



HAL
open science

Radiosensibilisation du glioblastome par un excès de porphyrines

Charles Dupin

► **To cite this version:**

Charles Dupin. Radiosensibilisation du glioblastome par un excès de porphyrines. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0073 . tel-04486110

HAL Id: tel-04486110

<https://theses.hal.science/tel-04486110v1>

Submitted on 1 Mar 2024

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ CANCEROLOGIE, GENETIQUE, HEMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

Par Charles DUPIN

**Radiosensibilisation du glioblastome
par un excès de porphyrines**

Sous la direction de : Sandrine Dabernat

Membres du jury :

M LIAGRE Bertrand	PU	Université de Limoges	Rapporteur
M CHEVET Eric	DR	Université de Rennes	Rapporteur
Mme MIRJOLET Céline	Dr	Université de Bourgogne	Examineur
M SEZNEC Hervé	DR	Université de Bordeaux	Examineur
Mme DABERNAT Sandrine	PUPH	Université de Bordeaux	Directrice

Membres Invités :

Mme VENDRELY Véronique	PUPH	Université de Bordeaux
M FEUGEAS Jean-Luc	DR	CELIA

Soutenue le 23 mars 2023

Titre : Radiosensibilisation du glioblastome par un excès de porphyrines

Résumé

Introduction

le glioblastome, tumeur cérébrale fréquente présente un mauvais pronostic avec une survie médiane autour de 14 mois. L'acide 5-amino-lévilinique (5-ALA), précurseur de la voie de biosynthèse de l'hème entraîne une accumulation de protoporphyrine IX (PpIX) dans les cellules du glioblastome. PpIX est un photosensibilisant connu et nous proposons de l'utiliser comme radiosensibilisant.

Objectif

Ce travail a évalué l'intérêt d'une sensibilisation de la radiothérapie par l'excès de porphyrines induit par le 5-ALA dans des modèles de cellules dérivées de tumeurs, en culture et dans un modèle de xenogreffe orthotopique. L'effet radiosensibilisant du 5-ALA a été évalué sur des lignées cellulaires, en radiothérapie à haute et basse énergie et en photothérapie. Enfin, l'effet Tcherenkov et son interaction avec la PpIX ont été recherchés sur un accélérateur de haute énergie.

Matériel et méthode

Nous avons utilisé des lignées P3, GG6 et GG16 dérivées de tumeurs. Le 5-ALA était mis au contact 4h avant les traitements pour les sphéroïdes (à 1mM) ou les souris (à 100mg/kg en intra péritonéal). La taille des sphéroïdes était estimée par seuillage semi-automatique sur ImageJ. Les souris immunodéficientes RAGy2C-/- étaient implantées en intra-cérébral par 5 sphéroïdes P3 transfectés par la luciférase. La croissance tumorale murine était quantifiée par bioluminescence après injection de D-Luciférase. La radiothérapie était réalisée sur l'encéphale à 220kV et en cas de haute énergie à 6 ou 18MV. La photothérapie était réalisée à 440nm.

Résultats

Nous avons évalué la croissance et la taille tumorale après différents schémas de radiothérapie encéphalique multifractionnée avec ou sans 5-ALA. Un schéma de fractionnement de 5 x 2 Gy, 3 fois par semaine a entraîné une survie intermédiaire [48-62 jours] par rapport à 0 Gy [15-24 jours], 3 x 2 Gy [41-47 jours] et 5 x 3 Gy [73-83 jours] (n=5 souris/groupe). La survie a été corrélée à la croissance tumorale. La croissance tumorale et la survie étaient similaires après des irradiations de 5 x 2 Gy, indépendamment du traitement au 5-ALA (groupe RT (53-67 jours), groupe RT+5-ALA (40-74 jours), HR = 1,57, p = 0,24) (n=11 souris/groupe). La croissance et la survie des sphéroïdes P3 en kV étaient diminuées par la radiothérapie *in vitro*, inchangées par le prétraitement au 5-ALA, confirmant les résultats *in vivo*. Sur d'autres lignées dérivées de glioblastome, GG6 et GG16, il n'y avait pas de radiosensibilisation par le 5-ALA. D'autres lignées cellulaires de carcinome (HT29-HT116-A431) et de mélanome (A375) n'étaient pas sensibilisées par l'accumulation de porphyrines. Comme la photothérapie sur les cellules P3 était efficace sur les cellules adhérentes (4,7% de cellules survivantes à 1J) et dans une moindre mesure sous forme de sphéroïdes (77,6% de cellules survivantes à 20J), nous avons testé la radiothérapie à haute énergie connue pour produire de l'effet Tcherenkov. Néanmoins, le 5-ALA n'entraînait pas sensibilisation des P3 irradiées à haute énergie (en MV) sous forme adhérente ou en sphéroïdes.

Sur le plan physique, on a pu montrer un léger effet Tcherenkov sur une machine de traitement clinique. Cet effet était plus haut avec des électrons de haute énergie (20MeV) qu'avec des photons en MV. A 20MeV, le signal spectroscopique d'un milieu contenant de la PpIX était modifié par absorption-émission de la PpIX.

Conclusion

Notre étude montre pour la première fois que dans un modèle tumoral préclinique pertinent pour le glioblastome humain, traité comme en routine clinique, l'administration de 5-ALA, bien que conduisant à une accumulation importante de PpIX, ne potentialise pas la radiothérapie. La radiothérapie à haute énergie ne semble pas suffisante pour produire suffisamment d'effet Tcherenkov pour avoir un effet de photothérapie.

Résumé grand public

Augmenter l'effet de la radiothérapie sur le glioblastome est une piste intéressante pour augmenter la survie de ce cancer incurable. On a constaté qu'avant l'intervention chirurgicale, la prise d'acide 5-aminolévilinique entraînait l'accumulation de protoporphyrine IX fluorescente dans la tumeur et permettait d'optimiser sa résection. Nous avons voulu tester la protoporphyrine IX pour sensibiliser la radiothérapie. Nous avons conçu un modèle préclinique murin robuste de glioblastome avec des tumeurs implantées dans le cerveau de souris traitées par radiothérapie fractionnée, comme pour les humains. Malgré l'accumulation spécifique de porphyrines dans le glioblastome, aucune radiosensibilisation n'a été observée. Nous avons confirmé ces résultats dans des sphéroïdes 3D *in vitro* de lignées dérivées de patients et d'autres lignées tumorales. La radiosensibilisation par les porphyrines ne peut pas être utilisée actuellement pour le traitement du glioblastome.

Mots clés : Glioblastome, radiosensibilisation, radiothérapie, photothérapie, porphyrine, 5-ALA

Title : Glioblastoma radiosensitization by porphyrin excess

Abstract

Introduction

Glioblastoma is a common brain tumor with a poor prognosis and 14 months of median survival. Five-Amino-Levulinic Acid (5-ALA) is a precursor of heme biosynthetic pathway that leads to an accumulation of protoporphyrin IX (PpIX) in glioblastoma cells. PpIX is a known photosensitizer, and we proposed to use it as a radiosensitizer.

Objective

This work evaluated the radiosensitization of glioblastoma by 5-ALA-induced porphyrin accumulation, *in vitro* and in orthotopically xenografted patient-derived tumor cells. The sensitizing effect of porphyrins was evaluated in cell lines, with high and low energy radiotherapy and with phototherapy. Finally, we investigated the PpIX fluorescence-induced by the Tcherenkov effect produced with a high energy radiotherapy accelerator.

Material and method

We used the patient-derived P3, GG6 and GG16 tumor cell lines. 5-ALA was delivered 4h before irradiation for spheroids (at 1mM) or mice (at 100mg/kg intraperitoneally). Spheroid size was determined by semi-automatic thresholding on ImageJ. RAGY2C^{-/-} immunodeficient mice were implanted orthotopically with 5 luciferase-transfected P3 spheroids. Tumor growth was quantified by bioluminescence after injection of D-Luciferin. Radiotherapy was performed on the brain at 220kV (low energy) and with 6-18MV (High energy). Phototherapy was performed at 440nm.

Results

We evaluated the xenotransplanted P3-derived tumor growth and tumor burden after different regimens of encephalic multifractionated radiation therapy with or without 5-ALA. A fractionation scheme of 5 × 2 Gy three times a week resulted in intermediate survival [48–62 days] compared to 0 Gy (15–24 days), 3 × 2 Gy (41–47 days) and, 5 × 3 Gy (73–83 days). Survival was correlated to tumor growth. Tumor growth and survival were similar after 5 × 2 Gy irradiations, regardless of 5-ALA treatment (RT group (53–67 days), RT+5-ALA group (40–74 days), HR = 1.57, *p* = 0.24). Spheroid growth and survival were diminished by radiotherapy *in vitro*, unchanged by 5-ALA pre-treatment, confirming the *in vivo* results. The analysis of two additional stem-like patient-derived cell lines GG6 and GG16 confirmed the absence of radiosensitization by porphyrin accumulation. Cell lines from carcinomas (HT29-HT116-A431) and melanoma (A375) cell lines were not radiosensitized after 5-ALA treatment. As porphyrin accumulation did induce phototoxicity on P3 cells with higher efficiency on adherent cells (4.7% of cells surviving at 1J) than on spheroids (77.6% of cells surviving at 20J), we tested high energy radiotherapy, known to induce the Tcherenkov effect. However, MegaVoltage irradiation did not radiosensitize adherent or spheroidal P3 cells pre-treated with 5-ALA. Physical experimentations showed a slight Tcherenkov effect in clinical settings. It was higher with high-energy electrons (20MeV) than with MegaVoltage photons irradiation. With 20MeV, the spectroscopic signal was modified in a medium containing PpIX by absorption-emission of PpIX.

Conclusion

Our study shows for the first time that in a preclinical tumor model relevant to human glioblastoma, treated as in clinical routine, 5-ALA administration, although leading to significant PpIX accumulation, does not potentiate radiotherapy. High voltage radiotherapy does not seem sufficient to produce enough Tcherenkov effect to induce phototherapy.

Simple Summary

Radiosensitization of glioblastoma is a major ambition to increase the survival of this incurable cancer. Before surgery, oral administration of 5-aminolevulinic acid leads to the accumulation of fluorescent protoporphyrin IX, preferentially in the cancer cells rather than in the normal brain. This property is used to optimize the resection of the tumor under fluorescent light. Protoporphyrin IX may also carry radiosensitization activity. To test this hypothesis, we designed a robust murine preclinical model of glioblastoma with tumors implanted into the brain of mice treated by fractionated radiotherapy, as for humans. Despite the specific accumulation of porphyrins in glioblastoma, there was no radiosensitization. We confirmed these results in *in vitro* 3D patient-derived spheroids other tumor cell lines. Radiosensitization by porphyrin accumulation cannot be currently used for the treatment of glioblastoma.

Keywords : Glioblastoma, radiosensitization, radiotherapy, phototherapy, porphyrin, 5-ALA

REMERCIEMENTS

Merci à tous les membres du jury qui ont bien voulu lire et juger mon travail.

Merci à Sandrine pour ces 3 années de recherche, de débats contradictoires et d'aventures scientifiques. Merci pour ton écoute, ton expertise et ta gentillesse.

Merci à Véronique pour ton enthousiasme sans faille et ton écoute. Tu as tracé un chemin vers le laboratoire, et tu cherches généreusement à le faire partager. C'est précieux.

Merci à Renaud d'avoir rendu possible l'aménagement du temps de travail à l'hôpital pour faire cette thèse.

Merci à toute l'unité ex-1035, néo-1312, pour tous ces moments passés ensemble, et le partage d'un quotidien de chercheur entre réfrigérateur, règle de 3 et tableaux Excel : Isabelle M, Isabelle LG, Magalie, François, Jean Marc, David, Aurélie, et toutes celles et ceux qui m'ont apporté joie, aide et rire pendant ces années.

Merci à mes co-thésards Samuel et Julian, pour leur enthousiasme et le partage de moments que la banalité du quotidien fait croire à tort qu'ils ne sont pas précieux.

Merci à Jade pour son enthousiasme et son efficacité pendant son master puis pour son retour salvateur 6 mois plus tard.

Merci à l'équipe de l'animalerie : Marie-Alix, Marie-Paule, Marcia, Julie et par gravitation rapprochée, Wilfried, pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur professionnalisme.

Merci à l'équipe de sphéroïdologues : Thomas et Joris pour leur intérêt sincère pour transmettre et à collaborer.

Merci à l'équipe de physique CELIA-Bergo-CHU : Jean Luc, Philippe, Jérôme, Didier, Denis, Jean-Christophe pour ces moments assez particuliers où le bricolage bon enfant se mélange avec le maniement d'échelles physiques, en volume, en spectre, en plan et en débit. Vertigineux.

Merci à mes co-internes : Renaud, Aymeri, Nora, Thibaud, Claudia, Véronique encore, et bien sûr les phases socles : Thomas, Delphine, Alexis et Raphaël qui ont assuré à l'hôpital quand il le fallait et pour le bonheur de travailler avec eux au quotidien.

Merci enfin bien sûr à ma *spin-doctor* mais pas que : Isabelle.

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract	2
Remerciements	3
Abbréviations	6
Table des figures.....	7
Table des tableaux.....	7
Introduction.....	8
1. Glioblastome	8
1.1. Epidémiologie	8
1.2. Anatomopathologie.....	9
1.3. Traitement du glioblastome	10
1.3.1. Chirurgie	11
1.3.2. Place de la radiothérapie.....	13
1.3.3. Place des traitements généraux.....	16
1.3.4. Place des <i>champs électriques alternatifs</i> dans le traitement du glioblastome	25
1.3.5. Difficulté de la recherche translationnelle dans le traitement du glioblastome	26
2. 5-ALA et glioblastome	28
2.1. Voie de biosynthèse de l'hème	28
2.2. Localisation de la PpIX dans la cellule.	30
2.3. Facteur influençant l'accumulation de PpIX dans les cellules de glioblastomes	30
2.4. Radiosensibilisation par le 5-ALA dans le glioblastome	32
Objectifs	33
Article publié dans le journal Cancers en 2022	34
Résultats non publiés	49
Introduction.....	49
1. La photothérapie	49
1.1. Rappel du fonctionnement de la photothérapie dynamique	49
1.2. Pénétration de la lumière dans le milieu	51
1.3. Photoactivation maximale.....	51
1.4. Effet du fractionnement sur l'effet de la photothérapie	52
1.5. Effet de l'oxygénation sur la photothérapie.....	53
1.6. Oxygénation du glioblastome.....	53
1.7. Photothérapie dynamique en cancérologie.....	54
1.8. Photothérapie dynamique dans le glioblastome chez l'homme.....	55

1.9. Améliorer l'efficacité de la photothérapie par l'adressage des porphyrines.....	56
2. L'effet Tcherenkov.....	57
2.1. Minime rappel de physique. Le photon et la dose.....	57
2.2. Effet Tcherenkov	58
Matériel et méthode	61
1. radiosensibilisation d'autres lignées tumorales par les porphyrines induites par le 5-ALA	61
1.1. Survie cellulaire par analyse au Cristal Violet.....	61
1.2. Tests de clonogénicité	61
2. Photosensibilisation des cellules P3 après traitement par le 5-ALA	62
3. Radiosensibilisation à haute énergie des cellules P3 par les porphyrines induites par le 5-ALA..	64
4. Détection directe de l'effet Tcherenkov et indirecte dans une solution de PpIX lors d'une irradiation à haute énergie.....	66
Résultats/Discussion.....	68
1. radiosensibilisation d'autres lignées tumorales par les porphyrines induites par le 5-ALA.	68
1.1. Evaluation de la viabilité à 48h par le Cristal Violet	68
1.2. Evaluation de la radiosensibilité par le test clonogénicité	69
2. Photosensibilisation des cellules P3 par les porphyrines induites par le 5-ALA	72
3. Radiosensibilisation à haute énergie des cellules P3 par les porphyrines induites par le 5-ALA. 75	
4. Détection directe de l'effet Tcherenkov et indirecte dans une solution de PpIX lors d'une irradiation à haute énergie.....	79
4.1. Caractérisation directe de l'effet Tcherenkov.....	79
4.2. Caractérisation indirecte de l'effet Tcherenkov par Fluorescence de la PpIX	81
4.3. Quelques considérations d'échelle	83
4.4. Stratégies alternatives d'apport de lumière pour la photothérapie.....	84
Conclusion	88
Bibliographie.....	90

ABBREVIATIONS

¹⁸FDG : ¹⁸Fluoro Desoxy-Glucose

⁶⁴Cu : ⁶⁴Cuivre

ALAS1 : 5-aminolevulinic acid synthase 1

ALAS2 : 5-aminolevulinic acid synthase 2

ALAD : 5-aminolevulinic acid dehydratase

ANOCEF : Association des Neuro Oncologues d'Expression Française

ATR-X : Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome X linked

CAR-T : Chimeric Antigen Receptor T cells

CDKN2A/B : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A/2B

CPOX : coproporphyrinogen oxidase

CTV : Clinical Target Volume. Volume tumoral microscopique

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer

FECH : ferrochelatase

GTV : Growth Target Volume. Volume tumoral macroscopique

IDH : l'Isocitrate DesHydrogenase

kV : KiloVolt

mCi : milliCurie

mmHg : millimètres de mercure

MV : Mégavoltage

MeV : Méga électronVolt

PEPT1 : Peptide transporter 1

PEPT2 : Peptide transporter 2

PpIX : Protoporphyrine IX

PBGD : porphobilinogen deaminase

PFS : Progression Free Survival = Survie sans récurrence

PPOX : protoporphyrinogen oxidase

PTV : Planning Target Volume. Volume de traitement

ROS : Reactive Oxygen Species – Espèces réactives de l'oxygène

RTOG : Radiation Therapy Oncology Group. Groupe américain de radiothérapie

TEP : Tomographie à émission de Positron

TERT : Telomerase Reverse Transcriptase

TP53 : Tumor Protein 53

UROD : uroporphyrinogen decarboxylase

UROS : uroporphyrinogen III synthase

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Epidémiologie des glioblastomes	p8
Figure 2 : Classification des gliomes de l'adulte dans la classification OMS 2021	p10
Figure 3 : Visualisation des zones d'hypoxie par IRM fonctionnelle et imagerie métabolique	p23
Figure 4 : Voie de Biosynthèse de l'hème et structure chimique du 5-ALA et de la PpIX	p29
Figure 5 : Vue peropératoire en A. lumière blanche B. après illumination en bleu et Aspect spectroscopique quantitatif selon la zone prélevée	p31
Figure 6 : Diagramme de Jablonski des états électroniques d'un photosensibilisateur	p50
Figure 7 : Schéma de l'étude INDYGO, réalisé au CHU de Lille évaluant la photothérapie per opératoire pour les patients d'un gliome de haut grade	p56
Figure 8 : Emission Tcherenkov provoquée par un faisceau et direction sa propagation	p59
Figure 9 : Simulation de l'effet Tcherenkov à partir d'un faisceau d'électron traversant un milieu aqueux ...	p59
Figure 10 : Dispositif d'acquisition du rayonnement induit par la PpIX stimulées par le rayonnement Tcherenkov	p67
Figure 11 : Survie cellulaire de 5 lignées cellulaires selon la présence de 5-ALA et la dose de radiothérapie .	p68
Figure 12 : Clonogénicité pour 4 lignées cellulaires sans et avec 5-ALA à 5 doses d'irradiation	p69
Figure 13 : Effet de la photothérapie sur des cellules P3 selon la présence de 5-ALA dans le milieu et selon l'état des cellules : en monocouche ou en sphéroïdes	p72
Figure 14 : Effet du 5-ALA sur la croissance des sphéroïdes P3 après irradiation à haute énergie de cellules P3 en monocouche à 0Gy, 4Gy et 10Gy	p75
Figure 15 : Ratio de croissance des sphéroïdes irradiés individuellement avec ou sans 5-ALA	p76
Figure 16 : Détection de l'effet Tcherenkov par spectroscopie dans le faisceau à haute énergie	p79
Figure 17 : Emission Tcherenkov induite par des faisceaux de photon et d'électrons.	p80
Figure 18 : Signal de détection d'une caméra d'une boîte irradiée à 20MeV avec PpIX	p81
Figure 19 : Spectres d'émission d'une solution de PpIX avec des électrons de 20MeV	p82
Figure 20 : Modification spectroscopique d'une solution de PpIX à 18MeV, 6MV et 18MV	p83

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Survie globale et sans récurrence pour les patients ayant un glioblastome traités par radiothérapie et Temozolomide	p17
Tableau 2 : Impact du statut MGMT sur le bénéfice en survie globale de la chimiothérapie par Temozolomide	p18
Tableau 3 : Rendement en profondeur d'une illumination à 630nm avec un applicateur de 2cm dans des conditions d'absorption calculées sur un tissu cérébral	p51
Tableau 4 : Comparaison de l'effet radiosensibilisant de 3 drogues selon 3 lignées cellulaires selon la condition d'irradiation 2D ou 3D	p74

INTRODUCTION

1. GLIOBLASTOME

Les gliomes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et parmi celles-ci, le glioblastome présente le plus mauvais pronostic (1).

1.1. Épidémiologie

L'incidence des glioblastomes est estimée à 3,2 patients/100 000 personnes/an au Etats Unis. En France, en 2018 il y a eu 3481 cas de glioblastome (2). L'incidence en France était de 3,7 cas/100 000 personnes/an chez l'homme et 2,3 cas/100 000 personnes/année chez la femme soit un rapport d'incidence de 1,6 hommes pour une femme. Ces données d'incidence sont superposables entre la France et les USA (figure 1). L'incidence augmente avec l'âge notamment à partir de 54 ans, et atteint un pic à 15,24 patients/100 000 personnes/an pour la tranche d'âge 75-84 ans(Ostrom et al. 2015) .

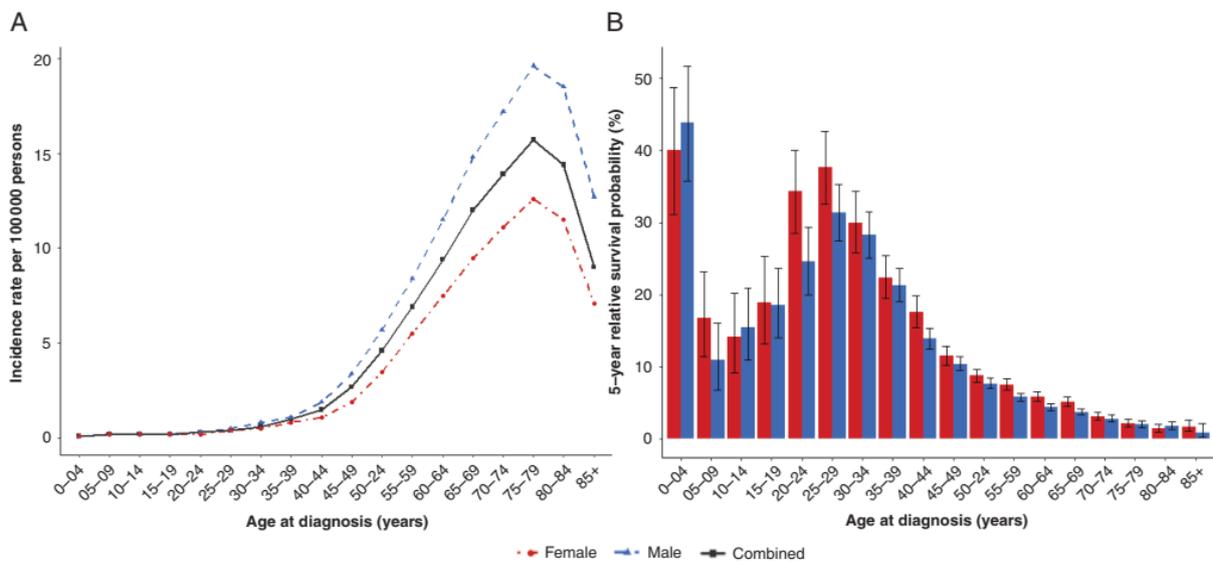


Figure 1 : Épidémiologie des glioblastomes. A. Incidence des glioblastomes selon l'âge et B. Probabilité de survie selon l'âge de survenue du glioblastome. Aux USA de 2012 à 2016. extrait de Wen et al. (4)

La figure extraite des recommandations Européennes de 2020 (4) illustre bien que le glioblastome est plutôt une maladie des personnes âgées avec un pic d'incidence dans la tranche 75-79 ans. On pourra noter que cette incidence augmente en France, mais aussi dans le reste du monde, et qu'elle est passée chez l'homme de 1,4 en 1990 à 3,4 en 2018, et chez la femme de 0,9 en 1990 à 2,3 en 2018. L'autre facteur important est que la survie

globale est d'autant plus mauvaise que l'âge augmente. Ces 2 éléments expliquent bien le pronostic perçu comme très mauvais du glioblastome.

Le glioblastome est une pathologie de la personne âgée, de mauvais pronostic.

1.2. Anatomopathologie

Historiquement, les tumeurs étaient classées selon leur grade, les grades 3 et 4 correspondants aux gliomes de haut grade. On notera que les études cliniques portent souvent sur ces 2 types de tumeurs de haut grade, avec de tumeurs de grade 4 majoritaires (5). D'autres n'incluent que les glioblastomes (6–10). Le glioblastome présente un pronostic moins bon que le gliome de grade 3.

En 2021, la classification anatomopathologique des gliomes, définie par l'organisation mondiale de la santé a changé et prend désormais en compte les mutations de l'Isocitrate DésHydrogénase (codé par le gène *IDH*) et les co-délétion 1p/19q (1). Ainsi, dans les gliomes diffus de l'adulte, on distingue :

- Les astrocytomes : *IDH* muté.
- Les oligodendrogliomes : *IDH* muté et 1p/19q codélétés
- Les Glioblastomes : *IDH* wild type.

Le glioblastome, *IDH* wild type donc, présente plutôt des mutations avec amplification ou gain de fonction de l'EGFR, gain de chromosome 7, perte du chromosome 10, modification du promoteur de Telomerase Reverse Transcriptase (TERT).

La mutation *IDH* a été montrée comme driver dès le stade précoce (early event) de la tumorigenèse dans les astrocytomes de bas grade. Les astrocytomes peuvent se transformer en glioblastome par acquisition d'une des 4 caractéristiques moléculaire suivantes : gain du chromosome 7 (dont l'amplification d'EGFR, perte du chromosome 10, mutation du promoteur de TERT ou perte homozygote de cycline-dependent kinase inhibitor 2A/B (*CDKN2A/B*)).

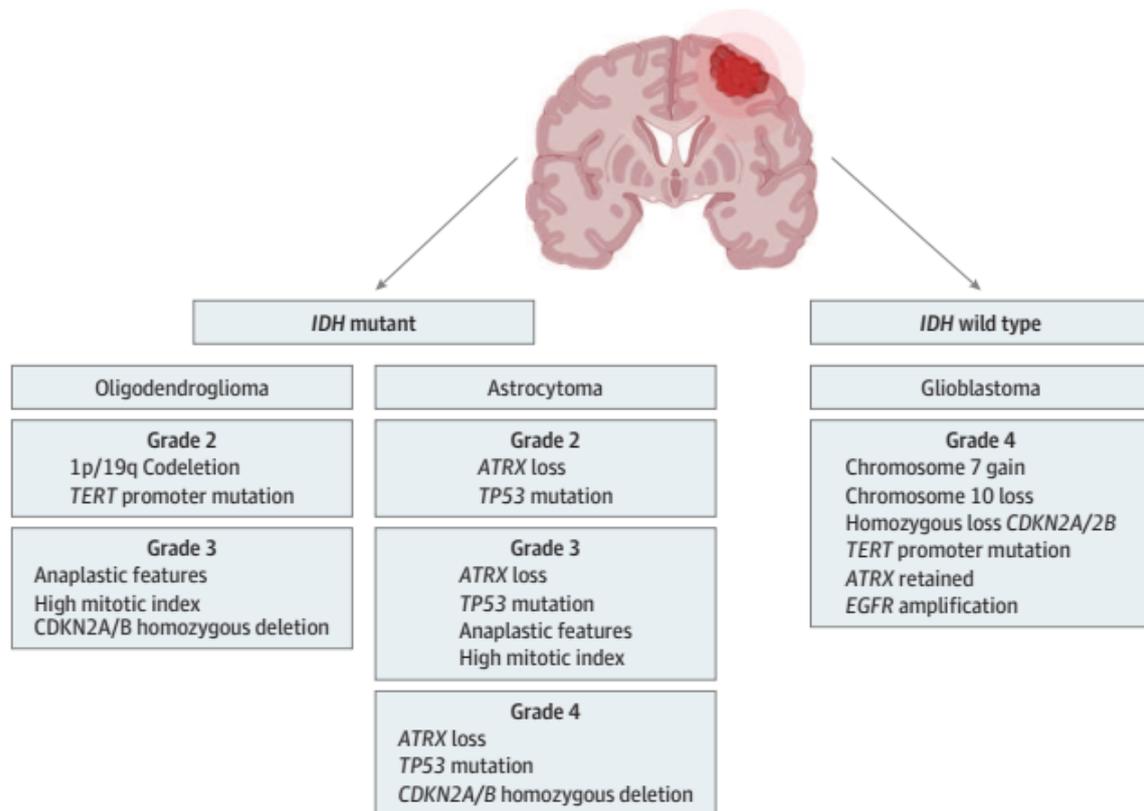


Figure 2 : Classification des gliomes de l'adulte dans la classification OMS 2021. Extrait de Berger et al. (1). ATR-X : Alpha-Thalassemia/mental Retardation syndrome, X linked, CDKN2A/B : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A/2B, EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor, IDH : l'Isocitrate DesHydrogenase, TERT : Telomerase Reverse Transcriptase, TP53 : Tumor Protein 53

En pratique, il n'y a pas de modification de la prise en charge de ces tumeurs dès lors qu'elles sont de grade 4.

La classification anatomopathologique des tumeurs gliales inclut la détection d'altérations génétiques ou épigénétiques.

1.3. Traitement du glioblastome

Le traitement du glioblastome repose sur un triptyque (5):

- Chirurgie,
- Radiothérapie
- Chimiothérapie concomitante et adjuvante par Temozolomide.

Nous verrons chacune de ces thérapeutiques, les autres thérapies essayés dans le traitement du glioblastome, les voies d'amélioration de la radiothérapie, et enfin nous verrons le concept de radiothérapie dynamique appliquée au glioblastome.

1.3.1. Chirurgie

La chirurgie constitue une étape incontournable de la prise en charge du glioblastome. En effet, elle intervient en phase initiale et a un but diagnostique et thérapeutique.

En effet, la preuve histologique est indispensable pour ne pas ignorer un diagnostic différentiel, notamment un abcès cérébral ou un lymphome, mais aussi pour grader la tumeur. L'histologie est indispensable, et en cas de tumeur non réséquable, une biopsie stéréotaxique peut être réalisée.

En cas de signes en lien avec la tumeur ou la compression de la tumeur par elle-même ou par l'œdème péri-tumoral, la chirurgie permettra une résolution rapide des symptômes.

L'évaluation de la qualité d'exérèse se fait par la chirurgie en per opératoire (présence ou non de résidu tumoral) et par une IRM injecté dans les 24h suivant le geste. Les zones prenant le contraste correspondent à de la tumeur et sont considérées comme un résidu. Après 24-48h, la néovascularisation tumorale peut être en partie au moins réactionnelle à la chirurgie.

La chirurgie améliore la survie sans récurrence, d'autant plus qu'elle est complète (11). En ce qui concerne la survie globale, la chirurgie est curative dans les gliomes de bas grade et notamment dans les astrocytomes de grade 2. La chirurgie n'est par contre pas curative dans le glioblastome. Le rôle de la chirurgie pour son impact sur la survie globale est important à évaluer, mais la méthodologie pour montrer qu'une résection sous-optimale aurait le même résultat qu'une résection optimale sur la survie est difficile à défendre sur le plan éthique. La question porte plutôt sur l'intérêt de proposer une chirurgie maximaliste pour améliorer la survie, éventuellement au prix d'une toxicité neurologique sur-ajoutée.

Dans des études rétrospectives, il existe une corrélation entre la qualité de la résection et la survie globale en prise en charge initiale (12) aussi bien qu'en situation de récurrence (13). Une méta-analyse portant sur 37 études et 41 117 patients, montrait une amélioration de la survie globale à 1 an, d'autant plus importante que la résection était complète (14) :

- Biopsie vs Résection sub-totale : RR=0,85 ; IC95%[0,80-0,91] p<0,001
- Résection subtotalaire vs Résection totale : RR=0,62 ; ; IC95%[0.56-0.69] p<0,001

Néanmoins, une tumeur complètement réséquable, comme une tumeur du lobe temporal antérieur, n'aura pas le même pronostic qu'une tumeur en zone fonctionnelle. De la même façon une tumeur très volumineuse n'aura pas le même pronostic qu'une tumeur de faible taille « facilement » réséquable. Ainsi ce type d'étude rétrospective n'est pas en mesure de

répondre à la question étant donnée la présence de facteurs confondants qu'aucune correction statistique ne pourrait corriger, les groupes n'étant pas comparables (15).

C'est pourtant grâce à l'essai qui sert de point de départ à cette thèse qu'une partie de cette question trouve sa réponse (11). Effectivement, dans cet essai chirurgical de phase III, 322 patients ont été randomisés entre une chirurgie classique et une chirurgie guidée par la fluorescence. Pour la chirurgie par fluorescence, les patients prenaient avant la chirurgie du Gliolan[®], c'est-à-dire du 5-ALA per os, et la chirurgie était réalisée sous éclairage bleu, avec un filtre rouge de visualisation permettant de mieux voir la tumeur qui a tendance à accumuler préférentiellement les porphyrines en situation d'excès de 5-ALA (Cf chapitre 2.1.). Grâce à cette chirurgie guidée par la fluorescence, il existe une nette amélioration de la résection complète du gliome de haut grade : 65% de résection complète contre 37% dans le bras chirurgie standard ($p=0,0001$). De la même façon, la survie à 6 mois est de 41,0% dans le groupe avec 5-ALA contre 21,1% en chirurgie standard ($p=0,0003$). Il n'existait pas de différence en terme de toxicité. Par contre, il n'est pas noté de différence en survie globale selon les groupes. On notera que cette information n'est marquée explicitement que dans la discussion de l'article bien qu'il s'agisse d'un objectif secondaire habituellement représenté dans ce type d'étude. Si cette étude est clairement positive sur l'amélioration de la survie dans progression (Progression Free Survival – PFS) et de la qualité de résection, elle remet en cause la nécessité d'une résection la plus complète possible, qui pourrait être faite au prix de perte de fonction plus importante (en l'absence de prémédication par 5-ALA).

Ce constat est partagé par les recommandations de 2014 de l'EANO (European Association for Neuro Oncology) qui précisent que « la prévention de nouveaux déficits neurologiques permanent est plus prioritaire qu'une extension de la résection, en l'état actuel des connaissances » (rang IV de preuve = accord professionnel). Cette attitude a été reprise dans les recommandations les plus récentes (4).

Ainsi, la chirurgie des glioblastomes est indispensable pour la prise en charge initiale diagnostique et fonctionnelle. Elle doit être aussi complète que possible sans altérer les fonctions neurologiques intactes.

1.3.2.Place de la radiothérapie

La radiothérapie est indispensable dans le traitement des glioblastomes.

1.3.2.1. Intérêt de la radiothérapie sur la survie globale

D'un point de vue historique, la radiothérapie a été initialement utilisée sur l'encéphale en totalité. Des essais assez anciens montrent son intérêt. En 1978, Andersen a randomisé après chirurgie 108 patients entre une surveillance et une radiothérapie sur l'encéphale en totalité, à la dose de 45Gy en 25 séances de 1,8Gy(16). Les survies à 6 mois et 1 an étaient meilleures dans le groupe irradiation par rapport au groupe surveillance : 64% vs 28% et 19% vs 0% respectivement.

La radiothérapie augmente la survie globale dans le traitement du glioblastome.

1.3.2.2. Intérêt de la radiothérapie chez les patients à l'état général altéré

Pour les patients en mauvais état général, étant donné le mauvais pronostic à court terme et la toxicité de la radiothérapie ainsi que le temps qui lui est consacré sur la période de vie restante, l'intérêt de la radiothérapie pouvait se discuter. Il a été proposé par l'Association des neurooncologues de langue française (ANOCEF) un essai randomisé entre surveillance et radiothérapie. Keime-Guibert et al. (17) ont montré une amélioration nette et significative de la survie globale grâce à une irradiation à la dose de 50,4Gy en 28 fractions de 1,8Gy (HR=0.47 95%IC[0.29-0.76]. La survie médiane passait de 17 mois à 29 mois avec la radiothérapie. Il n'y avait pas de différence de qualité de vie avec ou sans radiothérapie.

La radiothérapie augmente la survie même chez les patients en mauvais état général.

