



HAL
open science

Evaluation de la radiothérapie vectorisée à l'aide de nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 pour le traitement du glioblastome : investigation des modalités d'administrations locales

Annabelle Cikankowitz

► To cite this version:

Annabelle Cikankowitz. Evaluation de la radiothérapie vectorisée à l'aide de nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 pour le traitement du glioblastome : investigation des modalités d'administrations locales. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2015. Français. NNT : 2015ANGE0057 . tel-02082316

HAL Id: tel-02082316

<https://theses.hal.science/tel-02082316>

Submitted on 28 Mar 2019

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

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

Thèse de Doctorat

Annabelle CIKANKOWITZ

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

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : DS5 Biologie, Médecine, Santé

Spécialité : Pharmacologie Expérimentale et Clinique

Unité de recherche : *INSERM Unité 1066 MINT (Micro et Nanomédecines Biomimétiques)
Angers – ONIRIS- Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes*

Soutenue le 10 Décembre 2015

Thèse N° : 1450

Evaluation de la radiothérapie vectorisée à l'aide de nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 pour le traitement du glioblastome : investigation des modalités d'administrations locales.

JURY

Rapporteurs : **Samuel VALABLE**, Chargé de recherche 1, CNRS, HDR, UMR 6301 ISTCT, équipe CERVOxy, Caen
Etienne GARIN, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université de Rennes, INSERM U991, Rennes

Examineur : **Nicolas NOIRET**, Professeur, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes UMR CNRS 6226, Rennes

Invité: **Luca MACIOCCO**, R&D project leader, Engineering&Service manager, Advanced Accelerator Applications,
St. Genis Pouilly

Directeur de Thèse : **Olivier COUTURIER**, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Université d'Angers – CHU d'Angers

Co-directeurs de Thèse : **François HINDRE**, Maître de conférences, INSERM U1066 MINT, Angers
Catherine IBISCH, Maître de conférences, DVM PhD, ONIRIS, Nantes

REMERCIEMENTS

Cette page rend hommage aux principales personnes, qui de près ou de loin, ont permis le bon déroulement de cette thèse. MERCI !

Le travail de recherche présenté dans ce mémoire a principalement été effectué au laboratoire INSERM Unité 1066 MINT (Micro et Nanomédecines Biomimétiques) basé au sein de l'Institut de Biologie en Santé (IBS) du Centre Hospitalier Universitaire, à Angers. Je remercie donc, en premier lieu, le Professeur Jean-Pierre Benoît, directeur de ce centre de recherche, de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir mis à disposition des équipements modernes, performants et adaptés au travail durant ces trois années.

Olivier Couturier, chef de Médecine Nucléaire au CHU d'Angers, a dirigé cette thèse. Je tiens à vous remercier de m'avoir confié ce travail de recherche financé par le programme de recherche de la Région Pays de la Loire NucSan (Nucléaire pour la santé).

Je remercie particulièrement François Hindré, responsable de la plateforme PRIMEX (Angers), qui a dirigé cette thèse malgré sa charge de travail importante, se partageant entre plusieurs sites. Il a toujours trouvé le temps pour répondre à mes sollicitations.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Catherine Ibisch pour son investissement, un encadrement sans faille, nos discussions et sa grande disponibilité qui m'ont apporté des conseils avisés à chaque fois que j'en ai eu besoin ; sa confiance, ses encouragements et tant de qualités dont la gentillesse et l'écoute: tout ceci m'a permis de progresser dans mon travail. Merci beaucoup !

Les nombreux déplacements professionnels, notamment à Singapour pour le 3^{ème} congrès Nano Today 2013 (Matrix, Biopolis) (je les remercie encore pour le prix qui m'a été décerné pour le poster présenté) et à Vienne pour le Young Investigator Meeting 2014 (YIM'14) de l'EANM, ont permis de m'enrichir tant au niveau scientifique que personnel.

Je remercie à cette occasion:

- le Cancéropôle Grand Ouest et L'Axe Vectorisation & Radiothérapies, pour m'avoir accordé un financement afin de me donner l'opportunité de participer à une conférence internationale en 2013.
- la Société Française de Médecine Nucléaire (SFMN) et l'EANM (European Association of Nuclear Medicine) pour la prise en charge du voyage à Vienne.

Je remercie Monsieur Samuel Valable (professeur, Chargé de recherche 1, CNRS, UMR 6301 ISTCT, équipe CERVOxy de Caen) ainsi que Monsieur Etienne Garin, professeur à l'université de Rennes 1 (Praticien Hospitalier, Centre Eugène Marquis, Médecine Nucléaire, INSERM U991), d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur Nicolas Noiret (Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes) et Monsieur Luca Maciocco (R&D project leader, Engineering&Service manager, Advanced Accelerator Applications) qui ont bien voulu accepter d'être les membres du jury.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Anne Clavreul, d'avoir cru en moi, aidé à tester et valider notre approche thérapeutique sur un tissu tumoral d'origine humaine. Grâce à tes conseils avisés, ta confiance, tes encouragements et tant de qualités dont la gentillesse et l'écoute : tu m'as permis de progresser dans mon travail. Merci beaucoup de m'avoir consacré du temps !

Je souhaite aussi remercier de nombreuses personnes qui ont contribué à la réussite de ce travail de thèse en nous accordant un peu de leur temps précieux ces trois années : Laurent Lemaire (INSERM 1066-MINT), Florence Franconi (INSERM 1066-MINT, PRIMEX), merci pour votre aide, les journées interminables à chercher des tumeurs (ou pas) dans les cerveaux des souris, et votre confiance pour m'avoir permis d'utiliser de manière autonome l'IRM. Nicolas Lepareur (Centre Eugène-Marquis, Rennes) pour ses explications sur la formation du complexe lipophile et les fournitures de la collection de boîtes plombées (et toujours à l'heure !!). Borhane Fellah (Oniris) pour la mise au point du cadre de stéréotaxie sur les cadavres de chiens. Jérôme Abadie (Oniris) pour tes conseils, ton aide précieuse pour les analyses histologiques de toutes les coupes de cerveaux et les corrections du manuscrit. Audrey Rousseau (CHU Angers) pour les analyses histologiques des coupes de cerveaux Lab1.

REMERCIEMENTS

Médecine nucléaire du CHU d'Angers (Franck Lacoeyille, Francis Bouchet et Djamel Dabli) pour les heures passées à trouver un moyen d'étudier les autoradiogrammes et tant d'autres... MERCI !

Que ces trois années d'apprentissage à la recherche ne soit qu'un prologue...

J'adresse un grand merci à tous les membres du MINT et de l'école nationale vétérinaire de Nantes qui ont aimablement contribué à rendre cette période plus agréable. Je pense en particulier et avant tout à trois amis hors pairs : Camille, Clément et Aurélien, à qui je dois beaucoup et que je n'oublierai jamais ! Nous avons passé de longues journées, soirées et même nuits sans manger à expérimenter, mettre au point des techniques comme l'autoradiographie (ou à réanimer certaines souris) mais toujours en musique (DJ Otzi, Coldplay, U2, The Script, Imagine Dragons, One Republic...) ! Je me souviendrai toujours du 1^{er} Avril 2014 où j'ai retrouvé Clément en train de brasser la fumée qui sortait du moteur de la perceuse tant attendue et que nous venions tout juste de déballer ! Et non ce n'était même pas une farce ! Nous pourrions publier le manuel de réanimation des souris et breveter notre méthodologie d'autoradiographie !

