG, nous avons préparé des nanoparticules transacylées au chitosan renfermant une sonde fluorescente liposoluble, le 1,1′-Dioctadecyl-3,3,3′,3′-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DID), à la concentration finale de 1 mg par gramme de Labrafac®, l'importance de la stabilité du marquage et donc du choix du bon fluorophore a été précédemment démontré par d'autres membres de notre équipe (Bastiat et al., 2013). Les cellules U87MG ont été traitées avec ces LNCs pendant 6h et 96h à la concentration de 100 µg/mL pour éviter une mortalité cellulaire. Les résultats obtenus ont montré une faible concentration des chitosan-LNCs dans les cellules après 6h d'incubation, alors qu'après 96h d'incubation la concentration des particules dans les cellules est très importante, ce qui indique que ces particules sont capables de traverser la membrane plasmique des cellules U87MG (Figures 17 A et B). Par la suite, une évaluation de la capacité des complexes siRNA/chitosan-LNCs à entrer dans les cellules a été réalisée en utilisant un siRNA anti-EGFR marqué au FITC transporté par des chitosan-LNCs non marquées au DID. Suite à une incubation de 48h, les images obtenues ont montré clairement que les siRNA fluorescents sont rentrés dans la cellule, ce qui témoigne de l'efficacité des chitosan-LNCs dans le transport des siRNA (Figures 18 A et B).

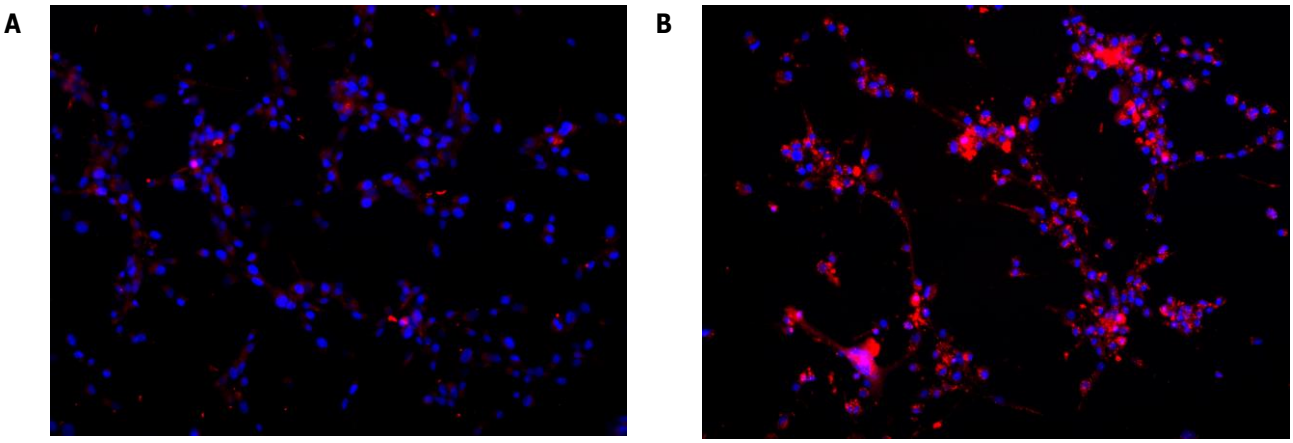

Figure 17: Images en microscopie à fluorescence des cellules U87MG traitées par des chitosan-LNCs-DID pendant 6 h (A) et 96 h (B). Les noyaux cellulaires marqués au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) apparaissent en bleu et les chitosan-LNCs chargées en DID apparaissent en rouge.

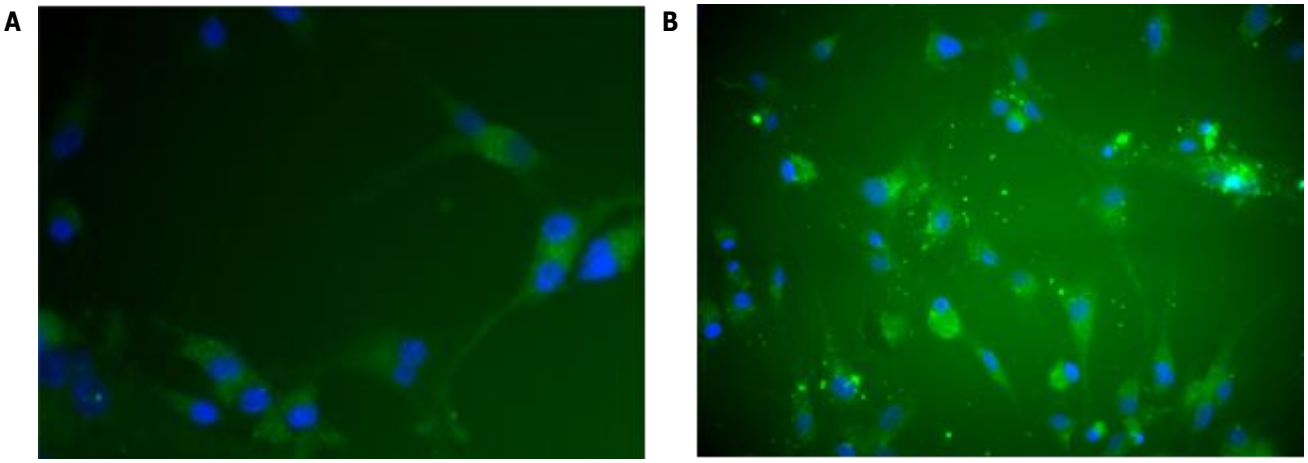

Figure 18: Images en microscopie à fluorescence des cellules U87MG traitées pendant 48 h par des chitosan-LNCs (A) et chitosan-LNCs/siRNA-FITC (B). Les noyaux cellulaires marqués au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) apparaissent en bleu et les siRNA marqués au FITC et transportés par des chitosan-LNCs apparaissent en vert.

L'internalisation des drogues dans les cellules se fait souvent par diffusion passive ou active alors que celle des nano-vecteurs se fait souvent par endocytose (Torchilin, 2006). Deux grands modes d'endocytose ont été décrits. Il s'agit de la phagocytose et de la pinocytose.

La phagocytose concerne les cellules du système immunitaire (macrophages, monocytes, polynucléaires neutrophiles), elle permet d'internaliser et de dégrader des micro-organismes pathogènes et des cellules mortes (Paillard et al., 2010). La pinocytose est un mécanisme d'endocytose réalisé par de nombreuses cellules et regroupe quatre sous-groupes selon les constituants membranaires et les mécanismes impliqués. Il s'agit de la macropinocytose également appelée endocytose en phase fluide (Mercer and Helenius, 2009), la pinocytose clathrines dépendante (Popova et al., 2013), la pinocytose cavéoles dépendante (Nabi and Le, 2003) et la pinocytose indépendante des clathrines et des cavéoles (Frick et al., 2007).

Les mécanismes d'endocytose qui régissent l'internalisation des LNCs ont été étudiés sur les cellules F98 issues de gliome de rat (Paillard et al., 2010). Les résultats obtenus ont montré que, quelle que soit leur taille, ces LNCs sont internalisées selon un mécanisme actif et saturable (Paillard et al., 2010). La voie de l'endocytose semble dépendre de la taille des particules. En effet, les particules de 20 et de 50 nm de diamètre hydrodynamique sont internalisées via un mécanisme d'endocytose clathrines et cavéoles indépendant, alors que les LNCs de 100 nm semblent être internalisées selon un mécanisme plutôt dépendant d'un mécanisme clathrines ou cavéoles dépendant (Paillard et al., 2010).

Dans le cas des chitosan-LNCs, il est évident que les interactions électrostatiques entre les charges positives de ce vecteur et la surface de la membrane plasmique chargée négativement guident l'internalisation de ces particules dans les cellules pour permettre une libération des siRNA (Elouahabi and Ruysschaert, 2005; Rehman et al., 2013). L'internalisation de ce vecteur cationique se fait probablement par endocytose comme les autres nanoparticules. Cependant, les mécanismes d'endocytose dépendent de nombreux facteurs tels que la nature chimique du vecteur (Rehman et al., 2013), sa taille (Rabinovich et al., 2002; Rejman et al., 2006; Rejman et al., 2004), et sa forme (Chithrani et al., 2006), il est donc difficile de prédire le mécanisme d'endocytose emprunté par ces chitosan-LNCs pour entrer dans les cellules.

2. Choix du modèle cellulaire

Un choix pertinent du modèle d'étude est primordial pour se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques et anatomopathologiques. Pour les études *in vitro*, les cellules de GBMs testées peuvent être d'origine animale ou humaine à condition d'exprimer en excès les protéines étudiées. Cependant, pour l'étude *in vivo*, il est impératif de prendre en considération le statut immunitaire de l'animal recevant la greffe. En effet, l'implantation d'une tumeur humaine dans le cerveau d'un animal (souris ou rat) peut entrainer une réaction immunitaire responsable du rejet de la greffe. Ceci implique que, si le choix est porté sur des GBMs humains, un modèle animal immunodéprimé serait nécessaire pour éviter un rejet de la greffe mais, dans ce cas, l'influence des réactions immunitaires induites par la présence d'une tumeur ne pourra pas être étudiée.

De plus, l'implantation des cellules tumorales peut être ectopique (sous-cutanée) ou orthotopique (implantée dans le tissus cible de la tumeur, le cerveau dans notre cas). L'implantation de cellules de GBMs en sous-cutanée est beaucoup plus facile à réaliser qu'une implantation stéréotaxique dans le cerveau des animaux.

Cependant, les cellules tumorales implantées de façon ectopique ne possèdent pas le même environnement que les cellules implantées en intracérébral, ce qui pose la question de l'extrapolation des résultats obtenus sur une tumeur ectopique à une tumeur intracérébrale.

Pour notre étude, nous avons choisi des cellules issues de GBM humain qui expriment en excès les protéines choisies comme cibles. Les cellules U87MG répondent parfaitement à ces deux exigences car elles sont issues de GBM humain et expriment en excès l'EGFR et la galectine-1 (Toussaint et al., 2012; Xing et al., 2013). De plus, ce modèle a été utilisé pour de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, en particulier pour évaluer l'effet des anticancéreux (Dos Santos et al., 2010; Koul et al., 2010; Lal et al., 2009).

Ces cellules ont été cultivées sous atmosphère à 5 % en CO_2 et sous pression normale d'oxygène. La galectine-1 a été décrite comme étant une protéine stimulée par l'hypoxie sur des cellules Hs683 (Le Mercier et al., 2009). Nous avons donc cultivé les U87MG sous hypoxie (0,4 % et 3 % d'O_2) pour évaluer l'expression de la galectine-1. Les résultats n'ont indiqué aucune différence d'expression de la galectine-1 par rapport à la culture en normoxie (21 %), ce qui signifie que la stimulation de la production de cette protéine par l'hypoxie est dépendante du type cellulaire.

Concernant la MGMT, sa production dans ces cellules a été rendue possible grâce à une transfection stable d'un plasmide (pSV2neo) qui porte un gène de résistance à la néomycine (Kaina et al., 1991; Knizhnik et al., 2013). La vérification de la surexpression de ces trois protéines dans ces cellules a été faite par cytométrie de flux.

Nous avons choisi de travailler avec des lignées cellulaires plutôt qu'avec des cultures primaires en raison de la facilité de leur culture et la rapidité de leur prolifération. Les cultures primaires sont des cellules issues d'un organe ou d'un tissu. Il est donc nécessaire de dissocier mécaniquement ou enzymatiquement ces cellules d'intérêt du reste des cellules gênantes. Ces cultures primaires se caractérisent de plus par une sensibilité importante à l'environnement, un nombre limité de passages et des temps de prolifération lents. De plus, pour notre étude, il était nécessaire que ces cultures primaires surexpriment les protéines cibles choisies, ce qui constitue une contrainte supplémentaire à leur utilisation. Enfin, il faut également ajouter que le modèle U87MG est aujourd'hui bien connu et utilisé dans notre laboratoire (Clavreul et al., 2014), utiliser ce type cellulaire permettait aussi de comparer les résultats à ceux précédemment obtenus par d'autres membres de notre équipe.

3. Essais *In vitro*

3.1. Efficacité de transfection des siRNA

Au cours de ce travail, nous avons montré que les chitosan-LNCs étaient capables de transporter les siRNA anti-EGFR, anti-galectine-1 et anti-MGMT à travers la membrane des cellules U87MG pour permettre une action spécifique sur leurs cibles respectives. Cependant, les GBMs sont des tumeurs très agressives qui ont des profils d'expression protéique très hétérogènes et peuvent exprimer en excès différentes protéines et enzymes en même temps. Ceci implique que la stratégie d'inhibition de la production d'une seule cible protéique sera insuffisante pour rendre le profil des cellules tumorales moins agressif. C'est pour cette raison que nous avons combiné ces siRNA (deux par deux ou les trois en même temps) afin de réduire la production de toutes ces

protéines cibles et d'espérer par la suite un meilleur effet du TMZ. L'association des siRNA aux chitosan-LNCs s'est faite en respectant les concentrations efficaces obtenues lors de leur utilisation séparée et surtout en gardant la même concentration en vecteur pour éviter un effet toxique.

Les résultats obtenus ont montré que les associations de siRNA deux par deux avec le vecteur étaient aussi efficaces en terme de réduction des taux de protéines cibles que lors de l'utilisation des siRNA séparément. Cependant, l'association des trois siRNA avec les chitosan-LNCs n'a pas augmenté les taux d'inhibition des protéines cibles par rapport aux autres formulations. Deux éléments pourraient expliquer pourquoi l'association des trois siRNA n'apporte pas d'effet supplémentaire par rapport aux autres associations. Il s'agit de l'intensité de charges positives et la stabilité des complexes siRNA/chitosan-LNCs.