1.3.2.3. Volume d'irradiation

Concernant le volume d'irradiation, une approche par radiothérapie encéphalique *in toto* par rapport à une radiothérapie plus focalisée a montré une efficacité identique de la radiothérapie (18). Dans cet essai de Shapiro et al., 363 patients avaient reçu une irradiation encéphalique totale à la dose de 60,2Gy et 147 patients avaient reçu une irradiation de 43Gy sur l'encéphale en totalité suivi d'un boost de 17,2Gy sur le lit tumoral (soit une dose totale sur la tumeur de 60,2Gy).

Les récurrences après radiothérapie sont situées essentiellement dans le site irradié. Cette observation assez ancienne a été initialement démontrée par Wallner et al. (19). Lors d'une chirurgie de rattrapage, les auteurs ont retrouvé 25 tumeurs récurrentes sur 32 dans les 2cm autour de la tumeur initiale. Dix-huit tumeurs étaient contenues dans 1 cm du site initial.

Ces observations ont servi de recommandations aux consignes de délimitation, notamment récentes, comme dans l'étude de phase III de Gilbert et al. (20). Les auteurs recommandaient de délivrer 46Gy dans la cavité post opératoire incluant l'œdème post opératoire (en hypersignal T2 / Hypersignal FLAIR) + 2cm, et 60Gy (boost de 14Gy) sur la cavité opératoire se relevant au contact.

La définition du volume de radiothérapie reste quand même sujet à débat, ou en tout cas à des pratiques hétérogènes(21). Certaines sociétés savantes proposent une solution à 2 volumes comme présenté plus haut (RTOG : Radiation Therapy Oncology Group. Groupe américain de radiothérapie), ou une solution à un seul volume traité (EORTC European Organisation for Research and Treatment of Cancer, l'ANOCEF, Association des Neuro Oncologues d'Expression Française). La définition de la portion macroscopique de la tumeur (GTV), les extensions tumorales microscopiques (CTV), peuvent aussi varier de façon importante. Dans un exemple, Antoni et al. (21), retrouvent des volumes de traitement (PTV) très différents selon les méthodes de contourage :

- $PTV_{60Gy}ANOCEF = 69,9cm^3$
- $PTV_{60Gy}EORTC = 151,3cm^3$
- $PTV_{46Gy}RTOG = 213,4cm^3 + PTV_{60Gy}RTOG=151,3cm^3$

Considérant les marges microscopiques utilisées, la radiothérapie traite en général un important volume cérébral. Une standardisation des volumes à l'échelle internationale pourrait être réalisée.

En ce qui concerne la technique d'irradiation, l'utilisation de la radiothérapie en modulation d'intensité plutôt que la radiothérapie conformationnelle 3D permet une amélioration des paramètres d'irradiation, notamment l'index de conformité, qui matérialise l'adéquation du volume d'irradiation physique avec le volume cible (22). Dans l'étude de Thibou et al. portant rétrospectivement sur 220 patients, il existait même une moindre toxicité dans le groupe radiothérapie en modulation d'intensité, notamment sur l'œdème cérébral, les troubles de la concentration et les troubles de la conscience. Il n'y avait pas de différence par contre en terme de survie.

Le volume d'irradiation utilisé en radiothérapie prend en compte les marges microscopiques d'extension de la tumeur et est au minimum entre 1 et 2cm. Une irradiation en modulation d'intensité est à privilégier.

1.3.2.4. Intérêt de l'escalade de dose en radiothérapie

L'augmentation de la dose de radiothérapie améliore le contrôle local dans une grande variété de cancers (23–25).

Cette stratégie a évidemment été évaluée dans le glioblastome. L'essai de phase II NRG Oncology BN001 a été communiqué au congrès américain de radiothérapie 2020 (ASTRO) (26). Deux cent vingt-neuf patients étaient randomisés entre une radiothérapie à 60Gy en 30 séances et une radiothérapie à 75Gy en boost intégré sur le lit tumoral sur 30 séances. Les résultats en survie globale (16,3 mois vs 18,7 mois respectivement) n'étaient pas différents : HR=0,94, IC95%[0,80-1,11 ; p=0,19]. Les auteurs concluent à la futilité de conduire un essai de phase III.

Une méta-analyse sur données publiées a comparé l'impact d'une escalade de dose sur la survie globale sur 22 études et 2198 patients(27). Les résultats de cette étude sont intéressants puisqu'ils montrent qu'en l'absence de Temozolomide, il existe un bénéfice à 1 an de l'escalade de dose par rapport au traitement standard aussi bien sur la survie globale (46,3% vs 23,4%; p=0,02) que de la survie sans récurrence (17,9% vs 5,3%; p=0,02). Par contre, chez les patients recevant du Temozolomide, à 1 an, il n'y avait ni bénéfice en survie globale OS (73,2% vs 64,4%; p=0,23) ni bénéfice en survie sans récurrence (44,5% vs 44,3%; p=0,33) indépendamment du statut méthylé ou non méthylé. Cet article valide la preuve de concept d'une escalade de dose, mais l'exclut à l'heure du Temozolomide comme standard de traitement en 1^{ère} ligne.

Un des problèmes de l'escalade de dose pourrait être de ne pas cibler correctement la zone d'intérêt. Dans un essai français de phase III, pour lequel il a été prévu d'inclure 220 patients, Laprie et al. (28) proposent une stratégie d'escalade de dose sur les volumes identifiés comme étant le plus à risque de récurrence sur l'IRM fonctionnelle. Cette équipe a constaté qu'un ratio du spectre choline/N acetyl aspartate >2 était prédictif du site de récurrence (29). Ce type de ratio est utilisé pour identifier des zones de récurrence et différencier de la tumeur gliale par rapport à de l'œdème ou de la néovascularisation. Dans cette étude longitudinale sur 9 patients, la récurrence prenant le contraste en T1Gado correspondait dans 80% des cas à une

zone où ce ratio du spectre choline/N acetyl aspartate était augmenté dans la séquence FLAIR initiale contre 20% dans une zone où ce ratio n'était pas augmenté. Considérant ce risque augmenté, il a été proposé de comparer une radiothérapie standard à 60Gy en 30 fractions de 2Gy à une radiothérapie 60Gy sur un volume identique avec un boost intégré à la dose de 72Gy en 30 fractions de 2,4Gy sur les zones où le ratio était augmenté. L'objectif principal était la survie globale. Les résultats préliminaires présentés à la réunion de la Société Française de Radiothérapie Oncologique de 2022 ne montraient pas d'amélioration en survie sans récurrence ou en survie globale (Résultats non publiés). Au total, dans un travail récent de revue, Laprie et al. (30) ne retrouvent pas de bénéfice de cette escalade de dose pour le glioblastome.

L'escalade de dose n'a pas montré son efficacité et son utilisation doit être réservée à l'évaluation dans des essais cliniques.

~

En somme, la radiothérapie est une pierre angulaire du traitement. Elle améliore la survie, y compris chez les patients à l'état général précaire. Il n'y a pas de place pour une escalade de dose actuellement.

1.3.3. Place des traitements généraux

1.3.3.1. Le Temozolomide : indiscutable en première ligne de traitement

Depuis l'étude de Stupp et al. (5,31), le Temozolomide est le standard de traitement en association avec la radiothérapie et en adjuvant à la radiothérapie (32). Pendant la radiothérapie, le Temozolomide, un agent alkylant, est donné une fois par jour à la dose de 75mg/m² du premier au dernier jour, 7 jours/7. Après la radiothérapie 6 cycles de 5 jours à la dose de 200mg/m² (éventuellement diminué à 150mg/m² en cas de mauvaise tolérance) tous les 28 jours. En cas de persistance de tumeur macroscopique à 6 mois post radiothérapie, certains proposent une poursuite du Temozolomide jusqu'à 12 mois.

L'essai de Stupp et al. (5,31) comparait un traitement par chirurgie suivi de radiothérapie à cette même prise en charge avec une association de Temozolomide pendant la radiothérapie et avec 6 cures adjuvantes. Entre 2000 et 2002, 573 patients ont été randomisés, avec un objectif principal d'augmentation de la survie globale. Dans cette indication, le Temozolomide augmente globalement la survie globale avec un Hazard Ratio de survie globale à 0,63 (IC95%

0,53–0,75, $p < 0,0001$). Un aspect particulier de ce bénéfice en survie globale est l'apparition de patients dits « long survivants » avec une survie globale qui passe à 4 ans de 3% avec la radiothérapie seule à 12% avec l'adjonction du Temozolomide (5). D'un point de vue de l'information au patient, et de la gestion du temps de vie restant, savoir qu'une survie prolongée est possible a probablement plus d'impact que l'augmentation de 2 mois ½ de la survie médiane qui passe de 12,1 mois à 14,6 mois grâce au Temozolomide.

Ce bénéfice a été confirmé chez les patients âgés puisque Perry et al. (33) ont randomisé l'utilisation du Temozolomide chez les patients de plus de 65 ans avec une radiothérapie adaptée à l'âge, c'est-à-dire à la dose de 40Gy en 15 fractions. La survie était meilleure dans le groupe recevant le Temozolomide (HR=0,67 IC95% [0,56-0,80], $p < 0,001$). La survie médiane passait de 7,6 mois à 9,3 mois avec Temozolomide.

Le Temozolomide est un standard de traitement chez tous les patients en première ligne, y compris chez les sujets âgés.

1.3.3.2. Impact de la méthylation de MGMT : pronostic ou prédictif de réponse au traitement par Temozolomide ?

La O6-méthylguanine–DNA méthyltransferase (MGMT) est une enzyme de réparation de l'ADN dont le gène peut être rendu silencieux par la méthylation de son promoteur (34). Cette méthylation de MGMT a été montrée de façon formelle comme facteur pronostic sur la survie globale. A partir de patients inclus dans une phase II testant l'efficacité du Temozolomide, Hegi et al. ont testé le statut méthylé du promoteur de MGMT. La survie était de 12,2 mois dans le groupe non méthylé contre 18.2 mois dans le groupe méthylé. Le hazard ratio de décès était de 0,45 [0.32-0,61] en faveur des patients méthylés (tableau 1).

Survie globale En mois [IC95%]	OS	PFS
MGMT Méthylé	24,6 [22,2-27,0]	9,5 [7,4-11,6]
MGMT non Méthylé	14,1 [13,2-15,0]	5,0 [5,2-5,7]

Tableau 1 : Survie globale et sans récurrence pour les patients ayant un glioblastome traités par radiothérapie et Temozolomide. D'après Heigi et al. (34).

Alnahhas et al. ont récemment ré-évalué les données de survie sans récurrence et la survie globales des glioblastomes méthylés MGMT ou non méthylés, tous traités par Temozolomide dans des essais randomisés (Tableau 2)(35). La survie était nettement meilleure pour les

tumeurs MGMT méthylées puisque la survie globale était de 24,6 mois contre 14,1 mois en cas de méthylation. Chez les patients âgés, ayant une tumeur MGMT non méthylé, sans Temozolomide, la survie globale était estimée à 8,35 mois.

Le caractère MGMT méthylé d'un glioblastome est donc un facteur de bon pronostic.

Le caractère prédictif de réponse du Temozolomide selon le statut de méthylation du gène *MGMT* est en réalité plus difficile à affirmer. Si les auteurs mentionnent la plupart du temps ce caractère prédictif de la réponse au Temozolomide (5,34), il n'est pas sûr qu'on ne puisse pas affirmer que le Temozolomide fonctionne mieux sur les tumeurs *MGMT* méthylés que sur les tumeurs *MGMT* non méthylés. Les données sont en faveur d'une efficacité moindre du Temozolomide par 2 phénomènes. D'abord il existe une diminution moindre du risque de décès dans le groupe non méthylé que dans le groupe méthylé, mais le pronostic est moins bon dans le groupe non méthylé, ce qui entraîne un gain absolu en survie moins important. Je résume dans le tableau ci-dessous les 2 études qui permettent de se faire une idée sur ce caractère prédictif du statut *MGMT* sur la réponse au Temozolomide.

Auteur Journal	N disponibles (/nb patients)	Caractéristiques de l'étude	HR [IC95%] décès	
			Méthylé	Non méthylé
Heigi NEJM 2005(Hegi et al. 2005)	206 (/573)	Randomisation TMZ/placebo Pas de stratification sur MGMT 59,4 à 60Gy en 30 à 33 fractions	0,62 [0,42-0,92]	0,69 [0,47-1,02]
Perry NEJM 2017 (Perry et al. 2017)	462 (/562)	Pas de stratification sur MGMT >65 ans RT : 40Gy en 15 fractions	0,53 [0,38-0,73]	0,75 [0,56-1,01]

Tableau 2 : **Impact du statut MGMT sur le bénéfice en survie globale de la chimiothérapie par Temozolomide.**

*Données de l'essai Stupp Lancet Oncol 2005 (31), actualisé 2009 (5)

De fait, actuellement, les recommandations sont de faire un traitement par Temozolomide quel que soit le statut de méthylation de *MGMT*. En cas d'état général altéré et de statut MGMT non méthylé, étant donné le pronostic très péjoratif, peut se discuter une absence de traitement par le Temozolomide, après discussion partagé avec le patient et sa famille.

Le rôle prédictif du statut MGMT sur la réponse au Temozolomide reste débattu. Le Temozolomide peut être donné à tous les patients quel que soit leur statut *MGMT*.

1.3.3.3. Immunothérapie dans le glioblastome

Trois approches principales d'immunothérapie sont actuellement testées dans le traitement des glioblastomes

- L'immunothérapie par anticorps immunomodulateurs
- L'immunothérapie par vaccination
- L'immunothérapie par CAR-T cells.

1.3.3.3.1. L'immunothérapie par anticorps immunomodulateurs

Ce type d'immunothérapie a pour but de réactiver l'immunité anti-tumorale en modulant les récepteurs de la synapse immunologique. Il implique des anticorps spécifiques de ces récepteurs : anti-CTLA4, Anti-PD-1, Anti-PDL-1.

Cette approche a déjà montré une claire efficacité dans les cancers du poumon (36,37), le mélanome (38), le sein (39), la vessie (40) par exemple.

Plusieurs essais de phase III ont testé l'immunothérapie pour le glioblastome.

En situation initiale, considérant l'efficacité plus limitée du Temozolomide dans la population des patients MGMT non méthylés, le Nivolumab (anticorps anti-PDL-1) a été comparé au Temozolomide en association à la radiothérapie (9). Sur les 560 patients randomisés, la survie globale était meilleure dans le groupe Temozolomide. La médiane était de 13,4 mois dans le groupe Nivolumab et 14,9 mois dans le groupe Temozolomide (HR=1,31 ; IC95% [1,09-1,58] p = 0,0037). Les survies sans récurrence et la réponse au traitement étaient les mêmes dans chacun des groupes.

Réciproquement, dans le cas de cancers MGMT méthylés, le même groupe international a comparé en situation initiale le Temozolomide à l'association Temozolomide + Nivolumab avec la radiothérapie (10). Sur les 716 patients randomisés, la survie sans récurrence et la survie globale étaient les mêmes. La survie globale médiane était de 28,9 mois dans le groupe Nivolumab et 32,1 mois dans le groupe Placebo (HR=1,1 ; IC95% [0,9-1,3]).

Dans la situation des glioblastomes en récurrence le Nivolumab a été comparé au Bevacizumab (Anticorps anti-VEGF, utilisé aux USA en 1^{ère} ligne à la récurrence) (41). Sur les 369 patients randomisés, la survie globale était la même dans les 2 groupes. La médiane était de 9,8 mois dans le groupe Nivolumab et 10,0 mois dans le groupe Bevacizumab (HR, 1.04 ; IC95% [0,83-1,30] p = 0,76).

L'immunothérapie par anticorps anti-PDL-1 n'a pas montré d'efficacité, en situation initiale ou en récurrence.

1.3.3.3.2. L'immunothérapie par vaccination

Concernant la vaccination, après certains espoirs déçus en ce qui concerne le ciblage de l'antigène spécifique EGFRvIII, un essai semble prometteur en utilisant un lysat de cellules tumorales.

La première approche par vaccination spécifique implique de cibler un antigène idéalement spécifique de tumeur, ou du moins très surexprimé dans la tumeur. L'EGFRvIII est retrouvé dans 20-30% des glioblastomes, et l'amplification d'*EGFR* est retrouvée dans 40% des glioblastomes (42). La protéine de l'EGFRvIII présente un domaine extracellulaire tronqué, et donc potentiellement une immunogénicité spécifique. Un vaccin avec un peptide spécifique, le Rindopepimut® a été testé dans plusieurs cohortes de patients chez lesquels l'EGFRvIII avait été détecté dans la tumeur (43,44). La comparaison par rapport à une cohorte historique était en faveur d'un traitement par vaccination. L'essai ACT-IV, de phase III conduit sur 745 patients avec un gliome EGFRvIII entre 2012 et 2014 et comparant la vaccination vs un véhicule en concomitance de la radiochimiothérapie n'a pas pu montrer d'amélioration de la survie (20,1 mois vs 20,0 mois ; HR=1,01, IC95% [0,79–1,30] p=0,93)(42).

Une autre stratégie est la vaccination sur lysat tumoral. Cette stratégie de vaccination ne présage pas des antigènes qui seront trouvés dans la tumeur. Liau et al. (8) ont proposé de tester cette stratégie de vaccination dans un essai contrôlé non randomisé sur 331 patients. Le lysat tumoral récupéré lors de la chirurgie était mis en contact avec des cellules du patient enrichies en cellules dendritiques activées (DCVax-L). Ce produit était injecté en sous cutané 3 fois à 10 jours d'intervalle après la fin de la radiothérapie puis à 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30 mois après la fin de la radiothérapie. La méthodologie initialement prévue pour randomiser 2:1 (DCVax-L /Placebo) avec une évaluation de la PFS a été secondairement modifiée pour comparer les patients effectivement vaccinés avec des patients des groupes RT+Temozolomide d'essais randomisés publiés précédemment. Les résultats montrent une amélioration de la survie globale (HR=0,80, IC95% [0,00–0,94] p=0,002). La survie médiane est de 16,5 mois dans les séries contemporaines externes et de 19,3 mois dans le groupe vacciné. Si ce résultat est intéressant et prometteur, cet article peut prêter le flanc à plusieurs limitations, en plus de celles du changement de critère d'évaluation principal en cours d'essai. Par ailleurs, la randomisation après la fin de la radiothérapie induit un biais de survivants, par rapports aux autres séries 'historiques'. Le choix des essais utilisés pour les comparaisons n'est

pas non plus justifiés. On peut s'interroger sur l'absence de l'essai de Stupp et al. actualisé en 2009 (5) qui présente le plus long suivi. Dans cet essai, la survie globale est meilleure que dans les essais utilisés dans l'article de Liau et al. (8). Il paraît difficile de valider l'efficacité de ce traitement sur cet essai.

La vaccination sur lysat tumoral est une piste qui reste à confirmer par des essais bien conduits.

1.3.3.3.3. L'immunothérapie par CAR-T cells.

Les Chimeric Antigen Receptor T cells (CAR T) sont actuellement principalement utilisées en hématologie, constituant une avancée majeure sur ce type de pathologie avec atteinte initialement monogénique (45,46). Dans le glioblastome et les tumeurs solides, plus hétérogènes, cette stratégie est à l'étude. Les CAR sont des récepteurs synthétiques qui permettent aux lymphocytes T une reconnaissance spécifique sur des antigènes spécifiques de tumeur. Avec l'EGFRvIII évoqué plus haut, l'IL13R α 2 est l'autre antigène bien caractérisé dans les glioblastomes (47). Ce récepteur est surexprimé dans 60% des glioblastomes et permet d'éviter l'apoptose induite par la fixation de l'IL4R α sur le complexe IL13R α 1-IL13. Ce récepteur IL13R α 2 est aussi exprimé sur les cellules de cerveau sain. Dans une étude publiée dans le New England Journal of Medicine(48) ne concernant qu'un patient, Brown et al. ont montré que l'injection de CAR-T au contact de la tumeur (intra-tumoral, ou intraventriculaire pour les lésions périventriculaires) pouvaient entraîner une réponse tumorale locale prolongée. La limite était l'absence d'action à distance dès lors qu'il y avait du parenchyme cérébral qui s'interposait. D'autres études sont en cours mais encore sur de faibles effectifs (de 3 patients à 92 prévus dans ces études) (47). Les résultats sont en attente.

L'intérêt des CAR-T cells n'a pas encore été montré pour le glioblastome.

1.3.3.4. Intérêt des anti-angiogéniques

Les anti-angiogéniques sont une piste très pertinente dans le glioblastome puisque :

- L'hypoxie est un facteur connu de radiorésistance dans tous les modèles tumoraux, or la radiothérapie est un traitement indispensable du glioblastome
- L'hypoxie est particulièrement présente dans le glioblastome

1.3.3.4.1. L'hypoxie : un facteur de radiorésistance à toute cellule tumorale.

L'hypoxie induit une radiorésistance. Ce phénomène est décrit depuis les tout débuts de la radiobiologie. Très tôt, d'un point de vue technique, des irradiations avec et sans oxygène étaient réalisables. Dès les années 1950. Gray et al. ont ainsi pu montrer en mesurant les anaphases normales 24h après l'irradiation que la radiothérapie sur des fibroblastes en l'absence d'oxygène était moins efficace que celles en présence d'oxygène (49). De la même façon, ils ont montré que sur des cellules des « Ehrlich ascites tumour cells », implantées en sous cutané, il existait une meilleure efficacité de la radiothérapie en inhalation d'oxygène pur : une dose de 10Gy avec hyperoxygénation avait la même efficacité que 15Gy en air ambiant. Détail croustillant : l'unité utilisée dans la publication était le Rad, puisqu'il s'agit du M^r Gray qui a donné son nom à l'unité actuellement utilisée en clinique.

1.3.3.4.2. L'hypoxie dans le glioblastome

En ce qui concerne le glioblastome, il existe une abondante littérature pour caractériser l'hypoxie(50). De façon intéressante, elle est détectable en IRM, mais aussi par des traceurs couplés à des rapporteurs radioactifs, tel le F-MISO qui se fixe sur les zones hypoxiques. L'utilisation de ces mesures d'hypoxie pourrait permettre de cibler spécifiquement dans ces zones en y augmentant la dose de radiothérapie.

Collet et al.(51) suggèrent que cette cartographie permettrait d'adapter les traitements, et notamment les volumes de traitement. Effectivement, comme vu plus haut, l'hypoxie diminue la radiosensibilité, et une augmentation de la dose de radiothérapie pourrait restaurer cette sensibilité.

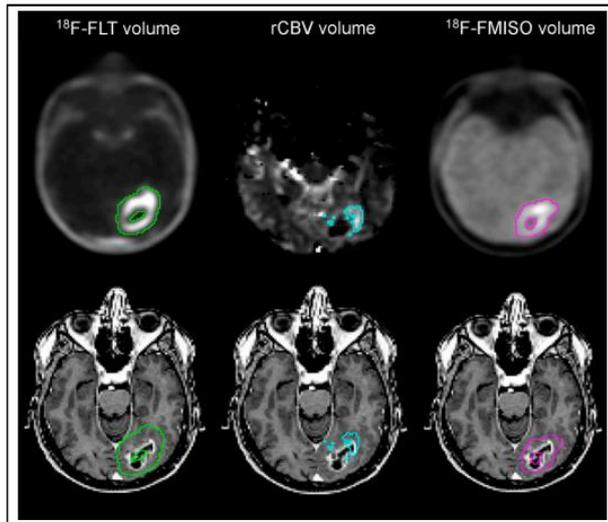


Figure 3 : Visualisation des zones d'hypoxie par IRM fonctionnelle et imagerie métabolique. A gauche, le ^{18}F -FLT est un marqueur de prolifération (rose). Au milieu, le rCBV est un paramètre d'acquisition IRM permettant de détecter l'hypervascularisation (en cyan). A droite, le ^{18}F -MISO est un marqueur d'hypoxie. D'après Collet et al. (51)

L'hypoxie tumorale peut être évaluée de façon non invasive par imagerie fonctionnelle (IRM) ou Métabolique (TEP).

1.3.3.4.3. Antiangiogéniques dans le traitement du glioblastome : de *l'in vitro*, à la phase 3. Histoire d'une déception.

La trajectoire du Bevacizumab (Ac Anti-VEGF) dans le glioblastome illustre bien la difficulté de la recherche translationnelle, particulièrement dans le glioblastome.

A titre d'exemple de modèle murin « réussi », Mac Gee et al. (52) ont montré la pertinence de l'effet de l'hypoxie sur la radiorésistance dans un modèle murin greffé orthotopiquement par des cellules U87. Dans ce modèle, l'ajout de Bevacizumab entraînait une diminution de l'hypoxie dans les tumeurs des souris greffées, notamment 2 jours après l'injection de Bevacizumab. Par contre, l'hypoxie était revenue 5 jours après l'injection. La détection de l'hypoxie se faisait par marquage au Pimonidazole, un marqueur injecté aux souris 1 heure avant sacrifice. La radiothérapie a été délivrée aux souris soit en même temps que l'injection de Bevacizumab soit 2 jours après. Le suivi des tumeurs par bioluminescence montrait une diminution maximale de la croissance tumorale pour les tumeurs injectées 2 jours avant significativement différentes des tumeurs injectées concomitamment avec le Bevacizumab ou 5 jours avant. La radiosensibilité avait donc été majorée par un anti-angiogénique et cette majoration était concomitante de la diminution de l'hypoxie.

Dans des essais de phase II de patients en récurrence de glioblastome, le Bevacizumab, seul ou en combinaison avec de l'Irinotecan a permis des réponses objectives de allant de 28,2% à

71% (53,54) selon les études et les critères utilisés. De fait, il s'agit actuellement de la première ligne de traitement de la récurrence aux USA, bien qu'il n'ait pas été montré de bénéfice en survie. En situation de récurrence, l'utilisation de ce produit en pratique clinique aboutit souvent à une amélioration fonctionnelle transitoire, intéressante pour le patient, sans amélioration de la survie cependant.

Cette approche prometteuse de radiosensibilisation par le Bevacizumab a été testée par 2 essais de phase III chez l'homme en première ligne de prise en charge du glioblastome. Les résultats ont été discordants en ce qui concerne l'efficacité en survie sans récurrence, mais concordant concernant l'absence d'effet sur la survie globale. Dans l'étude de promotion industrielle (Roche®), Chinot et al. (7) ont randomisé 921 patients en première ligne. Le traitement consistait en une radiothérapie de fractionnement classique (60Gy, 2Gy/fraction, 5j/7) et Temozolomide (75mg/m² pour 6 semaines en concomitant + 6 cycles adjuvants 150-200mg/m², pendant 5 jours toutes les 4 semaines) et randomisait Bevacizumab débuté depuis le début de la radiothérapie (10mg/kg/2 semaines) puis en entretien (15mg/kg toutes les 3 semaines) vs placebo. Dans cette étude, la survie globale était la même : Hazard Ratio = 0.88 IC95% [0.76-1.02], p=0.10. Par contre, il existait une amélioration de la survie sans récurrence : HR=0.64 IC95% [0.55-0.74], p<0.001. La qualité de vie était la même.

Dans l'étude de promotion institutionnelle américaine portée par le RTOG, Gilbert et al. (20) ont randomisé 627 patients en première ligne. Le Bevacizumab était débuté à la 4^{ème} semaine de radiothérapie (10mg/kg/2 semaines) et comparé au placebo. Dans cette étude, la survie globale était aussi la même : Hazard Ratio = 1.13 IC95% [0.93-1.37], (p=0.21). Il existait aussi une amélioration de la survie sans récurrence : HR=0.79 IC95% [0.66-0.94] (p=0.007). L'évaluation des fonctions neurocognitives et de la qualité de vie était moins bonne dans le groupe Bevacizumab que dans le groupe placebo.

Ces 2 études bien menées et dimensionnées ont fait conclure à la communauté scientifique du non-intérêt de cette stratégie par Bevacizumab en première ligne, et en tout cas en association avec la radiothérapie.

Le Bevacizumab n'a pas de place en prise en charge initiale du glioblastome. En 2^{ème} ligne, il peut être utilisé pour améliorer l'état fonctionnel, sans amélioration sur la survie globale.

1.3.4. Place des *champs électriques alternatifs* dans le traitement du glioblastome

C'est une thérapeutique plutôt non conventionnelle qui a apporté un progrès pour le traitement du glioblastome depuis l'essai de Stupp et al. en 2005 (31). Ce traitement est le *Tumor-Treating Fields* (TTF) qui a été consacré par un essai positif sur la survie globale en première ligne de traitement du glioblastome en 2017 (6). Le principe de ce traitement est d'exposer les cellules à un champ électrique alternatif ce qui entraîne une diminution de la mitose par interaction avec le faisceau mitotique(55). Les premiers résultats sur 10 patients montraient des résultats intéressants (56). Par contre, l'essai de phase III, randomisé sur 337 patients, à la récurrence montrait des résultats négatifs puisque la survie sans récurrence et la survie globale étaient strictement superposables (57). Il existait une légère amélioration non significative du taux de réponse qui passait de 9,6% à 14% ($p = 0,19$). Le dispositif porté par les patients consistait en 4 plaques collées sur la peau rasée du crâne permettant de délivrer des champs électriques alternatifs à 200kHz. Ce matériel était relié à une batterie portable et au mieux devait être porté au moins 18h par jour.

Malgré ces résultats décevants, les TTF ont été testées en 1^{ère} ligne de traitement. Dans l'essai de 2017, 695 patients étaient randomisés (2 :1) entre radiothérapie avec TTF et Temozolomide en concomitance et en maintenance vs le même traitement sans TTF. La survie sans récurrence (objectif principal) était significativement meilleure pour le groupe TTF : HR=0.63 IC95% [0,52-0,76] ($p<0,001$). La médiane passait de 4,0 mois à 6,7 mois. La survie globale (objectif secondaire) était significativement meilleure pour le groupe TTF : HR=0,63 IC95% [0,53-0,76 ; $p<0,001$]. La médiane passait de 16,0 mois à 20,9 mois. L'enchaînement d'un résultat négatif à la récurrence, puis positif en première ligne mériterait d'être validé par des études indépendantes sous promotion académique. Ce traitement s'implante au rythme de développement de l'entreprise et de ses moyens à assumer les soins requis sur des bassins de population de plus en plus grands. Actuellement, le dispositif est accessible aux Etats Unis, en Allemagne et le sera prochainement en France.

Les *Tumor-Treating Fields* devraient devenir le standard de traitement en première ligne en association au Temozolomide et à la radiothérapie dans les années qui viennent.

1.3.5. Difficulté de la recherche translationnelle dans le traitement du glioblastome

L'effort de la communauté scientifique médicale a été colossal au cours des dernières années, avec un résultat d'efficacité qui reste décevant. De 2005 à 2022, 400 essais cliniques avec 32 000 patients ont été inclus (58). Dans cet intervalle, seul un essai de phase III randomisé a montré son efficacité (6) en prise en charge initiale, et aucun essai en phase de récurrence. L'essai de vaccination paru récemment est aussi porteur d'espoir (8), mais doit être confirmé. Dans un article de revue, Alexander et Cloughesy (58) analysent les études préliminaires des phases II qui ont conduit aux phases III sans atteindre l'objectif de la survie globale. L'exemple de l'échec du Bevacizumab est particulièrement troublant quand on connaît l'importance du microenvironnement tumoral pour le développement du glioblastome (59).

Dans les difficultés évoquées, les auteurs évoquent l'utilité discutable des modèles précliniques et des essais de phase I qui surestiment fortement l'efficacité de succès et peuvent conduire à des échecs tardifs. Le caractère spécifique du site de développement de la tumeur à savoir le cerveau, ainsi que les caractéristiques propres du glioblastome sont aussi évoquées. La capacité à délivrer le produit d'intérêt (*drug delivery*) par la présence de la barrière hémato encéphalique est aussi un obstacle au traitement. La difficulté à l'analyse de la pharmacodynamie et pharmacocinétique en condition réelle complique aussi l'analyse des échecs des traitements.

Les auteurs soulignent aussi la faible association entre la réponse clinique, et même de la PFS avec la survie globale, comme on l'a déjà mis en évidence plus haut (7,11,53). Cela complique la transposition d'essai précliniques et des essais de phase précoce pour justifier d'essais de large ampleur. Enfin, le caractère peu immunogénique particulier peut expliquer l'échec des essais d'immunothérapie (41,42), à l'exception de l'essai récent de Liao et al. (8). Une bonne stratégie en oncologie est le repositionnement de drogues utilisées dans d'autres cancers. Malheureusement, le Temozolomide n'est prescrit quasiment que pour les tumeurs cérébrales, à l'exception des tumeurs neuro-endocrines qui sont des tumeurs rares (60) et du mélanome (61), et les données d'association avec les autres drogues disponibles manquent, obligeant à des essais préliminaires de phase I d'association.

Les limitations des essais préliminaires servant justification aux essais de phase III (sans bénéfice finalement démontré) sont de plusieurs types :

- Un bras de traitement comparé à une série historique
- La PFS comme critère de jugement principal
- La prise de contraste tumorale comme point de jugement (dans le cas du Bevacizumab)

Tous ces éléments concourent à expliquer la négativité des essais de phase III. Ces faiblesses dans les essais préliminaires doivent être repérées et doivent susciter la mise en place d'autres essais bien construits avant de faire les essais de validation.

Confirmer les études précliniques et les essais précoces (phase I et II) dans la prise en charge du glioblastome dans des essais comparatifs de phase III nécessite une rigueur méthodologique particulière.

Les efforts intenses de la communauté scientifique et médicale, et la difficulté obtenir un gain en survie pour le patient, amènent à envisager d'autres voies de radiosensibilisation.

2. 5-ALA ET GLIOBLASTOME

L'étude de Stummer et al. (11) qui comparait la chirurgie guidée par la fluorescence après prise de 5-ALA et la chirurgie classique a servi de point de départ à cette thèse. En effet, elle montre une accumulation préférentielle des porphyrines dans les glioblastome. Si les porphyrines ont un effet radiosensibilisant, leur ajout à la radiothérapie permettrait d'ajouter un ciblage biologique (accumulation préférentiel de porphyrines) à un ciblage spatial (radiothérapie).

2.1. Voie de biosynthèse de l'hème

L'excès d'apport de 5-ALA exogène entraîne une formation excessive de PpIX. La voie de biosynthèse de l'hème une voie métabolique conservée. Quels sont les mécanismes biochimiques impliqués ?

La voie de biosynthèse de l'hème est indispensable à la vie des cellules humaines (62). L'hème couplé à l'hémoglobine assure la fonction de transport d'oxygène dans les cellules érythroïétiques. L'hème dans les cytochromes participe aux réactions d'oxydo-réduction dans les cellules hépatiques. Les protéines couplées à l'hème sont appelées hémoprotéines et appartiennent à la famille des métalloprotéines.

La biosynthèse de l'hème est d'abord cytosolique puis comprend des étapes mitochondriales. Le substrat initial est l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA).

La synthèse du 5-ALA est catalysée par une enzyme, l'ALA Synthase (ALAS). Cette enzyme est codée par 2 gènes dont l'expression varie selon les tissus. L'*ALAS1* (chromosome 3) est ubiquitaire. Dans le foie, l'activité de l'*ALAS1* est limitée par la quantité d'hème. L'*ALAS2* (Chromosome X) est spécifique des cellules érythroïétiques. Dans ces cellules, la régulation négative de l'*ALAS2* se fait, non pas par la quantité d'hème, mais par la quantité en fer disponible. *ALAS1* et *ALAS2* sont les enzymes régulatrices de la voie de biosynthèse de l'hème. Ainsi l'apport exogène de 5-ALA entraîne activation permanente des enzymes jusqu'à épuisement du substrat.

Quatre molécules de 5-ALA vont ensuite être transformées en hème à travers 9 réactions enzymatiques successives. La dernière étape est le couplage de l'atome de fer à la protoporphyrine IX dans la matrice mitochondriale.