Aux membres de l'unité MINT et de l'animalerie SCAHU : collègues (Emmanuel, Laurence, Edith, Jérôme Roux, Pierre Legras etc.), et ami(e)s (Ambroise, Anne-Laure, Pauline, Leila, Marie, Audrey, Jérôme).

Je pense en particulier à ma meilleure amie Justine qui m'a fait l'honneur de me demander d'être le témoin à son mariage. Tu m'as accompagnée, soutenue durant cette longue période, qui s'est avérée conséquente et compliquée. Merci pour ton amitié sincère et sans faille. Bon maintenant fini les souris à perte de vue, le dossier pour l'école vétérinaire est à préparer ! Enfin !

Je remercie profondément Lionel. Merci de m'avoir soutenue, de ton aide tout au long de la rédaction de ce mémoire, pour tant de gentillesse et m'avoir gardé à flot jusqu'au bout. Je sais que ça n'a pas dû être facile pour toi, même si tu es la joie de vivre incarné ! Merci pour nos merveilleux moments sur la piste ou en compétition avec Grisette (le monstre de Dinard ;-)) et Irikou (qui va quand même vite sur le Derby) et en stage intensif chez Laurent. En espérant qu'il y en ait pleins d'autres ! Merci tout simplement de croire en moi, tu comptes beaucoup pour moi.

Merci à toute l'équipe de l'écurie de la Verrière, et en particulier mon coach Bertrand, Marjorie, Clément (qui a fait un grand travail lors de mon arrivée pour effacer le disque dur et me réapprendre les bonnes bases, je m'excuse d'avoir contribué à la perte de quelques cheveux supplémentaires...) de nous avoir accueillies Mam'zelle et moi et de nous avoir redonné le sourire. Mam'zelle profite de sa retraite dans vos pâtures, et la nouvelle venue dans la famille, Extasy s'applique et progresse. Zhou, on tient bon, on ne lâche rien (même pas le dressage) ! Le travail paye toujours !

J'exprime maintenant toute ma gratitude à des personnes extraordinaires, mes parents, qui m'ont toujours écoutée, à tout moment, en toute circonstance ; mes parents qui m'ont soutenue et encouragée, depuis toujours. Vous avez tant donné et donné encore tant... Je ne pourrais pas vivre sans vous. Merci pour tout ! Vous êtes mon énergie et mon modèle.

Pour finir, *last but not least* : ma formidable grande sœur Anne qui a 35 ans ☺, que j'aime plus que très fort, merci d'être toujours là (ainsi que super Loïc en tongues et Shamu), merci aussi pour tes conseils. Merci pour tes lectures attentives de mon manuscrit à des heures parfois tardives, merci pour notre complicité et ton aide précieuse. Et oui, cela fait 7 ans, jour pour jour, que tu as soutenu ta thèse sur les meilleures techniques disponibles ! Le 10 Décembre est décidément une affaire de famille dédiée aux thèses de doctorat !!

Merci à tous tout simplement.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	7
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13

INTRODUCTION GENERALE

Avant-propos.....	19
I. Généralités sur les tumeurs du cerveau: épidémiologie.....	20
II. Classification actuelle des gliomes	21
III. Oncogénèse du glioblastome : gliomagénèse.....	25
IV. Diagnostic du glioblastome.....	29
IV.1 L’Imagerie par Résonance Magnétique ou IRM.....	29
IV.2 La Tomographie par Emission de Positons couplée à la TomoDensitoMétrie (TEP/TDM)	30
IV.3 Diagnostic et suivi en imagerie	31
V. Les traitements.....	32
V.1 Traitement standard du glioblastome : protocole de Stupp	32
V.2 Modalités thérapeutiques	34
V.2.1 Chirurgie.....	34
V.2.2 Traitement médical.....	36
V.2.2.1 Chimiothérapie	36
V.2.2.2 Thérapie locale : implants.....	37
V.2.2.3 Thérapie locale-injection directe : systèmes de réservoir-cathéter.....	38
V.2.2.4 Convection-Enhanced Delivery ou CED	39
V.2.3 Radiothérapie externe	40
V.2.4 Radiothérapie interne	45
VI. Présentation du projet	46
VI.1 Les nanovecteurs.....	46
VI.2 Le rhénium-188	47
VI.3 L’administration du traitement.....	49
VI.4 Plan	50
Références bibliographiques de l’introduction:.....	52

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : REVUE

I. Internal radiotherapy for malignant glioma in clinical trials-State of the art.....	66
I.1 Locoregionale brachytherapy through sealed source.....	66
I.2 Targeted internal radiation therapy – radioimmunotherapy (RIT) with mAb	68
I.3 Targeted internal radiation therapy – peptide receptor therapy	73
II. Clinical trials for internal radiotherapy of malignant gliomas: technical choices ..	79
II.1 Properties of radionuclides influencing their use in GBM therapy	79
II.2 Technical procedures for applying radionuclides to the brain.....	84
II.3 Molecular targeting of radionuclides in GB treatment.....	85
II.3.1 Monoclonal antibodies	85
II.3.2 Peptides	87
III. Opportunities and innovation in applying radionuclide-combined particulate systems to GB	91
References	101

DEUXIEME PARTIE : ARTICLE

I. Materials and methods.....	122
I.1 Glioblastoma cell culture	122
I.2 The orthotopic Lab1 GB model.....	122
I.3 Production and characterization of LNC ¹⁸⁸ Re-SSS complex.....	123
I.4 LNC distribution analysis: comparison of two techniques	123
I.4.1 Fluorescence analysis of LNC distribution	125
I.4.2 Autoradiography analysis of LNC distribution	125
I.5 Evaluation of LNC ¹⁸⁸ Re-SSS therapy on the orthotopic Lab1 GB model and comparison with an external radiotherapy.....	126
I.6 MRI	127
I.7 Evaluation of LNC ¹⁸⁸ Re-SSS CED effect on tumor growth and its microenvironment	127
I.8 Immunofluorescence	128
I.9 Statistical analysis	128

TABLE DES MATIERES

II. Results	129
II.1 Analysis of LNC distribution in the orthotopic Lab1 GB model	129
II.2 Analysis of the retention of ^{188}Re -SSS activity within mice brain	131
II.3 Analysis of the efficacy of the internal radiotherapy on the Lab1 GB model and comparison with an external radiotherapy	134
II.4 Effect of LNC ^{188}Re -SSS treatment on the tumor and its microenvironment	137
III. Discussion	139
IV. Conclusion	142
References	143

TROISIEME PARTIE :

I. Matériels et méthodes	152
I.1 Culture des cellules GL261	152
I.2 Le modèle syngénique de gliome GL261	152
I.3 Mise en place du modèle GL261 <i>in vivo</i>	154
I.4 Production des LNC ^{188}Re -SSS	154
I.5 Analyse de la toxicité des LNCs	154
I.6 Analyses des effets des LNC ^{188}Re -SSS dans le modèle syngénique GL261 : études d'efficacité	155
I.7 Analyses de l'effet des LNC ^{188}Re -SSS sur la croissance tumorale	155
I.8 IRM	155
I.9 Analyses statistiques	157
II. Résultats	158
II.1 Le modèle de gliome murin syngénique : souris C57BL6/J / cellules GL261 ..	158
II.2 Efficacité de la radiothérapie interne fractionnée et délivrée aux jours 12 et 19 post injection des cellules de gliome GL261	160
II.3 Effets des radiations dans le striatum sain des souris immunocompétentes ...	162
II.4 Effets des radiations sur la tumeur	164
III. Discussion – Conclusion	166
Références bibliographiques de la troisième partie :	170