Une différence des potentiels zêtas entre les différentes combinaisons de siRNA/chitosan-LNCs a été observée. En effet, les potentiels zêtas sont positifs mais diminuent avec la quantité de siRNA ajoutée en raison de la neutralisation de plus en plus importante des charges positives du chitosan fixé à la surface des LNCs par les charges négatives des siRNA. Or, l'intensité de charge positive du vecteur (rapport N/P élevé) est un facteur essentiel qui permet une interaction plus efficace du complexe siRNA/vecteur avec la membrane plasmique et une transfection efficace des acides nucléiques (Hattori et al., 2008; Huang et al., 2011).

D'autre part, la stabilité des complexes siRNA/chitosan-LNCs dans le milieu de culture et dans l'eau RNAse free a été évaluée pour avoir une idée de la quantité de siRNA qui reste fixé à la surface des particules. En effet, les siRNA libres ne rentrent pas dans la cellule et donc ne produisent pas d'effet biologique (Joo et al., 2014; Whitehead et al., 2009). Pour cela, des volumes allant de 1 à 6 µL d'une suspension de siRNA marqué au FITC à 1000 µM ont été ajouté à un volume de 100 µL de chitosan-LNCs et complété jusqu'au volume final de 300 µL avec de l'eau RNAse free ou du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) sans sérum de veau fœtal (SVF). Une mesure de fluorescence au Floroskan® aux longueurs d'onde d'excitation de 485 nm et d'émission à 520 nm a été réalisée. Les siRNA-FITC fixés par les chitosan-LNCs ne sont pas fluorescents à cette longueur d'onde, la fluorescence mesurée est donc liée aux siRNA libres dans le milieu. Les résultats obtenus dans l'eau RNAse free ont montré que les complexes siRNA/chitosan-LNCs étaient stables avec un pourcentage de siRNA fixé supérieur à 80 % pour toutes les quantités de siRNA ajoutées dans le milieu (Figure 19). Cependant, dans le DMEM, une augmentation de la fluorescence a été observée proportionnellement à la quantité de siRNA ajoutée, ce qui implique une augmentation de la quantité de siRNA libre dans le milieu (Figure 19).

Les concentrations de siRNA-FITC et de chitosan-LNCs testées pour cette étude de stabilité sont importantes en raison du seuil de détection élevé du Fluoroskan® qui ne permet pas de descendre aux doses utilisées pour la transfection des siRNA *in vitro*. Néanmoins, cet essai peut nous donner une indication de ce qui se produit aux faibles concentrations.

Cette différence de stabilité entre les deux milieux pourrait donc expliquer pourquoi l'association des trois siRNA (anti-EGFR, galectine-1 et MGMT) avec les chitosan-LNCs n'a pas donné une inhibition de la production des protéines cibles supérieure à celle obtenue avec les autres associations de siRNA avec les chitosan-LNCs.

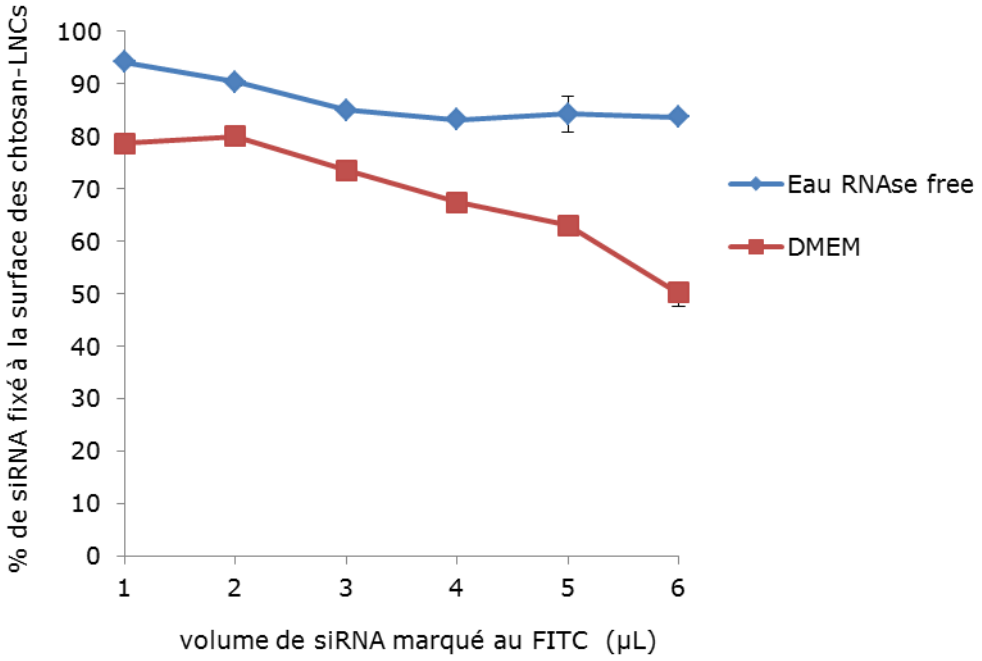

Figure 19: Stabilité des complexes siRNA/chitosan-LNCs dans l'eau RNAse free et le DMEM

3.2. Détermination des doses de TMZ à tester

Afin d'évaluer l'effet du traitement des cellules U87MG par des siRNA transportés par des chitosan-LNCs sur leur sensibilité au TMZ, il était nécessaire de définir des doses de TMZ à tester. Or, dans la littérature, différentes doses et différents temps d'incubation sont décrits (Markiewicz-Zukowska et al., 2013; Rubner et al., 2014). Ceci nous a poussé à choisir les doses à tester en prenant en considération la sensibilité des cellules à différentes doses de TMZ tout en se rapprochant le plus possible des concentrations circulantes chez l'homme. En effet, les concentrations plasmatiques en TMZ chez des patients atteints de gliomes de hauts grades ont été déterminées. La concentration circulante de TMZ augmente proportionnellement à la dose après administration intraveineuse. Pour une dose de 250 mg/m^2 de surface corporelle, la concentration maximale plasmatique est de 10 µg/mL et la concentration au niveau du liquide céphalorachidien (LCR) représente 29 % de la concentration plasmatique (Marzolini et al., 1998). En tenant compte de la sensibilité au TMZ des cellules U87MG, nous avons choisi de nous placer à des concentrations en TMZ comprises entre 0,03 et 0,5 mg/mL.

3.3. Effet du traitement des cellules U87MG par siRNA sur leur sensibilité au TMZ

La stratégie d'interférence ARN a été utilisée par de nombreuses équipes pour potentialiser l'effet des drogues anticancéreuses (Francescone et al., 2012; Schulte et al., 2013). Cette stratégie a été appliquée aux cibles choisies pour notre étude et les résultats obtenus étaient très prometteurs (Le Mercier et al., 2008b; T Kato, 2010; Verreault et al., 2013; Viel et al., 2013; Yoo et al., 2014). Afin de renforcer encore plus l'action du TMZ, nous avons traité les cellules U87MG/MGMT- par l'association des siRNA anti-EGFR et anti-galectine-1 et les

cellules U87MG/MGMT+ par l'association du siRNA anti-MGMT avec le siRNA anti-EGFR ou anti-galectine-1. Ces associations se sont révélées efficaces puisqu'elles ont permis une augmentation de la mortalité de ces cellules suite à leur traitement par TMZ. Cependant, l'association des trois siRNA n'a pas amélioré l'effet du TMZ par rapport aux associations précédentes.

Plusieurs solutions s'offraient alors à nous pour optimiser ces formulations. Nous avons testé ces trois hypothèses mais sans succès :

- La première possibilité consistait à augmenter la concentration de chitosan-LNCs afin d'augmenter l'intensité des charges positives qui se caractérise par un potentiel zêta plus élevé que celui obtenu avec l'association des siRNA avec les chitosan-LNCs à la concentration de 100 µg/mL. Le problème réside dans la toxicité du vecteur qui se manifeste pour des concentrations supérieures à 100 µg/mL. Cette toxicité est liée au chitosan qui, à cause de la présence de charges positives au pH physiologique, va se lier aux constituants chargés négativement tels que les membranes plasmique et mitochondriale et va les déstabiliser et provoquer une mort cellulaire (Qi et al., 2005).
- La deuxième possibilité était de produire trois lots de siRNA/chitosan-LNCs avec chacun des trois siRNA et de les mélanger afin d'obtenir les mêmes concentrations finales en siRNA et en vecteur que celles précédemment utilisées. Les résultats obtenus ont montré que cette stratégie n'était pas efficace ni en terme de réduction des taux de protéines cibles ni en terme de potentialisation de l'effet du TMZ.
- La troisième solution consistait à augmenter la taille des LNCs pour permettre d'avoir une intensité de charges positives supérieure à celle obtenue avec les LNCs de 50 nm transacylées. Des LNCs de 100 nm ont été donc produites par le procédé d'inversion de phase et ont été transacylées au chitosan afin d'obtenir un vecteur cationique de 124 nm et de + 24 mV de PZ. Les résultats obtenus ont été malheureusement moins bons que ceux précédemment obtenus.

3.4. Encapsulation du TMZ

Le TMZ est considéré comme étant l'agent antinéoplasique le plus efficace pour le traitement des GBMs. Cependant, en raison de sa demi-vie plasmatique courte d'environ 1,8 heure, il doit être administré à doses élevées pour atteindre les concentrations thérapeutiques efficaces au niveau du cerveau (Tian et al., 2011). Ceci est à l'origine d'effets secondaires incluant myélosuppression, nausées et vomissements (Trinh et al., 2009). Dans le but d'atteindre les concentrations efficaces au niveau tumoral et de réduire la toxicité et les effets secondaires observés durant la période de traitement par TMZ, la stratégie qui consiste à encapsuler cette drogue dans des nanoparticules a été envisagée par certaines équipes et semble être une bonne solution pour répondre au mieux à ces deux exigences (Huang et al., 2008; Tian et al., 2011).

Nous avons donc souhaité encapsuler cette drogue dans les LNCs mais, comme nous allons le voir par la suite, le traitement par transacylation avait alors un effet délétère sur la stabilité du TMZ encapsulé.

Le TMZ est une drogue peu soluble dans l'eau (Sampson et al., 1999) et peu soluble dans le Labrafac®. De plus, cette drogue se dégrade lors des cycles de chauffage or, avec notre procédé de formulation, la température atteint 85°C. Afin de parvenir à encapsuler le TMZ dans les LNCs, il était nécessaire de baisser la température d'inversion de phase. Pour cela, le Lipoïd S75-3® a été remplacé par du Plurol oléique® qui a l'avantage d'être

liquide à température ambiante, ce qui permet d'avoir une température d'inversion de phase de l'ordre de 40°C (Vonarbourg et al., 2009). Les proportions des différents constituants pour des particules de 50 nm étaient 5,9 % (M/M) Solutol HS15®, 3,9 % (M/M) Plurol oléique®, 1,4 % (M/M) NaCl, 9,9 % (M/M) Labrafac®, 78,9 % (M/M) eau. Ces constituants ont été mis en présence de 8,75 mg de TMZ pour obtenir une concentration finale en TMZ de 0,5 mg/mL.

3.4.1. Analyse de l'encapsulation du TMZ dans les LNCs de plurol

L'analyse de l'intégrité du TMZ et de la stabilité de la formulation ainsi que la détermination du taux d'encapsulation du TMZ dans les nanocapsules ont été réalisés par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Pour cette analyse, la méthode utilisée est celle décrite par Wauthoz *et al* (Wauthoz et al., 2011). Brièvement, la colonne utilisée est une C-18, la phase mobile est constituée d'un mélange eau/acide acétique (0,5 % v/v) - acétonitrile dans des proportions de 90:10 v/v. Le débit de cette phase mobile était de 1 mL/min et la quantification du TMZ a été réalisée à 329 nm.

Le solvant utilisé pour préparer les solutions de TMZ et pour casser les LNCs était le Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) en raison de la solubilité et la stabilité des solutions de TMZ obtenues. De plus, une dilution des suspensions de LNCs au 1/20ème dans ce même solvant permet de les casser pour libérer le TMZ encapsulé.

Afin de doser le TMZ encapsulé dans les LNCs, une centrifugation des échantillons de LNCs chargées en TMZ a été réalisée à 80000 tours/min pendant 1 heure suivie d'une congélation des tubes à -80°C pendant une heure. Ensuite, le surnageant a été récupéré et dilué au 1/20ème dans du DMSO. Le dosage du TMZ dans ce surnageant a permis de déduire la quantité de TMZ encapsulée dans les LNCs et donc de déterminer le rendement d'encapsulation du TMZ.

La zone de linéarité de la gamme d'étalonnage préparée est comprise entre les concentrations de 3,75 et 30 µg/mL de TMZ. La stabilité des solutions de TMZ préparées a été évaluée après 6 jours de conservation à 4°C. Les résultats obtenus ont montré une diminution de 43 % de la quantité de TMZ dans ces solutions.

Après centrifugation et congélation de la suspension de LNCs contenant du TMZ à la concentration de 0,5 mg/mL, la concentration de TMZ contenue dans le surnageant dilué au 1/20ème dans du DMSO était de 12 µg/mL (Figure 20), ce qui correspond à une concentration dans le surnageant de 240 µg/mL. La quantité de TMZ contenue dans les LNCs était donc de 260 µg, elle a été déterminée en déduisant la quantité théorique de TMZ contenue dans 1 mL de formulation de la quantité de TMZ contenue dans 1 mL de surnageant.

Le rendement d'encapsulation du TMZ (RE) dans ces LNCs a été obtenu en appliquant la formule suivante :

$$RE\ (\%) = 100 \times (\text{Quantité de TMZ dans les LNCs} / \text{Quantité totale de TMZ})$$

Après calcul le rendement d'encapsulation du TMZ dans ces particules était de 52 %.