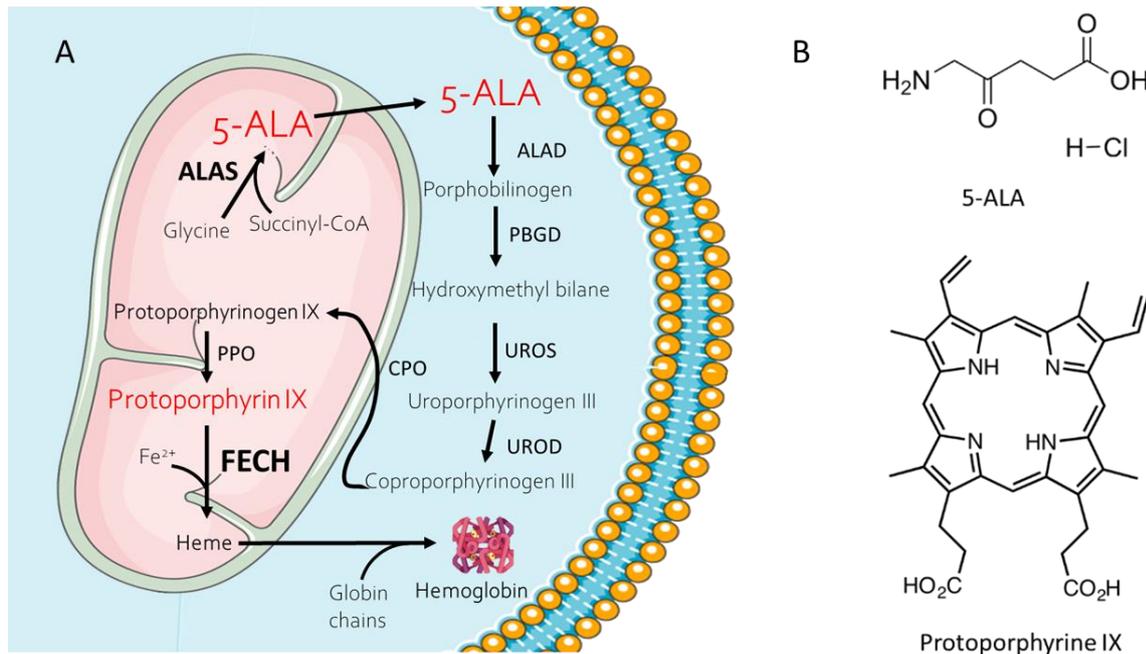


Figure 4 : A. Voie de Biosynthèse de l'hème. Dans cette voie de biosynthèse, l'ALA synthase est l'enzyme régulée permettant de contrôler la quantité totale d'hème synthétisé. L'enzyme limitante de la voie de biosynthèse de l'hème est la Ferrochelatase. En cas d'apport, non régulé, de 5-ALA, la PpIX s'accumule, avant d'être progressivement transformée en hème. **B. Structure chimique du 5-ALA et de la protoporphyrine IX.** ALAS : 5-aminolevulinic acid synthase, ALAD : 5-aminolevulinic acid hydratase, PBGD : porphobilinogen deaminase, UROS : uroporphyrinogen III synthase, UROD : uroporphyrinogen decarboxylase, CPO : coproporphyrinogen oxidase, PPO : protoporphyrinogen FECH : ferrochelatase

L'enzyme limitante est la Ferrochelatase (FECH). Son action consiste à coupler l'atome de fer ferreux Fe²⁺ à la PpIX (63). La conséquence d'une activité limitée de la FECH est une accumulation de PpIX, son substrat, lors de l'apport exogène de 5-ALA. Cependant, la FECH est une enzyme qui reste active, et l'accumulation de la PpIX est transitoire puisque progressivement couplée au fer. Ainsi, après apport exogène de 5-ALA, on constate dans l'heure suivante une augmentation de la concentration en PpIX, puis une diminution jusqu'à ses valeurs physiologiques.

L'excès de 5-ALA exogène court-circuite l'étape de l'ALA Synthase, enzyme régulatrice de la voie, et provoque une accumulation de PpIX, substrat de la Ferrochelatase, enzyme limitante de cette voie métabolique.

2.2. Localisation de la PpIX dans la cellule.

La PpIX est donc produite dans la lumière interne de la mitochondrie, et en excès lors de la mise en présence de 5-ALA de façon exogène. Où se répartit cette PpIX en excès au niveau cellulaire ? Chen et al. (64) ont pu montrer que la PpIX s'accumule quantitativement le plus dans le réticulum endoplasmique (RE), puis les mitochondries, puis les lysosomes. Il y a avait une colocalisation de l'organite cellulaire (RE/mitochondries/lysosomes) et de la PpIX. Dans leur modèle, la PpIX n'est pas détectable dans le noyau. De façon intéressante, dans cette étude qui portait des cellules DHL (lymphome folliculaire), la technique utilisée pour la détection de la PpIX était de la fluorescence à 2 photons. L'excitation par un laser femtoseconde était à 820nm, et le spectre de détection autour de 620nm. La longueur d'onde d'excitation étant plus basse que la longueur d'onde d'excitation normale (autour de 404nm), cette technique permettait d'éviter d'avoir un important photobleaching et une phototoxicité. L'autre avantage est aussi un accès à des profondeurs d'imagerie plus importantes, du fait d'une longueur d'onde plus longue et plus pénétrante. On pourra noter que cette localisation mitochondriale et cytoplasmique de la PpIX induit par le 5-ALA était la même pour le Photofrin® (autre photosensibilisant comme la PpIX) et commun à d'autres modèles cellulaires, notamment des cellules de fibrosarcome radio-induits, (RIF-1 et RIF-8) (65). Dans des cellules de lignées de tumeurs cérébrales (9L ou 6C), cette localisation mitochondriale a aussi été montrée (66).

On pourrait noter que cette localisation extra-nucléaire pourrait poser des problèmes de potentialisation de la radiothérapie dans la mesure où une des cibles principales de la radiothérapie est l'ADN(67).

La PpIX en excès est donc préférentiellement localisée dans le réticulum endoplasmique, les mitochondries et les lysosomes, mais pas dans le noyau.

2.3. Facteur influençant l'accumulation de PpIX dans les cellules de glioblastomes

Dans les études préliminaires de la phase III de Stummer et al. (11) évoqué plus haut qui comparait chirurgie classique du glioblastome, et chirurgie guidée par la fluorescence des études préliminaires avaient montré une accumulation spécifique de la PpIX dans les cellules tumorales comparées au tissu parenchymateux sain. Une illustration est particulièrement parlante dans l'article paru dans le Journal of Neurosurgery en 2000 (68) et je l'ai reproduite

ci-dessous (figure 5). On peut constater une accumulation plus importante dans la tumeur que dans le parenchyme cérébral qui apparaît en bleu.

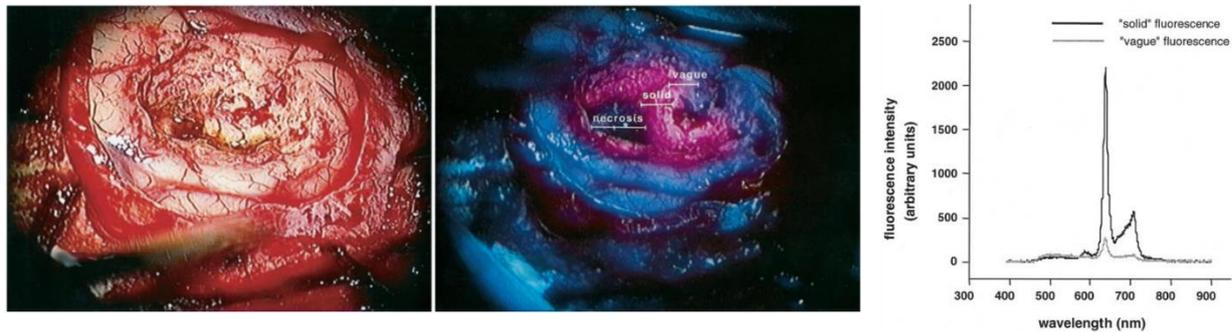


Figure 5 : Vue peropératoire en A. lumière blanche B. après illumination en bleu. L'intensité de fluorescence est définie comme solide ou vague. C. Aspect spectroscopique quantitatif selon la zone prélevée (solide ou vague), montrant les pics à 635nm et 704nm de la PpIX. D'après Stummer et al. (68)

Dans une revue récente exhaustive consacrée à cette question complexe, Mazurek et al. (69) proposent quelques pistes pour expliquer l'accumulation différentielle de porphyrines dans les cellules tumorales :

La prévision de l'accumulation spécifique dans le glioblastome est difficile à prévoir *a priori*. Cette modification peut être due à l'expression et l'activité des enzymes de biosynthèse de l'hème. Sachant que la prolifération cellulaire est un facteur de modification desdites enzymes (notamment ALAS, PBGD, UROS et FECH). Ce métabolisme est affecté par ABCB6 et ABCG2, qui sont des protéines d'efflux. Une certaine altération de la barrière hémato encéphalique est nécessaire pour laisser passer le 5-ALA, et que cette rupture est variable selon les tumeurs. Pour illustrer la complexité de cette question, l'influence de l'hypoxie a aussi été mise en évidence par Itaha et al (70) sur la concentration de PpIX suite à l'exposition de 5-ALA. Dans un premier temps, les auteurs ont cultivé 6 lignées cellulaires en conditions normoxiques (21% d'O₂), ou hypoxiques (5% O₂). La mesure par qRT-PCR a été faite sur les enzymes de biosynthèse de l'hème : PEPT1 et PEPT2, ALAS1 et ALAS2, ALAD, UROS, UROD, CPOX, PROX et FECH. Globalement, sur ces lignées, les enzymes de biosynthèses de l'hème étaient significativement surexprimées en conditions hypoxiques (ALAS1, ALAD, UROS, UROD, CPOX, PPOX et FECH notamment). Lorsque les cellules étaient exposées au 5-ALA, la concentration en PpIX était moins importante dans les cellules hypoxiques. Cependant, cette baisse d'accumulation de PpIX ne s'accompagnait d'une augmentation de la Dose Létale 50% à l'illumination à 404nm que sur 2 lignées sur les 6 après incubation à 0.3mM de 5-ALA pendant

4h. Ce dernier exemple particulièrement adapté au glioblastome, tumeur notoirement hypoxique montre qu'en plus, l'impact de l'accumulation de PpIX ne se traduit pas forcément par un effet phénotypique (ici la réponse à la photothérapie).

Les mécanismes d'accumulation préférentiels de PpIX dans les cellules gliales sont un phénomène classique, multifactoriel, et difficilement prévisible *a priori*.

2.4. Radiosensibilisation par le 5-ALA dans le glioblastome

L'accumulation de porphyrines spécifiquement dans les cellules tumorales suite à l'exposition de 5-ALA pourrait être combinée à la spécificité spatiale de la radiothérapie. Cette association 5-ALA/radiothérapie été essayé dans de nombreux modèles tumoraux, et notamment des modèles précliniques de glioblastome.

Yamamoto et al. (66) retrouvent un effet du 5-ALA (1mM, 4h) en test clonogénique en dose unique sur la lignée 9L (gliosarcome) mais pas sur la lignée C6 (Gliome). En faisant une dose fractionnée de 2Gy par séance sur 4 séances au total, les auteurs retrouvaient un effet statistiquement significatif ($p < 0,05$) entre les fractions survivantes avec 5-ALA+RT et RT seule à 18% vs 13% pour la lignée 9L, et 24% vs 22% pour la lignée 6C. Cet effet reste cependant modeste. Pour aller plus loin, cette même équipe a étudié cet effet *in vivo* avec un modèle murin (71). Dans ce modèle, la lignée cellulaire 9L, celle qui avait montré le plus de radiosensibilisation au 5-ALA a été utilisée, et implantée en sous cutanée à 4 groupes de rats (N=5 à 7/bras). Le traitement consistait en 1 injection intra veineuse par jour de 5-ALA (100mg/kg) et l'irradiation était réalisée 3h après à la dose de 2Gy, tous les jours sur 5 jours, jusqu'à la dose de 10Gy. Il existait une inhibition de croissance des tumeurs traitées par irradiation et 5-ALA par rapport aux tumeurs seulement irradiées ($p < 0,01$). Il existait aussi un effet propre du 5-ALA avec une diminution de la taille tumorale ($p < 0,05$). Il pourrait exister un effet additif, davantage qu'un effet potentialisateur dans cette étude. Les auteurs notaient une augmentation du marquage tumoral par la protéine Iba-1, marqueur de macrophages dans les tumeurs traitées par irradiation+5-ALA par rapport à chacune des conditions seules suggérant un rôle de l'immunité dans l'effet de l'association 5-ALA et radiothérapie. Enfin, on pourra noter dans ces 2 études ce que j'appellerai un biais de criblage qui consiste à n'essayer le traitement expérimental que sur les lignées qu'on a sélectionné pour être sensible de telle façon qu'on fait tout pour que ça fonctionne, au lieu d'une approche plus statistique où on devrait moyenner avec les situations où ça ne fonctionne pas.

Récemment, Takahashi et al. (72) ont étudié l'effet du 5-ALA dans un modèle se rapprochant des conditions cliniques. L'étude portait sur des lignées tumorales humaines « classiques » de glioblastome, en l'occurrence U251MG et U87MG. Les tumeurs étaient implantées sur le crâne en sous-cutané, la radiothérapie était délivrée de façon quotidienne, à la dose de 60Gy en 30 fractions de 2G à 150kV, et le 5-ALA était donné par voie orale. Sur le plan de l'efficacité, les tumeurs étaient surveillées par mesure directe et par bioluminescence. Il existe une décroissance plus rapide dans le groupe avec le RT+5-ALA à la dose la plus élevée (120mg/kg), davantage que dans le groupe RT+5-ALA à la dose la plus faible (60mg/kg), et que le groupe RT seule. Cet effet est plus notable dans pour la lignée U251MG que dans la lignée U87 qui diminue fortement de taille à l'irradiation. Ceci tient probablement compte d'une irradiation à des doses plus élevées que dans les autres publications (66,73–75). En fin d'expérience, il existe aussi une réaugmentation de la taille tumorale non significative pour le groupe RT seule dans le modèle avec la greffe d'U87.

Dans le glioblastome, certaines études montrent des résultats intéressants sur la croissance tumorale, avec des modèles qui restent à améliorer sur le plan de la transposabilité clinique.

OBJECTIFS

Au moment où ce travail de thèse a débuté, la propriété de radiosensibilisation des glioblastomes par les porphyrines était séduisante, mais sa démonstration préclinique manquait de modèle pertinent. Notre démarche a consisté à utiliser un modèle qui serait aussi proche que possible des conditions d'irradiation humaine.

Pour éviter un biais de criblage, nous avons décidé de tester dans nos expériences la lignée dérivée de tumeur P3, la mieux caractérisée, sans sélectionner *a priori* la lignée pour laquelle le résultat serait favorable. Les résultats sont présentés dans l'article publié dans la revue *Cancers* ci-après.

Les conditions d'irradiation ont été aussi testées : en sphéroïde ou en monocouche, en kV ou en MV. Ces expériences ont été répétées sur d'autres lignées de tumeurs cérébrales humaines, puis sur des lignées tumorales de carcinomes et de mélanome.

Enfin, une approche de modélisation et de mesure physique de l'effet Tcherenkov a été étudié en collaboration avec l'Institut Bergonié et le CELIA.

Article

An Orthotopic Model of Glioblastoma Is Resistant to Radiodynamic Therapy with 5-AminoLevulinic Acid

Charles Dupin ^{1,2,*}, Jade Sutter ¹, Samuel Amintas ^{1,3}, Marie-Alix Derieppe ⁴, Magalie Lalanne ¹, Soule Coulibaly ², Joris Guyon ^{5,6}, Thomas Daubon ⁷, Julian Boutin ^{1,8}, Jean-Marc Blouin ^{1,8}, Emmanuel Richard ^{1,8}, François Moreau-Gaudry ^{1,8}, Aurélie Bedel ^{1,8}, Véronique Vendrely ^{1,2} and Sandrine Dabernat ^{1,8,*}

¹ BRIC (BoRdeaux Institute of onCology), UMR1312, INSERM, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

² Radiotherapy Department, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

³ Tumor Biology and Tumor Bank Laboratory, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

⁴ Animalerie Mutualisée, Service Commun des Animaleries, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

⁵ INSERM, BPH, U1219, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

⁶ Service de Pharmacologie Médicale, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

⁷ CNRS, IBGC, UMR5095, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

⁸ Biochemistry Department, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux, France

* Correspondence: charles.dupin@u-bordeaux.fr (C.D.); sandrine.dabernat@u-bordeaux.fr (S.D.)



Citation: Dupin, C.; Sutter, J.; Amintas, S.; Derieppe, M.-A.; Lalanne, M.; Coulibaly, S.; Guyon, J.; Daubon, T.; Boutin, J.; Blouin, J.-M.; et al. An Orthotopic Model of Glioblastoma Is Resistant to Radiodynamic Therapy with 5-AminoLevulinic Acid. *Cancers* **2022**, *14*, 4244. <https://doi.org/10.3390/cancers14174244>

Academic Editors: Margarida Julia-Sape and Sheila K. Singh

Received: 30 March 2022

Accepted: 27 August 2022

Published: 31 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Radiosensitization of glioblastoma is a major ambition to increase the survival of this incurable cancer. Before surgery, oral administration of 5-aminolevulinic acid leads to the accumulation of fluorescent protoporphyrin IX, preferentially in the cancer cells rather than in the normal brain. This property is used to optimize the resection of the tumor under fluorescent light. Protoporphyrin IX may also carry radiosensitization activity. To test this hypothesis, we designed a robust murine preclinical model of glioblastoma with tumors implanted into the brain of mice treated by fractionated radiotherapy, as for humans. Despite the specific accumulation of porphyrins in glioblastoma, there was no radiosensitization. We confirmed these results in in vitro 3D patient-derived spheroids. Radiosensitization by molecules such as porphyrins needs more exploration for application in glioblastoma treatment.

Abstract: Radiosensitization of glioblastoma is a major ambition to increase the survival of this incurable cancer. The 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is metabolized by the heme biosynthesis pathway. 5-ALA overload leads to the accumulation of the intermediate fluorescent metabolite protoporphyrin IX (PpIX) with a radiosensitization potential, never tested in a relevant model of glioblastoma. We used a patient-derived tumor cell line grafted orthotopically to create a brain tumor model. We evaluated tumor growth and tumor burden after different regimens of encephalic multifractionated radiation therapy with or without 5-ALA. A fractionation scheme of 5 × 2 Gy three times a week resulted in intermediate survival [48–62 days] compared to 0 Gy (15–24 days), 3 × 2 Gy (41–47 days) and, 5 × 3 Gy (73–83 days). Survival was correlated to tumor growth. Tumor growth and survival were similar after 5 × 2 Gy irradiations, regardless of 5-ALA treatment (RT group (53–67 days), RT+5-ALA group (40–74 days), HR = 1.57, *p* = 0.24). Spheroid growth and survival were diminished by radiotherapy in vitro, unchanged by 5-ALA pre-treatment, confirming the in vivo results. The analysis of two additional stem-like patient-derived cell lines confirmed the absence of radiosensitization by 5-ALA. Our study shows for the first time that in a preclinical tumor model relevant to human glioblastoma, treated as in clinical routine, 5-ALA administration, although leading to important accumulation of PpIX, does not potentiate radiotherapy.

Keywords: glioblastoma; radiotherapy; 5-AminoLevulinic Acid (5-ALA); protoporphyrin IX; radiodynamic therapy

1. Introduction

Glioblastoma (GM) is the most common primary malignant brain tumor. Since 2005 and temozolomide concomitant treatment and adjuvant to radiotherapy (RT), no new drug has shown its superiority as a first-line treatment [1]. Many drugs and strategies have been evaluated including anti-angiogenic agents [2,3], the EGFR-tyrosine kinase inhibitor erlotinib [4], anti-PD1 immunotherapy [5], and vaccination of EGFRvIII glioblastoma [6]. Radiosensitizing agents need to reach high concentrations in the tumor tissue, but the blood-brain barrier limits the tumor-to-tissue ratio, particularly in the Magnetic Resonance Imaging non-enhanced zone [7]. Thus, novel radiosensitization agents are still needed and should have the property to go across the blood-brain barrier.

The ubiquitous heme metabolic pathway results in heme synthesis and cytochrome production [8]. The 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) is a heme precursor. The exogenous administration of 5-ALA leads to protoporphyrin IX (PpIX) accumulation because of the saturable activity of the ferrochelatase, the last enzyme of the pathway. PpIX emits fluorescence at 625 nm after excitation at 405 nm. A specific accumulation of fluorescent porphyrins occurs in glioblastoma multiform compared to the normal brain [9]. This property was exploited in a subsequent randomized phase III clinical trial to compare classical neurosurgery to fluorescence-guided surgery after 5-ALA administration. PpIX-guided tumor visualization increased complete resection from 36% to 65%. Progression-free survival was better, however, at the cost of neurological deficits with fluorescence-guided surgery, and this strategy did not improve overall survival [10]. In the same way, a recent review of fluorescence-guided surgery showed an increase in the overall survival and progression-free survival compared to the white light group [11]. Post-operative neurologic outcomes were better, the same, and worse after fluorescence-guided surgery in 42%, 35% and 23%, respectively.

PpIX accumulation after 5-ALA administration is now tested as a photosensitizing strategy in glioblastoma [12,13]. Although PpIX photosensitization of tumor cells is efficient, interstitial phototherapy used to improve in-depth light irradiation could be toxic for healthy surrounding tissue.

Porphyrins may potentialize radiotherapy by radiodynamic therapy [14–16]. If PpIX accumulates specifically in vivo in human glioblastoma, 5-ALA administration could be combined with spatially targeted radiotherapy. Porphyrin accumulation-based radiodynamic therapy showed encouraging results in a head and neck cancer model with the invalidation of Uroporphyrinogen III decarboxylase UROD, the fifth enzyme of the pathway [17]. Moreover, potentiation of radiotherapy was obtained with photofrin II or a hematoporphyrin derivative in a hepatic tumor model [18] and with 5-ALA-induced PpIX accumulation in a melanoma brain metastasis model [14]. In subcutaneous glioblastoma models, 5-ALA treatment, resulting in PpIX accumulation, radiosensitized the U87 and U251 cell lines [14,19,20] and the 9 L gliosarcoma cells [21].

Porphyrin-based radiodynamic therapy for glioblastoma is still in need of efficacy demonstration in a relevant orthotopic xenograft model, with a radiotherapy treatment sequence paralleling that of humans.

The first objective of this work was to establish a robust preclinical patient-derived xenograft (PDX) model, treated with 5-ALA, and irradiated according to a scheme paralleling human routine radiation therapy. Next, we assessed the radiosensitization potential of PpIX after 5-ALA in vitro treatment of 3D spheroids derived from patients' tumors.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The P3 cell line is a patient-derived GM stem cell line from Patient 3 published by Sakariassen et al. [22] and were well characterized by other studies [23–26]. GG6 and GG16 were obtained by Joseph et al. [27] from surgical samples pathologically confirmed as GB and characterized further [26]. GG16 was a giant cell glioblastoma. These 3 cell lines were derived from IDH wild-type GB patients.

P3 cells were transduced by the lentiviral virus coding for Luciferase [28]. Cells were cultured in Neurobasal medium Gibco, with B27 supplementation, Penicillin, streptomycin, sodic heparin, and 20 ng/mL FGFbeta. For the spheroid condition, a constant concentration of 17 $\mu\text{L}/\text{mL}$ medium of Accutase StemPro[®] Gibco was used to avoid cell adhesion to the dishes.

2.2. Spectroscopic Dosage

First, protein extraction was performed using Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, Rockford, IN, USA). The spectroscopic measures were carried out on a HITACHI F-4500 fluorescence spectrophotometer using a 404 nm excitation laser, and an emission spectrum from 550 nm to 700 nm. Each measure was reported to protein concentration. Calibration was set according to a known porphyrin calibrant by ChromSystems[®].

2.3. Porphyrin Concentrations Were Measured by Cytometry

Accury[®] C6Plus Flow Cytometer (Brussels, Belgium) was used. To estimate porphyrin accumulation, mean fluorescence for all cells was quantified, after excitation at 488 nm and signal recovering at 670 LP.

2.4. Spheroid Growth and Viability

To measure the spheroid growth, a brightfield picture was taken for each spheroid, and the area was determined using thresholding with ImageJ software (version 1.53c, Bethesda, MD, USA), as previously described by Guyon et al. [25]. To explore cell viability in spheroids, 4 spheroids were dissociated and incubated for 20 min in PI Propidium Iodide (PI)/Calcein staining dead and alive cells, respectively. Stained cells were analyzed by cytometry. For qualitative evaluation of live/dead cell status in spheroids themselves, whole spheroids were incubated with PI/Calcein for 20 min and imaged in a fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti-U). Spheroid formation assays with GG6 and GG16 resulted in spheroids of various sizes, probably linked to cell adhesion properties. To limit intra-experiment variations, individual spheroids were formed, then exposed to 5-ALA and/or radiotherapy. Their growth was individually followed after treatment.

2.5. Cell Culture for Radiotherapy

To determine the anti-tumor activity of RT combined with 5-ALA, 400,000 dissociated cells were cultured in T25 flasks for 2 days before adding 5-ALA to reach 0.3 mM to 1 mM final concentrations. Flasks were incubated for 4 h in the dark, before irradiation. Radiotherapy was carried out on XENX Xstrahl[®] irradiator, 220 kV, 1 Gy/min, at 0–4–10 Gy. After radiotherapy, spheroids were transferred in 15 mL tubes, centrifuged (2000 \times g for 10 min), washed with PBS, centrifuged again, incubated with accutase[®] for 12 min, counted in Kova cells, resuspended in NB medium and distributed in 100 μL -10,000 cells/well in low binding U-bottom 96 well plates.

All manipulations were done with minimal light exposure after 5-ALA incubation, particularly during the first 24 h.

2.6. Mouse Model

Immunodeficient RAG γ 2C^{-/-} [29] were housed and treated in the animal facility of Bordeaux University ("Animalerie Mutualisée Bordeaux"). All experiments were approved by the "Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI)" (authorization number 2018021416296098), and were carried out in accordance with the approved protocols.

Five spheroids of 10⁴ cells were stereotactically implanted into the right cerebral cortex of each mouse, 2.2 mm left of the bregma at a 3.3 mm depth, using a Hamilton syringe fitted with a needle (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). Tumor growth was monitored by bioluminescence on Biospace Lab[®] after intraperitoneal injection of 150 mg/kg de D-Luc (Promega, E264X) every week on Thursdays.

2.7. Radiotherapy

Radiotherapy was performed under general anaesthesia by isoflurane 2.5% at 220 kV on XENX Xtrahl®. The dose was controlled by a habilitated radiation physicist with EBT3 Gafchromic films (Ashland).

Before each mouse irradiation, position control was performed with a portal image to ensure radiotherapy accuracy. Treatment was done with 2 opposite lateral rectangular fields (15 × 20 mm) at 2.55 Gy/minute. Radiotherapy was performed 3 times a week (Monday-Wednesday-Friday)

Three radiotherapy regimens were evaluated 3 × 2 Gy, 5 × 2 Gy and 5 × 3 Gy, 3 times a week 43 days after orthotopic xenografts, and compared to an untreated group (n = 5/group).

To test the radiosensitization potential of porphyrin accumulation, 3 groups of 11 mice were used. One group received only 5-ALA, one group received radiotherapy alone and the third group received both. We treated the mice on day 39.

5-ALA injection was carried out at a final dose of 100 mg/kg with an intraperitoneal injection of approximately 100 µL, according to the mouse weight. The best window for 5-ALA injection during early tumor growth was determined to obtain a maximum PpIX concentration in tumors and a minimum concentration in healthy tissues, during irradiation.

For the pharmacokinetic experiment, after mouse sacrifice, the brain was collected. Parts of the tumor and the normal frontal brain were dissected. After tissue crushing, the same procedure was applied as for the spheroids, and porphyrin concentrations were spectroscopically determined and normalized to protein concentrations.

2.8. Statistical Analyses

Spheroid sizes and bioluminescence values were compared by ANOVA. Survivals were assessed by log rank tests. To determine the needed sample size to detect a difference between radiotherapy and radiotherapy+5-ALA, we used the results of the pilot study with different radiotherapy regimens (Figure 1). We hypothesized that 5-ALA administration with a 10 Gy (5 × 2 Gy) dose of radiotherapy could decrease the tumor growth as a total dose of 15 Gy (5 × 3 Gy, without 5-ALA) would do. The G*Power 3.1 software (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; <http://www.gpower.hhu.de/>, accessed on 15 December 2020) was used to calculate the appropriate minimum number of animals with an alpha-error type of 5% and a power of 95%. The minimum sample size was 5 mice per group [30]. To assess differences in tumor growth with a power of 99% and an alpha-type error of 2% 11 mice were needed per group.

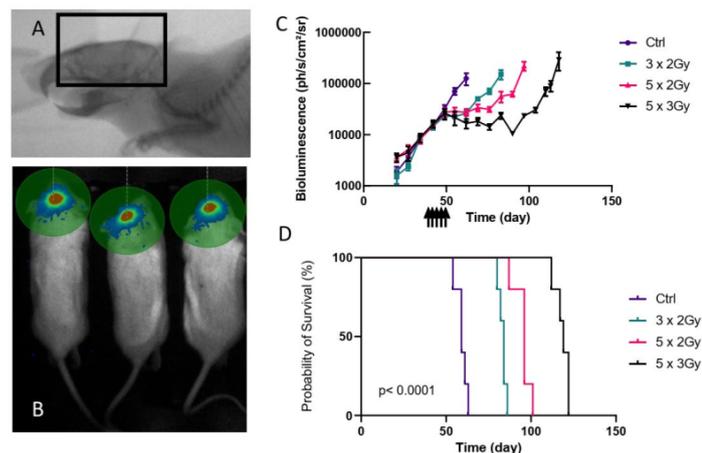


Figure 1. Modelling fractionated radiotherapy. (A) Portal imaging of mouse. The radiation field is delineated into the black rectangle. (B) Example of tumor bioluminescence after intraperitoneal injection

of D-Luciferin showing signal limited to the brain. (C) Tumor follow-up by bioluminescence (Mean \pm SEM). N = 5/group. Arrows indicate the days after implantation when mice received fractionated radiotherapy (6 Gy, 10 Gy, and 15 Gy). The control group did not receive radiotherapy. (D) Survival probabilities ($p < 0.0001$ according to a log rank test).

3. Results

3.1. Orthotopic PDX Treated by Radiotherapy

To test the relevance of 5-ALA treatment in radiodynamic therapy, we needed to develop an orthotopic PDX, treated with whole-brain irradiation (Figure 1A). For this, we used the P3 cells [25]. A unique 10 Gy dose on P3 cell-xenografted mice led to a long survival, suggesting that P3 cells were radiosensitive. To parallel the clinical situation, delivering fractionated doses between 2 and 3 Gy, and keeping in mind that we needed non-curative radiotherapy, we tested three fractionated radiation regimens with potential low and high efficiencies on tumors: 6 Gy (3×2 Gy, three times a week), 10 Gy (5×2 Gy, three times a week) and 15 Gy (5×3 Gy, three times a week). Luminescent P3 cell-derived tumor growth was followed by live bioimaging (Figure 1B). Groups were formed to obtain similar tumor bioluminescence averages 34 days post-implantation, before irradiation initiation, at day 39. The control untreated tumors displayed exponential bioluminescence. All treated groups showed a breakpoint in tumor growth from day 55 compared to the control group, and we observed various delays to regrowth, according to the treatment regimen (Figure 1C). Expectedly, the 6 Gy-treated group had an increase in bioluminescence at day 69 while growth curves of 10 Gy and 15 Gy regimens were statistically different after 76 days (Figure 1C). Thus, irradiation had a suspensive effect, and the time of regrowth depended on the delivered dose.

Survival was statistically different between all groups with clear dose-dependent mortality (Figure 1D) Median survivals were 59 days, 84 days, 96 days, and 119 days for control, 6 Gy, 10 Gy, and 15 Gy groups, respectively. Only one mouse of the 10 Gy group died during the survival span of the 6 Gy group. Overall, the groups displayed strong homogeneity in survival with death occurring in non-overlapping periods. Thus, mice outcomes strictly paralleled tumor regrowth.

In conclusion, to maximize the impact of 5-ALA treatments in combination with fractionated radiotherapy, the regimen of 10 Gy appears the best as it exposed tumor cells five times to the treatment. In addition, it delivered radiotherapy at 2 Gy/fraction like in the Stupp et al. protocol, routinely used in clinics [31].

3.2. Defining the Time to Inject 5-ALA before Irradiation

There is a delay between 5-ALA treatment and PpIX accumulation in tumor cells [10,32,33]. To determine the best window of irradiation post-5-ALA injection, 5-ALA was injected intraperitoneally and mouse brains were collected at different time points to quantify the porphyrin content of each tumor and its normal surrounding tissues. Porphyrins accumulated preferentially in tumors compared to the normal brain as soon as 2 h after 5-ALA injection (Figure 2). Concentrations tripled after 4 h. Although normal brain tissue also accumulated porphyrins after 4 h, concentrations were half of that found in the tumor tissue. We chose to inject 5-ALA 4 h before irradiation, considering that intra-tumor porphyrin concentration would be at their best while healthy tissues would be less impacted because of the lower accumulation. Interestingly, the only residual porphyrin concentrations were found in healthy cells after 24 h (Figure 2), suggesting that in a multifractionation radiation schedule, the previous injection of 5-ALA would not contribute to intracellular porphyrin content and potential radiosensitization activity.

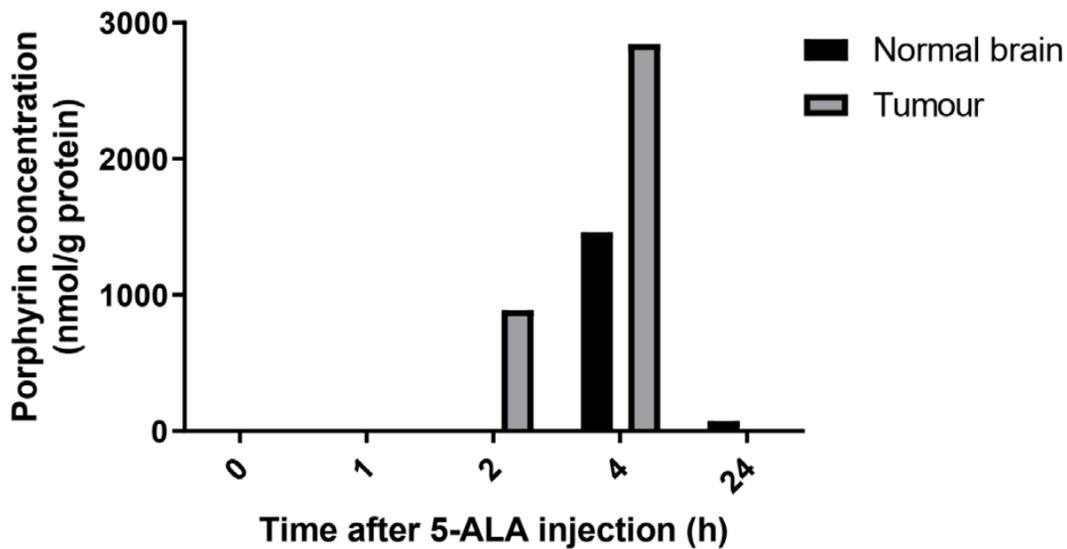


Figure 2. Pharmacokinetic of porphyrin concentration in normal brain, and tumor tissue according to time of 5-ALA intra-peritoneal injection (100 mg/kg).

3.3. 5-ALA Does Not Radiosensitize the P3 Orthotopic PDX Model Treated by the Whole Brain Fractionated Radiotherapy

As previously mentioned, to increase chances to observe radiosensitization, we used the irradiation protocol that exposed tumors five times to the combination treatment 5-ALA/radiotherapy.

To test the radiosensitization potential of porphyrin accumulation, three groups of 11 mice were used. One group received only 5-ALA, one group received radiotherapy alone and the third group received both. We treated the mice on day 39. Median survivals for 5-ALA, radiotherapy only and 5-ALA + radiotherapy were 56 days, 96 days, and 102 days, respectively. Overall tumor growth was very similar to that observed when testing the different radiotherapy regimens, with a split of the tumor growth curves at around day 50, and exponential growth of the tumors treated with 5-ALA only (Figure 3A), leading to the death of all the mice by day 60 in this group (Figure 3B). This suggests that 5-ALA alone does not affect tumor growth. Radiotherapy impacted the tumor growth as previously observed since tumors showed stable luminescence signals up to 83 days after treatment, then relapsed and killed all the mice around 100 days post-transplantation. This highlights the high comparability between independent experiments, showing the robustness of the model. Expectedly, there was a significant difference in survival between the 5-ALA only and the radiotherapy only groups (HR = 3.52[1.29–9.63] $p < 0.0001$), or between the 5-ALA only and the Radiotherapy + 5-ALA groups (HR = 3.52[1.29–9.63] $p < 0.0001$ for 5-ALA vs. 5-ALA+RT) (Figure 3C).

When 5-ALA administration was included in the radiotherapy regimen no difference was observed, neither on the tumor growth kinetics (Figure 3A) nor on the mouse survival (Figure 3B), as compared to radiotherapy only (HR = 1.57[0.67–3.69], $p = 0.24$). This suggests that in our settings 5-ALA administration failed to radiosensitize P3 cell-derived xenografts.