TABLE DES MATIERES

QUATRIEME PARTIE : LES MODELES TRANSLATIONNELS

I. Rappels sur la CED	175
II. Les modèles gros animaux pré-cliniques.....	177
II.1 Le modèle porcin.....	177
II.2 Le modèle primate non humain	184
II.3 Les carnivores domestiques : chats et chiens.....	188
III. Conclusion.....	199
Références bibliographiques de la quatrième partie :	200
CONCLUSION GENERALE.....	206
ANNEXE.....	213

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Histologie des grades des tumeurs astrocytaires selon la WHO (modifiée d'après Sanai N et al., 2005).....	23
Figure 2: Illustration de l'organisation des cellules gliales.....	26
Figure 3: Illustration de la capacité multipotente d'une cellule souche neurale et formation du néoplasme à partir du progéniteur de cellules gliales (d'après Sanai N <i>et al.</i> , 2005).	27
Figure 4: Images d'IRM d'un cas de glioblastome. (A) : coupe axiale post-contraste T1-weighted montrant l'irrégularité et la nécrose centrale et (B) : coupe axiale T2-weighted montrant une masse hyperintense hétérogène et l'invasion tumorale accompagnée d'un œdème (d'après Preusser M et al 2011).	30
Figure 5: Image [¹¹ C]-MET-TEP d'un glioblastome. Les couleurs jaune-rouge de l'image TEP correspondent aux plus forts niveaux d'incorporation du radiotraceur par les cellules tumorales (d'après Juhász C <i>et al</i> 2014).	31
Figure 6: Chronologie du traitement de première intention du gliome.	33
Figure 7: Probabilité de survie (estimation Kaplan-Meier) des patients après simple radiothérapie externe (rouge) ou en parallèle avec la chimiothérapie (bleu) (d'après Stupp R. et al., 2009).	34
Figure 8: Illustration intra-opérative de l'optimisation de la chirurgie d'exérèse par la technique de fluorescence 5-ALA. (A) sous lumière blanche et (B) lumière bleue (d'après Li Y <i>et al</i> 2014).....	35
Figure 9: Implant de Gliadel placés dans la cavité tumorale (d'après Juratli TA <i>et al.</i> 2013).	37
Figure 10: Principe du Gamma Knife.....	41
Figure 11: La technologie Cyber Knife.....	42
Figure 12 : (A) Image IRM avec la superposition du plan de ciblage de la radiothérapie externe. GTV en bleu, CTV en vert et PTV en rouge. (B) Considération de la dose déposée selon les volumes : PTV en rouge pour la forte dose et 50% de la dose prescrite pour la zone bleue (d'après Preusser M <i>et al.</i> , 2011).....	43
Figure 13: La proton thérapie.	44

LISTE DES FIGURES

Figure 14: Illustration d'un implant d'iode-125 comparé à un grain de café (d'après Ruge <i>et al.</i> 2012).....	45
Figure 15: Caractéristiques générales des LNC.	47
Figure 16: Schéma simplifié du changement de configuration et de complexation du rhénium dans notre étude.	48
Figure 17: LNC ¹⁸⁸ Re-SSS	49
Figure 18: Illustration du dispositif d'injection intracérébrale par Convection-Enhanced Delivery pour les modèles murins disposés sur le cadre de stéréotaxie (Pump 11 elite 70-4507INT, Harvard Apparatus®, Les Ulis, France).....	49
Figure 19: Représentation schématique d'une coupe axiale de cerveau de souris avec la pousse tumorale au niveau du corps calleux. Zoom sur le ciblage personnalisé en pré-clinique des LNC ¹⁸⁸ Re-SSS par CED.	50
Figure 20: Experimental design to analysis LNCs distribution in the orthotopic GB Lab1 model through fluorescence (LNC-DID) and autoradiography (LNC ¹⁸⁸ Re-SSS).	124
Figure 21: (supplementary data) Distribution of the LNC ¹⁸⁸ Re-SSS activity (MBq) through the whole mice brain..	132
Figure 22: (supplementary data) Biodistribution of the LNC ¹⁸⁸ Re-SSS 1 h (n=1) and 24 h (n=1) after their CED injection in mice bearing GB (Vi = 5 µL).	133
Figure 23: Efficacy of fractionated D12 – D19 internal radiotherapy using LNC ¹⁸⁸ Re-SSS after their CED administration in the Lab1 GB model.	136
Figure 24: Evaluation of LNC ¹⁸⁸ Re-SSS CED effect on tumor growth and its microenvironment.....	138
Figure 25 : Représentation schématique de l'environnement tumorale et de sa périphérie 7 jours après l'injection de 3 MBq de LNC ¹⁸⁸ Re-SSS au sein de la masse tumorale. Désorganisation des vaisseaux sanguins, infiltration de cellules de l'immunité innée, réponse inflammatoire et atypie des cellules tumorales.	150
Figure 26: Dispositif de stéréotaxie dédié au modèle murin pour l'injection des cellules....	153

LISTE DES FIGURES

- Figure 27** : A : Agencement du dispositif anesthésique-berceau chauffé utilisé pour l'antenne cryo et ayant un ballonnet pour le suivi en temps réel de la respiration de l'animal imagé ; B : Photo de la micro IRM BioSpec 70/20USR de Bruker ; C : Poste de contrôle respiratoire et d'acquisition des imageries (une coupe axial en T2-echo1 du cerveau d'une souris nude-NMRI) obtenues avec le logiciel d'analyse PV.5.1..... 156
- Figure 28**: Images IRM comparées à l'aspect histopathologique des lésions : validation du caractère infiltrant du modèle tumoral GL261. 159
- Figure 29**: Efficacité de la radiothérapie interne fractionnée (jours 12 – 19). A) Design expérimental du traitement du modèle de gliome GL261 avec les LNC¹⁸⁸Re-SSS. B) Courbes de Kaplan-Meier des souris GL261 contrôles (n=8 Blank-LNCs) et des souris GL261 traitées (n=6 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS). et C) Tableau récapitulatif des résultats de l'étude de survie. 161
- Figure 30**: Images histologiques de coupes des cerveaux sains 48h et 14 jours après l'injection de LNCs blanches ou de 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS. Lésion de nécrose parenchymateuse nerveuse d'extension légère post-traumatique (trajet d'injection). Coloration Hemalun-Eosine-Safran; grandissement x10 et zoom x40. 163
- Figure 31**: Images histologiques des gliomes GL261 14 jours après l'injection de 3 µL de 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS. Colorations HES des coupes fixées au formol ; (A) vue en périphérie de la tumeur dont le tissu est remanié par nécrose x10 ; (B et D) zoom x40 des atypies de cellules tumorales et (C) zoom x20 sur l'atypie morphologique. 165
- Figure 32** : Illustration du cathéter (A) et de la pompe Medtronic Synchronomed II (D) (d'après Bienemann A. *et al.*, 2012 et Kim I. *et al.*, 2014)..... 179
- Figure 33** : Examen macroscopique d'une coupe coronale du cerveau d'un cochon avec une masse tumorale développée à partir de cellules U87 MG (d'après Selek *et al.*, 2013)..... 181
- Figure 34** : (A) photographie illustrant la cannule anti-reflux développée dans l'étude the step-design cannula used (B) Distribution de 100 µL de bleu trypan dans le gel d'agarose à un débit de 5-µL/minute. (C) Coupe du cerveau d'un singe (épaisseur 40µm) révélant la