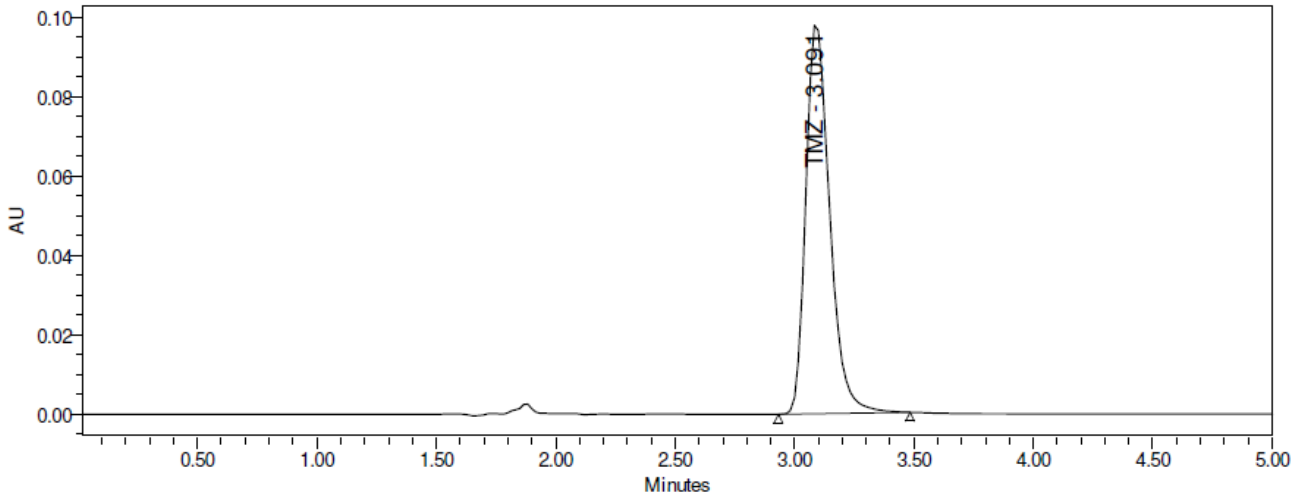

Figure 20: Pic de dosage du TMZ par HPLC, obtenu dans le surnageant de la suspension de LNCs.

3.4.2. Modification de la surface des LNCs de plurol chargées en TMZ par transacyltion

Après avoir vérifié que les LNCs de plurol oléique® pouvaient encapsuler le TMZ, une modification de la surface de ces particules par transacylation au chitosan a été envisagée de la même façon que pour les LNCs de Lipoïd S75-3®. La concentration finale de chitosan dans la formulation était de 1,2 mg/mL et la purification des particules obtenues a été réalisée par dialyse pendant 24 h.

Le diamètre hydrodynamique et le potentiel zêta de ces particules mesurés par diffusion dynamique de la lumière étaient de 71,62 ± 0,61 nm et de 24,66 ± 1,19 mV respectivement, ce qui témoigne de la modification de la surface des LNCs par greffage du chitosan.

L'analyse par HPLC de cette formulation après centrifugation suivie d'une congélation dans les mêmes conditions précédemment décrites a montré qu'il n'y avait pas de pic de TMZ autour de son temps de rétention ce qui témoigne de la dégradation du TMZ suite à la réaction de transacylation. En effet, le TMZ est une prodrogue très sensible au pH alcalin, car il subit une hydrolyse chimique qui donne lieu à d'autres composés (Ramirez et al., 2013). Or, au cours de la réaction de transacylation, le greffage du chitosan à la surface des LNCs nécessite l'utilisation du NaOH 10 N qui engendre donc cette dégradation du TMZ. IL est donc nécessaire d'appliquer des conditions plus douces à ces LNCs pour modifier leur surface. Ces résultats nous ont conduits à réviser, au moins dans un premier temps, notre objectif de produire un même vecteur contenant le TMZ et les siRNA. Nous avons, en effet, préféré avancer dans la preuve de concept *in vitro* puis *in vivo* pour valider la stratégie d'utiliser des siRNA afin de resensibiliser des cellules résistantes (ou moins sensibles) au TMZ. Si cette stratégie s'avère bénéfique, nous pourrons par la suite envisager des modifications des conditions de greffage des siRNA sur les LNCs contenant du TMZ.

4. Essais *in vivo*

Après avoir montré la capacité des chitosan-LNCs à transporter des siRNA et à les délivrer au niveau des cellules U87MG pour les sensibiliser au TMZ, nous avons envisagé de tester ces mêmes formulations sur un modèle de tumeur implantée par stéréotaxie dans le cerveau de souris *Swiss Nude*. L'administration des

complexes chitosan-LNCs/siRNA a été réalisée par Convection Enhanced Delivery (CED). Il était important de pouvoir vérifier sur un modèle animal la persistance des effets observés *in vitro*, car, pour les ARN interférents, la corrélation *vivo*/*vitro* n'est pas toujours évidente (Shim et al., 2013). En effet, dans les essais *in vitro*, les cellules tumorales sont cultivées seules dans un milieu de culture, ce qui ne correspond pas à leur environnement chez le patient (vascularisation, cellules du parenchyme sain, cellules du système immunitaire...). L'efficacité observée *in vitro* n'est pas automatiquement reproductible *in vivo* pour de nombreuses raisons. Lors d'une administration systémique, la distribution des siRNA transportés par des particules dans l'organisme et la dilution causée par le volume plasmatique sont responsables d'une réduction de la quantité de siRNA disponible pour agir au niveau de la tumeur. D'autre part, la reconnaissance par le système immunitaire, l'interaction avec les protéines plasmatiques ainsi que la difficulté à traverser la BHE, dans le cas des tumeurs cérébrales, entrainent également une diminution de leur effet au niveau tumoral par rapport à l'effet obtenu *in vitro*.

4.1. Implantation stéréotaxique des tumeurs

La chirurgie stéréotaxique est une technique qui permet d'implanter avec précision des cellules tumorales dans le cerveau en s'appuyant sur un système de coordonnées en 3 dimensions. Cette technique utilise un équipement appelé cadre de stéréotaxie qui permet de fixer l'animal après son anesthésie pour permettre un repérage de l'endroit où vont être injectées les cellules tumorales (Figure 21). L'injection des cellules tumorales se fait dans le striatum, et les coordonnées précises sont déterminées par rapport à celles du bregma.

Cette implantation intracrânienne de la tumeur permet de se mettre dans les conditions réelles d'une tumeur cérébrale. En effet, les tumeurs cérébrales sont caractérisées par une hypoxie importante (Boer et al., 2014) et par leur localisation dans le cerveau qui les isole du reste des organes contrairement aux tumeurs sous-cutanées très irriguées, donc moins hypoxiques, et non isolées du reste de l'organisme.

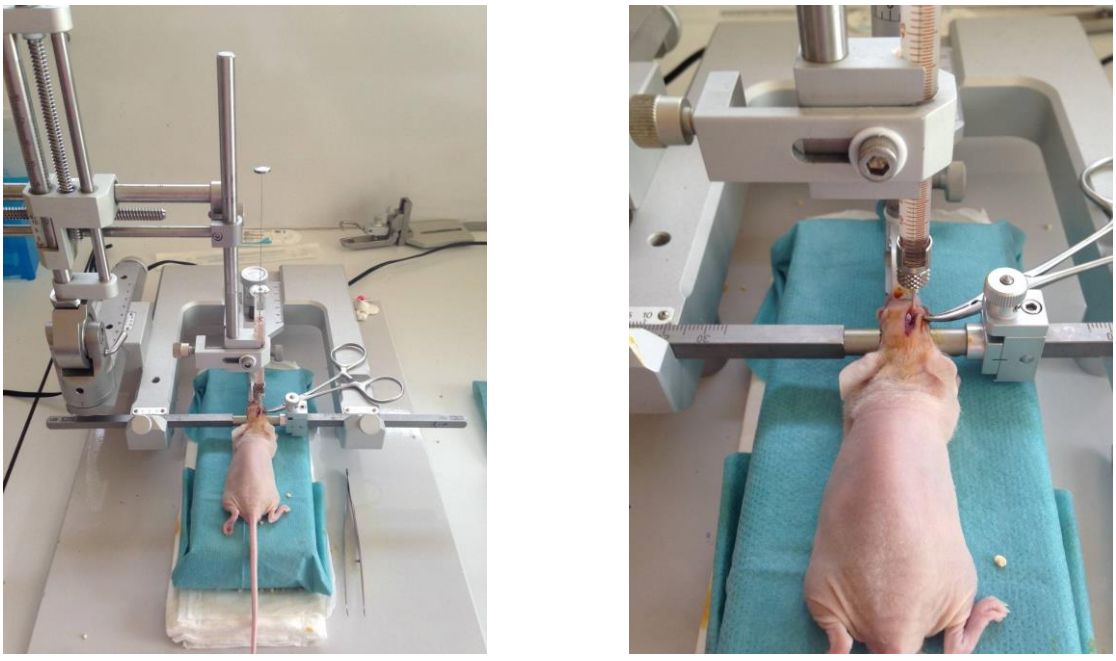

Figure 21: Injection stéréotaxique des cellules tumorales dans le cerveau de souris *Swiss Nude*

4.2. Choix de la voie d'administration des complexes siRNA/ chitosan-LNCs

Le cerveau est isolé du réseau vasculaire qui l'irrigue par une barrière physiologique très sélective nommée barrière hématoencéphalique (BHE) (Abbott et al., 2010). Cette barrière filtre et contrôle le passage des substances contenues dans les vaisseaux sanguins et les empêche de passer librement vers le cerveau et le liquide céphalo-rachidien (Abbott et al., 2010). Cette BHE est constituée de cellules endothéliales jointives et soudées entre elles par des jonctions serrées et ne présente pas de fenestrations comme dans les vaisseaux des autres organes (Abbott et al., 2006). De plus, des péricytes et une membrane basale entourent cet endothélium et contribuent à renforcer cette structure (Abbott et al., 2006). Enfin, cet endothélium est enserré entre les prolongements des astrocytes sur toute sa longueur, assurant à la fois l'isolation et le soutien tant mécanique que métabolique des neurones (Abbott et al., 2006).

Le passage des molécules à travers cette barrière dépend en partie de leurs propriétés physico-chimiques (Abraham, 2004). En effet, certaines substances lipophiles de petite taille traversent la BHE d'une manière passive alors que certaines petites molécules hydrophiles telles que le glucose et les acides aminés arrivent au cerveau via des transporteurs spécifiques identifiés le long de la surface endothéliale des capillaires qui irriguent l'encéphale (Golden and Pollack, 2003; Maher et al., 1994). Les grosses molécules chargées présentes dans la circulation sanguine ne traversent pas cette barrière (Golden and Pollack, 2003). De très nombreuses molécules n'arrivent pas à atteindre le système nerveux en raison de la présence de pompes à efflux dont la plus étudiée est la P-glycoprotéine (P-gp) qui empêche l'accumulation des toxines dans le cerveau en évacuant activement ces molécules vers la circulation, ce qui explique l'échec de certaines chimiothérapies telles que la doxorubicine (Malmo et al., 2013).

Depuis quelques années, de nombreux vecteurs ont été développés dans le but de transporter des drogues anticancéreuses qui ne parviennent pas à atteindre seules des concentrations suffisantes les cellules tumorales gliales (Barbu et al., 2009). De plus, avec l'avènement de la stratégie d'ARNi, il est devenu possible de potentialiser l'effet de ces anticancéreux et de réduire ainsi leur doses efficaces pour une meilleure tolérance (Kim et al., 2011). Cependant, malgré les efforts considérables fournis pour obtenir des vecteurs biocompatibles et non toxiques et les nombreux résultats très prometteurs obtenus *in vitro*, l'administration de ces vecteurs par voie intraveineuse (IV) se solde souvent par une efficacité insuffisante et une toxicité liée à l'augmentation des doses utilisées pour obtenir un meilleur effet, ce qui explique le faible nombre de vecteurs testés en essais cliniques (Bora et al., 2012). L'administration locale de ces vecteurs transportant des siRNA ou des anticancéreux semble être une solution alternative à l'administration IV car elle permet d'éviter le passage de la BHE et permet de mettre ces actifs directement au niveau du parenchyme cérébral (Weiser and Saltzman, 2014). Malgré cela, l'administration locale peut présenter certains inconvénients tels qu'une mauvaise diffusion des particules injectées au niveau de la tumeur (Raghavan et al., 2006; Voges et al., 2003). En effet, la diffusion des agents anticancéreux dans le cerveau à partir de la cavité obtenue lors de la résection de la masse tumorale, se fait sur quelques millimètres, ce qui ne permet pas à ces drogues d'atteindre la zone de récidive qui se situe à environ 2 cm de la cavité tumorale (Bruce et al., 2000).

Afin de résoudre ce problème, une technique relativement nouvelle appelée Convection-Enhanced Delivery (CED) a vu le jour, elle permet d'injecter les thérapeutiques sous un gradient de pression pour une distribution plus homogène au niveau de la tumeur (Bobo et al., 1994; Mehta et al., 2012) (Figure 22).

L'efficacité de la CED dépend notamment du débit d'infusion qui doit être compris pour un modèle murin entre 0,5 et 5 µL/min car un débit trop faible limite l'étendue de la zone de distribution des drogues alors qu'un débit trop élevé favorise le reflux et peut provoquer des lésions tissulaires (Bobo et al., 1994; Chen et al., 1999). Le diamètre de l'aiguille est un autre paramètre qui contrôle la convection. En effet, l'utilisation d'aiguilles de faible diamètre, notamment celles de 32 gauges, permet d'éviter le reflux de la substance et permet d'éviter des lésions tissulaires (Chen et al., 1999).