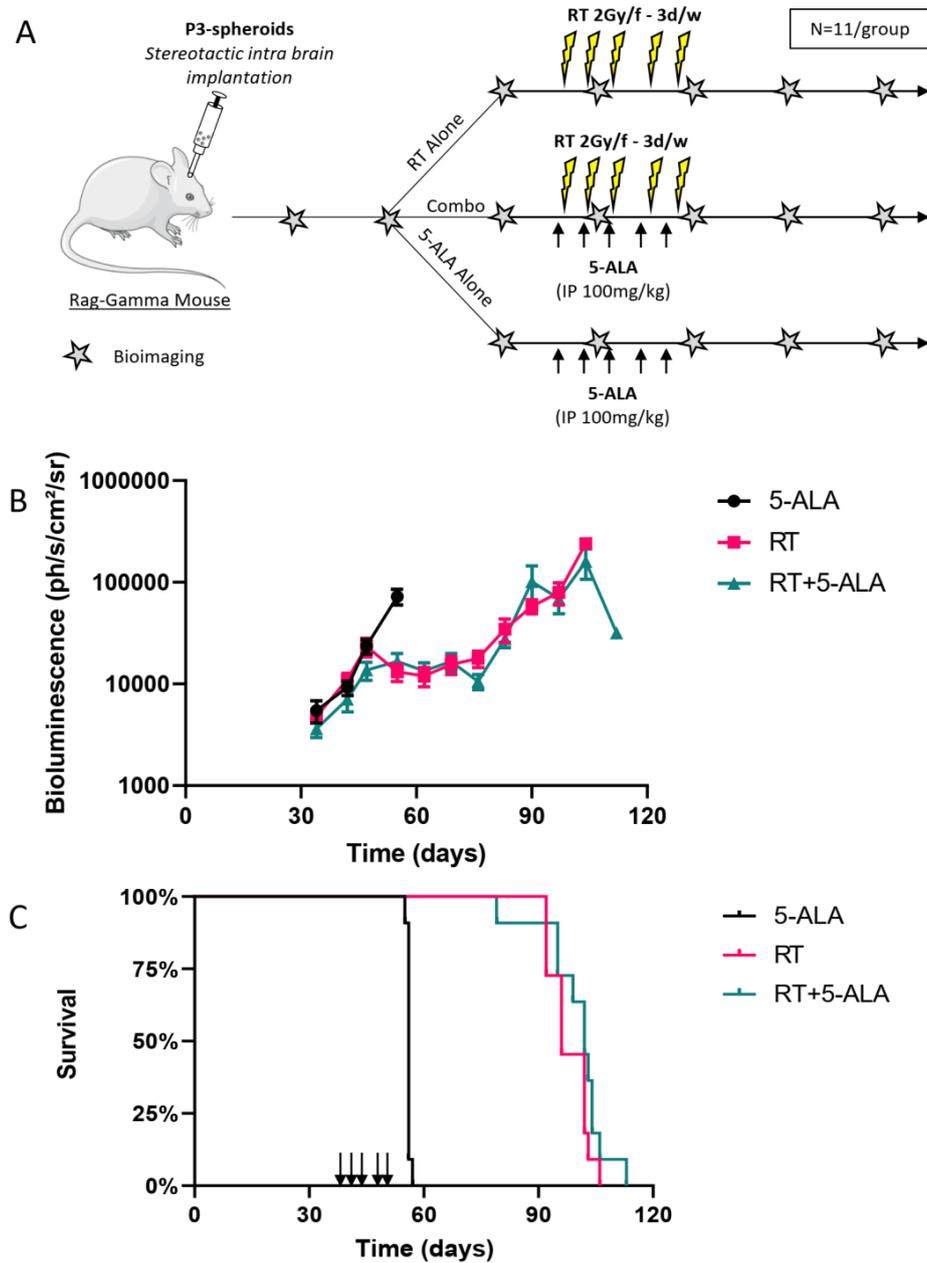


Figure 3. Combination treatment of 5-ALA and radiotherapy. (A) experimental protocol (details in materials and methods). Black arrows indicate 5-ALA administration 4 h before irradiation. Each star corresponds to luminescence imaging. (B) Tumor follow-up by bioluminescence (Mean \pm SEM). N = 11/group. Arrows indicate the days after implantation where mice received fractionated radiotherapy five times 2 Gy \pm 5-ALA. The control group received 5-ALA only. (C) Corresponding survival curves. /f: per fraction; 3 d/w: 3 days a week; IP: intraperitoneal. Mouse picture provided by Servier Medical Art.

3.4. 5-ALA Treatment Radiosensitization Evaluation on P3 Cell-Derived Spheroids

The absence of radiosensitization was puzzling, especially with regard to published data, using 5-ALA [14,32,33]. To test whether radiosensitization would be more easily achievable *in vitro*, we determined the growth of P3 cell-derived spheroids by measuring spheroid areas, after a single dose of irradiation, with or without 5-ALA pre-treatment. We also quantified the proportions of live and dead cells within each spheroid after different treatments.

Untreated spheroids showed linear growth (Figure 4A). P3 cell-derived spheroids were radiosensitive in a dose-dependent manner, confirming the observed *in vivo* efficacy of radiotherapy. Of note, even at a high dose (10 Gy), spheroids did not die but displayed growth arrest. There was no dose-effect of 5-ALA treatment in the absence of radiotherapy (Figure 4B). In the same way, increasing doses of 5-ALA did not alter the P3 cell-derived spheroid growth, regardless of the irradiation dose (Figure 4C). These results were confirmed by the evaluation of the proportions of live/dead cells of the spheroids. The proportions were very similar for a given irradiation dose, with or without 5-ALA treatment (Figure 4D,E). Together, these results confirm that P3 cell-derived spheroids were radiosensitive but were not radiosensitized by 5-ALA pre-treatment.

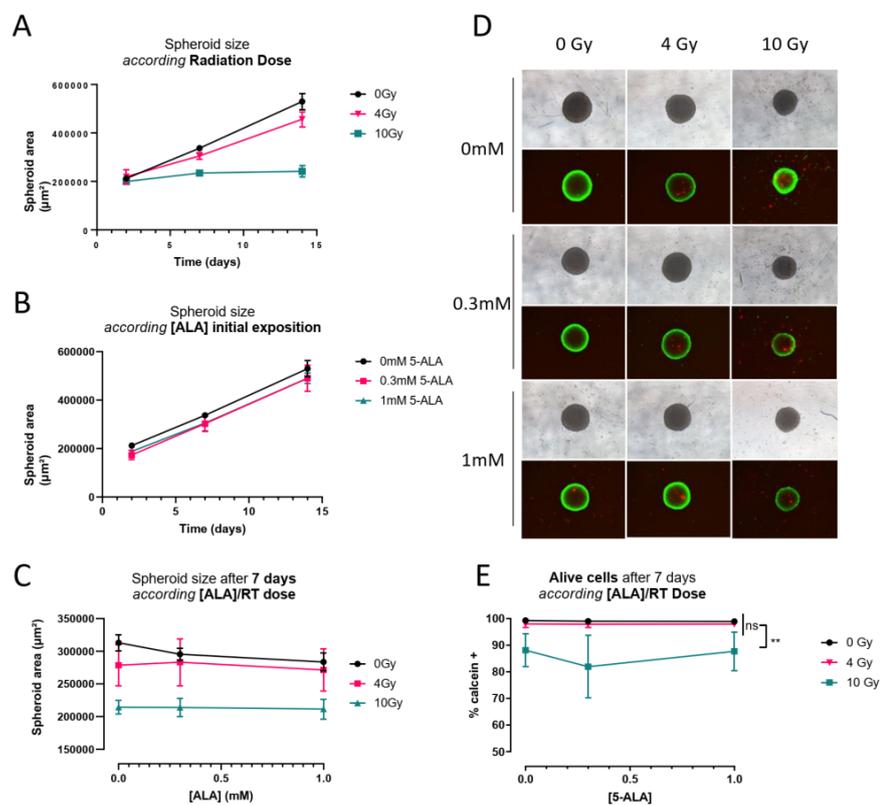


Figure 4. Irradiation and 5-ALA impact on spheroid growth (A) Spheroid size according to radiation dose without 5-ALA. (N = 3 experiments with three spheroids per condition in each experiment) (B) Spheroid size according to [5-ALA] initial exposure (C) Spheroid size according to [5-ALA] and radiation dose on day 7. (D) Spheroid in white light after PI/Calcein (red/green) staining. (E) Cytometric quantification of live cells in spheroid by calcein fixation and cytometric quantification, after 7 days (four spheroids by condition, three independent experiments). There are significantly fewer live cells compared to 0 Gy and 4 Gy. ** $p < 0.005$, ns = non significant, ANOVA test.

As we confirmed that porphyrins accumulated in tumor tissues after 5-ALA administration, we verified that this was also true in the P3 cell-derived spheroids. We found that porphyrin concentrations in spheroid extracts, measured by spectroscopy, was proportional to the mean fluorescence intensities in 5-ALA treated cells, as determined by flow cytometry ($R^2 = 0.9984$, $p < 0.0001$) (Figure 5A). We also showed 24 h after a 4-h 5-ALA exposure, there was important porphyrin accumulation in P3 spheroids, at the time of radiotherapy treatment. As in vivo, cells had cleared porphyrins 24 h after 5-ALA exposure (Figure 5B).

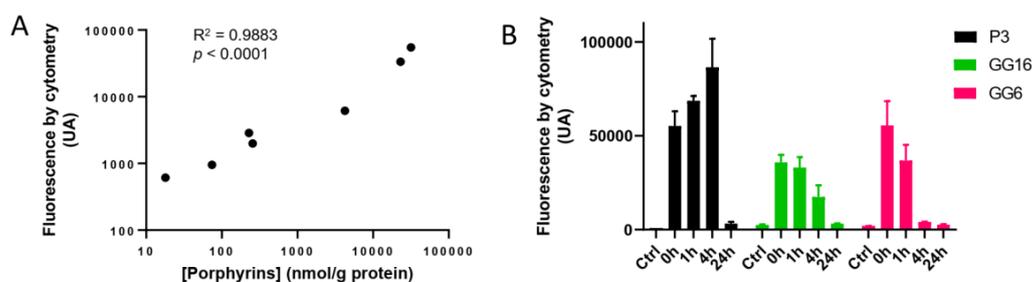


Figure 5. Porphyrin accumulation after 5-ALA exposition. (A) Porphyrin concentration determined by spectroscopy correlates fluorocyte mean fluorescence intensity in P3 cells as determined by flow cytometry. $R^2 = 0.9883$, $p < 0.0001$, $[Y = 1.59x + 867.2]$ (B) Fluorescence before incubation (Ctrl) or after incubation of P3 cells incubated with [5-ALA] = 1 mM during 4 h (N = 3 for P3, GG16 and GG6).

Taken together, this set of data confirms that despite porphyrin accumulation, to higher levels than what was obtained in vivo, 5-ALA treatment did not radiosensitize P3 cell-derived spheroids.

As these results suggest that 5-ALA exposure did not radiosensitize P3 cell-derived spheroids, we tested the GG6 and the GG16 cells, two additional patient-derived spheroid-forming GB cell lines. First, we confirmed that under 5-ALA treatment, they accumulated porphyrins, as evidenced by flow cytometry (Figure 5B). As for P3 spheroids, untreated cells showed very little fluorescence signals. 5-ALA induced the appearance of highly fluorescent fluorocytes. As for P3 spheroids, porphyrins were cleared after 24 h.

Next, we evaluated the radiosensitization property of 5-ALA treatment in GG16 and GG6 spheroids. Both cell lines were radiosensitive, in a dose-response manner, as evidenced by the reduced spheroid growth under radiotherapy (Figure 6A,B for 0 Gy, Figure 6C,D for 4 Gy and Figure 6E,F for 10 Gy, black curves).

The GG16 spheroids were not radiosensitized in the presence of 5-ALA, as evidenced by the overlapping green (+ 5-ALA) and black (no 5-ALA) spheroid growth curves (Figure 6A,C,E). The GG6 spheroid growths were similar at 0 Gy and 4 Gy (pink curves, Figure 6B–D), but 5-ALA treatment affected their growth at 10 Gy (pink curve, Figure 6F). GG16 spheroids were stably recovered over time, regardless of 5-ALA treatment (Figure 6G). By contrast, we observed frequent GG6 spheroid dissociation in the presence of 5-ALA, with numerous floating dead cells. Indeed, only 50% of the untreated or 4 Gy-treated spheroids were recovered at 7 and 14 days under 5-ALA treatment (Figure 6H, bold and dashed pink curves), whereas at least 85% of the spheroids were still growing without 5-ALA (Figure 6H bold and dashed black curves). At 10 Gy, 47% of the spheroids showed dissociation at 14 days, while all the 5-ALA treated spheroids had disappeared (Figure 6H, dotted black and pink lines, respectively). These results suggest that 5-ALA treatment was toxic for the GG6 cells, but did not increase the radiation toxicity.

All together, these results show that as for the P3 cell line, 5-ALA did not radiosensitize the GG6 and the GG16 cell lines in vitro making in vivo evaluation useless.

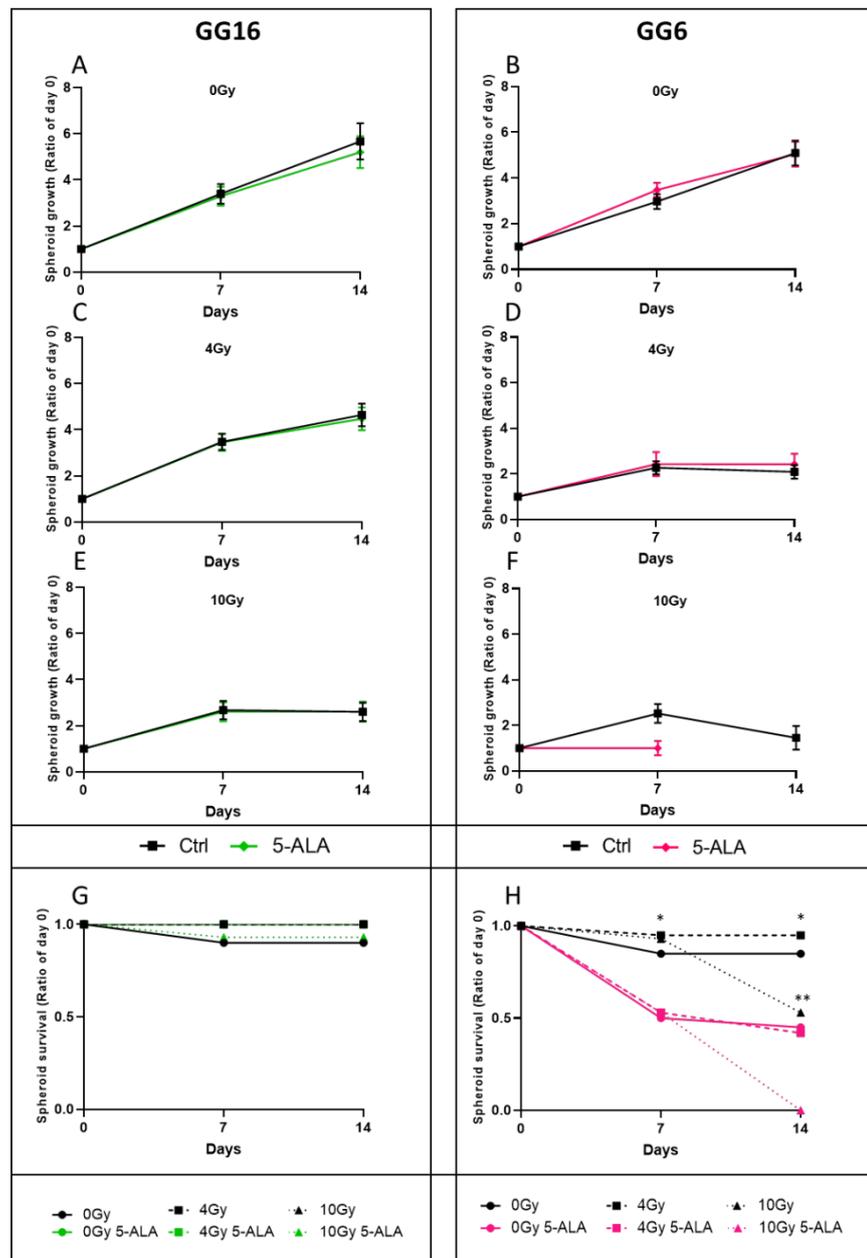


Figure 6. GG16 and GG6 spheroid growth and survival under radiotherapy and 5-ALA exposure. Individual spheroids obtained from the GG16 (left column) and GG6 (right column) cell lines were irradiated or not with or without 5-ALA exposure (green for GG16 with 5-ALA and pink for GG6 with 5-ALA and black curves for corresponding control), and were individually followed over a period of 14 days (n = 15 to 20 spheroids per condition), for growth (A–F) and survival (G,H). * $p < 0.05$ 0/4/10 Gy condition without 5-ALA vs. with 5-ALA. ** $p < 0.05$ Ctrl/5-ALA condition 0 Gy or 4 Gy vs. 10 Gy.

4. Discussion

To our knowledge, this study is the first to evaluate 5-ALA-induced radiosensitization potential using whole-brain radiotherapy in an orthotopic glioblastoma PDX.

In vitro models are of critical importance for translational medicine. The 3D spheroid model progressively appeared as the gold standard of preclinical studies in glioblastoma. Tumor-derived GB cells cultured in 3D displayed radiosensitization with temozolomide and bevacizumab, while erlotinib was inefficient. Interestingly, in vitro sensitization profiles were similar to patients' tumor responses [34]. The same cells cultured as monolayers showed contrasting results since temozolomide radiosensitized only one patient-derived GB line, bevacizumab had no effect, and erlotinib did radiosensitize the cells. Previous studies testing 5-ALA potential first tested cell response in 2D cultures, then moved to a further demonstration in vivo, potentially introducing a selection bias. Moreover, subcutaneously implanted tumors, that were widely used in studies testing 5-ALA, may not perfectly reflect the tumor in its microenvironment. Indeed, tumor vasculature depends on the implantation site, as well as the recruitment of supportive stromal cells. Together, these differences may impact tumor response [35]. Our results confirmed the reproducibility of tumor cell response whether they were evaluated as spheroids in vitro or orthotopically grafted in vivo.

Using a clinically relevant model, we found that 5-ALA administration did induce porphyrin accumulation in tumor cells, but did not radiosensitize them. Importantly, we validated the lack of effect in vitro on three independent 3D human spheroid models. In a subcutaneous syngeneic rat model of gliosarcoma, local fractionated radiotherapy (10 Gy, 2 Gy/day for 5 days) diminished tumor growth. This effect was enhanced with 5-ALA administration (100 mg/kg in tail vein 3 h before irradiation). In this study, where rats were housed under a 12 h light/dark cycle, 5-ALA could have an effect by itself, as suggested by the 5-ALA treatment tumor growth curve that was below the untreated curve. A phototherapeutic effect in subcutaneous tumors cannot be excluded [21]. In addition, this immune-competent model is interesting because the authors found increased macrophage tumor infusion in the 5-ALA-treated rats probably contributing to the tumoricidal effect. Subcutaneous implantations of glioblastoma U87MG and U251MG cell lines treated with fractionated radiotherapy (whole-brain, 60 Gy, 2 Gy/day, 5 days a week), and 5-ALA (60–120 mg/kg per os 4 h before irradiation) failed to find a radiosensitization effect in U87MG-transplanted mice at the endpoint of the experiment, by contrast to U251MG-transplanted mice [14]. This suggests heterogeneity in in vivo tumor cell response to 5-ALA-mediated radiosensitization.

Besides glioblastoma, other tumor cell types were challenged with radiotherapy and 5-ALA co-treatments. Intracranial xenografts of murine melanoma cells were treated with radiotherapy (whole-brain, 14 Gy, 2 Gy/day, 7 days), resulting in diminished tumor growth. This effect was enhanced by 5-ALA (200 mg/kg intraperitoneally 4 h before irradiation) [33]. However, the growth capacity of melanoma cells is drastically different from that of glioblastoma cells, since grafted mice died 9 days after implantation. This high rate of proliferation may identify an early effect of the combination treatment that may not persist if tumors can recover from the initial toxic crisis. In agreement with our results, subcutaneous PC-3 prostate tumors were not radiosensitized by 5-ALA (100 mg/kg intravenous). Authors noticed improved efficiency of radiotherapy (a single 4 Gy dose) only when they used carbamide peroxide delivered intratumorally [15] in combination with 5-ALA, suggesting that this model needed higher levels of reactive oxygen species.

Noticeably, the irradiation schedules were different between studies. Some were single doses [15,21,32] or multiple with at least 0.9 Gy (0.3 Gy/every day 3 times) [32] and up to 60 Gy (2 Gy/day/5 days/week/6 weeks) [14], compared to our treatment plan of 10 Gy (2 Gy/day/3 days/10 days). Radioresistance in glioblastoma depends on multiple biological processes [36] together with the tumor type (stem cells, tumor heterogeneity, metabolic alteration, DNA damage repair...) and the model itself (tumor microenvironment, hypoxia). As none of the published studies combine the same host/tumor/graft site, it is

difficult to compare them. It is also not necessary to reproduce the exact same experiments to obtain interpretable results [14]. We validated our model by (i) checking the efficacy of dose-response radiotherapy, and (ii) making sure that porphyrins accumulated preferentially in the tumor. A multi-fractionated treatment was close to the human radiotherapy regimen and allowed multiple exposures to porphyrins during irradiation.

Our study presents some limits. The irradiation window covered the whole mouse brain but copied the whole brain human routine protocol by opposed pair field plan. More accurate radiation therapy can be delivered, as shown by Rutherford et al. [37] when adaptative tumor brain imaging is available. This may be challenging, though, in the multifractionation treatment of mice. Overall, our irradiation setting was as close as possible to what is routinely used in patients and was not toxic for the mice. Of note, we used luciferase/luciferin for the tumor follow-up. Luciferase photon emission could interfere with a phototherapeutic effect. However, the administration of 5-ALA and luciferin were always distant by 24 h, and we showed that PpIX was cleared during this period. Moreover, we noted that 5-ALA only-treated tumors displayed growth similar to that of untreated tumors, and survivals were the same. Illumination induced by luciferin is many orders of magnitude below the needed energy to induce a phototherapeutic effect [38], even if self-exciting photodynamic therapy is a promising field of research [39].

Heme pathway modulation deserves attention in radiosensitization research. Indeed, the mechanism of porphyrin-related radiosensitization is still unclear and may be independent of their photoactivability [17]. Moreover, even regarding photoactivability, all porphyrins might not be equivalent. This hypothesis is supported by the fact that photodermatitis in porphyria does not occur for all the enzymatic deficiencies of the heme pathway. For example, ferrochelatase deficit-accumulating free PpIX in the skin leads to photosensitivity, as well as gain of function of 5-ALA synthase 2 (ALAS2) leading to accumulation of PpIX-Zinc and photodermatitis. Alternative porphyrin accumulation may improve radiosensitization, as their observed photosensitization in porphyria. Indeed, uroporphyrinogen decarboxylase (UROD) downregulation altered iron homeostasis in a head and neck cancer model, produced reactive oxygen species, and enhanced radiotherapy [17]. UROD blockade results in the accumulation of uroporphyrinogen III. In the same way, uroporphyrinogen III synthase (UROS) deficit results in the accumulation of type I porphyrins, with the strongest impact on skin lesions [40]. These intermediates might present properties towards response to radiotherapy different from other porphyrins. This field deserves to be explored.

5. Conclusions

This is the first study testing the radiosensitization potential of porphyrin accumulation induced by 5-ALA in orthotopically grafted patient-derived glioblastoma cells and in 3D in vitro cultures from three patient-derived models. Using a clinically relevant fractionated radiotherapy regimen, efficient on the tumor cells, we did not observe diminished tumor growth, increased survival, or impacted spheroid formation and growth in the presence of 5-ALA. Although this result does not confirm some of the published studies in the field, the exploration of alternative porphyrin accumulation by modulating the heme pathway enzymes deserves close attention.

Author Contributions: Conceptualization, C.D., J.S., S.A., M.-A.D., T.D., J.B., E.R., F.M.-G., A.B., V.V. and S.D.; Data curation, C.D., J.S., S.A., M.-A.D., M.L., J.G. and S.D.; Formal analysis, C.D., J.S., S.A., M.-A.D., S.C. and S.D.; Funding acquisition, C.D., S.A., T.D., F.M.-G., V.V. and S.D.; Investigation, C.D., J.S. and S.D.; Methodology, C.D., J.S., M.-A.D., J.G., T.D., V.V. and S.D.; Project administration, F.M.-G. and S.D.; Resources, M.L., S.C., J.G., J.-M.B., F.M.-G., V.V. and S.D.; Software, C.D. and J.G.; Supervision, S.A., T.D., E.R., F.M.-G. and A.B.; Validation, C.D., V.V. and S.D.; Visualization, C.D., J.S. and S.D.; Writing—original draft, C.D. and S.D.; Writing—review & editing, C.D., J.S., S.A., M.-A.D., M.L., S.C., T.D., J.B., J.-M.B., E.R., F.M.-G., A.B., V.V. and S.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the University of Bordeaux, the Cancéropôle Grand Sud-Ouest, the SIRIC-BRIO (Bordeaux Recherche Intégrée en Oncologie) and POPRA (Programme Optique Physique Radiothérapie Aquitaine).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the “Ministère de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation (MESRI)” (authorization number 2018021416296098).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Marie Paul Algeo and Marcia Campistron for her assistance in the animal facility. We are indebted to Sandrine Hamon for administrative assistance and Anthony Cook for lab technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. 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. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 709–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. 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. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *370*, 699–708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. van den Bent, M.J.; Brandes, A.A.; Rampling, R.; Kouwenhoven, M.C.M.; Kros, J.M.; Carpentier, A.F.; Clement, P.M.; Frenay, M.; Campone, M.; Baurain, J.-F.; et al. Randomized Phase II Trial of Erlotinib versus Temozolomide or Carmustine in Recurrent Glioblastoma: EORTC Brain Tumor Group Study 26034. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 1268–1274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Reardon, D.A.; Brandes, A.A.; Omuro, A.; Mulholland, P.; Lim, M.; Wick, A.; Baehring, J.; Ahluwalia, M.S.; Roth, P.; Bähr, O.; et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients with Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 1003–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Weller, M.; Butowski, N.; Tran, D.D.; Recht, L.D.; Lim, M.; Hirte, H.; Ashby, L.; Mechtler, L.; Goldlust, S.A.; Iwamoto, F.; et al. Rindopepimut with Temozolomide for Patients with Newly Diagnosed, EGFRvIII-Expressing Glioblastoma (ACT IV): A Randomised, Double-Blind, International Phase 3 Trial. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, 1373–1385. [[CrossRef](#)]
7. Sarkaria, J.N.; Hu, L.S.; Parney, I.F.; Pafundi, D.H.; Brinkmann, D.H.; Laack, N.N.; Giannini, C.; Burns, T.C.; Kizilbash, S.H.; Laramy, J.K.; et al. Is the Blood–Brain Barrier Really Disrupted in All Glioblastomas? A Critical Assessment of Existing Clinical Data. *Neuro-Oncology* **2018**, *20*, 184–191. [[CrossRef](#)]
8. Richard, E.; Ged, C.; Bedel, A.; Moreau-Gaudry, F.; de Verneuil, H. Cellular and Gene Therapy for Erythropoietic Porphyrias. In *Handbook of Porphyrin Science; Porphyrias and Sideroblastic Anemias*; World Scientific: Singapore, 2013; Volume 29.
9. Stummer, W.; Goetz, C. Fluorescence-Guided Resection of Glioblastoma Multiforme by Using 5-Aminolevulinic Acid-Induced Porphyrins: A Prospective Study in 52 Consecutive Patients. *J. Neurosurg.* **2000**, *93*, 11. [[CrossRef](#)]
10. Stummer, W.; Pichlmeier, U.; Meinel, T.; Wiestler, O.D.; Zanella, F.; Reulen, H.-J. ALA-Glioma Study Group Fluorescence-Guided Surgery with 5-Aminolevulinic Acid for Resection of Malignant Glioma: A Randomised Controlled Multicentre Phase III Trial. *Lancet Oncol.* **2006**, *7*, 392–401. [[CrossRef](#)]
11. Eatz, T.A.; Eichberg, D.G.; Lu, V.M.; Di, L.; Komotar, R.J.; Ivan, M.E. Intraoperative 5-ALA Fluorescence-Guided Resection of High-Grade Glioma Leads to Greater Extent of Resection with Better Outcomes: A Systematic Review. *J. Neurooncol.* **2022**, *156*, 233–256. [[CrossRef](#)]
12. Leroy, H.-A.; Guérin, L.; Lecomte, F.; Baert, G.; Vignion, A.-S.; Mordon, S.; Reyns, N. Is Interstitial Photodynamic Therapy for Brain Tumors Ready for Clinical Practice? A Systematic Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2021**, *36*, 102492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dupont, C.; Vermandel, M.; Leroy, H.-A.; Quidet, M.; Lecomte, F.; Delhem, N.; Mordon, S.; Reyns, N. INtraoperative Photo-Dynamic Therapy for Glioblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial. *Neurosurgery* **2019**, *84*, E414–E419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Takahashi, J.; Nagasawa, S.; Doi, M.; Takahashi, M.; Narita, Y.; Yamamoto, J.; Ikemoto, M.J.; Iwahashi, H. In Vivo Study of the Efficacy and Safety of 5-Aminolevulinic Radiodynamic Therapy for Glioblastoma Fractionated Radiotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Panetta, J.V.; Cvetkovic, D.; Chen, X.; Chen, L.; Ma, C.-M.C. Radiodynamic Therapy Using 15-MV Radiation Combined with 5-Aminolevulinic Acid and Carbamide Peroxide for Prostate Cancer in Vivo. *Phys. Med. Biol.* **2020**, *65*, 165008. [[CrossRef](#)]
16. Nordmann, N.J.; Michael, A.P. 5-Aminolevulinic Acid Radiodynamic Therapy for Treatment of High-Grade Gliomas: A Systematic Review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2021**, *201*, 106430. [[CrossRef](#)]
17. Ito, E.; Yue, S.; Moriyama, E.H.; Hui, A.B.; Kim, I.; Shi, W.; Alajez, N.M.; Bhogal, N.; Li, G.; Datti, A.; et al. Uroporphyrinogen Decarboxylase Is a Radiosensitizing Target for Head and Neck Cancer. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 67ra7. [[CrossRef](#)]
18. Luksiene, Z.; Juzenas, P.; Moan, J. Radiosensitization of Tumours by Porphyrins. *Cancer Lett.* **2006**, *235*, 40–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Takahashi, J.; Misawa, M.; Murakami, M.; Mori, T.; Nomura, K.; Iwahashi, H. 5-Aminolevulinic Acid Enhances Cancer Radiotherapy in a Mouse Tumor Model. *SpringerPlus* **2013**, *2*, 602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Takahashi, J.; Misawa, M.; Iwahashi, H. Combined Treatment with X-Ray Irradiation and 5-Aminolevulinic Acid Elicits Better Transcriptomic Response of Cell Cycle-Related Factors than X-Ray Irradiation Alone. *Int. J. Radiat. Biol.* **2016**, *92*, 774–789. [[CrossRef](#)]
21. Yamamoto, J.; Ogura, S.-I.; Shimajiri, S.; Nakano, Y.; Akiba, D.; Kitagawa, T.; Ueta, K.; Tanaka, T.; Nishizawa, S. 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX with Multi-Dose Ionizing Irradiation Enhances Host Antitumor Response and Strongly Inhibits Tumor Growth in Experimental Glioma in Vivo. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *11*, 1813–1819. [[CrossRef](#)]
22. Sakariassen, P.Ø.; Prestegarden, L.; Wang, J.; Skaftnesmo, K.O.; Mahesparan, R.; Molthoff, C. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16466–16471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Eskilsson, E.; Rosland, G.V.; Talasila, K.M.; Knappskog, S.; Keunen, O.; Sottoriva, A. EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogeneous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro-Oncol.* **2016**, *18*, 1644–1655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Daubon, T.; Léon, C.; Clarke, K.; Andrique, L.; Salabert, L.; Darbo, E. Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1146. [[CrossRef](#)]
25. Guyon, J.; Andrique, L.; Pujol, N.; Røslund, G.V.; Recher, G.; Bikfalvi, A.; Daubon, T. A 3D Spheroid Model for Glioblastoma. *J. Vis. Exp.* **2020**, 60998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Joseph, J.V.; Magaut, C.R.; Storevik, S.; Geraldo, L.H.; Mathivet, T.; Latif, M.A. TGF- β promotes microtubule formation in glioblastoma through thrombospondin 1. *Neuro-Oncology* **2022**, *24*, 541–553. [[CrossRef](#)]
27. Joseph, J.V.; Conroy, S.; Tomar, T.; Eggens-Meijer, E.; Bhat, K.; Copray, S. TGF- β is an inducer of ZEB1-dependent mesenchymal transdifferentiation in glioblastoma that is associated with tumor invasion. *Cell Death Dis.* **2014**, *2*, e1443. [[CrossRef](#)]
28. Lafitte, M.; Rousseau, B.; Moranvillier, I.; Taillepierre, M.; Peuchant, E.; Guyonnet-Dupérat, V.; Bedel, A.; Dubus, P.; de Verneuil, H.; Moreau-Gaudry, F.; et al. In Vivo Gene Transfer Targeting in Pancreatic Adenocarcinoma with Cell Surface Antigens. *Mol. Cancer* **2012**, *11*, 81. [[CrossRef](#)]
29. Colucci, F.; Soudais, C.; Rosmaraki, E.; Vanes, L.; Tybulewicz, V.L.; Di Santo, J.P. Dissecting NK Cell Development Using a Novel Alymphoid Mouse Model: Investigating the Role of the c-Abl Proto-Oncogene in Murine NK Cell Differentiation. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 2761–2765.
30. Kang, H. Sample Size Determination and Power Analysis Using the G*Power Software. *J. Educ. Eval. Health Prof.* **2021**, *18*, 17. [[CrossRef](#)]
31. Stupp, R.; Hegi, M.E.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Taphoorn, M.J.B.; Janzer, R.C.; Ludwin, S.K.; Allgeier, A.; Fisher, B.; Belanger, K.; 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*, 459–466. [[CrossRef](#)]
32. Yamada, K.; Murayama, Y.; Kamada, Y.; Arita, T.; Kosuga, T.; Konishi, H.; Morimura, R.; Shiozaki, A.; Kuriu, Y.; Ikoma, H.; et al. Radiosensitizing Effect of 5-aminolevulinic Acid in Colorectal Cancer in Vitro and in Vivo. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 5132–5138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Takahashi, J.; Nagasawa, S.; Ikemoto, M.J.; Sato, C.; Sato, M.; Iwahashi, H. Verification of 5-Aminolevulinic Acid Radiodynamic Therapy Using a Murine Melanoma Brain Metastasis Model. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gomez-Roman, N.; Stevenson, K.; Gilmour, L.; Hamilton, G.; Chalmers, A.J. A Novel 3D Human Glioblastoma Cell Culture System for Modeling Drug and Radiation Responses. *Neuro-Oncology* **2017**, *19*, 229–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. An ad hoc committee of the National Cancer Research Institute; Workman, P.; Aboagye, E.O.; Balkwill, F.; Balmain, A.; Bruder, G.; Chaplin, D.J.; Double, J.A.; Everitt, J.; Farningham, D.A.H.; et al. Guidelines for the Welfare and Use of Animals in Cancer Research. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 1555–1577. [[CrossRef](#)]
36. Ali, M.Y.; Oliva, C.R.; Noman, A.S.M.; Allen, B.G.; Goswami, P.C.; Zakharia, Y. Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. *Cancers* **2020**, *12*, 2511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rutherford, A.; Stevenson, K.; Tulk, A.; Chalmers, A.J. Evaluation of Four Different Small Animal Radiation Plans on Tumour and Normal Tissue Dosimetry in a Glioblastoma Mouse Model. *Br. J. Radiol.* **2019**, *92*, 20180469. [[CrossRef](#)]
38. Schipper, M.L.; Patel, M.R.; Gambhir, S.S. Evaluation of Firefly Luciferase Bioluminescence Mediated Photodynamic Toxicity in Cancer Cells. *Mol. Imaging Biol.* **2006**, *8*, 218–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. Blum, N.T.; Zhang, Y.; Qu, J.; Lin, J.; Huang, P. Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 594491. [[CrossRef](#)]
40. To-Figueras, J.; Millet, O.; Herrero, C. Congenital Erythropoietic Porphyria. In *Handbook of Porphyrin Science (Chapter 29)*; World Scientific: Singapore, 2013; pp. 151–217.

RESULTATS NON PUBLIES

INTRODUCTION

Nous avons pu montrer dans l'article qu'une exposition au 5-ALA ne permettait pas d'avoir une radiosensibilisation, dans un modèle irradié de cellules tumorales dérivées de tumeurs humaines dans un modèle murin immunodéprimé, et dans un modèle in vitro en sphéroïde, avec une irradiation en kV.

Considérant que ces données sont en contradiction apparente avec d'autres données de la littérature, nous avons évalué si le 5-ALA pouvait être considéré comme un radiosensibilisant dans d'autres lignées cellulaires.