LISTE DES FIGURES

distribution de 700 μ L de liposomes couplés à la rhodamine dans la corona radiata (<i>flèches</i>).	
(D) idem dans le tronc cérébral (<i>flèches</i>). (d'après Krauze <i>et al.</i> , 2005).	185
Figure 35 : (A) photographie illustrant le cadre de stéréotaxie compatible IRM pour le singe	
(B) Vue détaillée du guide de la canule. (C) Tube de silicone + guide + canule. (D) Zoom sur	
la canule avec ses composants internes et externes, conçue pour l'étude. Echelle	
millimétrique (d'après Krauze <i>et al.</i> , 2009).....	185
Figure 36 : (A) photographie illustrant le système de CED (B) Cadre destiné chien,	
compatible à l'IRM. (C) Guide + canule d'infusion de silice. (D) Zoom sur le guide multipores.	
France Mise en place de 3 canules d'injection de liposomes et (F) Guide <i>in situ</i> (d'après	
Dickinson <i>et al.</i> , 2010).	191
Figure 37 : Photographies du cadre de stéréotaxie dédié chien, compatible IRM avec son	
support de transport et du positionnement d'un trocart de biopsie au travers d'une fenêtre	
osseuse.....	194

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Gradation des tumeurs issues des cellules gliales (4 ⁱ ^{ème} édition de la classification WHO en cours, 2007).....	22
Tableau II : Médiane de survie des patients en fonction du grade de l'astrocytome.....	24
Tableau III : Présentation des cellules gliales non neuronales (adapté d'après Sanai N <i>et al.</i> 2005 ; Aloisi F 2001 et Jessen KR 2004).....	26
Tableau IV : Principales caractéristiques du rhénium-188.	47
Tableau V : Chronological classification of MG clinical trials (RIT – peptide receptor therapy).	76
Tableau VI: Common particles and their physical characteristics.....	79
Tableau VII: Chronological classification of available therapeutic radionuclides for MG clinical and pre-clinical trials (physical characteristics).....	83
Tableau VIII: Determination of LNC distribution with fluorescence (LNC-DID) and autoradiography (LNC ¹⁸⁸ Re-SSS) analyses following their CED injection into the Lab1 GB model (mean \pm SD).	130
Tableau IX: Autoradiography analysis: injection and distribution characteristics.	130
Le Tableau X suivant est un récapitulatif des articles concernant les études sur les améliorations techniques de la CED chez le cochon.	182
Le Tableau XI suivant est un récapitulatif des articles concernant les études sur les améliorations techniques de la CED chez le primate non humain.	186
Le Tableau XII suivant est un récapitulatif des articles concernant les études sur les améliorations techniques de la CED chez le modèle spontané canin.	197

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AA: Anaplastic Astrocytomas

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

B

BBB: Blood Brain Barrier

BCNU: 1,3-Bis (2-Chloroethyl)1-Nitrosourea - Carmustine®

BHE: Barrière Hémato-Encéphalique

BSA : Bovin Serum Albumin

C

CED: Convection Enhanced-Delivery

CNS: Central Nervous System

CPM: Count Per Minut

CT: Computed Tomography

CTV: Clinic Target Volume

CTX: Chlorotoxin

D

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride

DID:

DLU: Digital Light Unit

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

E

E/H: Eau dans Huile

EDTA: Ethylene Diamin Triaacetic Acid

EBRT: External Beam Radiotherapy

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

LISTE DES ABREVIATIONS

F

FCS: Fetal Calf Serum

FDA: Food and Drug Administration

FITC: Fluorescéine isothiocyanate

G

GB et GBM: Glioblastome

GFAP: Glial F A Protein

GTV: Gross Target Volume

H

HBSS: Hepes Buffered Saline Solution

H/E: Huile dans Eau

HES : Hématoxilin Eosine Safran

h-R3: Nimotuzumab

I

IFN- γ : Interferon-gamma

IMST: Increase in Median Survival Time (%)

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

L

L-Glu: L-Glutamine

LCR: Liquide Céphalo Rachidien

LET: Transfert Linéaire d'Energie

LNCs: Lipid Nanocapsules

LNC¹⁸⁸Re-SSS: Lipid Nanocapsules loaded with Rhenium-188

LT: Locoregional Therapies

M

Mab: Monoclonal Antibody

MG: Malignant Gliomas

MGMT: O6-methylguanine-DNA-methyltransferase

LISTE DES ABREVIATIONS

MMP-2: Matrix Metalloproteinase 2

MRI: Magnetic Resonance Imaging

MTD: Maximum Tolerated Dose

N

NK: Natural Killer cells

NK1R: Neurokinin type 1 Receptor

P

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PEG: Polyethylene glycol

PhCS2H: Dithiobenzoate de sodium

P/S: Pénicilline/Streptomycine

PTV: Planning Target Volume

R

RARE: Rapid Acquisition Relaxation Enhancement

RIT: RadiolImmunoTherapy

ROI: Region Of Interest

S

SCRC: Surgically Created Resection Cavity

SI: Simple Injection

SNC: Système Nerveux Central

SP: Substance P

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

SSS: Super Six Sulfur

SST: Somatostatin

SSTR: Somatostatin Receptor

SVF: Sérum de Veau Foetal

T

Tem: Mean Echo Time

LISTE DES ABREVIATIONS

TIP: Température d'Inversion de Phase

TMZ: Temozolomide - Temodal®

TN: Tenascin

V

Vd: Volume de distribution

VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor

Vi: Volume d'injection

W

WHO: World Health Organization

Z

ZIP: Zone d'Inversion de Phase

INTRODUCTION GENERALE

Avant-propos

Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus agressive du système nerveux central avec des symptômes qui dépendent de sa localisation et donc de la zone cérébrale atteinte. Le développement tumoral ou gliomagenèse dérive des cellules de type astrocytaire qui possèdent de multiples fonctions au sein du système nerveux central. La pathologie met en jeu des facteurs de risque propres à chaque individu et des facteurs environnementaux.

La prise en charge thérapeutique conventionnelle du gliome de haut grade débute par un acte chirurgical visant à enlever plus de 90% de la masse tumorale visible lors de l'examen IRM. Cette première étape est suivie par le protocole de radio-chimiothérapie recommandé depuis 2005 (suite aux études de Stupp). Celui-ci, bien qu'améliorant la survie moyenne, est suivi par une récurrence pour la quasi-totalité des patients, ce qui justifie des efforts de recherches intenses pour identifier des innovations thérapeutiques efficaces sur les GBM.

Notre travail vise à explorer de manière pré-clinique la pertinence d'une nouvelle thérapie du GBM par radiothérapie interne localisée faisant appel à une combinaison innovante d'un radionucléide (le rhénium-188) et d'un nanovecteur (nanocapsules lipidiques ou LNCs).

Le chapitre introductif développé ci-après décrit tout d'abord les généralités concernant le gliome : son oncogénèse et sa gradation selon la dernière classification réalisée par la WHO en 2007. L'établissement du diagnostic et les traitements et techniques conventionnels sont ensuite présentés avant d'aborder le traitement local par radiothérapie interne. Une dernière partie présentant les objectifs de notre travail clôturera l'introduction.