Pour notre étude, en plus de vouloir éviter l'administration IV pour contourner la BHE, nous avons choisi une administration par voie locale afin d'éviter l'interaction entre les constituants chargés contenus dans le plasma en particulier les protéines et les siRNA fixés à la surface des chitosan-LNCs, ce qui pourrait avoir comme conséquence une réduction de la quantité de siRNA atteignant la tumeur (Molinaro et al., 2013).

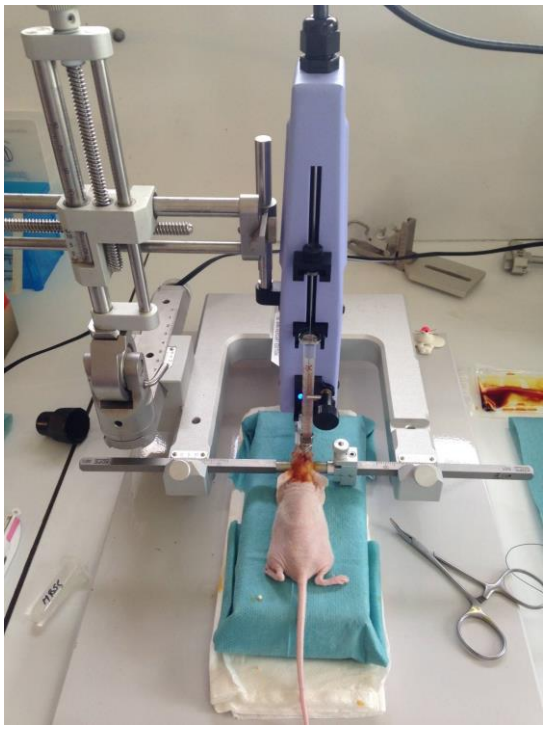

Figure 22: Injection par CED des traitements par siRNA à des souris *Swiss Nude*

4.3. Choix du schéma de traitement

Les posologies de TMZ les plus utilisées dans la littérature sont de 40 ou 50 mg/kg/j. La durée et le rythme d'administrations sont variables selon les études. Les voies d'administrations du TMZ utilisées sont la voie intraveineuse (IV), intrapéritonéale (IP) et la voie orale (gavage). Même si la biodisponibilité du TMZ par voie orale est de 100 %, cette voie présente l'inconvénient d'être difficile à utiliser et présente une variabilité importante par rapport aux deux autres voies d'administration. L'utilisation de la voie IV nécessite une dilatation préalable de la veine caudale des souris et la sollicitation répétée de cette veine cause souvent des

nécroses au niveau de la queue. C'est pour toutes ces raisons que nous avons choisi la voie IP pour notre étude.

En ce qui concerne l'administration des siRNA, il fallait choisir soit de traiter en une seule fois les souris soit de faire des administrations répétées, ce qui nécessitait de mettre en place une sonde pour éviter d'opérer l'animal plusieurs fois. Pour notre travail, nous avons choisi d'injecter les complexes siRNA/chitosan-LNCs dans les tumeurs une seule fois par simplicité, pour faire la preuve de concept. Il est clair qu'une deuxième série d'expérience montrant l'effet des administrations répétées au cours du temps sera à envisager pour être plus proche de ce qui se fait en clinique humaine.

Au cours de ce travail, nous avons d'abord choisi de traiter les souris *Swiss Nude* 6 jours après l'implantation de la tumeur par les complexes siRNA/chitosan-LNCs suivi d'un traitement par TMZ à la posologie de 40 mg/kg aux 9ème, 16ème et 23ème jour après l'implantation de la tumeur. Les résultats obtenus ont montré que tous les groupes ayant reçu le TMZ par voie IP (y compris le groupe traité par siRNA contrôle négatif/chitosan-LNCs et le groupe traité par HBSS) ont doublé leur temps de survie par rapport au groupe contrôle n'ayant reçu que du HBSS. Les images obtenues à l'IRM à différents temps après l'implantation des tumeurs et après traitement par siRNA et TMZ ont montré que la plupart des tumeurs sont devenues indétectables. Ceci indique que le traitement de ces tumeurs a été peut être trop précoce et que, de ce fait, la dose de TMZ utilisée a permis de guérir les souris. Ces résultats sont en accord avec le fait qu'un traitement précoce des tumeurs en général et des gliomes en particulier augmente les chances de guérison des patients (Ahmed et al., 2014).

Afin de tester l'hypothèse d'un effet bénéfique des siRNA dans la sensibilité des tumeurs au TMZ nous avons dû nous placer dans des conditions thérapeutiques moins favorables pour la chimiothérapie (ce qui correspond plus à la réalité clinique où les rechutes sont observées). Nous avons donc opté pour un allongement du temps de pousse tumoral avant traitement. En effet, nous avons laissé pousser la tumeur 10 jours et 14 jours au lieu de 6 jours avant de les traiter. De plus, nous avons choisi de traiter les souris par une seule dose de TMZ (20 et 40 mg/kg pour les souris traitées à J10 et 40 mg/kg pour les souris traitées à J14) au lieu de 3 doses et ce, 3 jours après traitement par siRNA.

Pour des raisons éthiques, dans un premier temps, le nombre de souris par condition a été limité à 5. Les résultats obtenus avec les souris traitées à J10 ne montrent pas une différence significative de la survie animaux traités par siRNA anti-EGFR, anti-galectine-1 ou par l'association des deux siRNA par rapport à ceux traités par le siRNA contrôle négatif. Les résultats après traitement à 14 jours semblent être en faveur d'une augmentation significative de la survie des souris traitées par la combinaison de siRNA anti-EGFR et anti-galectine-1 par rapport aux contrôles (siRNA contrôle négatif/chitosan-LNCs et HBSS) et se révèle plus efficace que les siRNA anti-EGFR et anti-galectine-1 utilisés séparément.

Ces résultats indiquent l'effet bénéfique de l'association à 14 jours de la combinaison des siRNA anti-EGFR et anti-galectine-1 avec le TMZ, conduisant à l'augmentation de la survie des animaux, ce qui est prometteur pour la suite des essais.

Les images d'immunofluorescence des coupes histologiques obtenues à partir des cerveaux de souris 8 jours après traitement par siRNA ont montré que l'effet sur les protéines cibles (EGFR et galectine-1) était persistant.

Ceci est en accord avec les données de la littérature qui témoignent du caractère transitoire de l'effet obtenu avec les siRNA (3 jours à une semaine environ) (Raemdonck et al., 2008). Ceci est dû à leur biodégradabilité et leur dilution au cours des divisons cellulaires, ce qui nécessite, pour les pathologies chroniques telles que les tumeurs, des administrations répétées avec un risque de toxicité liée à l'accumulation du vecteur et des siRNA dans la tumeur (Raemdonck et al., 2008; Xue et al., 2014). C'est pourquoi il est nécessaire de choisir des vecteurs les plus biocompatibles possibles et prévoir une évaluation de la tolérance suite à des administrations chroniques.

La CED a été aussi utilisée pour administrer des LNCs chargées en rhénium-188 dans le cerveau de rats, ce qui a augmenté la survie de ces animaux (Vanpouille-Box et al., 2011). Ceci prouve que ces particules sont parfaitement adaptées à ce mode d'administration et qu'il est possible d'envisager de co-administrer le rhénium et les siRNA après modification de la surface de ces LNCs pour un effet plus important sur les tumeurs.

Cette technique d'administration permet également de concentrer les particules et les siRNA au sein du foyer tumoral ce qui entraine leur reconnaissance par les TLRs (Xue et al., 2014; Zolnik et al., 2010). Ceci entraine une sécrétion par les cellules microgliales de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β, IL-6) conduisant au recrutement des macrophages et des lymphocytes au niveau du foyer tumoral (Xue et al., 2014; Zolnik et al., 2010). Cette stimulation du système immunitaire peut être exploitée comme moyen de thérapie additionnel qui permet à l'organisme de lutter contre les cellules cancéreuses qui échappent souvent par divers mécanismes à la reconnaissance par le système immunitaire. Malheureusement, pour privilégier l'utilisation de cellules tumorales humaines, notre étude a été réalisée sur un modèle de souris immunodéprimées ne permettant pas d'évaluer la capacité des complexes siRNA/chitosan-LNCs à provoquer une stimulation du système immunitaire et d'estimer ainsi l'intensité de cet effet.

La CED a été aussi utilisée en clinique pour délivrer différentes drogues dans le cerveau de patients atteints de gliomes malins et de maladies neurodégénératives (Bidros et al., 2010). Le reflux des solutés à administrer à travers le cathéter est l'une des difficultés observées avec cette technique. D'autre part, la complexité et l'hétérogénéité des tumeurs cérébrales ainsi que l'effet de la chirurgie et de l'œdème causent une distribution inégale et imprédictible des drogues ainsi que leur fuite vers l'espace sous-arachnoïdien. L'encapsulation des molécules actives dans des vecteurs ainsi que le développement de nouvelles techniques d'images en temps réel pour suivre et évaluer l'étendue de la distribution de ces drogues dans le tissu tumoral sont nécessaires pour améliorer l'efficacité de cette stratégie et réduire ses effets secondaires (Bidros et al., 2010).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a porté sur la formulation d'un vecteur cationique capable de transporter des siRNA jusqu'à leur site d'action cellulaire pour réduire l'expression de trois protéines cibles impliquées dans la résistance des cellules tumorales gliales au TMZ.

La première partie de ce travail a consisté à produire des nanocapsules lipidiques transacylées au chitosan afin de permettre une fixation des siRNA à leur surface par simple attraction électrostatique. Au cours de cette partie, nous avons montré que ces particules cationiques étaient stables 1 mois à 4°C et à 25°C et qu'elles étaient capables de fixer les siRNA à leur surface par attraction électrostatique. De plus, le ciblage de l'EGFR impliqué dans la résistance des cellules tumorales au TMZ par un siRNA spécifique transporté par ces particules dans les cellules U87MG a réduit la production de l'EGFR. Ceci témoigne de la capacité de ce vecteur à transporter ces siRNA jusqu'à leur cible située dans le cytoplasme cellulaire. Cette réduction de la production de l'EGFR s'est avérée bénéfique puisque les cellules U87MG sont devenues plus sensibles au TMZ suite à leur traitement par siRNA.

La deuxième partie de ce travail de thèse a été consacrée à la combinaison des effets des siRNA anti-EGFR, anti-galectine-1 et anti-MGMT pour réduire la production de leur protéine cible respective et augmenter ainsi l'effet du TMZ par rapport à leur utilisation séparée. Nous avons montré qu'il était possible de réduire la production de ces protéines cibles par l'association des siRNA deux à deux ou tous les trois avec la même quantité de particules, ce qui avait pour avantage d'éviter toute toxicité additionnelle liée au vecteur. De plus, nous avons montré que l'association de deux siRNA augmentait significativement la sensibilité des cellules U87MG au TMZ par rapport à l'utilisation d'un seul de ces siRNA. Cependant, l'association des trois siRNA n'a pas amélioré l'effet par rapport à l'utilisation de deux siRNA ensemble.

La dernière partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation *in vivo* de l'effet obtenu par l'administration locale par CED de ces traitements par siRNA sur l'augmentation de la sensibilité au TMZ des cellules tumorales implantées dans le cerveau de souris. Pour cela, la survie des animaux a été étudiée. Nous avons réussi à faire une preuve de notre concept avec les cellules U87MG/MGMT- et les siRNA anti-EGFR et anti-galectine-1 et à confirmer l'efficacité de l'association des deux siRNA avec les chitosan-LNCs par rapport aux autres traitements par siRNA. Il sera nécessaire d'évaluer cette stratégie *in vivo* sur la lignée U87MG qui exprime la MGMT afin de confirmer l'effet bénéfique de la combinaison des siRNA sur la survie des animaux. Bien que les GBMs soient des tumeurs très difficiles à traiter du fait de leur hétérogénéité et de leur microenvironnement particulier et complexe, nous pensons néanmoins que ce travail ouvre de belles perspectives pour améliorer le traitement de ces cancers qui restent incurables à l'heure actuelle.

Il est évident que le traitement des animaux par une administration unique de siRNA ne peut pas entrainer une guérison complète d'une tumeur aussi agressive que le GBM car l'effet des siRNA s'estompe après quelques jours. C'est pour cela que des administrations répétées doivent être envisagées afin d'éviter les récidives qui sont souvent la cause de l'échec du traitement dans les GBMs.

Le ciblage *in vitro* de la MGMT, l'EGFR et de la galectine-1 en même temps n'a pas abouti aux résultats attendus, c'est pour cela qu'une autre méthode devrait être appliquée pour obtenir un meilleur effet. Un traitement en séquentiel pourrait être envisagé mais nécessite de laisser un temps suffisant entre les traitements pour éviter une toxicité liée au vecteur.

L'encapsulation du TMZ dans les LNCs permettra de co-délivrer cet anticancéreux et les siRNA pour un effet synergique. En raison de la sensibilité du TMZ au pH alcalin nécessaire à la réaction de transacylation, une autre méthode de greffage de polymère réalisée dans des conditions de pH neutre telle que la post-insertion de lipochitosan permettrait de préserver l'intégrité du TMZ.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la mise en place d'une thérapie personnalisée basée sur la détermination préalable du profil d'expression génique de chaque tumeur avant de mettre en route un traitement par siRNA. Le but est d'adapter le traitement par siRNA à chaque patient pour une meilleure réponse au TMZ. En effet, tous les patients ne sont pas bons répondeurs au TMZ, ce qui implique qu'une thérapie standard ne sera pas adaptée à tous. De plus, chez certains patients qui répondaient bien au début du traitement, une résistance au TMZ est apparue, ce qui implique que le profil génétique d'une tumeur peut changer au cours du traitement (Yip et al., 2009). Il est donc nécessaire de déterminer le profil d'expression des tumeurs à différents moments afin de détecter ces anomalies qui apparaissent au cours du traitement. D'autre part, un dosage des protéines ou des ARNm produits en excès et impliqués dans cette résistance doit être réalisé pour adapter la dose d'ARN interférents à utiliser car les taux de production varient d'une tumeur à une autre (Esteller et al., 2000).