Par ailleurs, la radiothérapie dynamique repose au final sur un effet phototherapeutique. Il était possible que la lignée P3 ne soit pas photosensible après accumulation de porphyrines. Nous avons donc testé leur photosensibilité après traitement au 5-ALA. Enfin, il était possible que l'irradiation en kV ne génère pas suffisamment d'effet Tcherenkov pour provoquer un effet cytotoxique par phototherapie. La radiothérapie à haute énergie en MV a donc été évaluée.

Sur le plan physique, le concept de radiothérapie dynamique nécessite la production de photons par effet Tcherenkov. Pour s'assurer de l'applicabilité de ce principe en clinique, nous avons voulu détecter ces photons sur les machines de radiothérapie utilisées pour les patients. Une mesure directe de la présence de ces photons et leur interaction avec une solution de PpIX a donc été réalisée.

Avant de présenter les résultats de ces explorations, il est important de faire un rappel sur ce que sont la phototherapie et l'effet Tcherenkov.

1. LA PHOTOTHERAPIE

1.1. Rappel du fonctionnement de la phototherapie dynamique

La phototherapie dynamique est un traitement cytotoxique utilisant en combinaison un agent photosensibilisant, de la lumière et dont le fonctionnement est sous dépendance de la présence d'oxygène (76).

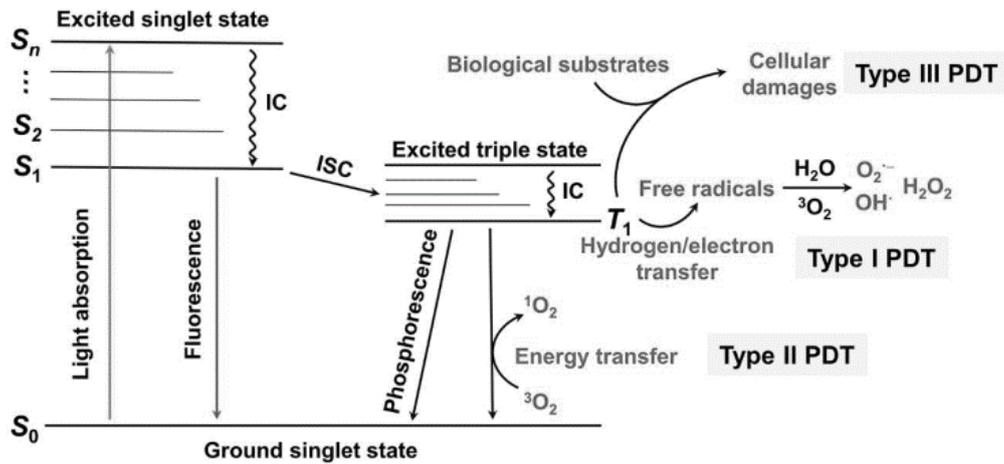


Figure 6 : Diagramme de Jablonski des états électroniques d'un photosensibilisateur après excitation par une énergie supérieure ou égale à l'énergie d'absorption. IC. *Internal Conversion* =Conversion Interne, ISC. *InterSystem Crossing*=Conversion Intersystème. D'après Gao et al. (77)

L'illumination permet de faire passer le photosensibilisateur d'un état de repos à un état excité, très instable (figure 6). L'énergie est perdue soit directement, soit en passant par un état excité triplet (78). Cet état triplet retourne à son état basal par une réaction photochimique de type I ou de type II. Le type I correspond à un transfert entre le photosensibilisateur excité et un substrat biologique avec un transfert d'électron ou d'hydrogène. Quand cette réaction de type I a lieu avec le dioxygène, il y a formation de radical superoxyde (O₂^{•-}) ou de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la réaction de type II, la réaction a aussi lieu avec le dioxygène, mais donne lieu à la formation d'un oxygène singulet (¹O₂). On notera que la diffusion de l'oxygène singulet est essentiellement locale : 0.02-1.0µm et sa durée de vie est courte de l'ordre de 0.04-4.0µs. En conséquence, le type de photoactivateur et sa répartition dans la cellule vont conditionner son mécanisme d'action. Enfin, ces espèces réactives de l'oxygène réagissent avec les macromolécules contenant des doubles liaisons, des acides gras non saturés, cholestérols... Ces réactions entraînent des lésions dans les organelles, et conduisent à terme à la nécrose, l'apoptose et au stress oxydatif en général (77). **La photothérapie nécessite la présence des 3 acteurs : lumière + photosensibilisateur + O₂.**

1.2. Pénétration de la lumière dans le milieu

La limitation principale de la photothérapie est la pénétration dans le milieu. Plus la longueur d'onde est grande, meilleur est le rendement en profondeur, donc on préfère les longueurs d'onde à 600-800nm que celles vers 400nm.

Si cette propriété est bien établie par les physiciens, elle dépend de lorsqu'un matériel biologique est impliqué, de la longueur d'onde utilisée, du tissu traversé et de la source. Il est parfois difficile d'avoir une information chiffrée. Dans le cas qui nous intéresse, Madsen et al. calculent les doses reçues en profondeur pour un cerveau avec un applicateur de 2cm (79). Les paramètres utilisés sont une longueur d'onde à 630nm, une profondeur de pénétration optique de 3,2mm et une constante de diffusion de $5,4 \times 10^{10} \text{ mm}^2\text{s}$ (tableau 3).

Profondeur (mm)	0	5	10	15	20	25
Débit de dose (mW/cm^2)	807	113	18	3,0	0,5	0,09
% de dose par rapport à la surface	100%	14%	2,2%	0,37%	0,062%	0,011%
Équivalence pour $200\text{J}/\text{cm}^2$ en surface	200J	28J	4,4	0,7	0,12	0,02

Tableau 3 : Rendement en profondeur d'une illumination à 630nm avec un applicateur de 2cm dans des conditions d'absorption calquées sur un tissu cérébral. D'après Madsen et al(79). Les 2 premières lignes du tableau sont traduites de la publication. Les 2 dernières lignes sont un calcul sur le % de dose selon la profondeur, et l'équivalence de dose avec une dose de surface de $200\text{J}/\text{cm}^2$ (telle qu'utilisée dans l'étude INDYGO(80))

Même avec une longueur d'onde de 630nm qui pénètre plus profondément dans les tissus que les longueurs d'onde autour de 404nm, il existe 50 fois moins de dose à 1 cm, et 10 000 fois moins à 2,5cm. On notera que les doses rapportées en photothérapie sont en J/cm^2 , avec parfois une notion de débit de dose, c'est-à-dire en W/cm^2 . La dose rapportée en J/cm^2 est la dose d'entrée. Elle varie donc fortement en profondeur, comme on vient de le souligner.

Même des longueurs d'onde autour de 630nm ne permettent pas d'avoir un bon rendement en profondeur avec une photothérapie de surface.

1.3. Photoactivation maximale

Pour avoir l'effet thérapeutique maximal, le but est d'atteindre l'« advanced photobleaching » du photosensibilisateur, défini comme la fluence qui cause >95% de photobleaching du

photosensibilisateur. Dans le cas du 5-ALA, les simulations suggèrent que l'advanced photobleaching est obtenu pour une distance de 4mm de la surface avec un diffuseur de lumière de 200mW/cm² pendant 1h (81). On pourra noter que cela pourrait entraîner des problèmes thermiques : 720 joules déposés en surface en 1h.

La recherche d'un effet maximal de photothérapie avec une concentration fixe de porphyrines induites par le 5-ALA nécessite une importante dose d'irradiation.

1.4. Effet du fractionnement sur l'effet de la photothérapie

L'efficacité de la photothérapie dépendant de l'oxygénation, la délivrance de la photothérapie de manière discontinue a été proposée, notamment par Curnow et al. (82). L'évaluation portait sur la surface de nécrose de colon de rat 3 jours après une photothérapie à 635nm, et un conditionnement par 200mg/kg de 5-ALA. Avec une dose de 25J et un débit de dose de 100mW (soit une durée totale d'illumination de 250 secondes), une pause de 150 secondes après 5J (50 secondes), permettait une nécrose d'une surface 3 fois plus importante qu'avec une illumination continue. Une dose de 15J avec une interruption (50s+150s+100s=300s au total) permettait d'avoir le même effet qu'une dose de 25J en continu (250s). L'hypothèse retenue est celle de l'intérêt de la réoxygénation pour permettre d'avoir l'effet de photothérapie.

La photothérapie a été essayée dans le glioblastome chez l'homme par l'équipe lilloise dans le cadre de l'essai INDYGO (80). Préalablement à cet essai, Leroy et al.(83) ont étudié l'intérêt du fractionnement de l'illumination. Sur des modèles de rats « nude » orthogreffés dans le putamen avec des cellules de la lignée U87, plusieurs schémas d'illumination étaient utilisés avec une dose totale d'illumination constante de 25J à un débit de 30mW. Quatre heures après injection intrapéritonéale de 100mg/kg de 5-ALA, chacun des 9 rats avaient une IRM de ciblage puis la mise en place de fibres pour l'illumination interstitielle. Soit les 25J étaient délivrés en 2 fractions de 5J+20J (durée totale de 16min25s) soit en 5 fractions de 5J (durée totale de 23 min 54s). Chaque pause durait 150 secondes. Les rats étaient ensuite sacrifiés 3 jours plus tard. Comparé au groupe contrôle (5-ALA + mise en place des fibres mais sans illumination) (N=8), la photothérapie était efficace avec davantage de nécrose, mais aussi davantage d'œdème péritumoral et d'infiltration macrophagique. Le schéma en 5 fractions permettait d'avoir davantage d'apoptose que dans le groupe 2 fractions mais aussi davantage de néovascularisation. Sur le même modèle, Vermandel et al. (84) ont fait varier le débit de

dose (5mW ou 30mW) en même temps que le fractionnement (2 ou 5 fractions). Cette étude montrait que l'association 5-ALA et l'illumination entraînait davantage de variation de la perfusion en IRM (assimilées à la nécrose) par rapport aux contrôles (illumination seule ou 5-ALA seul). Il y avait cependant moins d'œdème réactionnel dans les groupes traités avec un débit bas de 5mW. Les auteurs concluaient à un intérêt d'un schéma en 5 fractions avec un débit de dose plutôt bas (5mW).

Le fractionnement de la photothérapie permet de majorer son effet, notamment dans les modèles précliniques de glioblastome. Cet effet pourrait être dû à la réoxygénation de la tumeur.

1.5. Effet de l'oxygénation sur la photothérapie

Comme on l'a vu, l'oxygène est une composante indispensable de la photothérapie. Ce facteur a été intensivement étudié(85). On peut prendre à titre d'exemple illustratif l'étude de Dysart et Patterson (86), qui ont incubé des cellules MLL (MAT-LyLu : cellules d'adénocarcinome de rat) avec 1mM de 5-ALA puis ont étudié la quantité de PpIX et la fraction survivante. Ils ont pu montrer une diminution de la fraction survivante beaucoup plus importante à 10J en condition hypoxique (>10%) qu'en condition normoxique (<0.01%).

L'hypoxie compromet l'efficacité de la photothérapie.

1.6. Oxygénation du glioblastome

Le glioblastome est une tumeur hypoxique (50). Bien qu'il soit complexe de pratiquer chez l'homme des mesures physiques de l'hypoxie dans le glioblastome, une étude portant sur 18 patients a positionné des dispositifs de mesure (Clark-type électrodes) lors de la biopsie stéréotaxique qui étaient enlevées lors de la chirurgie 7 jours plus tard (87). Ils ont montré que les pressions en O₂ dans la zone périphérique de la tumeur étaient de 17,9mmHg alors qu'elles étaient de 9,2mmHg dans la zone nécrotique centrale. De façon intéressante, l'oxygénation du patient à 100% à 3L/minute ou 6L/minute n'avait pas d'impact sur le taux d'oxygénation tumorale. Par contre, l'oxygénothérapie hyperbarique, qui durait 1h40, avait un intérêt pour augmenter l'oxygénation péri et intratumorale, respectivement à 65 mmHg et 45 mmHg à 10 minutes, mais avec une rapide décroissance jusqu'au niveau basal à 40 minutes. Notons que cette stratégie de réoxygénation tumorale a été utilisée en association avec la radiothérapie. Yahara et al (88) ont pu montrer sur une cohorte prospective de 24 patients que

l'oxygénation hyperbarique était réalisable avec des caissons individuels et un traitement par radiothérapie dans les 15 minutes suivant la sortie du caisson, sur les 8 dernières séances. Il n'y avait pas de toxicité particulière, et à 2 ans la survie globale et la PFS étaient de 46,5% et 35,4%. On notera que cet essai comprenait, après 40Gy en fractions de 2Gy, un inhabituel boost intégré en Cyberknife® : les 8 dernières séances délivraient 28 Gy à 3.5Gy/fraction sur la zone centrale et 16 Gy à 2Gy/fraction sur l'œdème périlésionnel. Ce fractionnement à 3,5Gy/fraction est plus élevé qu'habituellement. D'un point de vue logistique, la lourde préparation du patient dans le caisson hyperbarique était à même d'expliquer l'intérêt d'un traitement par radiothérapie un peu accéléré. Aucune duplication de cet essai n'a été publiée à ce jour.

Le glioblastome est une tumeur hypoxique pour laquelle l'utilisation d'un caisson hyperbare pourrait augmenter physiquement l'oxygénation.

1.7. Photothérapie dynamique en cancérologie

La photothérapie est utilisée en cancérologie, principalement pour des tumeurs cutanées cancéreuses ou précancéreuses(76). Les principales indications sont la kératose actinique et les carcinomes basocellulaires. Dans ces situations, le 5-ALA a été testé en application topique, c'est-à-dire par application directe sous forme de crème. Le 5-ALA est un précurseur de photosensibilisateur, mais hors des lésions cutanées, les photosensibilisateurs déjà constitués sont plutôt utilisés : Porfimer Sodium®, Temoporfin®. Ces stratégies de photothérapie restent assez expérimentales dans des indications de tumeurs superficielles accessibles à du matériel endoscopique permettant aussi l'acheminement de la lumière. Ainsi, les indications testées actuellement sont l'oesophage de Barret, les carcinomes intra épithéliaux du col utérin et de la vulve, les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou ou les cancers du poumons(76).

On notera que dans les indications de cancers, les doses données s'échelonnent entre 20J/cm² et 300J/cm² pour des longueurs d'onde entre 535 et 630nm.

La photothérapie dynamique est actuellement utilisée principalement par application topique de 5-ALA dans la kératose actinique. Son utilisation dans d'autres cancers est en cours d'exploration, souvent après échec des autres moyens thérapeutiques.

1.8. Photothérapie dynamique dans le glioblastome chez l'homme

Étant donné le contexte décrit plus haut d'une maladie grave, de progrès récents limités, et du rationnel qui découle de l'accumulation plus spécifique des porphyrines dans les cellules tumorales cérébrales, certaines équipes ont proposé d'appliquer une stratégie de photothérapie per opératoire chez l'homme.

Un essai sur 12 tumeurs cérébrales variées (tumeurs gliales de grade III et IV), en situation de récurrence a testé la photothérapie interstitielle (avec mise en place de cathéter dans le parenchyme cérébral) avec le Photofrin® (89). Le Photofrin® est un produit commercial composé porphyrine sodique. Trois niveaux de dose étaient testés : entre 1500 et 3700J, 3700J-4400J et 4400-5900J, à 630nm, sans qu'il soit détaillé à quoi correspondaient cette énergie. Il existait une réaction parenchymateuse importante sur les imageries post-procédure et une toxicité dose dépendante. Les auteurs ne concluaient pas à un bénéfice de cette stratégie.

L'équipe de Lille ONCO-THAI (Image-Assisted Laser Therapy for Oncology) travaille depuis de nombreuses années pour proposer en clinique une photothérapie aux patients(90). Elle a notamment modélisé la distribution de dose en condition interstitielle et en condition per-opératoire (91), dans un TPS (Treatment Planning System), de la même façon que sont calculées les dosimétries prévisionnelles en radiothérapie. Ce type d'étude peut ouvrir la voie à une photothérapie interstitielle mise en place de façon stéréotaxique.

Dupont et al. (90) ont publié le protocole de cette étude INtraoperative photoDYnamic Therapy for GliOblastomas (INDYGO, NCT03048240).

Contrairement à l'essai en situation de récurrence présenté plus haut (89), les patients étaient en première ligne de traitement, lors de la prise en charge chirurgicale initiale et la photothérapie était intra-cavitaire et non interstitielle. Les patients inclus étaient prémédiqués par du 5-ALA à 20mg/kg, 4h avant la chirurgie. La résection était guidée par la fluorescence, puis une photothérapie était réalisée en per opératoire (figure 7). La photothérapie était réalisée selon le schéma inspiré des études précliniques, à savoir la réalisation de 5 fractions séparées de 120 secondes pour permettre une réoxygénation des tissus.

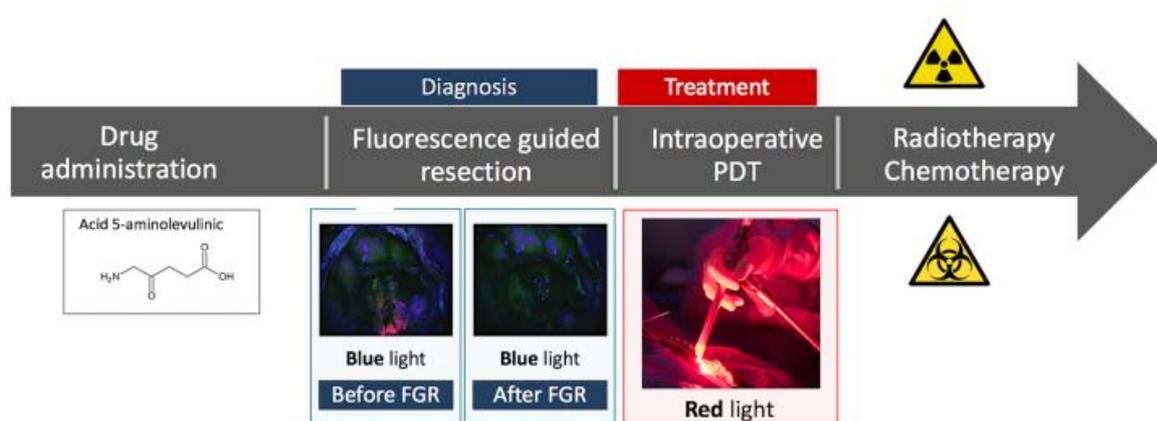


Figure 7 : Schéma de l'étude INDYGO, réalisé au CHU de Lille évaluant la photothérapie per opératoire pour les patients en prise en charge initiale d'un gliome de haut grade. D'après Dupond et al. (90). FGR : Fluorescence Guided Resection. PDT : PhotoDynamic Therapy.

Les résultats préliminaires (80), décrivent les cas de 10 patients sans toxicité inacceptable. La dose en surface du ballonnet était de $200\text{J}/\text{cm}^2$. La durée médiane de l'illumination était de 10 minutes [7-16,5] et la durée opératoire médiane supplémentaire était de 35 minutes [20-48]. Il n'existait ni d'effet indésirable supplémentaire durant la procédure, ni après la chirurgie. La survie sans progression et la survie globale à 1 an étaient de 60% et 80% respectivement. Les auteurs concluent à la faisabilité de cette approche.

La photothérapie dynamique est en cours d'évaluation chez l'homme, avec un profil acceptable de toxicité immédiate.

1.9. Améliorer l'efficacité de la photothérapie par l'adressage des porphyrines.

Une stratégie d'amélioration de la radiothérapie dynamique pourrait être d'améliorer l'adressage des photosensibilisants dans la tumeur. La radiothérapie pourrait bénéficier en cela des recherches faites en photothérapie. L'utilisation des nanoparticules est en plein essor dans cette indication.

A titre d'illustration, Bretin et al. (78) ont pu montrer que l'association d'une nanoparticule de silice de 80nm enveloppé d'un photosensibilisateur, le 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphenylporphyrine (TPPOH) conjugué à du xylan, permettait d'avoir une plus grande concentration dans les lignées tumorales de cancer du colon, mais aussi une toxicité plus importante à la photothérapie. Cette approche utilise un effet dit de rétention et de perméabilité augmentée (EPR) des nanoparticules dans les cancers. *In vivo*, sur un modèle de souris immunodéprimées, traitées par +/- photothérapie (PDT) +/- TPPOH et +/- vectorisé par

nanoparticule (NP) (n=5/groupe) il a été constaté un ralentissement de la croissance tumorale des xénogreffes traitées avec TPPOH-NPs-PDT. De plus, il existait une plus grande quantité de photosensibilisants dans la tumeur (mais aussi dans le foie) quand ce dernier était couplé à la nanoparticule.

Ces approches pourraient bénéficier à la photothérapie dynamique à la condition de trouver une méthode efficace d'amener l'énergie lumineuse localement.

2. L'EFFET TCHERENKOV

2.1. Minime rappel de physique. Le photon et la dose

Energie d'un photon. L'énergie individuelle de chaque photon augmente avec la diminution de la longueur d'onde selon la formule $E=h\nu$ où E est l'énergie, h, la constante de Planck et ν (lettre grecque nu), la fréquence du photon qui évolue de façon inverse à la longueur d'onde. Un photon de 630nm a donc moins d'énergie individuelle qu'un photon de 404nm. De la même façon, un photon issu d'un accélérateur linéaire à 220kV est probablement moins énergétique qu'un photon issu d'un accélérateur de 6MV. Si on classe l'énergie des photons par ordre décroissant : photon X > photon Ultraviolet > photon dans le visible > photon dans l'infrarouge > photon d'ondes radiophoniques.

Dose physique rapportée.

- En radiothérapie : La dose est rapportée en Gray (Gray), qui correspond à 1J/kg. Il ne faut pas confondre cependant cette notion individuelle particulière avec l'énergie qu'un faisceau de ces photons pourraient déposer. Il ne faut pas confondre énergie des photons et dose. Un kilogramme de plume est aussi lourd qu'un kilogramme de plomb. Ainsi un joule délivré en photons de 220kV correspond à la même énergie déposée dans le volume qu'un joule en 6MV.
- En photothérapie : la dose est rapportée à l'entrée en J/cm². Cette subtilité rend la comparabilité des doses de radiothérapie et de photothérapie extrêmement complexe.

Point de sémantique.

- En radiothérapie, on a pour habitude de désigner l'énergie du faisceau par la tension accélératrice en Volt du tube accélérateur du faisceau d'électron avant qu'il n'atteigne une cible qui permet l'émission de photons. Ainsi, on désigne souvent les énergies des photons sous la forme kV, MV, comme kiloVolt et MégaVolt. Ce type de faisceau présente un spectre avec tous les photons sous le seuil nominal permis par cette tension accélératrice. Il n'est pas « pur ». Entre parenthèse, la capacité des physiciens médicaux de produire des modèles de qualité de dépôt de la dose, malgré la non connaissance de la longueur d'onde exacte du spectre émis reflète bien la différence entre la dose déposée (mesurable avec un outil de type calorimètre), et le spectre d'émission (mesurable avec un outil de type spectromètre).
- Les faisceaux d'électrons sont exprimés en Méga Électron Volt ou MeV, qui correspond à leur énergie. Un photon de 20MeV contient $3,20 \cdot 10^{-12} \text{J}$.
- En clinique, la radiothérapie en MV est classiquement utilisée pour toute la radiothérapie externe du fait de son bon rendement en profondeur, c'est-à-dire sa capacité à déposer de l'énergie en profondeur dans les tissus malgré le fait qu'une quantité de matière importante ait été traversée.

L'interprétation des données physiques est délicate et nécessite de bien comprendre les notions de dose, de spectre et de rendement en profondeur.

2.2. Effet Tcherenkov

Plusieurs notions peuvent être intéressantes pour comprendre l'effet Tcherenkov.

1. Il s'agit d'un rayonnement de photons produit par une particule qui se déplace au-dessus de la vitesse de la lumière dans un milieu.
2. L'image classique utilisée est celle d'un avion de chasse et du mur du son. Dans cette image, l'avion est la particule en mouvement. L'avion de chasse émet du son, tandis que la particule émet des photons. Quand le mur du son est franchi, il y a un front d'onde sonore dans le cas de l'avion, de photons dans l'effet Tcherenkov.
3. Ce phénomène est décrit par les patients, lors de l'irradiation des globes oculaires par récupération du signal bleu sur la macula(92)

4. Le rayonnement n'est pas isotropique, et les photons Tcherenkov sont émis selon un angle précis par rapport à l'axe du faisceau (figure 8)

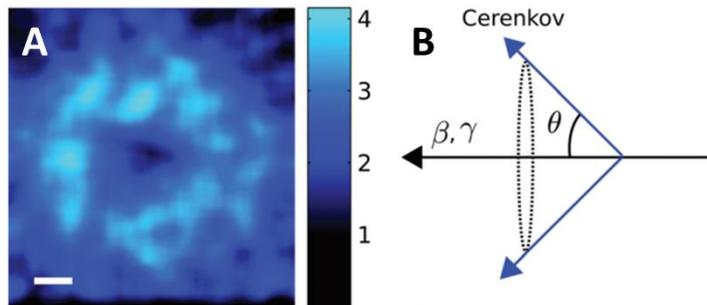


Figure 8 : A. Emission Tcherenkov provoquée par un faisceau d'électron à 18MeV, dans un plan perpendiculaire à l'axe du faisceau. B. Direction de propagation de l'émission Tcherenkov (flèche bleue), par rapport à l'axe du faisceau de la particule (flèche noir), selon l'angle θ , habituellement autour de 40° . D'après Axelsson et al. (93)

5. La connaissance de ce phénomène physique permet une modélisation avec des modèles de type Monte Carlo. L'effet Tcherenkov a notamment été modélisé au CELIA par Philippe Nicolai pour illustrer l'effet Tcherenkov (figure 9). Cette figure permet de bien voir le front d'onde assymétrique produit par l'effet Tcherenkov.

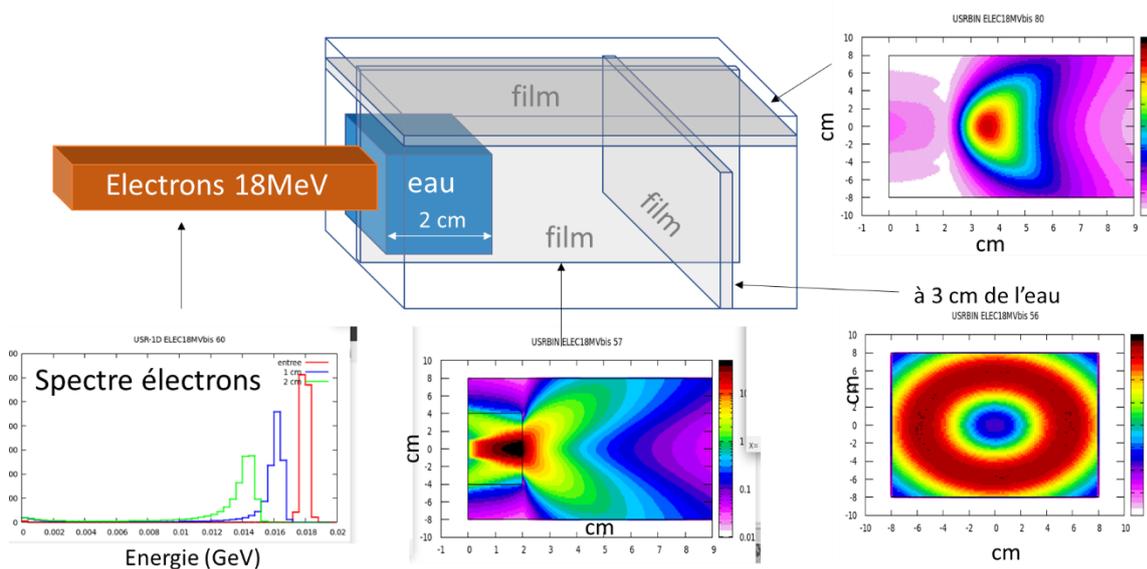


Figure 9 : Simulation de l'effet Tcherenkov à partir d'un faisceau d'électron traversant un milieu aqueux. Trois représentations de l'intensité lumineuse de ces photons sont représentées : longitudinalement dans l'axe, longitudinalement, en dehors de l'axe et dans un plan perpendiculaire à l'axe du faisceau. Cette simulation a été réalisée par Philippe Nicolai au CELIA. L'algorithme utilisé était Monte-Carlo Flukka.

6. Il existe une notion de seuil selon le milieu traversé. Dans l'eau cet effet apparaît pour des énergies d'électrons de radiothérapie d'environ 250keV(94). En dessous de ce niveau de dose, aucun effet Tcherenkov ne peut être constaté, puisque l'énergie nominale du photon est trop faible car il ne se déplace pas plus vite que la vitesse de la lumière dans le milieu.
7. En cas d'irradiation en photons, l'émission Tcherenkov est produite par les électrons secondaires émis dans le milieu.
8. On notera qu'en radiothérapie, le rayonnement Tcherenkov a été proposé récemment pour faire de la dosimétrie surfacique. (95)

L'effet Tcherenkov correspond à une émission de photons dans le spectre du bleu retrouvé lors de la réalisation d'une radiothérapie à haute énergie.

MATERIEL ET METHODE

1. RADIOSENSIBILISATION D'AUTRES LIGNEES TUMORALES PAR LES PORPHYRINES INDUITES PAR LE 5-ALA

Les lignées cellulaires pour les tests de survie cellulaires et de clonogénicité sont :

- **A375** : Lignée humaine de mélanome
- **A431** : Lignée humaine de carcinome épidermoïde cutané
- **HT29** : Lignée humaine de cancer du Colon
- **HT116** : Lignée humaine de cancer du Colon kRAS muté
- **U87** : Lignée humaine de glioblastome

Chaque lignée a été testée en cytométrie en flux après exposition au 5-ALA et les cellules montraient une accumulation des porphyrines.

1.1. Survie cellulaire par analyse au Cristal Violet

Principe du test de vitalité au Cristal Violet : Seules les cellules vivantes fixent le cristal violet. Après exposition des cellules au Cristal Violet, le lavage permet de ne garder sur la plaque que les cellules fixées et vivantes. L'ajout d'acide acétique détruit les cellules et libère le Cristal violet dans la solution. La densité optique résultante dans le puit est considérée comme proportionnelle à la quantité de cellules vivantes. Le test a été réalisé comme précédemment publié (96)

1.2. Tests de clonogénicité

Principe : le test de clonogénicité est un test de référence en radiothérapie utilisé dans de nombreuses études (66,72,75,97,98). Dans un test de clonogénicité, les cellules sont irradiées puis mise en culture. On observe le résultat par le nombre de colonies formées. Chaque colonie est considérée comme le produit d'une cellule qui a survécu au traitement et qui a montré ses capacités à survivre mais aussi à proliférer. La contrainte de cette approche est d'avoir des cellules adhérentes, raison pour laquelle il a été impossible de l'appliquer au cellules P3, trop sensibles au décollement. La difficulté technique est le bon ajustement du nombre de cellules dans chaque puit, de telle façon que la proportion survivante soit entre 10 et 200, pour que les colonies puissent être comptées.

Protocole expérimental :

Dix flasques **T25** contenant 5mL de milieu contenant 1 000 000 de cellules étaient préparées la veille de l'expérience. Le 5-ALA était ajouté pour une concentration finale de 1mM pendant 4 h. Les flasques étaient irradiées à 5 niveaux de dose : 0-2-4-6-8Gy, à 220kV. Après lavage du 5-ALA au PBS, dissociation avec la trypsine, et comptage cellulaire, les cellules étaient mise en culture dans 3 puits par condition, à 2mL par puit, dans une plaque 6 puits. La quantité de cellules dans chaque puit était ajustée à la dose, lignée par lignée. Dans le cas de A431, par exemple :

- 0Gy-> 500 cellules
- 2Gy-> 500 cellules
- 4Gy-> 1000 cellules
- 6Gy-> 2000 cellules
- 8Gy-> 5000 cellules

Les flasques étaient ensuite incubées à l'abri de la lumière et l'apparition des colonies était vérifiée 3 fois par semaine à partir de J7 de façon à ne pas avoir de colonies à confluence. Les cellules étaient ensuite fixées au cristal violet vers J10-15, puis comptées à l'œil, sur fond blanc dans un endroit bien éclairé en lumière naturelle, avec un marqueur et un compteur de cellules. Pour l'analyse, chaque condition était rapportée à sa propre condition sans 5-ALA et sans irradiation. Cette représentation permet de faire figurer graphiquement l'effet propre du 5-ALA.

2. PHOTOSENSIBILISATION DES CELLULES P3 APRES TRAITEMENT PAR LE 5-ALA

Principe de l'expérience

Afin d'être dans les conditions superposables à la radiothérapie, une photothérapie sur sphéroïdes a été planifiée. Afin d'avoir un comparatif sur les conditions habituellement testées dans le laboratoire et les études de photothérapie *in vitro*, une expérience a aussi été menée sur des cellules en monocouche (adhérentes).

Les échantillons cellulaires ont été exposés à des doses croissantes de photothérapie à 440nm, selon une croissance de dose. L'incubation des cellules reproduisait les conditions *in vitro* en sphéroïdes précédemment réalisées, à savoir une incubation de 4h, avec un jugement de l'efficacité sur la survie cellulaire 48h après le traitement.

Protocole expérimental de préparation des plaques avant photothérapie :

1. Sur sphéroïdes

Dans 100µL de milieu supplémenté en Accutase® dans des puits en U, de faible adhérence d'une plaque 96 puits Falcon®, 10 000 cellules P3 étaient déposées à J-2.

A J0, 100µL de milieu étaient ajoutées dans les puits sans 5-ALA pour le groupe contrôle et à 2mM de 5-ALA pour le groupe expérimental ([5-ALA]_{finale}=1mM). Après une incubation de 4h dans le noir, 5 sphéroïdes étaient récupérés, et lavés au PBS avant d'être remis en culture dans une nouvelle plaque 96 puits low binding avant la photothérapie.

2. En monocouche, sur cellules adhérentes

Après dissolution de sphéroïdes par Accutase® pendant 12 minutes, et lavage de cet Accutase®, les cellules étaient comptées, et 40 000 cellules étaient mises en culture dans 200µL d'une solution sans Accutase® dans un puit d'une plaque 48 puits adhérente. Après 24h, 200µL de milieu était ajouté, sans ou avec 5-ALA à 2mM, puis, après 4h d'incubation dans le noir, les puits étaient lavés au PBS, 200µL de milieu était remis avant réalisation de la photothérapie.

Photothérapie :

Le Laser Thor était récupéré auprès de la plateforme Vivoptic®, puis calibré (homogénéité du faisceau, puissance à 100mW/cm²). Le traitement était délivré dans le noir, avec la mise en place de masque en papier Canson noir avec un trou de la taille du puit, et un chronométrage de l'exposition pour obtenir les doses désirées dans chacune des conditions.

Illumination à 440nm à 100mW	
0 Joule	0 seconde
1 Joule	10 secondes
2,5 Joules	25 secondes
5 Joules	50 secondes
10 Joules	100 secondes
20 Joules	200 condes

Les cellules étaient ensuite remises en culture pendant 48h.

Après photothérapie pour les cellules en sphéroïdes, ces derniers étaient prélevés, incubés avec 100µL d'Accutase pour dissocier les cellules, puis 300µL de milieu était ajouté, et enfin

400µL de la solution mère d'IP-Calcéine. Après 20 minutes d'incubation dans le noir, les cellules étaient analysées en cytométrie.

Après photothérapie pour les cellules en monocouches, après aspiration du milieu, chaque puit était incubé avec 100µL d'Accutase®, puis transféré avec 300µL de milieu et 400µL de la solution mère d'IP-Calcéine. Après 20 minutes d'incubation dans le noir, les cellules étaient analysées en cytométrie.

Mesure en FACS de la viabilité

Les cellules ont été passées au FACS Accury® C6Plus Flow. Les particules jugées comme étant des cellules étaient d'abord sélectionnées par les valeurs de Forward Scatter (FSC), estimant la taille de la cellule et la Side Scatter (SSC), marqueur de la granularité de la cellule.

Les valeurs d'excitation/émission de la calcéine sont 494/517 nm. L'estimation du signal Calcéine était faite après seuillage sur une excitation à 488 nm et un signal de récupération de 533/30 (canal FITC). Le contrôle positif d'absence de viabilité était fait après lyse cellulaire avec incubation avec solution à concentration finale d'éthanol à 70%. L'estimation de la viabilité des cellules se faisait sur la population de particules considérées comme des cellules selon un seuillage par FSC et SCC.

3. RADIOSENSIBILISATION A HAUTE ENERGIE DES CELLULES P3 PAR LES PORPHYRINES INDUITES PAR LE 5-ALA

Radiothérapie haute énergie sous forme de sphéroïdes

La méthodologie de préparation, de culture et de mesure des sphéroïdes est la même que celle décrite dans l'article, figure 6 (99). Brièvement, après formation et mesure de 5 sphéroïdes de 10 000 cellules P3 (mesure J0), les sphéroïdes étaient incubés ou non en présence 5-ALA avec une concentration finale de 1mM pendant 4h puis irradié à 0-4-10Gy.