I. Généralités sur les tumeurs du cerveau: épidémiologie

Les tumeurs du système nerveux central sont des cancers difficiles à appréhender compte tenu de leur localisation anatomique, de leur agressivité et de leur tendance infiltrante. Ces tumeurs (incidence de 2% par rapport à l'ensemble des pathologies tumorales) sont initiées dans le cerveau et métastasent peu. L'incidence annuelle est de 5-8 cas diagnostiqués pour 100000 habitants. La majorité des patients atteints de cette maladie sont des adultes avec une prépondérance chez le sujet masculin (ratio M/F : 1,3/1). Cependant, elle peut apparaître chez de jeunes patients. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales primitives (pour 50% d'entre-elles) correspondant à des néoplasies issues des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes...). Ceci sera étayé par la suite dans le paragraphe de gliomagenèse.

Il n'y a pas de prévention connue pour ce cancer. En effet, les causes de développement et les facteurs de risques sont variés et non définis avec certitude. Les recherches de liens entre exposition à un facteur potentiel et le type tumoral n'ont pas été concluantes du fait de la grande hétérogénéité entre les patients (Bondy ML *et al.*, 2008). Cependant, des hypothèses de causalité sont retenues comme l'influence de l'environnement du patient (lieu géographique, pollution, variations ethniques, historique familial de mutations génétiques) et son mode de vie (traumatisme crânien, allergies, protocole de thérapie, alcool, exposition aux fumées du tabac, utilisation de téléphone portable...) (Wrensch M *et al.*, 2002). Le facteur de risque d'épilepsie est controversé car les crises épileptiformes sont souvent un symptôme de la maladie menant au diagnostic donc son lien avec le risque semble difficile à estimer.

Les facteurs pronostiques établis sont pour beaucoup des éléments cliniques tels que l'état général du patient, son âge, le statut (score de performance de Karnofsky), la localisation de la tumeur gliale, des éléments apportés par l'imagerie (comme l'augmentation de contraste à l'IRM), l'accessibilité chirurgicale et donc de l'étendue de la résection chirurgicale et la possibilité d'effectuer une chimiothérapie. Enfin, l'indice de prolifération, les altérations génétiques et le grade histologique de la tumeur que nous allons évoquer dans le chapitre

INTRODUCTION GENERALE

suivant sont également des facteurs pronostiques avérés. La combinaison de ces paramètres contribue à l'estimation globale du pronostic.

II. Classification actuelle des gliomes

La classification des tumeurs du Système Nerveux Central (SNC) publiée en 2007 dans la 4^{ième} édition de la World Health Organization (WHO) est présentée dans le tableau 1 (David NL *et al.* 2007). Elle est basée sur un consensus d'un groupe de travail de 25 pathologistes et généticiens. La contribution de plus de 70 experts internationaux à ce travail présente cette 4^{ième} édition comme la référence dans la définition des tumeurs cérébrales pour la communauté d'oncologie clinique et de recherche pour le cancer à travers le monde. Alors que la première édition était basée sur un typage histologique de la tumeur (Zulch KJ *et al.*, 1979), la seconde édition a intégré l'immunohistochimie (Kleihues P *et al.*, 1993) pour aboutir à la troisième (Kleihues P *et al.*, 2000) incorporant le profil génétique dans la définition des tumeurs cérébrales. La dernière version de la classification complète ce dispositif par l'ajout de nouveaux types tumoraux. Bien que cette 4^{ième} édition soit considérée comme le standard des tumeurs cérébrales, de nombreuses discussions sont actuellement en cours de façon à affiner cette classification.

Cette classification de la WHO n'est pas focalisée sur les glioblastomes mais reprend l'ensemble des tumeurs gliales en introduisant des critères de gradation comme l'indiquent le tableau I et la figure 1.

INTRODUCTION GENERALE

Tableau I : Gradation des tumeurs issues des cellules gliales (4^{ème} édition de la classification WHO en cours, 2007).

Type de tumeur cérébrale	Gradation selon la WHO
Astrocytome à cellules géantes subépendymal Ependymome myxopapillaire Subépendymome Astrocytome pilocytique	I (bénin)
Astrocytome diffus <i>astrocytome fibrillaire</i> <i>astrocytome gemistocytique</i> <i>astrocytome protoplasique</i> Oligodendrogliome Oligoastrocytome (gliome mixte)	II (bas-grade)
Astrocytome anaplasique Oligodendrogliome anaplasique Oligoastrocytome anaplasique Ependymome anaplasique	III (haut-grade)
Glioblastome <i>GBM à cellules géantes</i> <i>gliosarcome</i>	IV (haut-grade)

INTRODUCTION GENERALE

Type de tumeur gliale		Caractéristiques	
astrocytome pilocytique (grade I)	A	> tumeur d'évolution indolente	tumeur délimitée
		> capacité d'invasion limitée	
		> hyperplasie microvasculaire possible	
		> pléomorphisme cellulaire possible	
xanthoastrocytome pléomorphe (grade I)	B	> tumeur délimitée	
		> tend vers le bas grade (II)	
		> pléomorphisme cellulaire	
astrocytome diffus (grade II)	C	> pléomorphisme nucléaire faible à modéré	tumeur diffuse
		> bien différencié	
astrocytome anaplasique (grade III)	D	> index mitotique élevé	
		> pléomorphisme cellulaire modéré	
		> cellularité hétérogène	
glioblastome (grade IV)	E et F	> agressivité +++	
		> nécrose palissadique (E)	
		> hyperplasie microvasculaire (F)	
		> pléomorphisme cellulaire marqué	

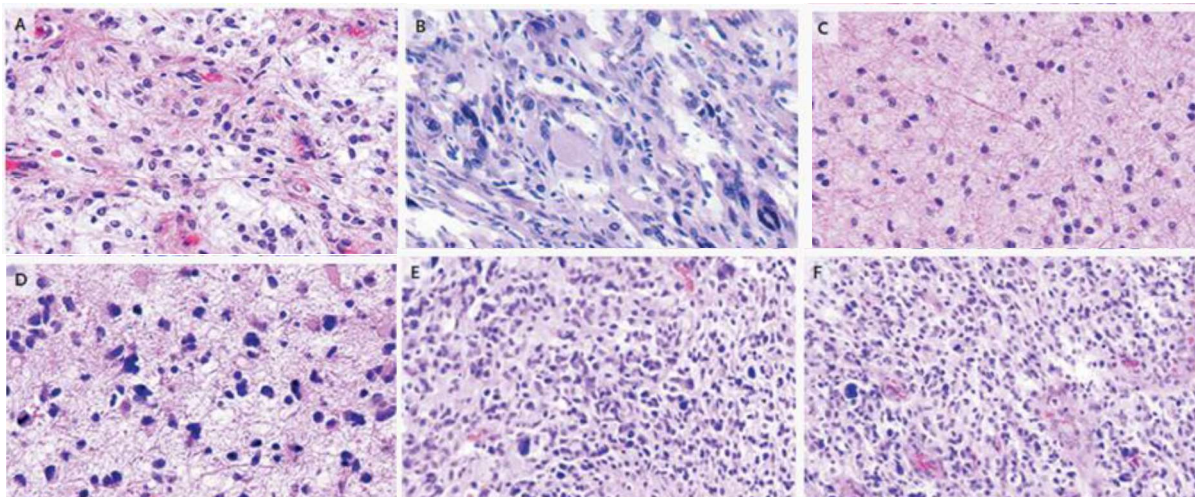


Figure 1: Histologie des grades des tumeurs astrocytaires selon la WHO (modifiée d'après Sanai N et al., 2005)

Celle-ci se fait sur des critères histologiques connus pour être liés au degré d'agressivité du néoplasme (tissu anormal nouvellement formé) (Figure 1). C'est bien évidemment des critères majeurs à l'échelle clinique pour le pronostic et l'orientation du choix de la thérapie. Quatre grades de tumeurs cérébrales ont été définis (Figure 1, tableau II). Le grade I, rarement représenté chez l'adulte est dit pilocytique et est qualifié de bénin. En effet, il est curable par la résection du néoplasme. Le grade II est défini comme un astrocytome diffus avec une

INTRODUCTION GENERALE

atypie cytologique. Le grade III est caractérisé par l'anaplasie et la présence d'activité mitotique.