Avec notre système de vectorisation, il est possible de fixer tout type de siRNA à sa surface car la structure de ces acides nucléiques est homogène, ce qui permet d'atteindre toute cible impliquée dans la résistance au TMZ. De plus, en raison de la facilité de production et de purification de ce vecteur, il est possible d'envisager une production à grande échelle, d'autant plus que des travaux antérieurs de notre unité ont montré qu'il était possible de produire des lots précliniques de LNCs, ce qui constitue un atout considérable pour une future utilisation en clinique (Thomas and Lagarce, 2013). En effet, pour une utilisation en clinique, un vecteur doit répondre à des exigences notamment en termes de sécurité des matériaux utilisés comme excipients pharmaceutiques, d'efficacité de transport des drogues et des acides nucléiques et de capacité de production à grande échelle (Sun et al., 2012). Ceci explique pourquoi seul un faible nombre de vecteurs atteint le stade clinique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Aagaard, L., and Rossi, J.J. (2007). RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. Adv Drug Deliv Rev *59*, 75-86.

Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiology of disease *37*, 13-25.

Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nature reviews. Neuroscience *7*, 41-53.

Abraham, M.H. (2004). The factors that influence permeation across the blood-brain barrier. European journal of medicinal chemistry *39*, 235-240.

Ahmed, R., Oborski, M.J., Hwang, M., Lieberman, F.S., and Mountz, J.M. (2014). Malignant gliomas: current perspectives in diagnosis, treatment, and early response assessment using advanced quantitative imaging methods. Cancer management and research *6*, 149-170.

Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. DNA Repair (Amst) *6*, 695-711.

Anton, N., Gayet, P., Benoit, J.P., and Saulnier, P. (2007a). Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. Int J Pharm *344*, 44-52.

Anton, N., Saulnier, P., Beduneau, A., and Benoit, J.P. (2007b). Salting-out effect induced by temperature cycling on a water/nonionic surfactant/oil system. The journal of physical chemistry. B *111*, 3651-3657.

Babashah, S., and Soleimani, M. (2011). The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis. Eur J Cancer *47*, 1127-1137.

Barbu, E., Molnar, E., Tsibouklis, J., and Gorecki, D.C. (2009). The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. Expert opinion on drug delivery *6*, 553-565.

Bastiat, G., Pritz, C.O., Roider, C., Fouchet, F., Lignieres, E., Jesacher, A., Glueckert, R., Ritsch-Marte, M., Schrott-Fischer, A., Saulnier, P.*, et al.* (2013). A new tool to ensure the fluorescent dye labeling stability of nanocarriers: a real challenge for fluorescence imaging. J Control Release *170*, 334-342.

Beduneau, A., Saulnier, P., Anton, N., Hindre, F., Passirani, C., Rajerison, H., Noiret, N., and Benoit, J.P. (2006). Pegylated nanocapsules produced by an organic solvent-free method: Evaluation of their stealth properties. Pharm Res *23*, 2190-2199.

Bernardi, A., Braganhol, E., Jager, E., Figueiro, F., Edelweiss, M.I., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., and Battastini, A.M. (2009). Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. Cancer letters *281*, 53-63.

Bhakat, K.K., and Mitra, S. (2003). CpG methylation-dependent repression of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene linked to chromatin structure alteration. Carcinogenesis *24*, 1337-1345.

Bidros, D.S., Liu, J.K., and Vogelbaum, M.A. (2010). Future of convection-enhanced delivery in the treatment of brain tumors. Future oncology *6*, 117-125.

Bignami, M., Casorelli, I., and Karran, P. (2003). Mismatch repair and response to DNA-damaging antitumour therapies. Eur J Cancer *39*, 2142-2149.

Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J.*, et al.* (2006). 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. Nature methods *3*, 199-204.

Blough, M.D., Beauchamp, D.C., Westgate, M.R., Kelly, J.J., and Cairncross, J.G. (2011). Effect of aberrant p53 function on temozolomide sensitivity of glioma cell lines and brain tumor initiating cells from glioblastoma. Journal of neuro-oncology *102*, 1-7.

Bobo, R.H., Laske, D.W., Akbasak, A., Morrison, P.F., Dedrick, R.L., and Oldfield, E.H. (1994). Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 2076-2080.

Bock, H.C., Puchner, M.J., Lohmann, F., Schutze, M., Koll, S., Ketter, R., Buchalla, R., Rainov, N., Kantelhardt, S.R., Rohde, V.*, et al.* (2010). First-line treatment of malignant glioma with carmustine implants followed by concomitant radiochemotherapy: a multicenter experience. Neurosurgical review *33*, 441-449.

Boer, J.C., Walenkamp, A.M., and Dunnen, W.F. (2014). Recruitment of bone marrow derived cells during anti-angiogenic therapy in GBM: The potential of combination strategies. Critical reviews in oncology/hematology.

Bora, R.S., Gupta, D., Mukkur, T.K., and Saini, K.S. (2012). RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities (review). Molecular medicine reports *6*, 9-15.

Brandes, A.A., Franceschi, E., Tosoni, A., Hegi, M.E., and Stupp, R. (2008). Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. Clin Cancer Res *14*, 957-960.

Brown, P.D., Krishnan, S., Sarkaria, J.N., Wu, W., Jaeckle, K.A., Uhm, J.H., Geoffroy, F.J., Arusell, R., Kitange, G., Jenkins, R.B.*, et al.* (2008). Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. J Clin Oncol *26*, 5603-5609.

Bruce, J.N., Falavigna, A., Johnson, J.P., Hall, J.S., Birch, B.D., Yoon, J.T., Wu, E.X., Fine, R.L., and Parsa, A.T. (2000). Intracerebral clysis in a rat glioma model. Neurosurgery *46*, 683-691.

Camby, I., Belot, N., Lefranc, F., Sadeghi, N., de Launoit, Y., Kaltner, H., Musette, S., Darro, F., Danguy, A., Salmon, I.*, et al.* (2002). Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration into the brain through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. J Neuropathol Exp Neurol *61*, 585-596.

Camby, I., Decaestecker, C., Lefranc, F., Kaltner, H., Gabius, H.J., and Kiss, R. (2005). Galectin-1 knocking down in human U87 glioblastoma cells alters their gene expression pattern. Biochem Biophys Res Commun *335*, 27-35.

Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., and Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. Glycobiology *16*, 137R-157R.

Castanotto, D., Sakurai, K., Lingeman, R., Li, H., Shively, L., Aagaard, L., Soifer, H., Gatignol, A., Riggs, A., and Rossi, J.J. (2007). Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. Nucleic Acids Res *35*, 5154-5164.

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.*, et al.* (2013). RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. International journal of radiation oncology, biology, physics *85*, 1206-1211.

Chen, H., Shen, X., Guo, C., Zhu, H., Zhou, L., Zhu, Y., Wang, H., Zheng, Y., and Huang, L. (2010). Phosphatase and tensin homolog reconstruction and vascular endothelial growth factor knockdown synergistically inhibit the growth of glioblastoma. Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals *25*, 713-721.

Chen, M.Y., Lonser, R.R., Morrison, P.F., Governale, L.S., and Oldfield, E.H. (1999). Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. Journal of neurosurgery *90*, 315-320.

Chinot, O.L., de La Motte Rouge, T., Moore, N., Zeaiter, A., Das, A., Phillips, H., Modrusan, Z., and Cloughesy, T. (2011). AVAglio: Phase 3 trial of bevacizumab plus temozolomide and radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma multiforme. Advances in therapy *28*, 334-340.

Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D.*, et al.* (2014). Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med *370*, 709-722.

Chithrani, B.D., Ghazani, A.A., and Chan, W.C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Nano letters *6*, 662-668.

Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., and Kaina, B. (2003). Mechanisms of human DNA repair: an update. Toxicology *193*, 3-34.

Clavreul, A., Guette, C., Faguer, R., Tetaud, C., Boissard, A., Lemaire, L., Rousseau, A., Avril, T., Henry, C., Coqueret, O.*, et al.* (2014). Glioblastoma-associated stromal cells (GASCs) from histologically normal surgical margins have a myofibroblast phenotype and angiogenic properties. The Journal of pathology *233*, 74-88.

Cohen, M.H., Shen, Y.L., Keegan, P., and Pazdur, R. (2009). FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. Oncologist *14*, 1131-1138.

Combs, S.E., Heeger, S., Haselmann, R., Edler, L., Debus, J., and Schulz-Ertner, D. (2006). Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol. BMC cancer *6*, 133.

Coutte, L., Dreyer, C., Sablin, M.P., Faivre, S., and Raymond, E. (2012). [PI3K-AKT-mTOR pathway and cancer]. Bull Cancer *99*, 173-180.

David, S., Resnier, P., Guillot, A., Pitard, B., Benoit, J.P., and Passirani, C. (2012). siRNA LNCs--a novel platform of lipid nanocapsules for systemic siRNA administration. Eur J Pharm Biopharm *81*, 448-452.

de Martimprey, H., Bertrand, J.R., Fusco, A., Santoro, M., Couvreur, P., Vauthier, C., and Malvy, C. (2008). siRNA nanoformulation against the ret/PTC1 junction oncogene is efficient in an in vivo model of papillary thyroid carcinoma. Nucleic Acids Res *36*, e2.

de Martimprey, H., Bertrand, J.R., Malvy, C., Couvreur, P., and Vauthier, C. (2010). New core-shell nanoparticules for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma. Pharm Res *27*, 498-509.

Deng, Y., Wang, C.C., Choy, K.W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., Li, L., Chung, T.K., and Tang, T. (2014). Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. Gene *538*, 217-227.

Denny, B.J., Wheelhouse, R.T., Stevens, M.F., Tsang, L.L., and Slack, J.A. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. Biochemistry *33*, 9045-9051.

Dos Santos, C., Karaky, R., Renoir, D., Hamma-Kourbali, Y., Albanese, P., Gobbo, E., Griscelli, F., Opolon, P., Dalle, S., Perricaudet, M.*, et al.* (2010). Antitumorigenic effects of a mutant of the heparin affin regulatory peptide on the U87 MG glioblastoma cell line. International journal of cancer. Journal international du cancer *127*, 1038-1051.

Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbo, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. DNA Repair (Amst) *3*, 1389-1407.

Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F., and Collins, V.P. (1991). Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. Cancer Res *51*, 2164-2172.

Ekstrand, A.J., Sugawa, N., James, C.D., and Collins, V.P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 4309-4313.

Elmen, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Orum, H., Koch, T.*, et al.* (2005). Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. Nucleic Acids Res *33*, 439-447.

Elouahabi, A., and Ruysschaert, J.M. (2005). Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *11*, 336-347.

Elsabahy, M., and Wooley, K.L. (2012). Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. Chemical Society reviews *41*, 2545-2561.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N Engl J Med *343*, 1350-1354.

Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov *3*, 391-400.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature *391*, 806-811.

Francescone, R., Scully, S., Bentley, B., Yan, W., Taylor, S.L., Oh, D., Moral, L., and Shao, R. (2012). Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. J Biol Chem *287*, 24821-24831.

Frick, M., Bright, N.A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., and Nichols, B.J. (2007). Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. Current biology : CB *17*, 1151-1156.

Fridman, J.S., and Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. Oncogene *22*, 9030-9040.

Friedman, H.S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. Clin Cancer Res *6*, 2585-2597.

Fukukawa, K., Rossin, R., Hagooly, A., Pressly, E.D., Hunt, J.N., Messmore, B.W., Wooley, K.L., Welch, M.J., and Hawker, C.J. (2008). Synthesis and characterization of core-shell star copolymers for in vivo PET imaging applications. Biomacromolecules *9*, 1329-1339.

Gan, H.K., Kaye, A.H., and Luwor, R.B. (2009). The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia *16*, 748-754.

Gavrilov, K., and Saltzman, W.M. (2012). Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. The Yale journal of biology and medicine *85*, 187-200.

Georgescu, M.M. (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. Genes & cancer *1*, 1170-1177.

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.*, et al.* (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. N Engl J Med *370*, 699-708.

Golden, P.L., and Pollack, G.M. (2003). Blood-brain barrier efflux transport. Journal of pharmaceutical sciences *92*, 1739-1753.

Gottesman, M.M., Fojo, T., and Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nature reviews. Cancer *2*, 48-58.

Grzelinski, M., Urban-Klein, B., Martens, T., Lamszus, K., Bakowsky, U., Hobel, S., Czubayko, F., and Aigner, A. (2006). RNA interference-mediated gene silencing of pleiotrophin through polyethylenimine-complexed small interfering RNAs in vivo exerts antitumoral effects in glioblastoma xenografts. Human gene therapy *17*, 751-766.

Guo, D., Wang, B., Han, F., and Lei, T. (2010). RNA interference therapy for glioblastoma. Expert Opin Biol Ther *10*, 927-936.

Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K.*, et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest *118*, 3132-3142.

Han, L., Zhang, A.L., Xu, P., Yue, X., Yang, Y., Wang, G.X., Jia, Z.F., Pu, P.Y., and Kang, C.S. (2010). Combination gene therapy with PTEN and EGFR siRNA suppresses U251 malignant glioma cell growth in vitro and in vivo. Med Oncol *27*, 843-852.

Hansen, W.K., and Kelley, M.R. (2000). Review of mammalian DNA repair and translational implications. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics *295*, 1-9.

Hartmann, C., Hentschel, B., Simon, M., Westphal, M., Schackert, G., Tonn, J.C., Loeffler, M., Reifenberger, G., Pietsch, T., von Deimling, A.*, et al.* (2013). Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. Clin Cancer Res *19*, 5146-5157.