L'irradiation était réalisée à haute énergie (18MV) sur un accélérateur clinique, le VersaHD® d'Elekta®, avec une ouverture de champs et des bolus afin d'être dans la zone d'équilibre électronique. Le calcul et la vérification de la dose ont été réalisés par l'ingénieur du service de radiothérapie de Haut Lévêque (Benoît Protat). Après lavage et retrait du 5-ALA, les sphéroïdes étaient remis en culture et mesurés à J3-J7 et J14. Les résultats sont exprimés en

ratio de croissance, chaque sphéroïde constituant son propre témoin. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

Radiothérapie haute énergie en monocouche

En monocouche, il n'est pas possible d'avoir une taille initiale de sphéroïde qui servirait à faire un ratio. C'est la raison pour laquelle les mesures sont données en taille absolue. La méthodologie se rapproche de celle décrite dans l'article, figure 4 (99). Brièvement, 400 000 cellules P3 sont incubés en l'absence d'Accutase® dans des flasques T25 à J-2. A J0, on vérifie qu'elles sont bien adhérentes. Puis les cellules sont incubées en présence ou non de 5-ALA avec une concentration finale de 1mM pendant 4h puis irradiées.

L'irradiation à 0-4-10Gy était réalisée à haute énergie (6MV) sur un accélérateur clinique, le VersaHD® d'Elekta®, avec une ouverture de champs et des bolus afin d'être dans la zone d'équilibre électronique. Le calcul et la vérification de la dose ont été réalisés par l'ingénieur du service de radiothérapie de Haut Lévêque (Benoît Protat).

Après lavage et retrait du 5-ALA, les cellules étaient décollées avec de l'Accutase® pendant 12 minutes puis lavées avec du milieu, comptées en cellules de Malassez, et réparties dans des plaques 96 puits de faible adhérence et à fond rond avec de l'Accutase®, 5 sphéroïdes par condition. Les sphéroïdes étaient mesurés à J3-J7 et J14. Les résultats sont exprimés en taille absolue. Chaque expérience a été répétée 3 fois.

4. DETECTION DIRECTE DE L'EFFET TCHERENKOV ET INDIRECTE DANS UNE SOLUTION DE PPIX LORS D'UNE IRRADIATION A HAUTE ENERGIE

Radiothérapie : La radiothérapie haute énergie était réalisée sur un irradiateur Clinac 21EX® de Varian®. Le bras était positionné à 270°, le collimateur à 90°, avec une distance source/surface du flacon de 107cm. L'irradiation en électrons se faisait avec mise en place d'un cache de 6x4cm² situé à 95cm de la source, en alliage de Lipowitz utilisé en clinique (50% Bismuth, 26,7% de plomb, 13,3% d'étain, 10% de Cadmium, point de fusion à 70°). L'irradiation était faite à 20MeV (10Gy/minute). L'irradiation en photons était faite avec une ouverture de collimateur à 6x4cm², 6MV (2Gy/minute) ou 18MV(2Gy/minute).

Matériel de détection physique. Le dispositif est prévu pour 2 types d'acquisition qui sont une acquisition par caméra qui présente l'avantage de permettre une quantification relative par l'acquisition d'image définies dans un plan, et l'acquisition spectroscopique qui permet une caractérisation des photons émis. La caméra était un modèle Clara de Andor® (DR-328G-C01-SIL) et le spectromètre un QEPro, Ocean Insite avec une fente 10 microns

Solution de PPIX. La PPIX était dilué dans du Tween® 10x puis après agitation augmentation de la dilution avec de l'eau distillée jusqu'à une concentration de Tween® 0,5x. Le Tween® est un polyoxyéthylène sorbitol ester. C'est un détergent non ionique.

Dispositif expérimental de détection directe de l'effet Tcherenkov

Dans la première expérience préliminaire, l'objectif est de détecter l'effet Tcherenkov directement avec une machine de traitement standard en radiothérapie, avec différents rayonnements (électrons vs photons), et à différentes énergies. Pour cela, l'irradiation dans l'air est comparée à une irradiation d'une flasque T75 d'eau. *On notera que lors de cette étape préliminaire, la seule fibre du spectroscope était fixée dans l'axe du faisceau, et le spectroscope n'était pas blindé, entraînant du bruit dans le signal, comme on s'en apercevra par la suite.*

Dispositif expérimental de détection de la réémission des photons par une solution de PpIX

Le principe de cette manipulation est de visualiser l'existence d'un signal de façon perpendiculaire au faisceau. Cela obéit à un impératif technique qui est le faisceau direct de radiothérapie endommage le matériel électronique, mais surtout pour s'affranchir des photons émis directement selon l'effet Tcherenkov, puisque ces derniers ont une direction d'émission dans l'axe du faisceau. Par contre, il n'y a pas de raison pour ne pas avoir le signal de désexcitation de la PpIX en dehors de l'axe du faisceau. L'émission de la PpIX est isotropique (figure 10).

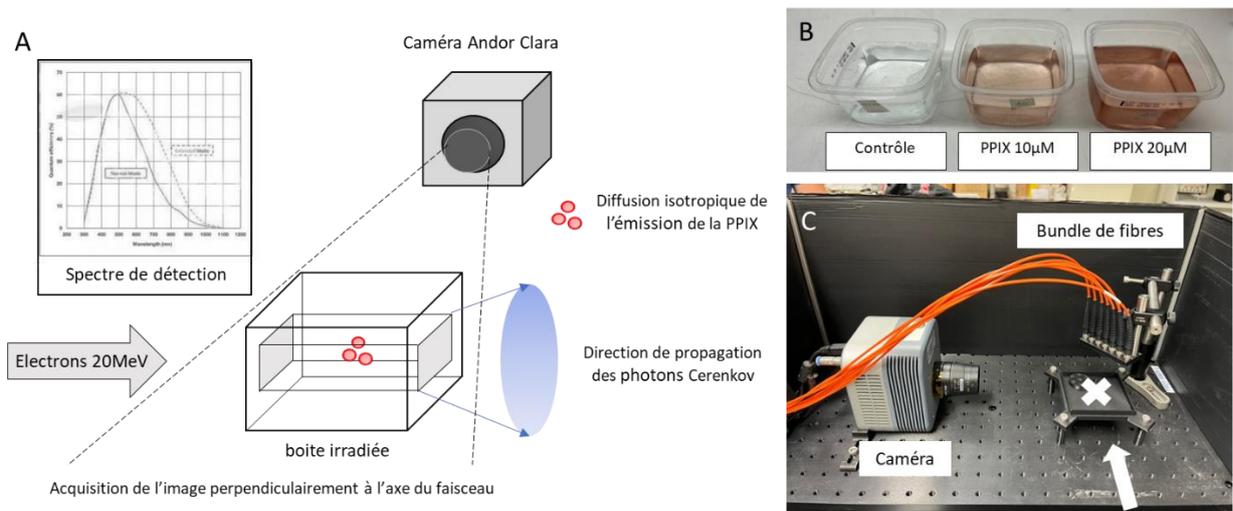


Figure 10 : Dispositif d'acquisition du rayonnement induit par la PpIX stimulées par le rayonnement Tcherenkov. A. Schéma du dispositif. On notera que les photons induits Tcherenkov se dirigent vers l'arrière de la boîte irradiée, et ne devraient donc pas être détectés par la caméra (sauf réflexion sur les parois de la boîte). La section de passage du faisceau incident d'électrons à 20MeV est figurée sous la forme d'un parallélogramme dans la boîte irradiée. B. Aspect des différentes solutions irradiées selon la quantité de PpIX. C. Photo du dispositif avec la caméra et le bundle de fibres qui permettra l'acquisition spectroscopique. La croix blanche figure l'emplacement de la boîte irradiée et la flèche blanche la provenance du faisceau d'irradiation

La détection spectrométrique est ici assurée par un bundle de fibre qui augmente la quantité de signal et qui est fixé après la boîte irradiée, de telle façon que l'effet Tcherenkov puisse être récupéré, sans mettre les fibres dans l'axe du faisceau. Le bruit sur le signal du spectromètre induit par la tête de l'accélérateur a été atténué par un blindage en plomb du spectromètre. La fente à l'entrée du spectromètre a aussi été supprimée permettant d'augmenter la sensibilité au prix d'une diminution de la précision.

RESULTATS/DISCUSSION

1. RADIOSENSIBILISATION D'AUTRES LIGNÉES TUMORALES PAR LES PORPHYRINES INDUITES PAR LE 5-ALA.

1.1. Evaluation de la viabilité à 48h par le Cristal Violet

La mesure de la vitalité montre sur cette expérience unique qu'il n'existe de différence statistiquement significative qu'à la dose de 10Gy pour 3 lignées(A375, U87 et HT29) et que cette différence plaide en faveur d'un effet plutôt protecteur du 5-ALA (figure 11). La vitalité est par contre très significativement affectée par la radiothérapie, puisque toutes les survies dans une condition donnée (Ctrl ou 5-ALA) sont statistiquement différentes selon la dose (0 vs 4Gy, 4Gy vs 10Gy et 0Gy vs 10Gy).

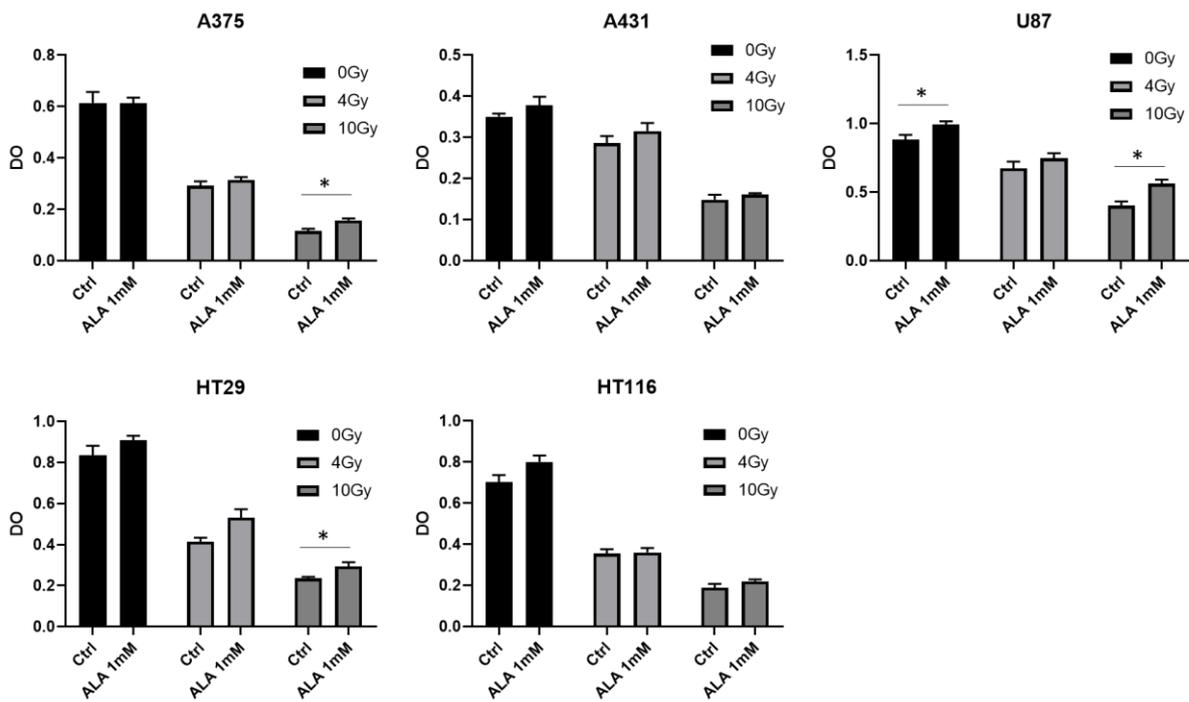


Figure 11 : Survie cellulaire de 5 lignées cellulaires selon la présence de 5-ALA et la dose de radiothérapie. La survie est estimée par la densité optique après marquage au Cristal Violet. Abréviations : * p < 0.05 ; DO = Densité Optique

Ces données ne plaident pas en faveur d'une radiosensibilisation par le 5-ALA. Ce type de test est souvent écarté pour évaluer la radiothérapie puisque cette dernière peut avoir un effet suspensif sur la croissance, sans forcément de mortalité comme nous avons pu le montrer (99). On lui préfère pour cette raison le test de clonogénicité. Dans le cas présent, ce test semble néanmoins pertinent puisqu'il existe un contrôle positif : la radiothérapie elle-même induit une diminution de la survie cellulaire de façon dose dépendante. Le 5-ALA ne modifie pas cet effet.

1.2. Evaluation de la radiosensibilité par le test clonogénicité

La radiosensibilisation par l'accumulation de porphyrines induites par le 5-ALA a été testée par test de clonogénicité pour compléter les données précédentes. L'analyse de la survie clonogénique ne retrouve pas d'effet clair du 5-ALA (figure 12)

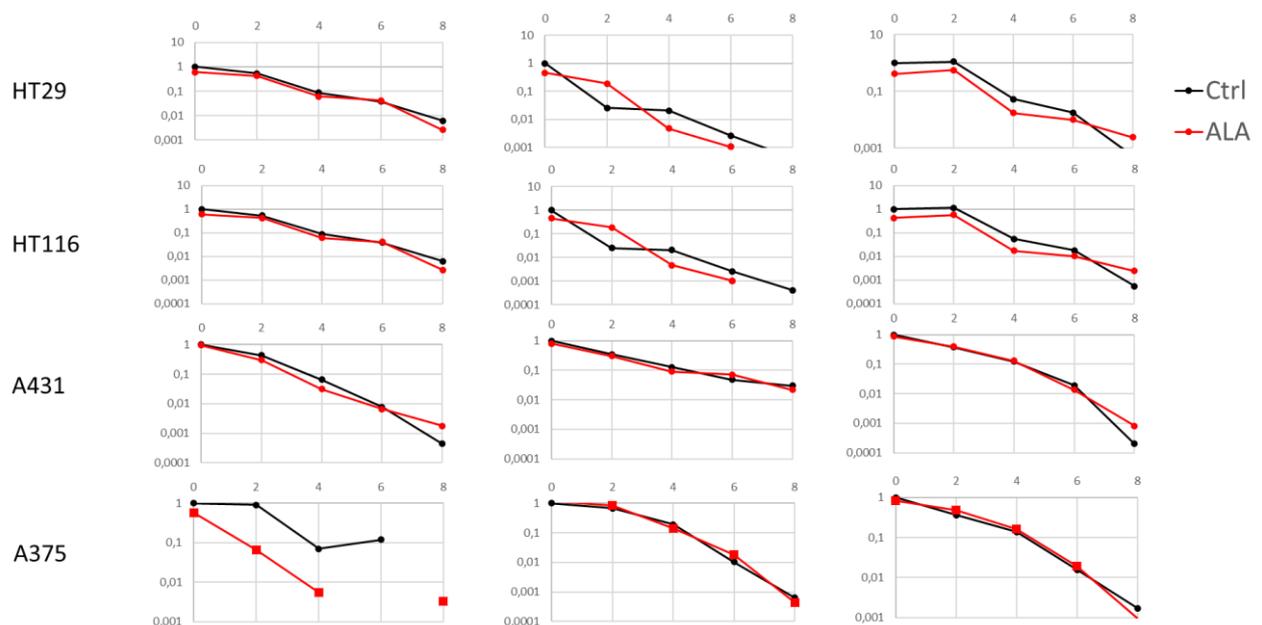


Figure 12 : Clonogénicité pour 4 lignées cellulaires sans et avec 5-ALA à 5 doses d'irradiation. Chaque lignée cellulaire est représenté en ligne, un graphique représentant une expérience, à raison de 3 expériences par lignée. Les résultats étant hétérogènes, les expériences n'ont pas été regroupées.

Il existe une importante hétérogénéité de réponse des cellules, ne permettant pas une représentation groupée des expériences. L'aspect plus traditionnellement décrit ressemble aux courbes A431 de droite et A375 du milieu et de la droite avec une diminution respectant une loi mathématique : $\text{Survie} = e^{-\alpha \cdot \text{dose} - \beta \cdot \text{dose}^2}$, selon le modèle linéaire quadratique (100). Nos expériences retrouvent pour la même lignée un modèle exponentiel (A431 milieu) et

linéaire quadratique (A431 droite), ce qui laisse suspecter une variabilité lors des expérimentations. Il n'en demeure pas moins qu'il n'existe pas de lignée parmi celles testées pour laquelle un effet du 5-ALA est indiscutablement radiosensibilisant.

L'intérêt de la radiosensibilisation par le 5-ALA a été testé dans des lignées cellulaires et des modèles murins non glioblastomes et les résultats ne sont pas univoques. Nous discutons ici les principaux résultats, selon les localisations tumorales, et dans les conditions d'une irradiation à énergie faible, sans émission Tcherenkov possible.

Colon. Dans un modèle de cancer du colon (lignée HT29), Yamada et al. (101) ne montrent pas d'effet sur la survie clonogénique avec une irradiation unique de 1Gy entre RT seule et RT + 5-ALA (1mM, 4h d'incubation). Quand le fractionnement de la radiothérapie est de 3 séances (1/jour) de 0,3Gy, le 5-ALA entraîne une diminution de la fraction survivante. La toxicité propre du 5-ALA n'est pas documentée. Dans un modèle souris BALB/c, les tumeurs sous cutanées irradiées une fois à 1Gy vs 1Gy + 5mg de 5-ALA en intra péritonéal n'avaient pas de différence de taille. Pour les souris irradiées à 15Gy, en 10 jours, 3 jours sur 7, l'ajout de 5-ALA entraînait une diminution de la taille tumorale mesurée, mais pas de la taille des tumeurs pesées en fin d'expérience. Le choix d'une faible dose en fraction unique à 1Gy pose question, alors même que les auteurs insistent sur la radiorésistance de ce type de tumeur. Enfin, la différence entre les tailles tumorales est discordante, et le nombre de souris par groupe (≤ 5) assez faible pour conclure. Ces résultats restent cohérente avec notre modèle puisqu'une irradiation unique n'entraînait pas de modification de la survie clonogénique. Nous disposons cependant de davantage de données, puisque 4 doses de radiothérapie ont été testées.

Sarcome. Schaffer et al. (102) ont évalué sur un modèle de souris, la réponse d'une lignée de cellules de sarcome de Lewis à une radiothérapie sur le volume tumoral en association avec différentes dose de 5-ALA et de Photofrin®. *Pour mémoire le Photofrin® est constitué de Porphimer Sodique, un photosensibilisant qui a l'autorisation de mise sur le marché pour les récidivies de cancers localisées de l'œsophage et du poumon non à petites cellules pour un traitement par photothérapie.* Dans ce modèle, la prémédication par du 5-ALA à 20mg/kg ou 200mg/kg suivie d'une irradiation de 3Gy ne montrait pas d'efficacité sur la progression tumorale (N=10/groupe). Seule l'association Photofrin® à 5mg/kg et radiodothérapie permettait un ralentissement de la croissance tumorale. On notera ici que la radiothérapie seule n'avait aucun effet sur la croissance tumorale, et que le groupe Photofrin® seul n'avait

aussi aucun effet. **Dans ce modèle de sarcome, le 5-ALA ne permettait pas de rendre les tumeurs plus radiosensibles.**

Tête et cou. En ce qui concerne les cancers ORL, Ito et al. (75) étudient la lignée FaDu. Ils ne montrent pas de radiosensibilisation à la dose de 4Gy par le 5-ALA (0,25mM, 0,5mM, 1mM), quand bien même l'accumulation de PpIX ait été montrée. **L'effet radiosensibilisant du 5-ALA n'est pas montré dans cette étude avec un modèle de cancer de la tête et du cou.** De façon intéressante, la suppression de UROD par siRNA radiosensibilise à la fois sur le plan cellulaire et sur le plan murin. Des tumeurs de cellules FaDu implantées en souscutanés dans les souris SCID croissaient plus lentement dans les bras siRNA-UROD + radiothérapie que tous les autres bras. L'accumulation particulièrement importante de Fe²⁺ et Fe³⁺ dans les cellules UROD- a été évoqué pour expliquer cette radiosensibilisation.

Mélanome. Le modèle du mélanome montre des résultats plus encourageants concernant la radiosensibilisation par le 5-ALA. Dans une première étude, Takahashi et al. (73), ont testé l'effet de l'ajout de 5-ALA (intratumoral, 50mg/kg) à une radiothérapie (30Gy en 10 séances) dans un modèle murin sous cutané de mélanome (lignée murine B16-BL6). La croissance tumorale était moins importante dans le groupe RT+5-ALA que dans chacun des autres groupes.

Dans une autre étude, Takahashi et al. (103) ont testé l'effet de l'ajout de 5-ALA (intrapéritonéal, 200mg/kg, 4 h avant l'irradiation) à une radiothérapie (30Gy en 10 séances) dans un modèle murin intra-crânien de mélanome (lignée murine B16-Luc). La taille tumorale était jugée par bioluminescence après injection de luciférine sur cette lignée transfectée avec le gène de la luciférase. Cette taille était significativement plus petite à J9 dans le groupe 5-ALA + RT (N=7) par rapport au groupe RT seule (N=7). Après sacrifice des souris cependant à J10, la taille tumorale était plus petite, mais de façon non significative. On notera que l'estimation de la taille tumorale était faite tous les 2 jours, sans qu'on sache si était prise en compte la séquence avec l'ajout de 5-ALA, rendant inconnue un éventuel phénomène de chimioluminescence. Cette stratégie consiste à amener de la lumière par la réaction de désexcitation de la luciférine au contact de la luciférase et que cette lumière interagisse avec la PpIX. Les limites qu'on peut avancer sont que la variation d'efficacité reste marginale et n'est pas retrouvée à la dissection des tumeurs, et que l'effectif des souris est relativement faible. Néanmoins, c'est une étude assez enthousiasmante en ce sens qu'elle cherche à se rapprocher au plus près d'une situation clinique fréquente, les métastases cérébrales de

mélanome, dans un système immunocompétent, avec une irradiation ciblée, et une administration réaliste de 5-ALA (par voie générale). Dans notre modèle de mélanome A375, nous n'avons pas de radiosensibilisation par les porphyrines induites par le 5-ALA, ce qui peut être la manifestation d'une variabilité entre les lignées. **Dans un modèle murin immunocompétent de mélanome, il semble exister des signes d'efficacité d'une de radiosensibilisation par le 5-ALA.**

Au total, nos résultats sont en accord avec une littérature qui reste partagée sur la réalité de l'effet de radiosensibilisation par le 5-ALA. Le fractionnement et des radiosensibilités variables selon les lignées pourraient être à l'origine de ces variations. La difficulté pour reproduire les résultats doit rendre prudent sur ces études qui méritent donc confirmation.

2. PHOTOSENSIBILISATION DES CELLULES P3 PAR LES PORPHYRINES INDUITES PAR LE 5-ALA

Les cellules P3 n'ont pas été radiosensibilisées par l'accumulation de porphyrines. Il était possible que ces cellules ne fussent pas photosensibles. De plus, l'architecture en sphéroïdes a été montrée comme influençant l'effet de la photothérapie (104). Ainsi, nous avons évalué la photosensibilisation dans 2 conditions de culture : en monocouche cellulaire et en en sphéroïdes (figure 13).

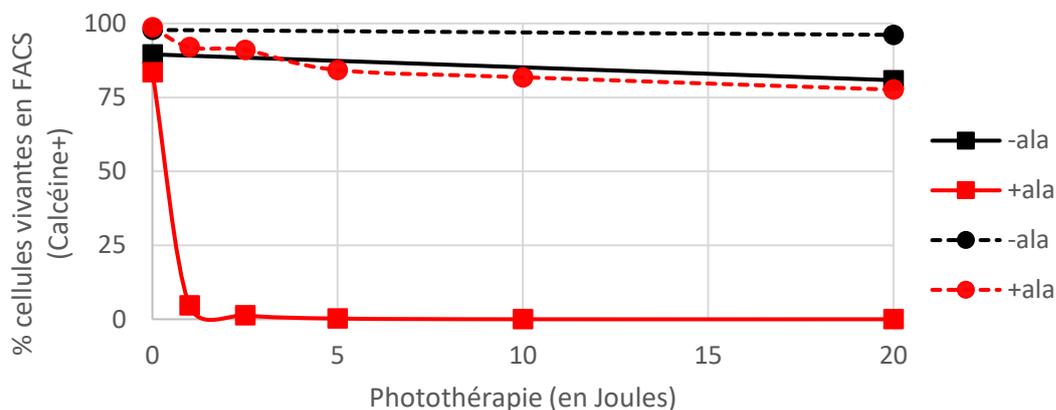


Figure 13 : Effet de la photothérapie sur des cellules P3 selon la présence de 5-ALA dans le milieu et selon l'état des cellules : en monocouche (■carrés, N=3 expériences) ou en sphéroïdes (●ronds, N=5 expériences). En noir : situation contrôle, sans 5-ALA. En rouge : Incubation 4h à 1mM de [5-ALA] préalablement à l'irradiation.

Les cellules en monocouche survivent à 4,7% [IC95% 0-10,1] à 1J avec du 5-ALA contre 83% [IC95% 77,0-90,0] sans illumination et 0% à 20J. En l'absence de 5-ALA, la photothérapie a un léger effet avec une viabilité qui est de 80,8% à 20J [IC95% 73,1-88,5]. La photothérapie est donc efficace à faible dose en cas de photothérapie sur cellules en monocouche.

Les cellules organisées en sphéroïdes survivent à 92,0% [IC95% 87,6-96,3] à 1J avec du 5-ALA contre 98,7% [IC95% 97,8-99,6] sans illumination et 77,6% [IC95% 64,8-90,4] à 20J. En l'absence de 5-ALA, la photothérapie n'a pas d'effet avec une viabilité qui est de 96,1% à 20J [IC95% 96,1-100]. Ainsi, la photothérapie présente une efficacité limitée, même à forte dose, en cas de photothérapie sur cellules organisées en sphéroïdes.

Comme on l'a vu précédemment, la photothérapie nécessite pour fonctionner les 3 composantes que sont l'accumulation d'un photosensibilisant, l'illumination et la médiation par l'oxygène. La différence d'effet ne peut être expliquée par l'absence de PpIX dans les cellules P3 sous forme de sphéroïde : il a été montré précédemment (article Cancers, figure 5), que cette accumulation était réelle et significative dans les cellules sous forme de sphéroïdes. Elle a par ailleurs été vérifiée pour les cellules en monocouche. La deuxième hypothèse pourrait être une diminution de l'intensité d'illumination suite à l'épaisseur des sphéroïdes. Les sphéroïdes lors de l'illumination ont une largeur de 500µm, et une épaisseur inférieure (forme aplatie). Le rendement en profondeur à moins de 1mm n'est pas significativement altéré, et la perte d'intensité éventuelle pourrait être compensée par l'augmentation de la dose de photothérapie. Ainsi donc, la piste principale pourrait être une **hypoxie qui rendrait la photothérapie inefficace**. Cette hypoxie a été constatée par l'équipe de Guyon et al. (105). Dans le même modèle cellulaire (non transfecté par la Luciferase cependant), le centre des sphéroïdes présente une augmentation de l'anhydrase carbonique IX en imagerie confocale, ce qui est un signe de l'hypoxie.

Une autre étude a porté sur l'effet de la photothérapie sur des cellules de glioblastomes s'organisant en sphéroïdes (ACBT cell line) (104). La taille des sphéroïdes était comparée par la mesure de la croissance prolongée, de l'ordre de 4 semaines, comme dans le modèle utilisé pour la radiothérapie dans cette thèse. Le groupe considéré pour le contrôle était la photothérapie, et il n'y avait pas de contrôle avec du 5-ALA seul. La photothérapie était réalisée à différentes doses (1,5J-3J-6J), à différents fractionnements (dose unique vs 4 illuminations à 4 jours d'intervalle) et à débit variable (chaque dose en 4h=bas débit, ou en 24h=ultra bas débit). Les données de taille montrent qu'il existe une croissance d'autant plus

rapide que le débit était élevé, à dose constante. La photothérapie n'entraînait donc pas de mort cellulaire de l'ordre de celle constaté avec les cellules en monocouche (<1% cellules viables à 5J). **La faible efficacité de la photothérapie sur des cellules tumorales cérébrales organisées en sphéroïdes est confirmée par cette étude.** Par contre, dans la condition à ultra bas débit de dose, il existe une stabilisation de la taille des sphéroïdes. Les auteurs en concluent que cette technique de photothérapie permettrait une utilisation en clinique avec des débits très bas, pour un traitement jusqu'à une profondeur de 2,8cm à $17\mu\text{W}/\text{cm}^{-2}$. Pour cela, le débit en surface serait de $1\text{w}/\text{cm}^{-2}$. Ils omettent néanmoins de préciser qu'avec ce traitement de 24h, le parenchyme cérébral normal de surface, aussi exposé au 5-ALA, recevrait une dose de surface de 86 400J. Cela paraît un peu excessif.

Enfin, on pourra noter que les différences d'efficacité constatée en photothérapie valident notre approche de rechercher des conditions les plus proches de celles de la clinique. L'utilisation d'un modèle en sphéroïdes permet une architecture cellulaire plus proche de celle vue en clinique et reproduit probablement l'hypoxie tumorale dont on a pu voir la réalité dans le glioblastome. Ici les résultats varient énormément entre les 2 conditions, en sphéroïde/en monocouche, ou hypoxiques/normoxiques, et les conclusions dans une perspective translationnelle sont diamétralement opposées. L'intérêt de l'utilisation des sphéroïdes dans le glioblastome avait déjà été démontrée par l'équipe de Gomez-Roman (106). Cette équipe comparait l'effet radiosensibilisant de 3 drogues utilisés dans le glioblastome : Temozolomide, Bevacizumab et Erlotinib. Les résultats (tableau 4) montrent une meilleure adéquation entre la condition en sphéroïdes et la clinique et inversement, des résultats parfois opposés avec la condition de culture 2D.

Drogue	2D	3D	Cliniquement
Temozolomide	Efficace 1 lignée/3	Efficace	Efficace
Bevacizumab	Inefficace	Efficace	Efficace*
Erlotinib	Efficace	Inefficace	Inefficace

Tableau 4 : Comparaison de l'effet radiosensibilisant de 3 drogues selon 3 lignées cellulaires selon la condition d'irradiation 2D ou 3D. D'après Gomez-Roman et al (106). *Selon les auteurs qui invoquent une augmentation de la PFS dans les études de phase III(7,20), qui vient probablement plus d'un effet propre du Bevacizumab que d'une radiosensibilisation.

Ainsi, un effet d'une drogue à visée radiosensibilisante paraît plus pertinente avec un modèle en 3D, comme les sphéroïdes P3 qu'un modèle en 2D, comme les cellules P3 en monocouche. **L'intérêt des modèles 3D pour construire des hypothèses cliniques est renforcé par nos expériences et par la littérature.**

3. RADIOSENSIBILISATION A HAUTE ENERGIE DES CELLULES P3 PAR LES PORPHYRINES INDUITES PAR LE 5-ALA

La radiothérapie à haute énergie, en MV, utilisée chez les patients permet l'apparition des photons d'émission Tcherenkov. Il est donc pertinent de tester notre modèle dans ces conditions. Par ailleurs, comme un des piliers théoriques de la radiothérapie dynamique est l'utilisation de photons bleus Tcherenkov pour provoquer une photothérapie locale, et qu'on a pu montrer un impact de l'organisation des cellules en sphéroïdes ou en monocouche sur l'efficacité de la photothérapie, ces 2 conditions ont été testées.

En condition d'irradiation en cellules monocouche, on observe une différence très modeste des croissances tumorales selon l'exposition ou non au 5-ALA (figure 14).

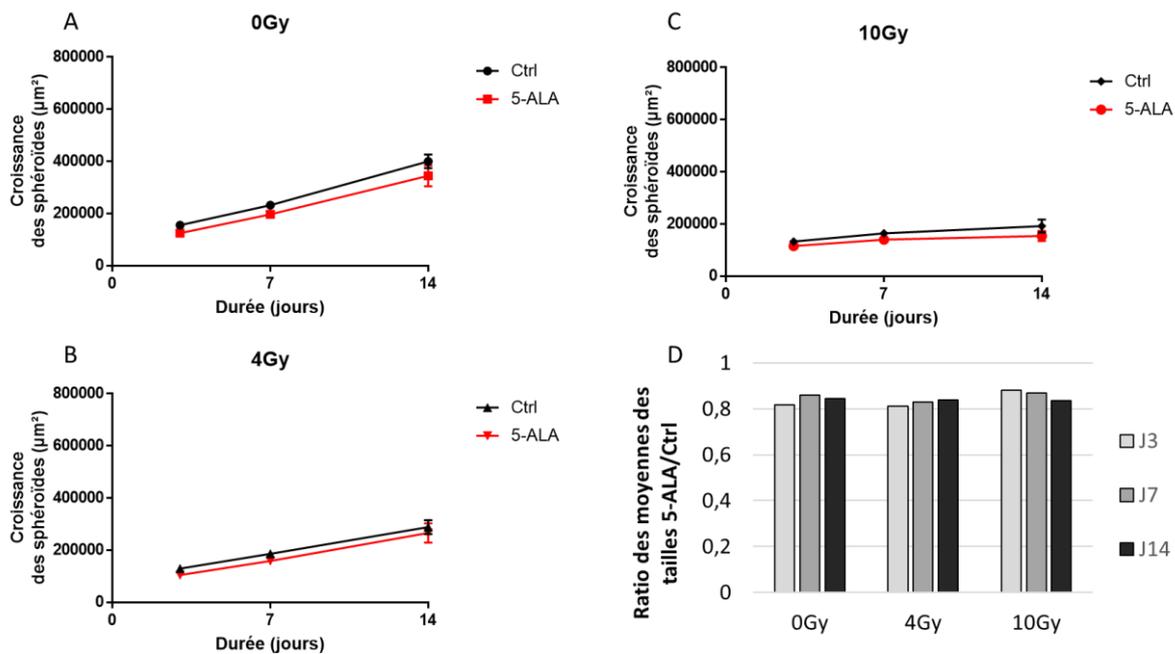


Figure 14 : Effet du 5-ALA sur la croissance des sphéroïdes P3 après irradiation à haute énergie (6MV) de cellules P3 en monocouche à **A. 0Gy**, **B. 4Gy** et **C. 10Gy**. Après irradiation, 10 000 cellules étaient distribuées dans chaque puit, pour former des sphéroïdes observés pour la première fois à J3. N=3 expériences avec 4-5 sphéroïdes pour chaque condition dans chaque expérience. **D. Effet propre du 5-ALA sur la croissance** représenté par le rapport de la taille du sphéroïde exposé au 5-ALA/sphéroïde non exposé au 5-ALA.

Présentation moyenne +/- SEM

L'effet différentiel est un effet propre du 5-ALA qui dans cette expérience entraîne une moindre croissance des sphéroïdes. Le rapport de taille moyenne constant 5-ALA/Ctrl à 0-4-10Gy autour de 0,82 (figure D) matérialise cet effet. Ce résultat pourrait paraître discordant par rapport à l'expérience de la publication (figure 4, p8/15) où les croissances à J3 dans la condition sans 5-ALA et avec 5-ALA sont superposables. En réalité, dans cette expérience, les

cellules étaient irradiées dans une flasque, mais à l'état de sphéroïdes. L'expérience précédente avec la photothérapie en conditions monocouche ne permet pas non plus de comparaison, puisque les cellules restaient adhérentes jusqu'à l'évaluation à J2.

Lorsque les cellules sont irradiées sous forme de sphéroïdes, il n'existe aucune différence statistiquement significative dans les ratios de croissance entre les groupes Ctrl et 5-ALA (figure 15A-C)).