Dans le cas des tumeurs de la lignée astrocytaire, les cellules de forme étoilée possèdent un noyau allongé, oblong et irrégulier avec une chromatine dense et expriment la protéine acide fibrillaire gliale (glial fibrillary acidic protein ou GFAP). La caractéristique infiltrante du tissu environnant ainsi que sa propension à la dissémination caractérise les néoplasmes de grade IV. De manière générale, la désignation du grade IV par la WHO est associée à une rapide évolution de la maladie avec une issue fatale. Ce dernier grade malin est aussi défini par la présence d'une prolifération vasculaire et/ou d'une nécrose. Cette nécrose dans la dernière classification n'est pas nécessairement palissadique. Certains auteurs acceptent également le critère de prolifération endothéliale : l'endothélium vasculaire au sein de la tumeur apparaissant sous forme de multicouche. La classification prend aussi en compte la prolifération micro-vasculaire d'aspect gloméruloïde (terme utilisé en histologie pour décrire la ressemblance entre la structure en « amas » formée par la micro-angiogénèse et les capillaires des glomérules rénaux). Le tableau II récapitule les médianes de survie des patients atteints d'une tumeur gliale selon sa gradation.

Tableau II : Médiane de survie des patients en fonction du grade de l'astrocytome.

Grade de l'astrocytome	Médiane de survie
II	5 à 8 ans
III	2 à 3 ans
IV	12 mois

Les trois grades ne seront pas discutés dans ce travail qui a pour sujet le gliome malin de grade IV, ou glioblastome.

La suite de l'introduction abordera particulièrement le glioblastome. Il est maintenant intéressant de comprendre la gliomagénèse qui décrit le développement de tumeur de grade IV.

III. Oncogénèse du glioblastome : gliomagénèse

Toutes les formes de cancer se développent à partir de perturbations complexes au niveau des fonctions cellulaires importantes. La tumorigénèse implique les six modalités suivantes :

- (1) le signal de prolifération des cellules cancéreuses,
- (2) l'échappement aux suppresseurs de croissance,
- (3) la capacité d'invasion tissulaire et métastatique,
- (4) la résistance à la mort cellulaire,
- (5) le potentiel de réplication illimitée,
- (6) l'induction de l'angiogénèse (Hanahan D *et al.*, 2000).

Deux nouveaux critères ont fait leurs apparitions : (1) la capacité de reprogrammation du métabolisme cellulaire et (2) l'échappement à la destruction par les cellules immunitaires (Hanahan D *et al.*, 2011).

L'inflammation, l'instabilité génomique et le microenvironnement immunosuppresseur (présence de Treg) tumoral favorisent également la progression de la tumeur et limitent l'action immunitaire. Toutefois, ces points ne seront pas détaillés car ces aspects ne concernent pas directement l'objet du travail de thèse.

Le glioblastome provient de cellules gliales qui constituent les cellules supports dans le cerveau permettant aux neurones d'assurer leur action (

Figure 2). Elles ont aussi de nombreux autres rôles comme nous allons le présenter de manière synthétique.

INTRODUCTION GENERALE

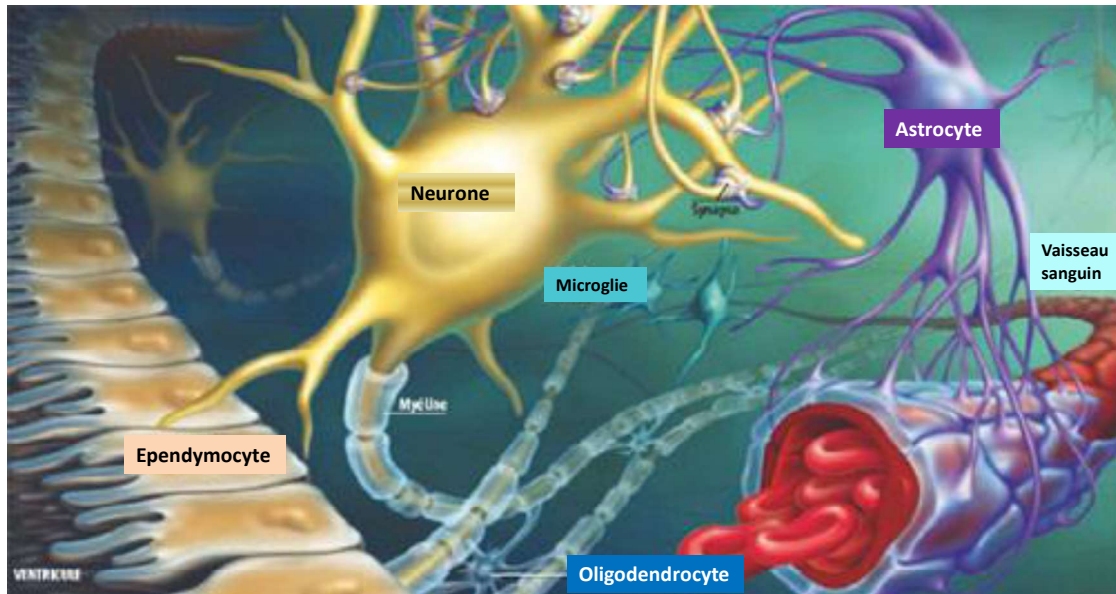


Figure 2: Illustration de l'organisation des cellules gliales (d'après <http://linhphu0ng.weebly.com/1/category/systeme%20nerveuxc6b4a2a004/1.html>).

Les cellules gliales sont largement plus nombreuses que les neurones et incluent : les astrocytes, les oligodendrocytes et les épendymocytes. La fonction de chacune de ces cellules au sein du cerveau ainsi que le lien avec le type de tumeur qu'elles peuvent engendrer sont présentées dans le tableau III.

Tableau III : Présentation des cellules gliales non neuronales (adapté d'après Sanai N et al. 2005 ; Aloisi F 2001 et Jessen KR 2004).