Hatanpaa, K.J., Burma, S., Zhao, D., and Habib, A.A. (2010). Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. Neoplasia *12*, 675-684.

Hattori, Y., Yoshizawa, T., Koga, K., and Maitani, Y. (2008). NaCl induced high cationic hydroxyethylated cholesterol-based nanoparticle-mediated synthetic small interfering RNA transfer into prostate carcinoma PC-3 cells. Biological & pharmaceutical bulletin *31*, 2294-2301.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., and Benoit, J.P. (2002a). A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. Pharm Res *19*, 875-880.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., and Benoit, J.P. (2002b). Properties of polyethylene glycol 660 12-hydroxy stearate at a triglyceride/water interface. Int J Pharm *242*, 167-170.

Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., and Benoit, J.P. (2003). Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. Biomaterials *24*, 4283-4300.

Hobel, S., and Aigner, A. (2013). Polyethylenimines for siRNA and miRNA delivery in vivo. Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology *5*, 484-501.

Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature *411*, 366-374.

Hornung, V., Guenthner-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A.*, et al.* (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. Nat Med *11*, 263-270.

Huang, G., Zhang, N., Bi, X., and Dou, M. (2008). Solid lipid nanoparticles of temozolomide: potential reduction of cardial and nephric toxicity. Int J Pharm *355*, 314-320.

Huang, H.Y., Kuo, W.T., Chou, M.J., and Huang, Y.Y. (2011). Co-delivery of anti-vascular endothelial growth factor siRNA and doxorubicin by multifunctional polymeric micelle for tumor growth suppression. J Biomed Mater Res A *97*, 330-338.

Hureaux, J., Lagarce, F., Gagnadoux, F., Rousselet, M.C., Moal, V., Urban, T., and Benoit, J.P. (2010). Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice. Pharm Res *27*, 421-430.

Hureaux, J., Lagarce, F., Gagnadoux, F., Vecellio, L., Clavreul, A., Roger, E., Kempf, M., Racineux, J.L., Diot, P., Benoit, J.P.*, et al.* (2009). Lipid nanocapsules: ready-to-use nanovectors for the aerosol delivery of paclitaxel. Eur J Pharm Biopharm *73*, 239-246.

Ichimura, K., Pearson, D.M., Kocialkowski, S., Backlund, L.M., Chan, R., Jones, D.T., and Collins, V.P. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. Neuro Oncol *11*, 341-347.

Ishida, T., Harashima, H., and Kiwada, H. (2002). Liposome clearance. Bioscience reports *22*, 197-224.

Jeong, J.H., Mok, H., Oh, Y.K., and Park, T.G. (2009). siRNA conjugate delivery systems. Bioconjugate chemistry *20*, 5-14.

Joo, M.K., Yhee, J.Y., Kim, S.H., and Kim, K. (2014). The potential and advances in RNAi therapy: Chemical and structural modifications of siRNA molecules and use of biocompatible nanocarriers. J Control Release.

Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., and Roos, W.P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. DNA Repair (Amst) *6*, 1079-1099.

Kaina, B., Fritz, G., Mitra, S., and Coquerelle, T. (1991). Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. Carcinogenesis *12*, 1857-1867.

Kanasty, R.L., Whitehead, K.A., Vegas, A.J., and Anderson, D.G. (2012). Action and reaction: the biological response to siRNA and its delivery vehicles. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *20*, 513-524.

Kato, H., Kato, S., Kumabe, T., Sonoda, Y., Yoshimoto, T., Kato, S., Han, S.Y., Suzuki, T., Shibata, H., Kanamaru, R.*, et al.* (2000). Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. Clin Cancer Res *6*, 3937-3943.

Kato, T., Natsume, A., Toda, H., Iwamizu, H., Sugita, T., Hachisu, R., Watanabe, R., Yuki, K., Motomura, K., Bankiewicz, K.*, et al.* (2010). Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxity of temozolomide in GBM-initiating cells. Gene Ther *17*, 1363-1371.

Kennerdell, J.R., and Carthew, R.W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. Cell *95*, 1017-1026.

Kim, C., Shah, B.P., Subramaniam, P., and Lee, K.B. (2011). Synergistic induction of apoptosis in brain cancer cells by targeted codelivery of siRNA and anticancer drugs. Mol Pharm *8*, 1955-1961.

Kim, D.H., and Rossi, J.J. (2007). Strategies for silencing human disease using RNA interference. Nat Rev Genet *8*, 173-184.

Knizhnik, A.V., Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K.H., Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. PLoS One *8*, e55665.

Knobbe, C.B., Merlo, A., and Reifenberger, G. (2002). Pten signaling in gliomas. Neuro Oncol *4*, 196-211.

Koul, D., Shen, R., Kim, Y.W., Kondo, Y., Lu, Y., Bankson, J., Ronen, S.M., Kirkpatrick, D.L., Powis, G., and Yung, W.K. (2010). Cellular and in vivo activity of a novel PI3K inhibitor, PX-866, against human glioblastoma. Neuro Oncol *12*, 559-569.

Kurreck, J. (2009). RNA interference: from basic research to therapeutic applications. Angew Chem Int Ed Engl *48*, 1378-1398.

Lal, B., Goodwin, C.R., Sang, Y., Foss, C.A., Cornet, K., Muzamil, S., Pomper, M.G., Kim, J., and Laterra, J. (2009). EGFRvIII and c-Met pathway inhibitors synergize against PTEN-null/EGFRvIII+ glioblastoma xenografts. Molecular cancer therapeutics *8*, 1751-1760.

Lamprecht, A., and Benoit, J.P. (2006). Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. J Control Release *112*, 208-213.

Lamprecht, A., Bouligand, Y., and Benoit, J.P. (2002). New lipid nanocapsules exhibit sustained release properties for amiodarone. J Control Release *84*, 59-68.

Le Mercier, M., Fortin, S., Mathieu, V., Roland, I., Spiegl-Kreinecker, S., Haibe-Kains, B., Bontempi, G., Decaestecker, C., Berger, W., Lefranc, F.*, et al.* (2009). Galectin 1 proangiogenic and promigratory effects in the Hs683 oligodendroglioma model are partly mediated through the control of BEX2 expression. Neoplasia *11*, 485-496.

Le Mercier, M., Lefranc, F., Mijatovic, T., Debeir, O., Haibe-Kains, B., Bontempi, G., Decaestecker, C., Kiss, R., and Mathieu, V. (2008a). Evidence of galectin-1 involvement in glioma chemoresistance. Toxicol Appl Pharmacol *229*, 172-183.

Le Mercier, M., Mathieu, V., Haibe-Kains, B., Bontempi, G., Mijatovic, T., Decaestecker, C., Kiss, R., and Lefranc, F. (2008b). Knocking down galectin 1 in human hs683 glioblastoma cells impairs both angiogenesis and endoplasmic reticulum stress responses. J Neuropathol Exp Neurol *67*, 456-469.

Le, Q.T., Shi, G., Cao, H., Nelson, D.W., Wang, Y., Chen, E.Y., Zhao, S., Kong, C., Richardson, D., O'Byrne, K.J.*, et al.* (2005). Galectin-1: a link between tumor hypoxia and tumor immune privilege. J Clin Oncol *23*, 8932-8941.

Lee, J.M., Yoon, T.J., and Cho, Y.S. (2013). Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. BioMed research international *2013*, 782041.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S.*, et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature *425*, 415-419.

Lefranc, F., Brotchi, J., and Kiss, R. (2005). Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. J Clin Oncol *23*, 2411-2422.

Lefranc, F., Mathieu, V., and Kiss, R. (2011). Galectin-1-mediated biochemical controls of melanoma and glioma aggressive behavior. World J Biol Chem *2*, 193-201.

Lefranc, F., Sadeghi, N., Camby, I., Metens, T., Dewitte, O., and Kiss, R. (2006). Present and potential future issues in glioblastoma treatment. Expert Rev Anticancer Ther *6*, 719-732.

Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. Cancéro dig *2*, 38-42.

Liu, F.T., and Rabinovich, G.A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. Nature reviews. Cancer *5*, 29-41.

Lo, H.W. (2010). EGFR-targeted therapy in malignant glioma: novel aspects and mechanisms of drug resistance. Current molecular pharmacology *3*, 37-52.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. Acta Neuropathol *114*, 97-109.

Madshus, I.H., and Stang, E. (2009). Internalization and intracellular sorting of the EGF receptor: a model for understanding the mechanisms of receptor trafficking. Journal of cell science *122*, 3433-3439.

Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. J Biol Chem *273*, 13375-13378.

Maher, F., Vannucci, S.J., and Simpson, I.A. (1994). Glucose transporter proteins in brain. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *8*, 1003-1011.

Malmo, J., Sandvig, A., Varum, K.M., and Strand, S.P. (2013). Nanoparticle mediated P-glycoprotein silencing for improved drug delivery across the blood-brain barrier: a siRNA-chitosan approach. PLoS One *8*, e54182.

Malmo, J., Sorgard, H., Varum, K.M., and Strand, S.P. (2012). siRNA delivery with chitosan nanoparticles: Molecular properties favoring efficient gene silencing. J Control Release *158*, 261-268.

Manoharan, M. (2004). RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. Current opinion in chemical biology *8*, 570-579.

Markiewicz-Zukowska, R., Borawska, M.H., Fiedorowicz, A., Naliwajko, S.K., Sawicka, D., and Car, H. (2013). Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. BMC complementary and alternative medicine *13*, 50.

Marzolini, C., Decosterd, L.A., Shen, F., Gander, M., Leyvraz, S., Bauer, J., Buclin, T., Biollaz, J., and Lejeune, F. (1998). Pharmacokinetics of temozolomide in association with fotemustine in malignant melanoma and malignant glioma patients: comparison of oral, intravenous, and hepatic intra-arterial administration. Cancer chemotherapy and pharmacology *42*, 433-440.

Mathupala, S.P. (2009). Delivery of small-interfering RNA (siRNA) to the brain. Expert opinion on therapeutic patents *19*, 137-140.

McGirt, M.J., Than, K.D., Weingart, J.D., Chaichana, K.L., Attenello, F.J., Olivi, A., Laterra, J., Kleinberg, L.R., Grossman, S.A., Brem, H.*, et al.* (2009). Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. Journal of neurosurgery *110*, 583-588.

McManus, M.T., and Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet *3*, 737-747.

Mehta, A.I., Choi, B.D., Ajay, D., Raghavan, R., Brady, M., Friedman, A.H., Pastan, I., Bigner, D.D., and Sampson, J.H. (2012). Convection enhanced delivery of macromolecules for brain tumors. Current drug discovery technologies *9*, 305-310.

Mercer, J., and Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. Nature cell biology *11*, 510-520.

Messaoudi, K., Clavreul, A., Danhier, F., Saulnier, P., Benoit, J.P., and Lagarce, F. (submitted). Combined silencing expression of MGMT with EGFR or Galectin-1 enhances the sensitivity of glioblastoma to temozolomide. Int J Nanomedicine.

Messaoudi, K., Saulnier, P., Boesen, K., Benoit, J.P., and Lagarce, F. (2014). Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. Int J Nanomedicine *9*, 1479-1490.

Mitragotri, S., Burke, P.A., and Langer, R. (2014). Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. Nat Rev Drug Discov.

Molinaro, R., Wolfram, J., Federico, C., Cilurzo, F., Di Marzio, L., Ventura, C.A., Carafa, M., Celia, C., and Fresta, M. (2013). Polyethylenimine and chitosan carriers for the delivery of RNA interference effectors. Expert opinion on drug delivery *10*, 1653-1668.

Moscatello, D.K., Holgado-Madruga, M., Emlet, D.R., Montgomery, R.B., and Wong, A.J. (1998). Constitutive activation of phosphatidylinositol 3-kinase by a naturally occurring mutant epidermal growth factor receptor. J Biol Chem *273*, 200-206.

Nabi, I.R., and Le, P.U. (2003). Caveolae/raft-dependent endocytosis. The Journal of cell biology *161*, 673-677.

Neyns, B., Sadones, J., Joosens, E., Bouttens, F., Verbeke, L., Baurain, J.F., D'Hondt, L., Strauven, T., Chaskis, C., In't Veld, P.*, et al.* (2009). Stratified phase II trial of cetuximab in patients with recurrent high-grade glioma. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *20*, 1596-1603.

Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., and Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 14687-14692.

Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. Gene *366*, 2-16.

Nyati, M.K., Morgan, M.A., Feng, F.Y., and Lawrence, T.S. (2006). Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. Nature reviews. Cancer *6*, 876-885.

Ocker, M., Neureiter, D., Lueders, M., Zopf, S., Ganslmayer, M., Hahn, E.G., Herold, C., and Schuppan, D. (2005). Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer. Gut *54*, 1298-1308.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. Am J Pathol *170*, 1445-1453.

Oliva, J.L., Griner, E.M., and Kazanietz, M.G. (2005). PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors. Growth factors *23*, 245-252.

Omar, A.I., and Mason, W.P. (2009). Temozolomide: The evidence for its therapeutic efficacy in malignant astrocytomas. Core evidence *4*, 93-111.

Paillard, A., Hindre, F., Vignes-Colombeix, C., Benoit, J.P., and Garcion, E. (2010). The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. Biomaterials *31*, 7542-7554.

Pal, A., Ahmad, A., Khan, S., Sakabe, I., Zhang, C., Kasid, U.N., and Ahmad, I. (2005). Systemic delivery of RafsiRNA using cationic cardiolipin liposomes silences Raf-1 expression and inhibits tumor growth in xenograft model of human prostate cancer. Int J Oncol *26*, 1087-1091.