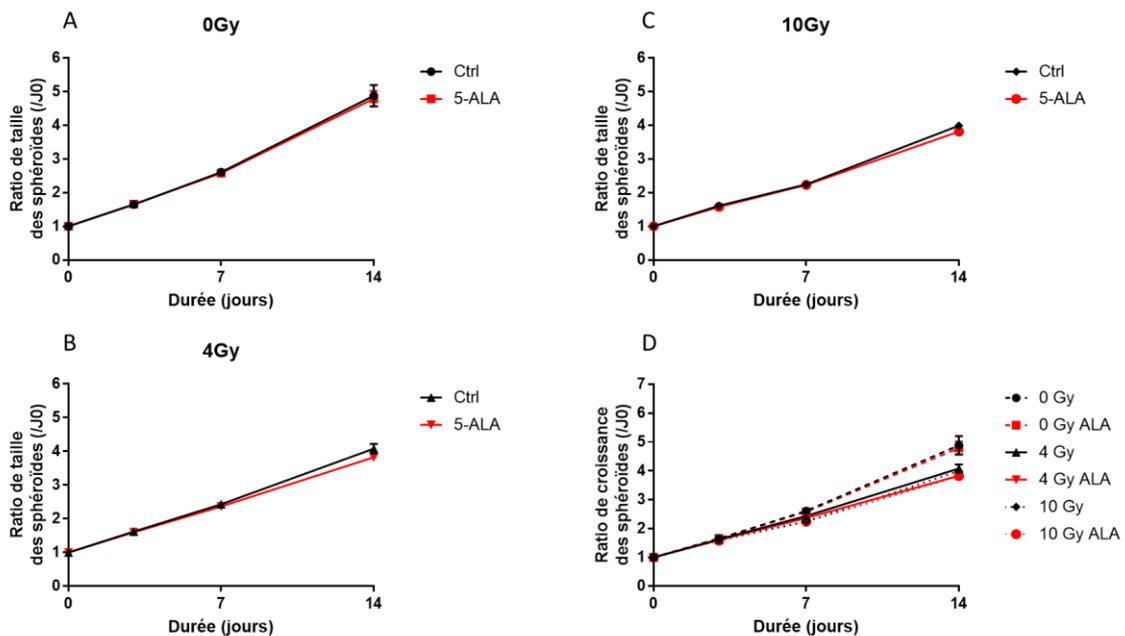


Figure 15 : Ratio de croissance des sphéroïdes irradiés individuellement à 18MV; avec ou sans 5-ALA, à A. 0Gy, B. 4Gy, C.10Gy, D. 0-4-10Gy. N=3 expériences avec 5 sphéroïdes pour chaque condition dans chaque expérience. Les sphéroïdes étaient traités en sphéroïde individuel. Les résultats sont présentés en ratio par rapport à la taille initiale. Présentation moyenne +/- SEM

On peut constater que la radiothérapie n'est pas très efficace pour diminuer la croissance (Figure 15D). D'un point de vue strictement numérique, il existe une différence statistiquement significative pour toutes les conditions 0Gy vs (4G ou 10Gy) (sauf à J3/J0 0Gy vs 4Gy, $p=0,29$, t.test). Il n'existe une différence en comparant 4Gy vs 10Gy que pour le ratio J7/J0. Dans cette expérience, l'effet est plus faible que dans la figure 4 de l'article, où les sphéroïdes étaient irradiés en kV, mais sous une forme de sphéroïdes plus petits, dispersés dans une flasque avant remise en culture sous forme de sphéroïdes. **Dans notre modèle de cellules P3, que les cellules soient en monocouche ou en sphéroïdes, une irradiation en MV ne rend pas le 5-ALA radiosensibilisant.**

Cette expérience invite à 2 types de réflexions

-Existe-t-il un effet radiosensibilisant des porphyrines induites par le 5-ALA dans d'autres modèles avec une irradiation en MV ?

- Quelles sont les raisons d'une si faible radiosensibilité en préclinique par rapport à ce qui est constaté en clinique ?

Radiosensibilisation par le 5-ALA avec une irradiation de haute énergie

Certains auteurs se sont spécialement intéressés à l'irradiation en MV.

Carcinome pulmonaire à petites cellules. Yang et al. ont étudié un modèle de carcinome pulmonaire à petites cellules (lignée KP1), sur 120 tumeurs sous cutanées (107). Une séance de 4Gy était réalisée en photons de 15MV, et une injection de 5-ALA à 100mg/kg pouvait être réalisée 4 heures avant la radiothérapie. Le groupe radiothérapie + 5-ALA montrait une croissance moins rapide que le groupe 5-ALA seul (+52%), radiothérapie seule (+48%) et le groupe contrôle (+58%). Cet effet était associé à une diminution de l'hypermétabolisme au TEP ¹⁸FDG. Les auteurs concluent à la pertinence de cette approche dans ce modèle. La force de cette étude est le nombre des tumeurs évaluées (120). Il demeure cependant un flou sur la façon dont étaient réparties les souris dans les groupes notamment au niveau de l'évaluation de la survie. Cette dernière n'était d'ailleurs pas comparée par le LogRank test, ou le modèle de Cox qui font pourtant référence dans ce type d'analyse. Les résultats restent assez convaincants.

Carcinome prostatique. Wang et al. (108) ont communiqué sous forme d'abstract du congrès américain de radiothérapie portant sur 26 souris nude, avec un modèle de tumeur de prostate (PC3) implantées en souscutané. La radiothérapie à la dose de 2Gy à 15MV, en 1 séance ne montrait pas de différence entre les souris avec 5-ALA (100mg/kg en intra veineux dans la queue) et les souris sans radiothérapie. Les résultats annoncés sont une croissance des tumeurs de +21% pour le groupe RT+5-ALA, à 3 semaines post traitement contre +395% dans le groupe radiothérapie et +766% dans le groupe contrôle. Cet abstract n'a jamais été publié en article, et n'avait pas de groupe 5-ALA seul. Les résultats définitifs sont donc en attente. Dans la même équipe que précédemment, Panetta et al. (109) ont évalué l'efficacité de l'association du 5-ALA (100mg/kg intraveineux dans la queue), du carbamide peroxide (intra-tumoral, 60mg/kg) et de la radiothérapie à haute énergie (15MV) dans un modèle tumeurs sous cutanées de cancer de prostate (lignée PC3). La taille tumorale était évaluée par IRM. Les

auteurs concluent pour une inefficacité l'ajout du 5-ALA ou du carbamide peroxide seuls à la radiothérapie. Chacun de ces éléments seuls ou en association n'a pas non plus d'effet sur la croissance tumorale. Par contre l'association des 3 traitements est plus efficace que la radiothérapie seule. Si on devait appliquer cette méthode à la clinique, il faudrait apporter localement le carbamide peroxide, ce qui est toujours complexe, en tout cas invasif, et on perdrait probablement l'intérêt de l'approche entièrement externe (intra-veineux + radiothérapie externe). En tout cas, la conclusion de l'étude est la non-potentialisation de l'ajout de 5-ALA à la radiothérapie externe à haute énergie. **Les résultats de potentialisation de la radiothérapie haute énergie par le 5-ALA varient selon le type de modèle : potentiellement intéressants pour le carcinome pulmonaire, non démontrés pour le cancer de prostate.**

Différence d'efficacité entre la radiosensibilité préclinique et clinique.

On notera une globalement faible radiosensibilité des sphéroïdes en ce qui concerne l'induction de mort cellulaire dans nos expériences de radiothérapie. Riedel et al. (110) ont proposés une approche vraiment pragmatique. Ils ont étudié la différence de radiosensibilité entre 10 tumeurs de patients et les sphéroïdes leur correspondant, qu'ils dénomment gliosphères. Les tumeurs fraîches étaient découpées en une fine tranche, mise en culture et irradiées. Les gliosphères étaient dérivées d'une partie proche de ces tumeurs, de la même façon que l'avaient été initialement les modèles de cellules P3, GG6 et GG16 utilisés dans notre travail. L'évaluation de la radiosensibilité portait sur la quantité de foci Phospho- γ H2AX, reflet des cassures double brin en cours de réparation. Ils ont pu montrer qu'il existait une moins grande proportion de foci phospho- γ H2AX dans les gliosphères que dans les tumeurs, et qu'il n'y avait pas de corrélation entre la quantité de ces foci dans les gliosphères et dans les tumeurs. Enfin, ils ont montré, comme attendu, que les cellules exprimant de la Nestin, qu'ils considèrent comme un marqueur des cellules souches de gliome étaient plus nombreuses dans les sphéroïdes que dans les tissus sains. Les auteurs pointent alors le caractère plus radiorésistant des modèles en sphéroïdes, du fait, probablement, d'une plus grande proportions en cellules souches, et des précautions que doivent entraîner ces différences dans les études translationnelles. Les différences constatées entre les différentes gliosphères sont cohérentes avec les profils de radiosensibilité variable dans notre travail (entre GG6-GG16 et P3). **Le modèle en sphéroïdes est enrichi en cellules souches de glioblastome et présente un profil plus radiorésistant.**

4. DETECTION DIRECTE DE L'EFFET TCHERENKOV ET INDIRECTE DANS UNE SOLUTION DE PPIX LORS D'UNE IRRADIATION A HAUTE ENERGIE

4.1. Caractérisation directe de l'effet Tcherenkov

Plusieurs manipulations préliminaires sur le site de l'Institut Bergonié pour calibrer les matériels de détections ont eu lieu avant la présentation de l'expérience ci-dessous.

Cette expérience retrouve un excès de signal bleu dans l'axe du faisceau en rapport avec l'interaction du faisceau avec la matière (figure 16)

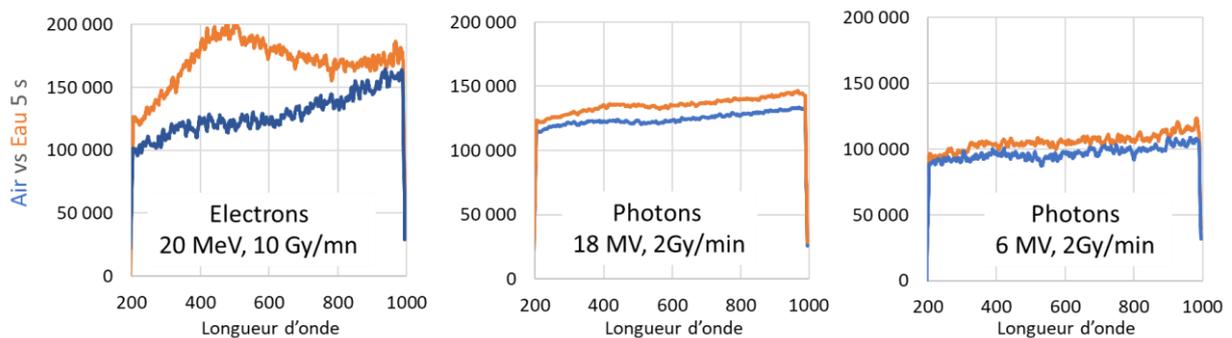


Figure 16 : Détection de l'effet Tcherenkov par spectroscopie dans le faisceau d'une irradiation à haute énergie d'air ou d'eau en A. Electrons, à 20MeV et 10Gy/minute, B. en photons de 18MV et 2Gy par minute et C. en photons à 6MV à 2Gy/minute. Les courbes sont normalisées pour représenter une dose de 2Gy. En ordonnée, l'intensité d'émission est en unités arbitraires.

Dans l'expérience avec les électrons de haute énergie à 20MeV, il est retrouvé un excès en pic de photons d'une longueur d'onde tout à fait compatible avec l'effet Tcherenkov. Dans l'irradiation avec les photons, il existe aussi un excès de photons dans la condition où le faisceau traverse la matière, mais il n'existe pas de pic particulier. L'absence de pic laisse à penser que l'effet Cerenov n'est pas l'évènement physique majeur dans cette situation. On notera l'impact quantitatif de l'effet Tcherenkov qui fait moins que doubler au maximum la quantité de photons bleus dans la situation la plus favorable, à savoir à 20MeV autour de 440nm (Figure 16A)

L'existence de l'effet Tcherenkov ne fait aucun doute. Son étude sur les machines de traitement de radiothérapie a été particulièrement bien menée par l'équipe d'Axelsson et al. (93). A l'énergie utilisée cliniquement à savoir 6MV, la quantité de photons Tcherenkov est la plus faible (Figure 17). A 18MV, une énergie plutôt élevée, classiquement peu utilisée en clinique en condition de modulation d'intensité, *a fortiori* pour l'encéphale, le rendement reste faible par rapport aux énergies les plus élevées en électrons.

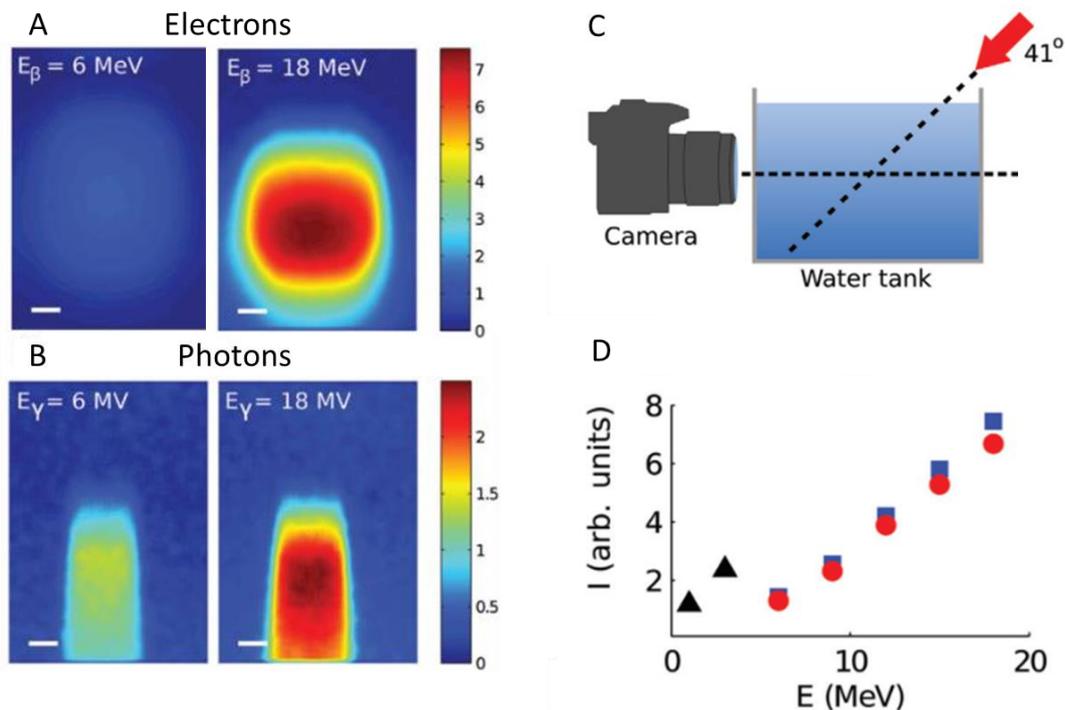


Figure 17 : Emission Tcherenkov induite par des faisceaux de photon et d'électrons. A. Après irradiation par un faisceau d'électron avec un collimateur rectangulaire de $4 \times 4 \text{ cm}^2$. B. Après irradiation par un faisceau de photons de 6MV et 18MV par une ouverture de champ de $2 \times 2 \text{ cm}^2$. Noter la différence d'échelle entre la première ligne en électrons et la 2ème ligne en photons. C. Dispositif expérimental avec incidence à 41° de l'irradiation par rapport à l'acquisition. D. Energie maximale sur le cm^2 d'énergie maximale dans différentes conditions. En Rouge et bleu, avec une irradiation en électrons. En triangle noir, à 6 et 18MV, en abscisse centré sur l'énergie moyenne générée des électrons secondaires. *Adapté d'après Axelsson et al. (93).*

Ces résultats confirment la possibilité de retrouver une émission de photons Tcherenkov après irradiation par une machine de radiothérapie. Sur le plan théorique, les auteurs rappellent que l'énergie moyenne des électrons produits à une énergie de 6MV et 18MV sont respectivement 1MeV et 3MeV (111), qui est supérieur au seuil théorique de 0,219MeV dans l'eau qu'ils calculent en introduction de leur article. Comme nous, ils retrouvent un meilleur rendement pour une irradiation en électrons qu'en photons. On notera que nos données ont une précision moindre. L'utilisation d'une fibre unique pour la collecte du signal de spectroscopie, ainsi que l'absence de blindage du spectromètre pourraient en être la raison. **L'effet Tcherenkov peut être détecté sur une machine de radiothérapie. Les électrons de haute énergie ont un meilleur rendement que les photons de haute énergie.**

4.2. Caractérisation indirecte de l'effet Tcherenkov par Fluorescence de la PpIX

Imagerie plane par la caméra. Par la caméra, il est possible de montrer qu'il existe davantage de signal lorsque la solution contient de la PpIX que lorsqu'elle n'en contient pas (figure 18). Il existe un léger d'effet dose avec une courbe à 20mM qui est au dessus de la courbe à 5mM et une courbe à 10mM globalement entre les 2.

La diminution du signal sur la portion postérieure de la boîte pourrait s'expliquer par le rendement en profondeur des électrons de 20MeV qui diminuent à partir de 7cm.

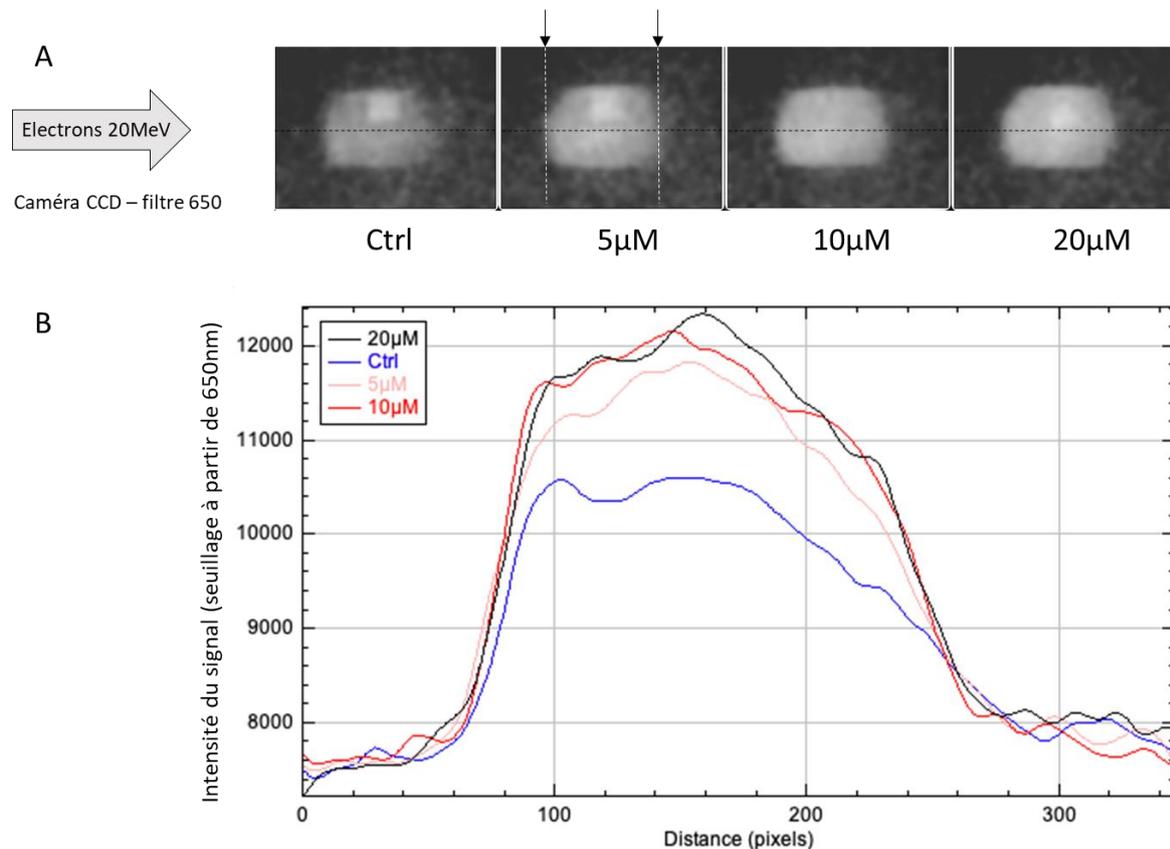


Figure 18 : Intensité du signal de détection d'une caméra (détection 300-1000nm) située perpendiculairement à une boîte irradiée à 20MeV sans et avec PpIX. A. Intensité de détection selon la concentration de PpIX (représentation en 2D) B. Analyse de l'intensité de détection selon un axe (en pointillé sur figure B) et selon la concentration de PpIX

L'absence de signal en dehors du volume de la boîte est en faveur de l'implication de cette dernière dans son interaction avec le faisceau pour expliquer le signal. L'existence de signal dans la boîte contrôle est expliquée par l'interaction du faisceau avec la matière et l'émission de photons d'énergies variées, sans pour autant que soit forcément impliqué le rayonnement Tcherenkov. Ceci est aussi constaté dans les autres expériences de spectroscopie.

Analyse spectrale. L'étude du spectre permet une visualisation des longueurs d'onde absorbées et des longueurs d'onde émises. L'ajout de PpIX dans le milieu entraîne théoriquement une absorption dans le bleu profond, et une émission dans le rouge/proche infrarouge. Le dispositif nous a permis de détecter ces 2 phénomènes, dont l'amplitude a varié de manière dose dépendante avec la porphyrine (figure 19) .

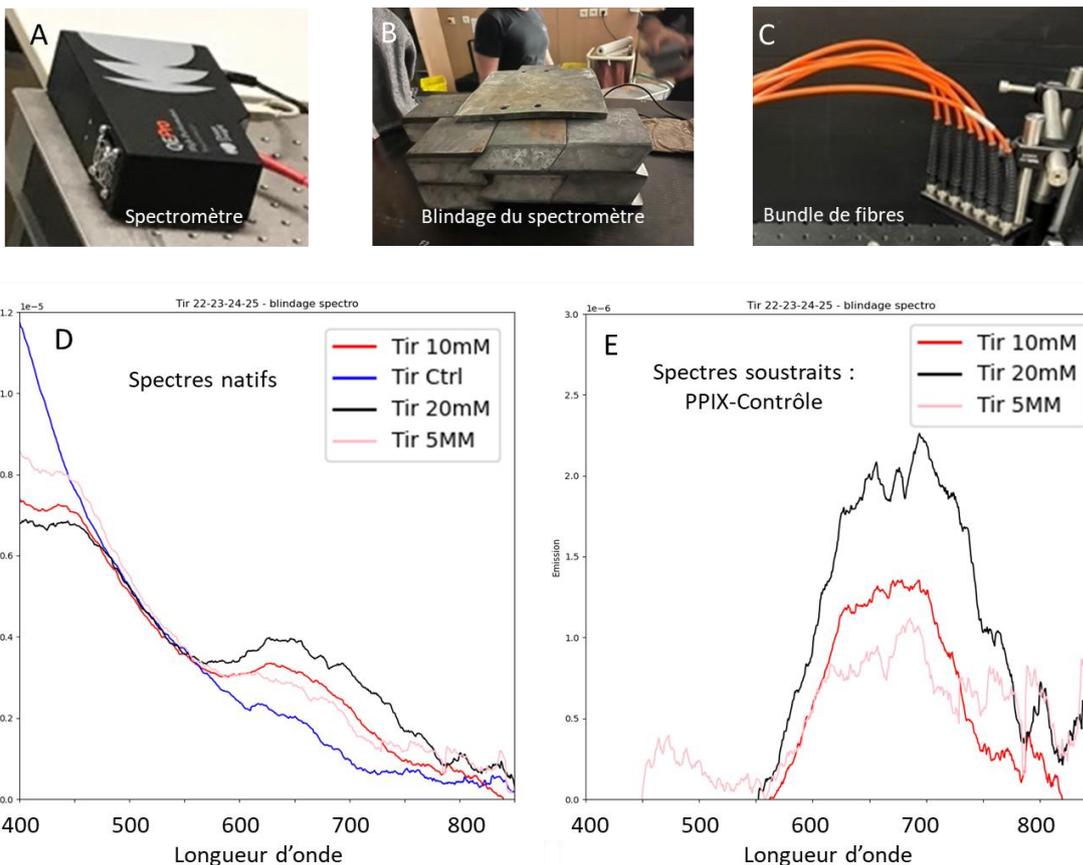


Figure 19 : Spectres d'émission d'une solution de PpIX après irradiation avec des électrons de 20MeV. A. Spectromètre QEPro, Ocean Insite. B. Blindage de plomb du spectromètre. C. Bundle de fibre du spectromètre permettant une majoration du signal. D. Analyse spectroscopique brute pendant l'irradiation. E. Analyse spectroscopique après soustraction du contrôle, et en échelle positive en ordonnées.

Les résultats en spectrométrie montrent pour le contrôle une émission dans toutes les longueurs d'onde, avec une quantité de photons d'autant moins importante que la longueur d'onde est élevée. Les paramètres physiques du spectroscope ne permettent pas de connaître les émissions en dessous de 400nm. Lors de la présence de PpIX, 2 phénomènes en miroir se déroulent (figure ... D):

- Diminution du signal autour des longueurs d'ondes autour de 400-440nm correspondant au spectre d'absorption de la PpIX.
- Augmentation du signal entre 600 et 780 nm correspondant aux longueurs d'onde de réémission de la PpIX.

Dans l'article d'Axelsson et al. (93), ce phénomène est aussi observé (figure 20).

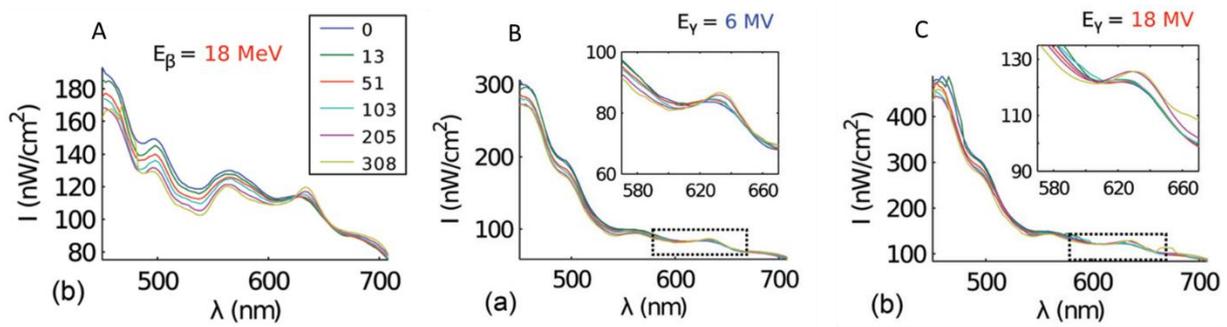


Figure 20 : Modification spectroscopique suite à l'irradiation d'une solution de PpIX à concentration croissante A. à 18MeV, B. 6MV C. et 18MV. Adapté d'après Axelsson et al. (93).

La lecture attentive des courbes de l'article permet de retrouver une diminution de l'intensité après 400nm, mais aussi à 550nm, avant une réémission importante à 630nm, de façon dose dépendante avec la [PpIX]. On pourra noter la très faible modification d'amplitude sur le plan relatif du spectre, comme ce qu'on a pu montrer dans nos résultats.

L'irradiation de PpIX est responsable d'une émission de lumière rouge, et d'un déficit en lumière bleu, en faveur d'un effet semblable à celui observé lors de la photothérapie. Il valide la présence de photons dans le bleu lors de l'irradiation à haute énergie.

4.3. Quelques considérations d'échelle

En pratique, la difficulté de la mise en évidence de l'effet Tcherenkov sur les machines de radiothérapie, comparée à la quantité de lumière émise lors des irradiations en photothérapie, qui nécessitent le port de lunettes de protection, pose la question de la quantité d'énergie réellement disponible après une irradiation en MV. La question de la quantification est donc centrale mais n'est pas facile à mettre en évidence, en tout cas nous ne l'avons pas encore correctement quantifiée dans notre dispositif.

Quelques conjectures peuvent cependant être posées.

1/ Considérant que la dose physique de photothérapie ne peut pas être plus importante que celle délivrée par la radiothérapie, on peut considérer que dans un litre de tissu recevant 1Gy, il n'y aura jamais plus de 1J/1L, avec un rendement à 100%. Ce qui fait qu'à 60Gy, on aurait au maximum 60J. On perçoit néanmoins tout à fait, via ce qui a été décrit plus haut que le rendement est très loin de 100%.

2/ Dans la partie discussion de leur article, s'appuyant sur leur données, Axelsson et al. (93) donnent une dose de radiothérapie pour une dose de 2Gy par séance équivalente à 20μJ/cm²

pour une énergie de 6MV et $32\mu\text{J}/\text{cm}^2$ pour 18MV. Sur 30 séances, la dose totale délivrée pourrait alors être de $0.6\text{mJ}/\text{cm}^2$, et $1\text{mJ}/\text{cm}^2$ (sur 49 jours). Dans ces conditions, il est difficile d'imaginer que la photothérapie puisse être efficace en temps que telle. La dose de radiothérapie étant déjà à la limite de ce qui est tolérable, on ne peut pas augmenter la dose de radiothérapie pour avoir une dose de photothérapie présumée correcte. Au maximum, on pourrait aller jusqu'à 75Gy (26)

3/ L'argument consistant à dire que l'ultra-bas débit de dose (93,104) pourrait être utilisés est spécieux, puisque, si le débit était bas dans l'étude de Mathews et al., à $17\mu\text{W}/\text{cm}^2$, la dose totale délivrée était tout de même de $1,5\text{J}/\text{cm}^2$. Cela équivaldrait dans l'étude susmentionnée à 48 875Gy pour obtenir la même dose de photothérapie.

Mon intime conviction est donc que la quantité d'énergie apportée par la radiothérapie à haute énergie est de plusieurs ordres trop petite pour provoquer un effet de photothérapie. Cela ne veut pas dire que les porphyrines ne peuvent pas être radiosensibilisantes, mais que le mécanisme d'action qui serait impliqué ne fonctionnerait pas via la photothérapie. Par ailleurs, dans notre modèle, nous n'avons pas pu constater cet effet.

4.4. Stratégies alternatives d'apport de lumière pour la photothérapie

La question de la génération de la lumière *in situ* est comme on l'a vu problématique pour les faisceaux générés par l'extérieur. Ce point peut être outrepassé par la photothérapie interstitielle mais qui nécessite la mise en place de sondes invasives, à la manière de la curiethérapie interstitielle. On a pu voir au dessus qu'il existe probablement un problème d'échelle pour que la radiothérapie dynamique (médiée par la radiothérapie en photons de haute énergie) soit efficace.

4.4.1. Stratégie d'apport des photons par la protonthérapie

L'hadronthérapie est une alternative à la radiothérapie par photons et par électrons. L'hadronthérapie est une radiothérapie par des particules lourdes (proton, neutrons, particule alpha, carbone) et pourrait aussi être pourvoyeuse d'effet Tcherenkov. Grigalavicius et al. ont montré récemment que la protonthérapie provoquait l'émission de photons Tcherenkov, que ces derniers pouvaient être convertis par la PpIX en photon de 610nm qui étaient à leur tour détectables (112). La méthodologie utilisée se rapproche de celle longuement détaillée dans l'article d'Axelsson et al. (93), à savoir l'utilisation de la PpIX pour détecter la présence de

réémission de lumière dans le proche infra-rouge. Les auteurs montrent que les protons sont plus efficaces pour entraîner une déplétion en photosensibilisateur, qui peut être un marqueur de l'efficacité de la photothérapie. L'effet est alors le même entre 10^{20} photons et 10^{11} protons. Enfin, sur une lignée cellulaire de glioblastome(T98G), ils retrouvent une potentialisation de la protonthérapie avec un photosensibilisateur, la cercosporine sur la survie cellulaire. **La protonthérapie produit donc un effet Tcherenkov détectable. L'intérêt translationnel reste à déterminer, surtout que la protonthérapie est un traitement coûteux, rare et donc souvent difficilement accessible.**

4.4.2. La photothérapie par effet Tcherenkov local : usage de la radioactivité

L'effet Tcherenkov local par des radionucléotides utilisés en clinique pourrait constituer l'apport de la lumière localement. Comme photoémetteur Tcherenkov, le ^{18}F (^{18}F Fluor) est un bon candidat, puisqu'il est émetteur β^+ (positon), de faible demi-vie et déjà utilisé très largement en clinique couplé au glucose dans les TEP- ^{18}F FDG. Il a aussi montré sa capacité à produire du rayonnement Tcherenkov.

Kotagiri et al. proposent un assemblage complexe de nanoparticules pour obtenir ce résultat(113). Le ^{18}F FDG et un autre radioélément ont été testés, le ^{64}Cu , émetteur α et β (β^+ 19%, β^- 39%), avec une demi-vie de 12,7h. La nanoparticule de TiO_2 est la molécule utilisée comme nanophotosensibilisateur (NPS). Cette nanoparticule absorbe l'ultraviolet entre 275nm et 390nm et génère des radicaux superoxydes (TiO). Elle a été couplée à du titanocène un autre photosensibilisateur comprenant du titane couplé à une molécule cyclique (TiO-Tc). Et enfin, cet ensemble a été couplé à de la transferrine (TiO-Tf-Tc). Cette transferrine est habituellement avidement captée par les cellules cancéreuses, afin d'ajouter de la spécificité à ce dispositif. Dans des souris avec une tumeur issue de cellules HT1080 (fibrosarcome humain), un traitement avec TiO-Tf-Tc et ^{18}F FDG à 0,87mCi entraîne une diminution de la croissance et une amélioration de la survie comparée aux mêmes souris sans ^{18}F FDG, ou sans TiO-Tf-Tc . Le même type de résultat est observé avec le ^{64}Cu . Cette approche semble prometteuse dans sa démarche. Cependant, la quantité de Fluor radioactif, ainsi que la stabilité et la toxicité de ces traitements restent à évaluer.

L'approche par effet Tcherenkov local via la radioactivité est actuellement à l'étude. La question de la biodisponibilité reste centrale dans ces approches.

On pourra noter en contrepoint que certains auteurs (94) simulent le dépôt de dose particule par particule, tenant en compte la quantité de photons disponibles et générés pour une éventuelle photothérapie médiée par la désintégration locale, par la méthode de Monte Carlo. Ils considèrent que l'utilisation de lumière à partir de l'effet Tcherenkov n'est pas une source utilisable pour faire de la photothérapie.

4.4.3. La photothérapie dynamique médiée par la chimioluminescence

Gao et al. (77) définissent la chimioluminescence comme « *un phénomène d'émission de lumière (luminescence) qui se produit en raison de réactions chimiques de certaines substances. Ces molécules chimioluminescentes, comme des réactifs ou des intermédiaires, sont activées par l'oxydation pour former des intermédiaires oxydés de haute énergie, qui se décomposent et dissipent leur énergie par l'émission de lumière ou un transfert d'énergie vers des molécules fluorescentes de voisinage* ». L'idée est de mettre à proximité immédiate (1-10nm) une molécule bioluminescente (donneuse de lumière) et un photosensibilisant (accepteur). La liaison peut être ou non covalente entre ces 2 acteurs. Le spectre d'émission de la molécule bioluminescente doit correspondre au spectre d'excitation du photosensibilisant. Cette approche est utilisée par l'équipe de An et al. (114). La molécule bioluminescente dans cette expérience est le luminol, l'agent chimique la stimulant est l'H₂O₂ et le photosensibilisateur est le Ce6. Ce6 et Luminol sont liés de façon covalente dans une molécule nommée CLP (Chlorine-Luminol-Polyéthylène glycol). Parmi les 8 lignées cellulaires testées, après conservation des 3 lignées produisant le plus de l'H₂O₂, les auteurs sélectionnent la lignée qui produit le plus de lumière et a l'IC50% (Concentration Inhibitrice) la plus basse *in vitro* : 4T1 (cancer mammaire murin). Ils injectent cette lignée cellulaire en sous cutané sur des souris *nude*. Les injections de la molécule CLP se fait de façon sous cutanée tous les 3 jours jusqu'au sacrifice à J18. Il existe à la fois un effet dose de la CLP pour diminuer la masse tumorale, mais aussi un effet inhibiteur de l'ajout de la N-acétyl cystéine, un antioxydant dont l'action est notamment de diminuer la quantité de H₂O₂ en apportant du substrat à la NADPH. Cet exemple illustre le type d'utilisation actuellement envisagé.

La chimioluminescence pourrait utiliser l'état d'oxydation de la cellule cancéreuse pour activer des molécules luminescentes couplées à des photosensibilisateurs.

4.4.4. La photothérapie médiée par la Luciférase

Le principe dans cette stratégie est d'apporter la lumière par la réaction enzymatique entre la Luciférine et la Luciférase, à proximité d'un photosensibilisateur(115). Un modèle de cette stratégie a été publié par Zhang et al. (116). Dans ce modèle, le photosensibilisateur est du Rose Bengale, qui est précipité sous forme de nanoparticules au contact du PLA (PolyLactic Acid). Cette nanoparticule est couplée à de très nombreuses luciférases. Ce modèle nécessite l'apport de Luciférine en présence d'oxygène mais aussi d'ATP pour la Luciférase. Après injection de la nanoparticule et de Luciferine, il est observé une efficacité sur la croissance tumorale de tumeurs sous cutanées.

Dans notre travail, le temps de l'injection de la Luciférine, le jeudi, était volontairement différent du temps d'injection du 5-ALA (lundi, mercredi, vendredi), et on avait pu montrer que les porphyrines étaient éliminées à 24h, la lumière émise par la réaction Luciférase/Luciférine/ATP ne durant pour sa part que quelques minutes. Cet effet ne pouvait être suspecté dans notre expérimentation.