Type cellulaire	Fonctions	Tumeurs associées
Astrocyte	> nutrition des neurones	Astrocytome
	> isolation des neurones	<i>pilocytique</i>
	> structure de support pour les neurones	<i>diffus</i>
	> sécrétion de modulateurs immuns	<i>anaplasique</i>
	> régule l'inflammation et les accidents vasculaires cérébraux	<i>glioblastome</i>
		Oligoastrocytome
		Xanthoastrocytome pléomorphe
		Astrocytome à cellules géantes subependymal
Microglie	> macrophage (propre au cerveau)	
	> neuro-inflammation	
	> fonction immunité innée (cytotoxicité, présentation d'Ag...)	
Oligodendrocyte	> facilite la conduction du signal neuronal	Oligodendrogliome
	> rôle isolant des axones (gaine de myéline)	Oligoastrocytome
Ependymocytes	> paroi du système ventriculaire	Ependymome

INTRODUCTION GENERALE

D'une façon généralement retenue, tous les types de ces cellules de lignées gliales proviennent d'une cellule souche neurale commune (une cellule souche est un type de cellule multipotente et dotée d'autorenouvellement qui peut donner naissance à une descendance se différenciant en plusieurs types cellulaires différents). Dans 90% des cas, un glioblastome provient de la transformation tumorale des cellules progénitrices gliales. Il progresse rapidement en ayant d'emblée une nature de glioblastome (« de novo ou primaire »). Quand la transformation survient au niveau d'une cellule engagée dans une voie de différenciation (astrocytaire ou oligodendrocytaire), la tumeur formée est soit un astrocytome soit un oligodendrocytome (Figure 3). Dans de rares cas (10%), un glioblastome peut apparaître par évolution graduelle. Il se manifeste chez de jeunes adultes (< 45 ans), le glioblastome est dit secondaire (Goldlust SA. *et al.*, 2008). Les glioblastomes primaires et secondaires sont histologiquement non différenciables avec toutefois quelques distinctions au niveau de certains marqueurs moléculaires (exemple : mutation des gènes IDH1 et 2 présents pour les secondaires).

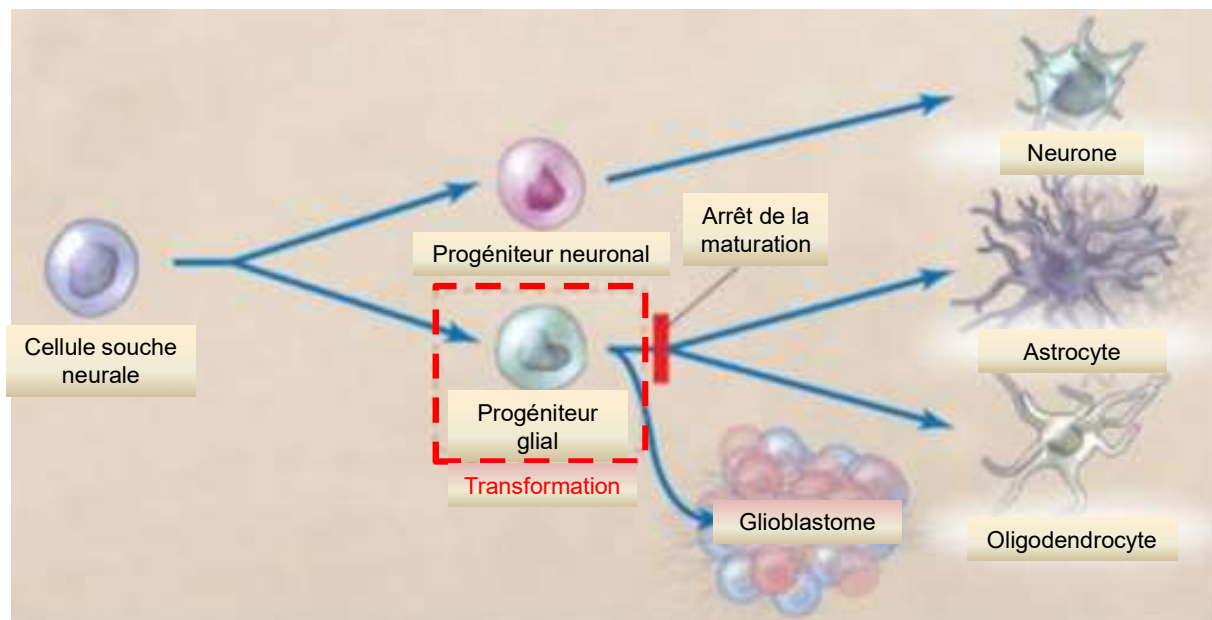


Figure 3: Illustration de la capacité multipotente d'une cellule souche neurale et formation du néoplasme à partir du progéniteur de cellules gliales (d'après Sanai N *et al.*, 2005).

INTRODUCTION GENERALE

Ces cellules souches cancéreuses responsables de la progression de la tumeur gliale et de sa récurrence sont chimiorésistantes. Elles le sont principalement aux agents alkylants (comme le témozolomide, cf paragraphe traitement). Cette chimiorésistance est dix fois plus importante lorsque le gène MGMT s'exprime chez les patients traités (Beier D. *et al.*, 2011).

La radiorésistance des cellules souches exprimant CD133 a aussi une part majeure dans l'échec thérapeutique.

Cette radiorésistance semble explicable par différents mécanismes dont voici plusieurs illustrations:

- la persistance de cellules tumorales dans les marges de la résection (Lim YC *et al.*, 2014),
- l'augmentation de la capacité à réparer les dommages de l'ADN engendrés lors de la radiothérapie (Altaner C *et al.*, 2008),
- l'impact de facteurs de régulation (comme IRF7 qui a un rôle dans la réponse inflammatoire et aide entre autre à l'infiltration du gliome (Kim JK *et al.*, 2015)),
- l'expression de certains marqueurs à la surface cellulaire comme la protéine CD44 (Lemke D *et al.*, 2014), AC133, CXCR4, EGFR...,
- l'activation des voies de signalisation associées aux cellules souches pendant la gliomagenèse (comme l'activation des voies Wnt/ β catenin, PI3K/Akt, NOTCH et Hedgehog) (Séhédic D *et al.*, 2015),
- l'influence de cytokines comme TGF β sur le microenvironnement tumoral et la progression tumorale (Zhou W. *et al.* 2015).

IV. Diagnostic du glioblastome

Il est suspecté chez le patient présentant un certain nombre de signes cliniques comme céphalées, souffrance cérébrale, confusion, perte de mémoire, de vision, changement de comportement, crises épileptiforme et traduisant alors des manifestations d'une hypertension intracrânienne. La croissance rapide de la tumeur, dans la boîte crânienne inextensible, est responsable de l'aggravation des symptômes. Toutefois la présence de ces symptômes insuffisamment spécifiques doit être complétée par des examens supplémentaires comme l'imagerie anatomique (Imagerie par Résonance Magnétique par les séquences T2-FLAIR ou pondérée T1 après injection d'un agent de contraste) ou fonctionnelles (Tomographie par Emission de Positons: TEP après l'injection de radiotraceurs).

IV.1 L'Imagerie par Résonance Magnétique ou IRM

Cette imagerie de référence en bilan préopératoire, détecte les protons des molécules d'eau présentes dans les tissus biologiques. Le tissu tumoral solide fournit un signal différent du tissu sain. Chaque séquence révèle une caractéristique du tissu. En effet, selon la séquence utilisée lors de l'acquisition de l'image, il est traduit en hypersignal T2 et en hyposignal en T1 (Figure 4). L'utilisation d'un agent de contraste en T1 permet de rehausser le signal et de mettre en évidence l'atteinte de la BHE. Celle-ci, si elle est fragilisée, est plus perméable à l'agent de contraste qui la traverse et révèle la zone d'invasion tumorale. De cette façon on a pu corrélérer que l'atteinte de la BHE est corrélée au niveau d'agressivité de la tumeur (Sahoo P *et al.*, 2013 ; Chikui T *et al.*, 2012).