Park, C.K., Kim, J.E., Kim, J.Y., Song, S.W., Kim, J.W., Choi, S.H., Kim, T.M., Lee, S.H., Kim, I.H., and Park, S.H. (2012). The Changes in MGMT Promoter Methylation Status in Initial and Recurrent Glioblastomas. Translational oncology *5*, 393-397.

Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E., and Kloog, Y. (2001). Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. Oncogene *20*, 7486-7493.

Peterson, S.M., Thompson, J.A., Ufkin, M.L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., and Congdon, C.B. (2014). Common features of microRNA target prediction tools. Frontiers in genetics *5*, 23.

Petitjean, A., Achatz, M.I., Borresen-Dale, A.L., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. Oncogene *26*, 2157-2165.

Pinto-Alphandary, H., Andremont, A., and Couvreur, P. (2000). Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. Int J Antimicrob Agents *13*, 155-168.

Pletsas, D., Garelnabi, E.A.E., Li, L., Phillips, R.M., and Wheelhouse, R.T. (2013). Synthesis and Quantitative Structure–Activity Relationship of Imidazotetrazine Prodrugs with Activity Independent of O6-Methylguanine-DNA-methyltransferase, DNA Mismatch Repair, and p53. Journal of Medicinal Chemistry *56*, 7120-7132.

Popova, N.V., Deyev, I.E., and Petrenko, A.G. (2013). Clathrin-mediated endocytosis and adaptor proteins. Acta naturae *5*, 62-73.

Prados, M.D., Chang, S.M., Butowski, N., DeBoer, R., Parvataneni, R., Carliner, H., Kabuubi, P., Ayers-Ringler, J., Rabbitt, J., Page, M.*, et al.* (2009). Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. J Clin Oncol *27*, 579-584.

Qi, L.F., Xu, Z.R., Li, Y., Jiang, X., and Han, X.Y. (2005). *In vitro* effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. World J Gastroenterol *11*, 5136-5141.

Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T., and Iacobelli, S. (2002). Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? Trends in immunology *23*, 313-320.

Raemdonck, K., Vandenbroucke, R.E., Demeester, J., Sanders, N.N., and De Smedt, S.C. (2008). Maintaining the silence: reflections on long-term RNAi. Drug discovery today *13*, 917-931.

Ragelle, H., Vandermeulen, G., and Preat, V. (2013). Chitosan-based siRNA delivery systems. J Control Release *172*, 207-218.

Raghavan, R., Brady, M.L., Rodriguez-Ponce, M.I., Hartlep, A., Pedain, C., and Sampson, J.H. (2006). Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. Neurosurgical focus *20*, E12.

Ramadan, A., Lagarce, F., Tessier-Marteau, A., Thomas, O., Legras, P., Macchi, L., Saulnier, P., and Benoit, J.P. (2011). Oral fondaparinux: use of lipid nanocapsules as nanocarriers and in vivo pharmacokinetic study. Int J Nanomedicine *6*, 2941-2951.

Ramirez, Y.P., Weatherbee, J.L., Wheelhouse, R.T., and Ross, A.H. (2013). Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. Pharmaceuticals *6*, 1475-1506.

Rehman, Z., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2013). How cationic lipids transfer nucleic acids into cells and across cellular membranes: recent advances. J Control Release *166*, 46-56.

Reischl, D., and Zimmer, A. (2009). Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. Nanomedicine *5*, 8-20.

Rejman, J., Conese, M., and Hoekstra, D. (2006). Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. Journal of liposome research *16*, 237-247.

Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., and Hoekstra, D. (2004). Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. Biochem J *377*, 159-169.

Rich, J.N., Reardon, D.A., Peery, T., Dowell, J.M., Quinn, J.A., Penne, K.L., Wikstrand, C.J., Van Duyn, L.B., Dancey, J.E., McLendon, R.E.*, et al.* (2004). Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol *22*, 133-142.

Rorive, S., Belot, N., Decaestecker, C., Lefranc, F., Gordower, L., Micik, S., Maurage, C.A., Kaltner, H., Ruchoux, M.M., Danguy, A.*, et al.* (2001). Galectin-1 is highly expressed in human gliomas with relevance for modulation of invasion of tumor astrocytes into the brain parenchyma. Glia *33*, 241-255.

Rubner, Y., Muth, C., Strnad, A., Derer, A., Sieber, R., Buslei, R., Frey, B., Fietkau, R., and Gaipl, U.S. (2014). Fractionated radiotherapy is the main stimulus for the induction of cell death and of Hsp70 release of p53 mutated glioblastoma cell lines. Radiation oncology *9*, 89.

S. Al-Qadi, A.G., C. Remunan-Lopez (2012). chitosan and its derivatives as nanocarriers for siRNA delivery J. Drug Del. Sci. Tech. *22*, 29-42.

Sahoo, S.K., and Labhasetwar, V. (2003). Nanotech approaches to drug delivery and imaging. Drug discovery today *8*, 1112-1120.

Salmaggi, A., Duri, S., Silvani, A., Gaviani, P., Milanesi, I., Casali, C., and Di Meco, F. (2011). Loco-regional treatments in first-diagnosis glioblastoma: literature review on association between Stupp protocol and Gliadel. Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology *32 Suppl 2*, S241-245.

Sampson, J.H., Archer, G.E., Villavicencio, A.T., McLendon, R.E., Friedman, A.H., Bishop, W.R., Bigner, D.D., and Friedman, H.S. (1999). Treatment of neoplastic meningitis with intrathecal temozolomide. Clin Cancer Res *5*, 1183-1188.

Scaringi, C., Enrici, R.M., and Minniti, G. (2013). Combining molecular targeted agents with radiation therapy for malignant gliomas. OncoTargets and therapy *6*, 1079-1095.

Schulte, A., Liffers, K., Kathagen, A., Riethdorf, S., Zapf, S., Merlo, A., Kolbe, K., Westphal, M., and Lamszus, K. (2013). Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110delta. Neuro Oncol *15*, 1289-1301.

Shangary, S., and Wang, S. (2009). Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. Annual review of pharmacology and toxicology *49*, 223-241.

Shchors, K., Persson, A.I., Rostker, F., Tihan, T., Lyubynska, N., Li, N., Swigart, L.B., Berger, M.S., Hanahan, D., Weiss, W.A.*, et al.* (2013). Using a preclinical mouse model of high-grade astrocytoma to optimize p53 restoration therapy. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, E1480-1489.

Shi, Y. (2003). Mammalian RNAi for the masses. Trends Genet *19*, 9-12.

Shim, G., Choi, H.W., Lee, S., Choi, J., Yu, Y.H., Park, D.E., Choi, Y., Kim, C.W., and Oh, Y.K. (2013). Enhanced intrapulmonary delivery of anticancer siRNA for lung cancer therapy using cationic ethylphosphocholine-based nanolipoplexes. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *21*, 816-824.

Silber, J.R., Bobola, M.S., Blank, A., and Chamberlain, M.C. (2012). O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: promise and problems. Biochim Biophys Acta *1826*, 71-82.

Singha, K., Namgung, R., and Kim, W.J. (2011). Polymers in small-interfering RNA delivery. Nucleic acid therapeutics *21*, 133-147.

Sriraman, S.K., Aryasomayajula, B., and Torchilin, V.P. (2014). Barriers to drug delivery in solid tumors. Tissue barriers *2*, e29528.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.J., and Group, A.L.-G.S. (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.

Stupp, R., Brada, M., van den Bent, M.J., Tonn, J.C., Pentheroudakis, G., and on behalf of the, E.G.W.G. (2014). High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K.*, 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*, 459-466.

Stupp, R., Hegi, M.E., Neyns, B., Goldbrunner, R., Schlegel, U., Clement, P.M., Grabenbauer, G.G., Ochsenbein, A.F., Simon, M., Dietrich, P.Y.*, et al.* (2010). Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. J Clin Oncol *28*, 2712-2718.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U.*, et al.* (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med *352*, 987-996.

Stupp, R., and Ruegg, C. (2007). Integrin inhibitors reaching the clinic. J Clin Oncol *25*, 1637-1638.

Sun, Q., Radosz, M., and Shen, Y. (2012). Challenges in design of translational nanocarriers. J Control Release *164*, 156-169.

Swiatek-Machado, K., Mieczkowski, J., Ellert-Miklaszewska, A., Swierk, P., Fokt, I., Szymanski, S., Skora, S., Szeja, W., Grynkiewicz, G., Lesyng, B.*, et al.* (2012). Novel small molecular inhibitors disrupt the JAK/STAT3 and FAK signaling pathways and exhibit a potent antitumor activity in glioma cells. Cancer Biol Ther *13*, 657-670.

T Kato, A.N., H Toda, H Iwamizu, T Sugita, R Hachisu, R Watanabe, K Yuki, K Motomura, K Bankiewicz and T Wakabayashi (2010). Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxity of temozolomide in GBM-initiating cells. Gene Therapy *17, 1363–1371*.

Thomas, O., and Lagarce, F. (2013). Lipid nanocapsules: a nanocarrier suitable for scale-up process. J. Drug Del. Sci. Tech. *23*, 555-559.

Tian, X.H., Lin, X.N., Wei, F., Feng, W., Huang, Z.C., Wang, P., Ren, L., and Diao, Y. (2011). Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. Int J Nanomedicine *6*, 445-452.

Torchilin, V.P. (2006). Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. Annual review of biomedical engineering *8*, 343-375.

Toussaint, L.G., 3rd, Nilson, A.E., Goble, J.M., Ballman, K.V., James, C.D., Lefranc, F., Kiss, R., and Uhm, J.H. (2012). Galectin-1, a gene preferentially expressed at the tumor margin, promotes glioblastoma cell invasion. Molecular cancer *11*, 32.

Trinh, V.A., Patel, S.P., and Hwu, W.J. (2009). The safety of temozolomide in the treatment of malignancies. Expert opinion on drug safety *8*, 493-499.

Tsujiuchi, T., Natsume, A., Motomura, K., Kondo, G., Ranjit, M., Hachisu, R., Sugimura, I., Tomita, S., Takehara, I., Woolley, M.*, et al.* (2014). Preclinical evaluation of an O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-siRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains. American journal of translational research *6*, 169-178.

Tubbs, J.L., Pegg, A.E., and Tainer, J.A. (2007). DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. DNA Repair (Amst) *6*, 1100-1115.

Uhm, J.H., Ballman, K.V., Wu, W., Giannini, C., Krauss, J.C., Buckner, J.C., James, C.D., Scheithauer, B.W., Behrens, R.J., Flynn, P.J.*, et al.* (2011). Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. International journal of radiation oncology, biology, physics *80*, 347-353.

Vanpouille-Box, C., Lacoeuille, F., Belloche, C., Lepareur, N., Lemaire, L., LeJeune, J.J., Benoit, J.P., Menei, P., Couturier, O.F., Garcion, E.*, et al.* (2011). Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules. Biomaterials *32*, 6781-6790.

Verbeek, B., Southgate, T.D., Gilham, D.E., and Margison, G.P. (2008). O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy. British medical bulletin *85*, 17-33.

Verreault, M., Weppler, S.A., Stegeman, A., Warburton, C., Strutt, D., Masin, D., and Bally, M.B. (2013). Combined RNAi-mediated suppression of Rictor and EGFR resulted in complete tumor regression in an orthotopic glioblastoma tumor model. PLoS One *8*, e59597.

Verschuere, T., De Vleeschouwer, S., Lefranc, F., Kiss, R., and Van Gool, S.W. (2011). Galectin-1 and immunotherapy for brain cancer. Expert Rev Neurother *11*, 533-543.

Viel, T., Monfared, P., Schelhaas, S., Fricke, I.B., Kuhlmann, M.T., Fraefel, C., and Jacobs, A.H. (2013). Optimizing glioblastoma temozolomide chemotherapy employing lentiviral-based anti-MGMT shRNA technology. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy *21*, 570-579.

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? Nature reviews. Cancer *10*, 842-857.

Voges, J., Reszka, R., Gossmann, A., Dittmar, C., Richter, R., Garlip, G., Kracht, L., Coenen, H.H., Sturm, V., Wienhard, K.*, et al.* (2003). Imaging-guided convection-enhanced delivery and gene therapy of glioblastoma. Annals of neurology *54*, 479-487.

Volkov, A.A., Kruglova, N.S., Meschaninova, M.I., Venyaminova, A.G., Zenkova, M.A., Vlassov, V.V., and Chernolovskaya, E.L. (2009). Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. Oligonucleotides *19*, 191-202.

Vonarbourg, A., Passirani, C., Desigaux, L., Allard, E., Saulnier, P., Lambert, O., Benoit, J.P., and Pitard, B. (2009). The encapsulation of DNA molecules within biomimetic lipid nanocapsules. Biomaterials *30*, 3197-3204.

Wang, Z., Rao, D.D., Senzer, N., and Nemunaitis, J. (2011). RNA interference and cancer therapy. Pharm Res *28*, 2983-2995.

Waterhouse, P.M., and Helliwell, C.A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. Nat Rev Genet *4*, 29-38.

Wauthoz, N., Deleuze, P., Hecq, J., Roland, I., Saussez, S., Adanja, I., Debeir, O., Decaestecker, C., Mathieu, V., Kiss, R.*, et al.* (2010). In vivo assessment of temozolomide local delivery for lung cancer inhalation therapy. European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences *39*, 402-411.

Wauthoz, N., Deleuze, P., Saumet, A., Duret, C., Kiss, R., and Amighi, K. (2011). Temozolomide-based dry powder formulations for lung tumor-related inhalation treatment. Pharm Res *28*, 762-775.

Weiner, L.M., Surana, R., and Wang, S. (2010). Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Nature reviews. Immunology *10*, 317-327.

Weiser, J.R., and Saltzman, W.M. (2014). Controlled release for local delivery of drugs: barriers and models. J Control Release.

Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K., Tonn, J.C., Stupp, R., Falini, A., Cohen-Jonathan-Moyal, E., Frappaz, D., Henriksson, R., Balana, C.*, et al.* (2014). EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. Lancet Oncol *15*, e395-e403.

Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jaaskelainen, J., and Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. Neuro Oncol *5*, 79-88.

Whitehead, K.A., Langer, R., and Anderson, D.G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nat Rev Drug Discov *8*, 129-138.

Wilda, M., Fuchs, U., Wossmann, W., and Borkhardt, A. (2002). Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). Oncogene *21*, 5716-5724.

Wilson, D.M., 3rd, and Bohr, V.A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. DNA Repair (Amst) *6*, 544-559.

Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., and Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. Science *291*, 1284-1289.

Wu, H., Hait, W.N., and Yang, J.M. (2003). Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. Cancer Res *63*, 1515-1519.

Xing, W.J., Zou, Y., Han, Q.L., Dong, Y.C., Deng, Z.L., Lv, X.H., Jiang, T., and Ren, H. (2013). Effects of epidermal growth factor receptor and phosphatase and tensin homologue gene expression on the inhibition of U87MG glioblastoma cell proliferation induced by protein kinase inhibitors. Clinical and experimental pharmacology & physiology *40*, 13-21.

Xue, H.Y., Liu, S., and Wong, H.L. (2014). Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. Nanomedicine (Lond) *9*, 295-312.

Yang, Y.P., Chien, Y., Chiou, G.Y., Cherng, J.Y., Wang, M.L., Lo, W.L., Chang, Y.L., Huang, P.I., Chen, Y.W., Shih, Y.H.*, et al.* (2012). Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI. Biomaterials *33*, 1462-1476.

Yang, Z.Z., Li, J.Q., Wang, Z.Z., Dong, D.W., and Qi, X.R. (2014). Tumor-targeting dual peptides-modified cationic liposomes for delivery of siRNA and docetaxel to gliomas. Biomaterials *35*, 5226-5239.

Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. Eur J Cancer *37 Suppl 4*, S3-8.

Yip, S., Miao, J., Cahill, D.P., Iafrate, A.J., Aldape, K., Nutt, C.L., and Louis, D.N. (2009). MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. Clin Cancer Res *15*, 4622-4629.

Yoo, B., Ifediba, M.A., Ghosh, S., Medarova, Z., and Moore, A. (2014). Combination Treatment with Theranostic Nanoparticles for Glioblastoma Sensitization to TMZ. Molecular imaging and biology : MIB : the official publication of the Academy of Molecular Imaging.

Yu, H., Zou, Y., Jiang, L., Yin, Q., He, X., Chen, L., Zhang, Z., Gu, W., and Li, Y. (2013). Induction of apoptosis in non-small cell lung cancer by downregulation of MDM2 using pH-responsive PMPC-b-PDPA/siRNA complex nanoparticles. Biomaterials *34*, 2738-2747.

Zhang, J., Stevens, M.F., and Bradshaw, T.D. (2012). Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. Current molecular pharmacology *5*, 102-114.

Zhang, Y., Zhang, Y.F., Bryant, J., Charles, A., Boado, R.J., and Pardridge, W.M. (2004). Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. Clin Cancer Res *10*, 3667-3677.

Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A.C., Hiller, D.J., Chen, A.J., Perry, S.R., Tonon, G., Chu, G.C., Ding, Z., *et al.* (2008). p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. Nature *455*, 1129-1133.

Zolnik, B.S., Gonzalez-Fernandez, A., Sadrieh, N., and Dobrovolskaia, M.A. (2010). Nanoparticles and the immune system. Endocrinology *151*, 458-465.

MESSAOUDI KHALED

32 ans (21/11/1981)
22 rue Thiers, 49100 ANGERS
☎ 06 26 95 79 08
Khaled.messaoudi2111@gmail.com

TITRES

PHARMACIE

2013-2014 Médaille d'Or du CHU d'Angers

2009-2013 Validation du DES de pharmacie en Innovation Pharmaceutique et Recherche (IPR) et obtention du diplôme de docteur d'état en pharmacie

2008-2009 Concours d'Internat en Innovation Pharmaceutique et Recherche (Angers)

2006-2007 5ème année de Pharmacie à l'université René Descartes (Paris V)

2005-2006 1ère année de pharmacie et équivalence scientifique du diplôme de Pharmacie à l'université René Descartes (Paris V)

1999-2004 **Diplôme de docteur d'état en Pharmacie** à l'université d'Alger

1998-1999 **Baccalauréat** série sciences de la nature et de la vie **mention assez bien** (Lycée du Sacré cœur Alger)

RECHERCHE

2011-2014 **Doctorat en Sciences Pharmaceutiques,** laboratoire INSERM UMRS-U1066 MINT "Micro et nanomédecines biomimétiques" CHU d'Angers

2010-2011 **Master 2 Recherche pharmacotechnie et biopharmacie** spécialité « Formulation et production des médicaments, produits cosmétiques et autres produits de santé » faculté de pharmacie de *Châtenay-Malabry* (Paris-Sud)

2009-2010 **Master 1 STIS (Sciences, Technologies et Ingénierie de la Santé)** faculté de pharmacie d'Angers

FORMATIONS EN COURS D'INTERNAT

- 1er semestre d'internat : secteur achats et dispositifs médicaux PUI CHU d'Angers
- Validation de 3 UE : - Dispositifs médicaux (Angers)
  - Production et contrôle (Angers)
  - Hygiène hospitalière (Poitiers)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

2008-2009 Faisant fonction d'interne (FFI) au Centre hospitalier de Versailles (biochimie et hormonologie ; hématologie et hémostase

2007-2008 Faisant fonction d'interne (FFI) au Centre hospitalier de Versailles (Pharmacologie et toxicologie)

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES AFFICHEES

Messaoudi K, et al. Sensitivity Increase of U87MG glioblastoma cells to temozolomide after treatment by siRNA carried by lipid nanocapsules. **Congrès de microencapsulation 09/2013 Pamplona, Espagne, et Translational Nanomedicine international Meeting 08/2014 Angers, France**

Messaoudi K, et al. Formulation and biological evaluation of chitosan transacylated lipid nancocapsules carrying an anti-galectin-1 siRNA in a cellular model of glioblastoma. **Congrès de l'Association Américaine des Sciences Pharmaceutiques (AAPS) 10/2012 Chicago, USA**

Messaoudi K, et al. siRNA mediated EGFR knockdown in a glioblastoma cell line delivered by lipid nanocapsules. **Congrès du Groupe Thématique de Recherche sur la Vectorisation (GTRV) 12/2011 Bruxelles, Belgique**

PUBLICATIONS

Messaoudi K, et al. Anti-epidermal growth factor receptor siRNA carried by chitosan-transacylated lipid nanocapsules increases sensitivity of glioblastoma cells to temozolomide. International Journal of Nanomedecine (2014) Impact Factor: 3.46

Messaoudi K, et al. Combined silencing expression of MGMT with EGFR or Galectin-1 enhances the sensitivity of glioblastoma to temozolomide. International Journal of Nanomedecine (soumis)

Messaoudi K, et al. Combined inhibited of galectin-1 and EGFR decreases temozolomide resistance in glioblastoma: *in vivo* evaluation (manuscrit en préparation)

Messaoudi K, et al. RNA interference potential for enhancing glioblastoma sensitivity to temozolomide (en cours de soumission à Drug discovery today)

RÉSUMÉ

L'objectif de cette thèse était de sensibiliser les glioblastomes (GBMs) au témozolomide (TMZ) par des siRNA transportés par des nanocapsules lipidiques transacylées au chitosan. La première partie de notre travail a été consacrée à la conception d'un vecteur cationique capable de fixer à sa surface des siRNA par attraction électrostatique. En effet, nous avons produit des nanocapsules lipidiques par le procédé d'inversion de phase, qui ont subi une modification de leur surface par greffage d'un polymère cationique (chitosan) grâce à la réaction de transacylation. Après caractérisation physico-chimique, détermination de la capacité de fixation des siRNA et de la concentration non toxique du vecteur. Nous avons ciblé l'EGFR dans des cellules issues de GBM humain par un siRNA spécifique afin d'évaluer l'effet de la réduction de sa production sur la sensibilité de ces cellules au TMZ. Les résultats ont montré l'effet bénéfique du ciblage de l'EGFR sur la sensibilité cellulaire au TMZ. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons souhaité combiner l'effet des siRNA anti- EGFR, galectine-1 et MGMT afin d'augmenter l'effet du TMZ par rapport à l'utilisation des siRNA séparément. Les résultats obtenus ont montré l'efficacité de la combinaison des siRNA deux à deux sur la production des protéines cibles et sur la sensibilité des cellules tumorales au TMZ. La troisième partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation de l'efficacité de cette stratégie *in vivo* sur un modèle de tumeur implanté dans le cerveau de souris immunodéprimées. Les résultats obtenus sont très prometteurs et montrent l'efficacité de notre stratégie *in vivo*.

mots-clés : Glioblastomes, témozolomide, nanocapsules, transacylation, chitosan, siRNA, *In vivo*

ABSTRACT

The aim of this thesis was to sensitize glioblastoma (GBMs) to temozolomide (TMZ) with siRNA transported by chitosan transacylated lipid nanocapsules. The first part of our work was devoted to the design of cationic vector to attach siRNA to its surface by electrostatic attraction. Indeed, we have produced the lipid nanocapsules by phase inversion method, which have undergone surface modification by grafting a cationic polymer (chitosan) with the transacylation reaction. After physico-chemical characterization, determination of the binding capacity of siRNA and non-toxic concentration of the vector. We targeted the EGFR in cells derived from human GBM by a specific siRNA to assess the effect of the reduction of its production on the sensitivity of these cells to TMZ. The results demonstrated the beneficial effect of targeting the EGFR on the cell sensitivity to TMZ. In the second part of this work, we wanted to combine the effect of anti-EGFR, galectin-1 and MGMT siRNAs to increase the effect of TMZ in comparison to the use of this siRNA separately. The results have shown the efficacy of the combination of siRNAs in pairs on the production of target proteins and on the sensitivity of tumor cells to TMZ. The third part of this work was devoted to assessing the effectiveness of this strategy *in vivo* on tumor model implanted in the brains of immune-compromised mice. The results obtained are very promising and show the effectiveness of our strategy *in vivo*.

keywords : Glioblastomas, temozolomide, nanocapsules, transacylation, chitosan, siRNA, *In vivo*

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné, Khaled MESSAOUDI
déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant le **01 / 10** / **2014**

Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint à tous les rapports, dossiers, mémoires.

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

université angers

Thèse de Doctorat

Khaled MESSAOUDI

Sensibilisation des glioblastomes au Témozolomide par des siRNA transportés par des nanocapsules lipidiques

Résumé

L'objectif de cette thèse était de sensibiliser les glioblastomes (GBMs) au témozolomide (TMZ) grâce à des siRNA transportés par des nanocapsules lipidiques transacylées au chitosan.
La première partie de notre travail a été consacrée à la conception d'un vecteur cationique capable de fixer à sa surface des siRNA par attraction électrostatique. En effet, nous avons produit des nanocapsules lipidiques par le procédé d'inversion de phase, qui ont subi une modification de leur surface par greffage d'un polymère cationique (chitosan) grâce à la réaction de transacylation. Après caractérisation physico-chimique, détermination de la capacité de fixation des siRNA et de la concentration non toxique du vecteur. Nous avons ciblé l'EGFR dans des cellules issues de GBM humain par un siRNA spécifique afin d'évaluer l'effet de la réduction de sa production sur la sensibilité de ces cellules au TMZ. Les résultats ont montré l'effet bénéfique du ciblage de l'EGFR sur la sensibilité cellulaire au TMZ. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons souhaité combiner l'effet des siRNA anti-EGFR, Galectine-1 et MGMT afin d'augmenter l'effet du TMZ par rapport à l'utilisation des siRNA séparément. Les résultats obtenus ont montré l'efficacité de la combinaison des siRNA deux à deux sur la production des protéines cibles et sur la sensibilité des cellules tumorales au TMZ. La troisième partie de ce travail a été consacrée à l'évaluation de l'efficacité de cette stratégie *in vivo* sur un modèle de tumeur implanté dans le cerveau de souris immunodéprimées. Les résultats obtenus sont très prometteurs et montrent l'efficacité de notre stratégie *in vivo*.

Mots clés
Glioblastomes, témozolomide,nanocapsules, transacylation, chitosan, siRNA

Abstract

The aim of this thesis was to sensitize glioblastoma (GBMs) to temozolomide (TMZ) with siRNA transported by chitosan transacylated lipid nanocapsules. The first part of our work was devoted to the design of cationic vector to attach siRNA to its surface by electrostatic attraction. Indeed, we have produced the lipid nanocapsules by phase inversion method, which have undergone surface modification by grafting a cationic polymer (chitosan) with the transacylation reaction. After physico-chemical characterization, determination of the binding capacity of siRNA and non-toxic concentration of the vector. We targeted the EGFR in cells derived from human GBM by a specific siRNA to assess the effect of the reduction of its production on the sensitivity of these cells to TMZ. The results demonstrated the beneficial effect of targeting the EGFR on the cell sensitivity to TMZ. In the second part of this work, we wanted to combine the effect of anti-EGFR, Galectin-1 and MGMT siRNA to increase the effect of TMZ in comparaison to the use of this siRNA separately. The results have shown the efficacy of the combination of siRNA in pairs on the production of target proteins and on the sensitivity of tumor cells to TMZ. The third part of this work was devoted to assessing the effectiveness of this strategy *in vivo* on tumor model implanted in the brains of immune-compromised mice. The results obtained are very promising and show the effectiveness of our strategy *in vivo*.

Key Words
Glioblastomas, temozolomide, nanocapsules, transacylation, chitosan, siRNA