La mise en œuvre d'une stratégie basée sur l'injection de Luciférine est séduisante sur le plan intellectuel, mais a des conditions assez spécifiques d'utilisation, nécessitant confirmation dans des études translationnelles.

Les exemples vus ci-dessus illustrent l'intérêt suscité par la photothérapie, à la croisée de la physique, des nanoparticules et de la biochimie. Les limites principales restent la complexité de la mise en œuvre, et notamment la biodisponibilité des dispositifs envisagés. Actuellement, pour les autres indications de cancérologie, les stratégies d'injection directe dans la tumeur n'ont pas été sélectionnées comme pertinentes et ne sont pas utilisées en clinique.

CONCLUSION

Ce travail a eu à cœur d'explorer sous plusieurs facettes, dans un modèle précisément défini, l'intérêt d'une radiosensibilisation médiée par les porphyrines induites par un excès d'apport de 5-ALA. L'hypothèse de départ, à savoir une accumulation spécifique de porphyrines, associée à une littérature souvent en faveur d'une radiosensibilisation par le 5-ALA était plausible. Le travail s'est attaché à produire et à caractériser un modèle qui soit le plus pertinent possible : cellules dérivées de tumeurs humaines, injection intracérébrale stéréotaxique, radiothérapie fractionnée à 2Gy/séance ciblée sur l'encéphale. La présence de porphyrines dans la tumeur après injection de 5-ALA a été vérifiée. Finalement, *in vivo*, il n'y a eu ni radiosensibilisation via l'évaluation de la taille tumorale ni modification de la survie des souris. Dans le modèle *in vitro*, sur un modèle en sphéroïde, reconnu comme le plus pertinent, la radiothérapie était efficace mais le 5-ALA ne modifiait pas cette efficacité. Sur d'autres lignées de glioblastome, de carcinome ou de mélanome, il n'y avait pas de radiosensibilisation. Sur la même lignée P3, la photothérapie était pourtant efficace, davantage sur les cellules en monocouche qu'en sphéroïde. La radiorésistance de la lignée P3 ne semblait donc pas liée à une photorésistance.

L'irradiation en MV, censée produire de l'effet Tcherenkov, ne montrait pas de radiosensibilisation par le 5-ALA, en monocouche ou en sphéroïdes. Pour supporter l'idée d'une radiosensibilisation médiée par l'effet Tcherenkov, avec une équipe pluridisciplinaire, nous avons exploré la réalité de l'effet Tcherenkov sur les machines de radiothérapie utilisées en clinique. De fait, l'effet Tcherenkov était détecté et il était capable d'entraîner une excitation de la PpIX et une désexcitation dans le proche infra-rouge. L'amplitude de cet effet semble cependant trop faible pour être signifiant cliniquement. Ce résultat n'est pas décevant, mais apporte une réponse robuste à la question de la radiosensibilisation par les porphyrines induites par le 5-ALA : dans notre modèle, ça ne fonctionne pas. Ce constat n'est pas en contradiction avec la stratégie consistant à amener de la lumière localement avec un photosensibilisant. Ce domaine est actuellement très actif, à la croisée des domaines de la physique, des nanoparticules et de la biochimie.

Ce travail a 2 perspectives. La première est d'approfondir l'analyse physique de l'effet Tcherenkov en lien avec la photothérapie. Il s'agit de poursuivre avec l'équipe de mathématique et de physique le travail de modélisation et de mesure du flux de photons dans

le bleu et l'ultraviolet généré par l'effet Tcherenkov. L'objectif est de quantifier (théoriquement et expérimentalement) l'énergie exacte délivrée par les photons de radiothérapie de haute énergie dans le volume de traitement. Ce projet fait l'objet d'un article en cours d'écriture.

La deuxième perspective porte sur l'exploitation du modèle animal robuste mis en place pour explorer tester des stratégies de radiosensibilisation. Profitant des compétences de notre laboratoire, il nous a paru légitime de proposer une radiosensibilisation par une thérapie vectorisée à visée radiosensibilisante, ciblée sur les cellules tumorales. La radiosensibilisation se ferait par altération des gènes de réparation de l'ADN (Rad50-Rad51 ou ATM) *via* une technologie Crispr-Cas9, et le ciblage par une vectorisation de l'enveloppe virale par un couplage avec Ac Anti-EGFRvIII. Ce projet est soutenu par le réseau de recherche impulsion de l'Université de Bordeaux via le programme NEWMOON (NEW MOdels in Oncology).

BIBLIOGRAPHIE

1. Berger TR, Wen PY, Lang-Orsini M, Chukwueke UN. World Health Organization 2021 Classification of Central Nervous System Tumors and Implications for Therapy for Adult-Type Gliomas: A Review. *JAMA Oncol.* 1 oct 2022;8(10):1493-501.
2. Gautier Defossez, Sandra Le Guyader-Peyrou, Zoé Uhry, Pascale Grosclaude, Marc Colonna, Emmanuelle Dantony, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. *Santé Publique France*; 2019.
3. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro-Oncol.* oct 2015;17 Suppl 4(Suppl 4):iv1-62.
4. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Alexander BM, Barnholtz-Sloan JS, Barthel FP, et al. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncol.* 17 août 2020;22(8):1073-113.
5. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJB, 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.* mai 2009;10(5):459-66.
6. Stupp R, Taillibert S, Kanner A, Read W, Steinberg DM, Lhermitte B, et al. Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 19 déc 2017;318(23):2306.
7. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med.* 20 févr 2014;370(8):709-22.
8. Liau LM, Ashkan K, Brem S, Campian JL, Trusheim JE, Iwamoto FM, et al. Association of Autologous Tumor Lysate-Loaded Dendritic Cell Vaccination With Extension of Survival Among Patients With Newly Diagnosed and Recurrent Glioblastoma: A Phase 3 Prospective Externally Controlled Cohort Trial. *JAMA Oncol.* 17 nov 2022;e225370.
9. Omuro A, Brandes AA, Carpentier AF, Idbaih A, Reardon DA, Cloughesy T, et al. Radiotherapy Combined With Nivolumab or Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma With Unmethylated MGMT Promoter: An International Randomized Phase 3 Trial. *Neuro-Oncol.* 14 avr 2022;noac099.
10. Lim M, Weller M, Idbaih A, Steinbach J, Finocchiaro G, Raval RR, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy with temozolomide plus nivolumab or placebo for newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter. *Neuro-Oncol.* 2 nov 2022;24(11):1935-49.
11. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, et al. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* mai 2006;7(5):392-401.
12. Chaichana KL, Jusue-Torres I, Navarro-Ramirez R, Raza SM, Pascual-Gallego M, Ibrahim A, et al. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-Oncol.* janv 2014;16(1):113-22.
13. Suchorska B, Weller M, Tabatabai G, Senft C, Hau P, Sabel MC, et al. Complete resection of contrast-enhancing tumor volume is associated with improved survival in recurrent glioblastoma-results from the DIRECTOR trial. *Neuro-Oncol.* avr 2016;18(4):549-56.

14. Brown TJ, Brennan MC, Li M, Church EW, Brandmeir NJ, Rakszawski KL, et al. Association of the Extent of Resection With Survival in Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 1 nov 2016;2(11):1460-9.
15. Austin PC. An Introduction to Propensity Score Methods for Reducing the Effects of Confounding in Observational Studies. *Multivar Behav Res.* 31 mai 2011;46(3):399-424.
16. Andersen AP. Postoperative irradiation of glioblastomas. Results in a randomized series. *Acta Radiol Oncol Radiat Phys Biol.* 1978;17(6):475-84.
17. Florence KG, Olivier C, Luc T, Stéphanie CC, Marc F, Guy K, et al. Radiotherapy for Glioblastoma in the Elderly. *N Engl J Med.* 2007;9.
18. Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Selker RG, VanGilder JC, et al. Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma: Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001. *J Neurosurg.* 1 juill 1989;71(1):1-9.
19. Wallner KE, Galicich JH, Krol G, Arbit E, Malkin MG. Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* juin 1989;16(6):1405-9.
20. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *N Engl J Med.* 20 févr 2014;370(8):699-708.
21. Antoni D, Feuvret L, Biau J, Robert C, Mazon JJ, Noël G. Radiation guidelines for gliomas. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol.* 2022;26(1-2):116-28.
22. Thibouw D, Truc G, Bertaut A, Chevalier C, Aubignac L, Mirjolet C. Clinical and dosimetric study of radiotherapy for glioblastoma: three-dimensional conformal radiotherapy versus intensity-modulated radiotherapy. *J Neurooncol.* avr 2018;137(2):429-38.
23. Kissel M, Krhili SL, Minsat M, El Ayachy R, Bringer S, Lahmi L, et al. Dose-escalation in prostate cancer: Results of randomized trials. *Cancer/Radiothérapie.* 1 oct 2022;26(6):899-904.
24. Bartelink H, Maingon P, Poortmans P, Weltens C, Fourquet A, Jager J, et al. Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* janv 2015;16(1):47-56.
25. Lacas B, Bourhis J, Overgaard J, Zhang Q, Grégoire V, Nankivell M, et al. Role of radiotherapy fractionation in head and neck cancers (MARCH): an updated meta-analysis. *Lancet Oncol.* sept 2017;18(9):1221-37.
26. Gondi V, Pugh S, Tsien C, Chenevert T, Gilbert M, Omuro A, et al. Radiotherapy (RT) Dose-intensification (DI) Using Intensity-modulated RT (IMRT) versus Standard-dose (SD) RT with Temozolomide (TMZ) in Newly Diagnosed Glioblastoma (GBM): Preliminary Results of NRG Oncology BN001. *Int J Radiat Oncol.* nov 2020;108(3):S22-3.
27. Singh R, Lehrer EJ, Wang M, Perlow HK, Zaorsky NG, Trifiletti DM, et al. Dose Escalated Radiation Therapy for Glioblastoma Multiforme: An International Systematic Review and Meta-Analysis of 22 Prospective Trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 oct 2021;111(2):371-84.
28. Laprie A, Ken S, Filleron T, Lubrano V, Vieillevigne L, Tensaouti F, et al. Dose-painting multicenter phase III trial in newly diagnosed glioblastoma: the SPECTRO-GLIO trial comparing arm A standard radiochemotherapy to arm B radiochemotherapy with simultaneous integrated boost guided by MR spectroscopic imaging. *BMC Cancer.* 21 févr 2019;19:167.
29. Laprie A, Catalaa I, Cassol E, McKnight TR, Berchery D, Marre D, et al. Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging in Newly Diagnosed Glioblastoma: Predictive Value for the Site of Postradiotherapy Relapse in a Prospective Longitudinal Study. *Int J Radiat Oncol.* 1 mars 2008;70(3):773-81.

30. Laprie A, Tensaouti F, Cohen-Jonathan Moyal E. [Radiation dose intensification for glioblastoma]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol*. oct 2022;26(6-7):894-8.
31. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med*. 10 mars 2005;352(10):987-96.
32. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol*. août 2014;15(9):e395-403.
33. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N Engl J Med*. 16 mars 2017;376(11):1027-37.
34. 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*. 10 mars 2005;352(10):997-1003.
35. Alnahhas I, Alsawas M, Rayi A, Palmer JD, Raval R, Ong S, et al. Characterizing benefit from temozolomide in MGMT promoter unmethylated and methylated glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Neuro-Oncol Adv*. 30 oct 2020;2(1):vdaa082.
36. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim SW, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 21 nov 2019;381(21):2020-31.
37. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 16 nov 2017;377(20):1919-29.
38. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 17 oct 2019;381(16):1535-46.
39. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 27 févr 2020;382(9):810-21.
40. Bajorin DF, Witjes JA, Gschwend JE, Schenker M, Valderrama BP, Tomita Y, et al. Adjuvant Nivolumab versus Placebo in Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma. *N Engl J Med*. 3 juin 2021;384(22):2102-14.
41. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, Mulholland P, Lim M, Wick A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 1 juill 2020;6(7):1003-10.
42. Weller M, Butowski N, Tran DD, Recht LD, Lim M, Hirte H, et al. Rindopepimut with temozolomide for patients with newly diagnosed, EGFRvIII-expressing glioblastoma (ACT IV): a randomised, double-blind, international phase 3 trial. *Lancet Oncol*. oct 2017;18(10):1373-85.
43. Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, Aldape KD, Friedman AH, Friedman HS, et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 nov 2010;28(31):4722-9.
44. Schuster J, Lai RK, Recht LD, Reardon DA, Paleologos NA, Groves MD, et al. A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro-Oncol*. juin 2015;17(6):854-61.
45. Park JH, Rivière I, Gonen M, Wang X, Sénéchal B, Curran KJ, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 1 févr 2018;378(5):449-59.
46. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 28 déc 2017;377(26):2545-54.

47. Zhang J, Siller-Farfán JA. Current and future perspectives of chimeric antigen receptors against glioblastoma. *Immunother Adv.* 2022;2(1):ltac014.
48. Brown CE, Alizadeh D, Starr R, Weng L, Wagner JR, Naranjo A, et al. Regression of Glioblastoma after Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy. *N Engl J Med.* 29 déc 2016;375(26):2561-9.
49. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OC. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol.* déc 1953;26(312):638-48.
50. Domènech M, Hernández A, Plaja A, Martínez-Balibrea E, Balañà C. Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma. *Int J Mol Sci.* 22 nov 2021;22(22):12608.
51. Collet S, Guillamo JS, Berro DH, Chakhoyan A, Constans JM, Lechapt-Zalcman E, et al. Simultaneous Mapping of Vasculature, Hypoxia, and Proliferation Using Dynamic Susceptibility Contrast MRI, ¹⁸F-FMISO PET, and ¹⁸F-FLT PET in Relation to Contrast Enhancement in Newly Diagnosed Glioblastoma. *J Nucl Med.* oct 2021;62(10):1349-56.
52. McGee MC, Hamner JB, Williams RF, Rosati SF, Sims TL, Ng CY, et al. Improved Intratumoral Oxygenation Through Vascular Normalization Increases Glioma Sensitivity to Ionizing Radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 avr 2010;76(5):1537-45.
53. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 oct 2009;27(28):4733-40.
54. Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 févr 2009;27(5):740-5.
55. Giladi M, Schneiderman RS, Voloshin T, Porat Y, Munster M, Blat R, et al. Mitotic Spindle Disruption by Alternating Electric Fields Leads to Improper Chromosome Segregation and Mitotic Catastrophe in Cancer Cells. *Sci Rep.* 11 déc 2015;5:18046.
56. Kirson ED, Dbalý V, Tovarys F, Vymazal J, Soustiel JF, Itzhaki A, et al. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 juin 2007;104(24):10152-7.
57. Stupp R, Wong ET, Kanner AA, Steinberg D, Engelhard H, Heidecke V, et al. NovoTTF-100A versus physician's choice chemotherapy in recurrent glioblastoma: a randomised phase III trial of a novel treatment modality. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* sept 2012;48(14):2192-202.
58. Alexander BM, Cloughesy TF. Adult Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 20 juill 2017;35(21):2402-9.
59. Bikfalvi A, da Costa CA, Avril T, Barnier JV, Bauchet L, Brisson L, et al. Challenges in glioblastoma research: focus on the tumor microenvironment. *Trends Cancer.* janv 2023;9(1):9-27.
60. Arrivi G, Verrico M, Roberto M, Barchiesi G, Faggiano A, Marchetti P, et al. Capecitabine and Temozolomide (CAPTEM) in Advanced Neuroendocrine Neoplasms (NENs): A Systematic Review and Pooled Analysis. *Cancer Manag Res.* 2022;14:3507-23.
61. Quirt I, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: a systematic review. *The Oncologist.* sept 2007;12(9):1114-23.
62. Peoc'h K, Martin-Schmitt C, Talbi N, Deybach JC, Gouya L, Puy H. Les porphyries héréditaires : anomalies du métabolisme de l'hème. *Rev Médecine Interne.* mars 2016;37(3):173-85.
63. Richard E, Ged C, Bedel A, Moreau-Gaudry F, de Verneuil H. Cellular and Gene Therapy for Erythropoietic Porphyrias. In: *Porphyrias and Sideroblastic Anemias. (Handbook of Porphyrin Science; vol. 29).*

64. Chen R, Huang Z, Chen G, Li Y, Chen X, Chen J, et al. Kinetics and subcellular localization of 5-ALA-induced PpIX in DHL cells via two-photon excitation fluorescence microscopy. *Int J Oncol.* avr 2008;32(4):861-7.
65. Wilson BC, Olivo M, Singh G. Subcellular Localization of Photofrin and Aminolevulinic Acid and Photodynamic Cross-Resistance in Vjfro in Radiation-Induced Fibrosarcoma Cells Sensitive or Resistant to Photofrin-Mediated Photodynamic Therapy. :11.
66. Yamamoto J. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in glioma cells in *in vitro*. *Oncol Rep [Internet].* 28 févr 2012 [cité 13 avr 2022]; Disponible sur: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2012.1699>
67. Muggioli G, Pomorski M, Claverie G, Berthet G, Mer-Calfati C, Saada S, et al. Single α -particle irradiation permits real-time visualization of RNF8 accumulation at DNA damaged sites. *Sci Rep.* 31 janv 2017;7:41764.
68. Stummer W, Novotny A, Stepp H, Goetz C, Bise K, Reulen HJ. Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme utilizing 5-ALA-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg.* 2000;93(6):1003-13.
69. Mazurek M, Szczepanek D, Orzyłowska A, Rola R. Analysis of Factors Affecting 5-ALA Fluorescence Intensity in Visualizing Glial Tumor Cells-Literature Review. *Int J Mol Sci.* 15 janv 2022;23(2):926.
70. Ihata T, Nonoguchi N, Fujishiro T, Omura N, Kawabata S, Kajimoto Y, et al. The effect of hypoxia on photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in malignant gliomas. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 1 déc 2022;40:103056.
71. Yamamoto J, Ogura SI, Shimajiri S, Nakano Y, Akiba D, Kitagawa T, et al. 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma in vivo. *Mol Med Rep.* mars 2015;11(3):1813-9.
72. Takahashi J, Nagasawa S, Doi M, Takahashi M, Narita Y, Yamamoto J, et al. In Vivo Study of the Efficacy and Safety of 5-Aminolevulinic Radiodynamic Therapy for Glioblastoma Fractionated Radiotherapy. *Int J Mol Sci.* 9 sept 2021;22(18):9762.
73. Takahashi J, Misawa M, Murakami M, Mori T, Nomura K, Iwahashi H. 5-Aminolevulinic acid enhances cancer radiotherapy in a mouse tumor model. *SpringerPlus.* déc 2013;2(1):602.
74. Yang DM, Cvetkovic D, Chen L, Ma CMC. Evaluating Therapeutic Effects of In Vivo 15MV Radiodynamic Therapy (RDT) with 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) Using 1.5T MRI and [18F]FDG PET/CT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1 nov 2022;114(3):e525.
75. Ito E, Yue S, Moriyama EH, Hui AB, Kim I, Shi W, et al. Uroporphyrinogen Decarboxylase Is a Radiosensitizing Target for Head and Neck Cancer. *Sci Transl Med.* 26 janv 2011;3(67).
76. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* août 2004;5(8):497-508.
77. Gao J, Chen Z, Li X, Yang M, Lv J, Li H, et al. Chemiluminescence in Combination with Organic Photosensitizers: Beyond the Light Penetration Depth Limit of Photodynamic Therapy. *Int J Mol Sci.* 19 oct 2022;23(20):12556.
78. Bretin L, Pinon A, Bouramtane S, Ouk C, Richard L, Perrin ML, et al. Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer. *Cancers.* 30 sept 2019;11(10):1474.
79. Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Hirschberg H. Repetitive 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on human glioma spheroids. *J Neurooncol.* mai 2003;62(3):243-50.

80. Vermandel M, Dupont C, Lecomte F, Leroy HA, Tuleasca C, Mordon S, et al. Standardized intraoperative 5-ALA photodynamic therapy for newly diagnosed glioblastoma patients: a preliminary analysis of the INDYGO clinical trial. *J Neurooncol.* mai 2021;152(3):501-14.
81. Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Stepp H, et al. Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med.* juin 2007;39(5):386-93.
82. Curnow A, McIlroy BW, Postle-Hacon MJ, MacRobert AJ, Bown SG. Light Dose Fractionation to Enhance Photodynamic Therapy Using 5-Aminolevulinic Acid in the Normal Rat Colon. *Photochem Photobiol.* 1999;69(1):71-6.
83. Leroy HA, Vermandel M, Vignion-Dewalle AS, Leroux B, Maurage CA, Duhamel A, et al. Interstitial photodynamic therapy and glioblastoma: Light fractionation in a preclinical model. *Lasers Surg Med.* 2017;49(5):506-15.
84. Vermandel M, Quidet M, Vignion-Dewalle AS, Leroy HA, Leroux B, Mordon S, et al. Comparison of different treatment schemes in 5-ALA interstitial photodynamic therapy for high-grade glioma in a preclinical model: An MRI study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* mars 2019;25:166-76.
85. Shen Z, Ma Q, Zhou X, Zhang G, Hao G, Sun Y, et al. Strategies to improve photodynamic therapy efficacy by relieving the tumor hypoxia environment. *NPG Asia Mater.* 30 avr 2021;13(1):1-19.
86. Dysart JS, Patterson MS. Photobleaching kinetics, photoproduct formation, and dose estimation during ALA induced PpIX PDT of MLL cells under well oxygenated and hypoxic conditions. *Photochem Photobiol Sci.* 2006;5(1):73-81.
87. Beppu T, Kamada K, Yoshida Y, Arai H, Ogasawara K, Ogawa A. Change of oxygen pressure in glioblastoma tissue under various conditions. *J Neurooncol.* mai 2002;58(1):47-52.
88. Yahara K, Ohguri T, Udono H, Yamamoto J, Tomura K, Onoda T, et al. Radiotherapy using IMRT boosts after hyperbaric oxygen therapy with chemotherapy for glioblastoma. *J Radiat Res (Tokyo).* 1 mai 2017;58(3):351-6.
89. Krishnamurthy S, Powers SK, Witmer P, Brown T. Optimal light dose for interstitial photodynamic therapy in treatment for malignant brain tumors. *Lasers Surg Med.* 2000;27(3):224-34.
90. Dupont C, Vermandel M, Leroy HA, Quidet M, Lecomte F, Delhem N, et al. INtraoperative photoDYnamic Therapy for GliOblastomas (INDYGO): Study Protocol for a Phase I Clinical Trial. *Neurosurgery.* 1 juin 2019;84(6):E414-9.
91. Dupont C, Betrouni N, Mordon SR, Reyns N, Vermandel M. 5-ALA Photodynamic Therapy in Neurosurgery, Towards the Design of a Treatment Planning System: A Proof of Concept. *IRBM.* 1 févr 2017;38(1):34-41.
92. Mathis T, Vignot S, Leal C, Caujolle JP, Maschi C, Mauget-Faÿsse M, et al. Mechanisms of phosphenes in irradiated patients. *Oncotarget.* 8 sept 2017;8(38):64579-90.
93. Axelsson J, Davis SC, Gladstone DJ, Pogue BW. Cherenkov emission induced by external beam radiation stimulates molecular fluorescence: Cherenkov emission stimulates molecular fluorescence. *Med Phys.* 23 juin 2011;38(7):4127-32.
94. Glaser AK, Zhang R, Andreozzi JM, Gladstone DJ, Pogue BW. Cherenkov radiation fluence estimates in tissue for molecular imaging and therapy applications. *Phys Med Biol.* 7 sept 2015;60(17):6701-18.
95. Li Y, Liu H, Huang N, Wang Z, Zhang C. The Measurement of the Surface Dose in Regular and Small Radiation Therapy Fields Using Cherenkov Imaging. *Technol Cancer Res Treat.* 2022;21:15330338211073432.

96. Vendrely V, Peuchant E, Buscail E, Moranvillier I, Rousseau B, Bedel A, et al. Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model. *Cancer Lett.* 01 2017;390:91-102.
97. Deland K, Starr BF, Mercer JS, Byemerwa J, Crabtree DM, Williams NT, et al. Tumor genotype dictates radiosensitization after Atm deletion in primary brainstem glioma models. *J Clin Invest.* 4 janv 2021;131(1):e142158, 142158.
98. Schnöller LE, Albrecht V, Brix N, Nieto AE, Fleischmann DF, Niyazi M, et al. Integrative analysis of therapy resistance and transcriptomic profiling data in glioblastoma cells identifies sensitization vulnerabilities for combined modality radiochemotherapy. *Radiat Oncol.* 19 avr 2022;17(1):79.
99. Dupin C, Sutter J, Amintas S, Derieppe MA, Lalanne M, Coulibaly S, et al. An Orthotopic Model of Glioblastoma Is Resistant to Radiodynamic Therapy with 5-AminoLevulinic Acid. *Cancers.* 31 août 2022;14(17):4244.
100. McMahon SJ. The linear quadratic model: usage, interpretation and challenges. *Phys Med Biol.* 19 déc 2018;64(1):01TR01.
101. Yamada K, Murayama Y, Kamada Y, Arita T, Kosuga T, Konishi H, et al. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid in colorectal cancer in vitro and in vivo. *Oncol Lett.* 2019;17(6):5132-8.
102. Schaffer M, Schaffer PM, Jori G, Corti L, Sotti G, Hofstetter A, et al. Radiation therapy combined with photofrin or 5-ALA: effect on Lewis sarcoma tumor lines implanted in mice. Preliminary results. *Tumori.* oct 2002;88(5):407-10.
103. Takahashi J, Nagasawa S, Ikemoto MJ, Sato C, Sato M, Iwahashi H. Verification of 5-Aminolevulinic Radiodynamic Therapy Using a Murine Melanoma Brain Metastasis Model. *Int J Mol Sci.* 17 oct 2019;20(20):5155.
104. Mathews MS, Angell-Petersen E, Sanchez R, Sun CH, Vo V, Hirschberg H, et al. The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids. *Lasers Surg Med.* oct 2009;41(8):578-84.
105. Guyon J, Andrique L, Pujol N, Røslund GV, Recher G, Bikfalvi A, et al. A 3D Spheroid Model for Glioblastoma. *J Vis Exp.* 9 avr 2020;(158):60998.
106. Gomez-Roman N, Stevenson K, Gilmour L, Hamilton G, Chalmers AJ. A novel 3D human glioblastoma cell culture system for modeling drug and radiation responses. *Neuro-Oncol.* 30 août 2016;now164.
107. Yang DM, Cvetkovic D, Chen L, Ma CMC. Therapeutic effects of in-vivo radiodynamic therapy (RDT) for lung cancer treatment: a combination of 15MV photons and 5-aminolevulinic acid (5-ALA). *Biomed Phys Eng Express.* nov 2022;8(6):065031.
108. Wang B, Cvetkovic D, Gupta R, Chen L, Ma CMC, Zhang Q, et al. Radiation Therapy Combined With 5-Aminolevulinic Acid: A Preliminary Study With an In Vivo Mouse Model Implanted With Human PC-3 Tumor Cells. *Int J Radiat Oncol.* nov 2015;93(3):E522.
109. Panetta JV, Cvetkovic D, Chen X, Chen L, Ma CMC. Radiodynamic therapy using 15-MV radiation combined with 5-aminolevulinic acid and carbamide peroxide for prostate cancer *in vivo*. *Phys Med Biol.* 19 août 2020;65(16):165008.
110. Riedel A, Klumpp L, Menegakis A, De-Colle C, Huber SM, Schittenhelm J, et al. γ H2AX foci assay in glioblastoma: Surgical specimen versus corresponding stem cell culture. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* juin 2021;159:119-25.
111. Siebers JV, Keall PJ, Nahum AE, Mohan R. Converting absorbed dose to medium to absorbed dose to water for Monte Carlo based photon beam dose calculations. *Phys Med Biol.* avr 2000;45(4):983-95.

112. Grigalavicius M, Mastrangelopoulou M, Berg K, Arous D, Ménard M, Raabe-Henriksen T, et al. Proton-dynamic therapy following photosensitiser activation by accelerated protons demonstrated through fluorescence and singlet oxygen production. *Nat Commun.* déc 2019;10(1):3986.
113. Kotagiri N, Sudlow GP, Akers WJ, Achilefu S. Breaking the Depth Dependency of Phototherapy with Cerenkov Radiation and Low Radiance Responsive Nanophotosensitizers. *Nat Nanotechnol.* avr 2015;10(4):370-9.
114. An H, Guo C, Li D, Liu R, Xu X, Guo J, et al. Hydrogen Peroxide-Activatable Nanoparticles for Luminescence Imaging and In Situ Triggerable Photodynamic Therapy of Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces.* 15 avr 2020;12(15):17230-43.
115. Blum NT, Zhang Y, Qu J, Lin J, Huang P. Recent Advances in Self-Exciting Photodynamic Therapy. *Front Bioeng Biotechnol.* 20 oct 2020;8:594491.
116. Yang Y, Hou W, Liu S, Sun K, Li M, Wu C. Biodegradable Polymer Nanoparticles for Photodynamic Therapy by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Biomacromolecules.* 8 janv 2018;19(1):201-8.

Titre : Radiosensibilisation du glioblastome par un excès de porphyrines

Résumé

Introduction : le glioblastome, tumeur cérébrale fréquente présente un mauvais pronostic avec une survie médiane autour de 14 mois. L'acide 5-amino-lévilinique (5-ALA), précurseur de la voie de biosynthèse de l'hème entraîne une accumulation de protoporphyrine IX (PpIX) dans les cellules du glioblastome. PpIX est un photosensibilisant connu et nous proposons de l'utiliser comme radiosensibilisant.

Objectif : Ce travail a évalué l'intérêt d'une sensibilisation de la radiothérapie par l'excès de porphyrines induit par le 5-ALA dans des modèles de cellules dérivées de tumeurs, en culture et dans un modèle de xenogreffe orthotopique. L'effet radiosensibilisant du 5-ALA a été évalué sur des lignées cellulaires, en radiothérapie à haute et basse énergie et en photothérapie. Enfin, l'effet Tcherenkov et son interaction avec la PpIX ont été recherchés sur un accélérateur de haute énergie.

Matériel et méthode : Nous avons utilisé des lignées P3, GG6 et GG16 dérivées de tumeurs. Le 5-ALA était mis au contact 4h avant les traitements pour les sphéroïdes (à 1mM) ou les souris (à 100mg/kg en intra péritonéal). La taille des sphéroïdes était estimée par seuillage semi-automatique sur ImageJ. Les souris immunodéficientes RAGy2C-/- étaient implantées en intra-cérébral par 5 sphéroïdes P3 transfectés par la luciférase. La croissance tumorale murine était quantifiée par bioluminescence après injection de D-Luciférase. La radiothérapie était réalisée sur l'encéphale à 220kV et en cas de haute énergie à 6 ou 18MV. La photothérapie était réalisée à 440nm.

Résultats : Nous avons évalué la croissance et la taille tumorale après différents schémas de radiothérapie encéphalique multifractionnée avec ou sans 5-ALA. Un schéma de fractionnement de 5 × 2 Gy, 3 fois par semaine a entraîné une survie intermédiaire [48-62 jours] par rapport à 0 Gy [15-24 jours], 3 × 2 Gy [41-47 jours] et 5 × 3 Gy [73-83 jours] (n=5 souris/groupe). La survie a été corrélée à la croissance tumorale. La croissance tumorale et la survie étaient similaires après des irradiations de 5 × 2 Gy, indépendamment du traitement au 5-ALA (groupe RT (53-67 jours), groupe RT+5-ALA (40-74 jours), HR = 1,57, p = 0,24) (n=11 souris/groupe). La croissance et la survie des sphéroïdes P3 en kV étaient diminuées par la radiothérapie *in vitro*, inchangées par le prétraitement au 5-ALA, confirmant les résultats *in vivo*. Sur d'autres lignées dérivées de glioblastome, GG6 et GG16, il n'y avait pas de radiosensibilisation par le 5-ALA. D'autres lignées cellulaires de carcinome (HT29-HT116-A431) et de mélanome (A375) n'étaient pas sensibilisées par l'accumulation de porphyrines. Comme le photothérapie sur les cellules P3 était efficace sur les cellules adhérentes (4,7% de cellules survivantes à 1J) et dans une moindre mesure sous forme de sphéroïdes (77,6% de cellules survivantes à 20J), nous avons testé la radiothérapie à haute énergie connue pour produire de l'effet Tcherenkov. Néanmoins, le 5-ALA n'entraînait pas sensibilisation des P3 irradiées à haute énergie (en MV) sous forme adhérente ou en sphéroïdes.

Sur le plan physique, on a pu montrer un léger effet Tcherenkov sur une machine de traitement clinique. Cet effet était plus haut avec des électrons de haute énergie (20MeV) qu'avec des photons en MV. A 20MeV, le signal spectroscopique d'un milieu contenant de la PpIX était modifié par absorption-émission de la PpIX.

Conclusion : Notre étude montre pour la première fois que dans un modèle tumoral préclinique pertinent pour le glioblastome humain, traité comme en routine clinique, l'administration de 5-ALA, bien que conduisant à une accumulation importante de PpIX, ne potentialise pas la radiothérapie. La radiothérapie à haute énergie ne semble pas suffisante pour produire suffisamment d'effet Tcherenkov pour avoir un effet de photothérapie.

Mots clés : Glioblastome, radiosensibilisation, radiothérapie, photothérapie, porphyrine, 5-ALA

Titre : Glioblastoma radiosensitization by porphyrin excess

Abstract

Introduction : Glioblastoma is a common brain tumor with a poor prognosis and 14 months of median survival. Five-Amino-Levilinic Acid (5-ALA) is a precursor of heme biosynthetic pathway that leads to an accumulation of protoporphyrin IX (PpIX) in glioblastoma cells. PpIX is a known photosensitizer, and we proposed to use it as a radiosensitizer.

Objective : This work evaluated the radiosensitization of glioblastoma by 5-ALA-induced porphyrin accumulation, *in vitro* and in orthotopically xenografted patient-derived tumor cells. The sensitizing effect of porphyrins was evaluated in cell lines, with high and low energy radiotherapy and with phototherapy. Finally, we investigated the PpIX fluorescence-induced by the Tcherenkov effect produced with a high energy radiotherapy accelerator.

Material and method : We used the patient-derived P3, GG6 and GG16 tumor cell lines. 5-ALA was delivered 4h before irradiation for spheroids (at 1mM) or mice (at 100mg/kg intraperitoneally). Spheroid size was determined by semi-automatic thresholding on ImageJ. RAGy2C-/- immunodeficient mice were implanted orthotopically with 5 luciferase-transfected P3 spheroids. Tumor growth was quantified by bioluminescence after injection of D-Luciferin. Radiotherapy was performed on the brain at 220kV (low energy) and with 6-18MV (High energy). Phototherapy was performed at 440nm.

Results : We evaluated the xenotransplanted P3-derived tumor growth and tumor burden after different regimens of encephalic multifractionated radiation therapy with or without 5-ALA. A fractionation scheme of 5 × 2 Gy three times a week resulted in intermediate survival [48–62 days] compared to 0 Gy (15–24 days), 3 × 2 Gy (41–47 days) and, 5 × 3 Gy (73–83 days). Survival was correlated to tumor growth. Tumor growth and survival were similar after 5 × 2 Gy irradiations, regardless of 5-ALA treatment (RT group (53–67 days), RT+5-ALA group (40–74 days), HR = 1.57, p = 0.24). Spheroid growth and survival were diminished by radiotherapy *in vitro*, unchanged by 5-ALA pre-treatment, confirming the *in vivo* results. The analysis of two additional stem-like patient-derived cell lines GG6 and GG16 confirmed the absence of radiosensitization by porphyrin accumulation. Cell lines from carcinomas (HT29-HT116-A431) and melanoma (A375) cell lines were not radiosensitized after 5-ALA treatment. As porphyrin accumulation did induce phototoxicity on P3 cells with higher efficiency on adherent cells (4.7% of cells surviving at 1J) than on spheroids (77.6% of cells surviving at 20J), we tested high energy radiotherapy, known to induce the Tcherenkov effect. However, MegaVoltage irradiation did not radiosensitize adherent or spheroidal P3 cells pre-treated with 5-ALA. Physical experiments showed a slight Tcherenkov effect in clinical settings. It was higher with high-energy electrons (20MeV) than with MegaVoltage photons irradiation. With 20MeV, the spectroscopic signal was modified in a medium containing PpIX by absorption-emission of PpIX.

Conclusion : Our study shows for the first time that in a preclinical tumor model relevant to human glioblastoma, treated as in clinical routine, 5-ALA administration, although leading to significant PpIX accumulation, does not potentiate radiotherapy. High voltage radiotherapy does not seem sufficient to produce enough Tcherenkov effect to induce phototherapy.

Keywords : Glioblastoma, radiosensitization, radiotherapy, phototherapy, porphyrin, 5-ALA

Bordeaux Institute in onCology – BRIC ; INSERM U1312 ; BioGo Team

Université de Bordeaux site Carreire ; Bâtiment Recherche, 146 Rue Léo Saignat

33076 Bordeaux CEDEX