La présence de la tumeur peut être également révélée par l'imagerie de diffusion révélant l'orientation des fibres par la direction de déplacement des molécules d'eau ou plus exactement leur restriction de déplacement. On parle d'anisotropie (hypersignal) lorsque les fibres sont orientées dans la même direction facilitant alors le déplacement et d'isotropie

INTRODUCTION GENERALE

quand il n'y a pas d'organisation tissulaire précise dans laquelle les molécules sont en mouvement librement.

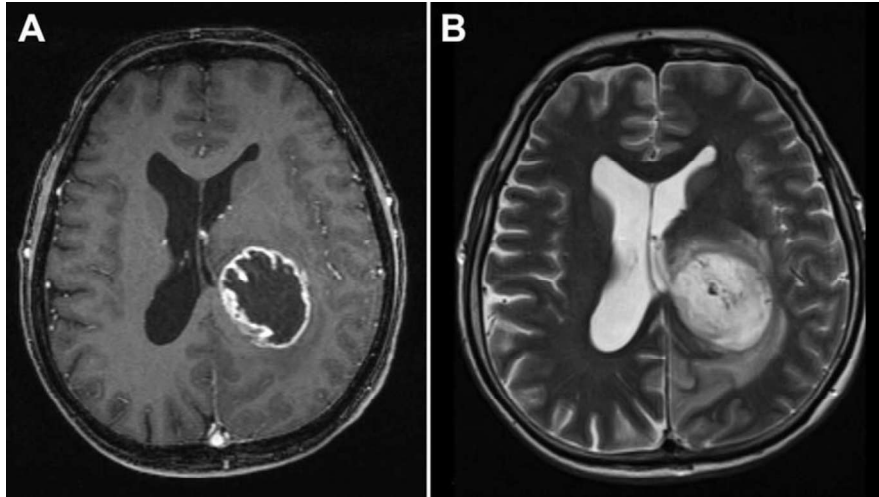


Figure 4: Images d'IRM d'un cas de glioblastome. (A) : coupe axiale post-contraste T1-weighted montrant l'irrégularité et la nécrose centrale et (B) : coupe axiale T2-weighted montrant une masse hyperintense hétérogène et l'invasion tumorale accompagnée d'un œdème (d'après Preusser M et al 2011).

IV.2 La Tomographie par Emission de Positons couplée à la TomoDensitoMétrie (TEP/TDM)

L'imagerie TEP/TDM est une technique de médecine nucléaire qui utilise des médicaments radiopharmaceutiques (MRP qui sont des traceurs (vecteurs) marqués par un isotope radioactif émetteur de positons β^+ (marqueur)). L'isotope le plus utilisé en routine clinique est le fluor-18 dont la demi-vie physique est de 109 min., suffisamment courte pour une utilisation chez l'homme et suffisamment longue pour les phénomènes biologiques à étudier (métabolisme tumoral) et les temps de radiomarquage et de transport. Selon le type de vecteurs, ces MRP permettent d'étudier par exemple la prolifération tumorale ($3'$ - ^{18}F]fluoro-3'-désoxy-thymidine ou ^{18}F]FLT), la consommation tumorale de sucre ($2'$ - ^{18}F]fluor-2-désoxy-D-glucose ou ^{18}F]FDG) ou le transport/l'incorporation d'acides aminés par les tumeurs

INTRODUCTION GENERALE

cérébrales ($[^{11}\text{C}]$ carbone-méthionine ou $[^{18}\text{F}]$ fluoro-éthyl-tyrosine ou $[^{18}\text{F}]$ FET) (Tatsch K. *et al.*, 2013). Outre le bilan d'extension ou de récurrences des tumeurs, l'évaluation de la réponse au traitement, le $[^{18}\text{F}]$ FDG, qui est le MRP utilisé en routine clinique permet également d'évaluer le grade histologique de certaines tumeurs, notamment les tumeurs cérébrales (gliomes). L'incorporation tumorale de $[^{11}\text{C}]$ MET (Figure 5), quant à elle, est un facteur pronostique péjoratif démontré mais la courte demi-vie du carbone-11 (50 min.) rend son utilisation impossible dans les centres ne disposant pas de cyclotron car incompatible avec les temps de radiomarquage et de transport.

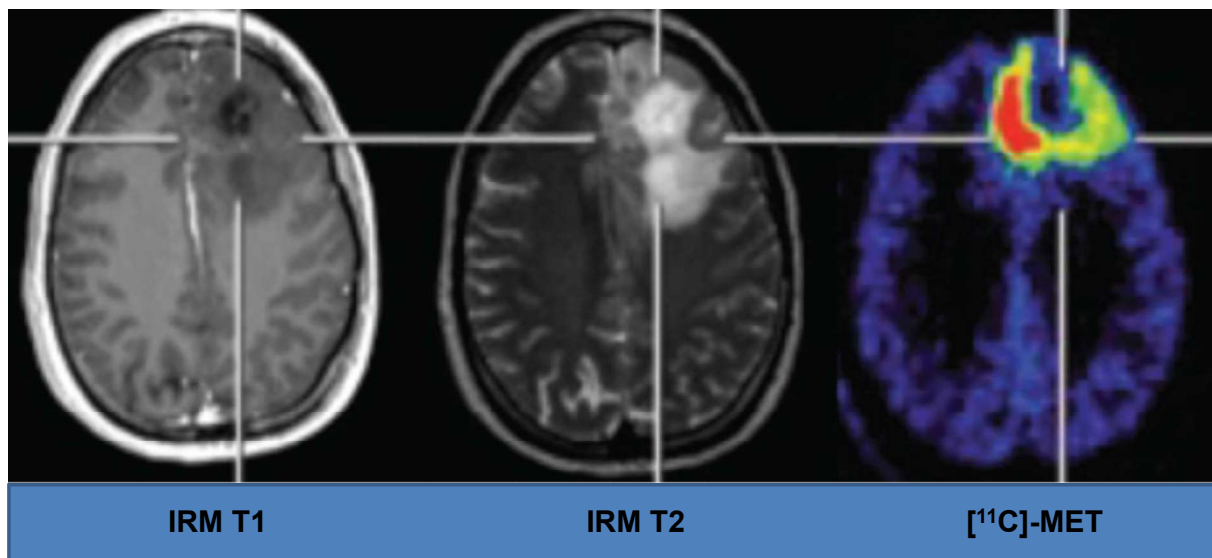


Figure 5: Image $[^{11}\text{C}]$ -MET-TEP d'un glioblastome. Les couleurs jaune-rouge de l'image TEP correspondent aux plus forts niveaux d'incorporation du radiotraceur par les cellules tumorales (d'après Juhász C *et al* 2014).

IV.3 Diagnostic et suivi en imagerie

Le protocole retenu en imagerie combine les différents types d'imagerie et vise :

- la localisation de la masse tumorale, l'évaluation de son volume, ainsi que le caractère plus ou moins infiltrant de la tumeur. Ceci est réalisé par une évaluation et une spécification du niveau de contraste entre les tissus.

INTRODUCTION GENERALE

- l'aide à la chirurgie,
- l'identification de la nature du tissu en recherchant les caractéristiques définissant le gliome : l'invasion, la nécrose, l'œdème, la vascularisation (perméabilité, taille des vaisseaux, angiogénèse), la prolifération cellulaire, la mort cellulaire,
- l'évaluation de la réponse à la thérapie (foyers résiduels, récurrence).

Enfin, le diagnostic est confirmé avec certitude par l'analyse histologique des tissus tumoraux présentée précédemment dans le paragraphe II. Classification actuelle des gliomes.

V. Les traitements

V.1 Traitement standard du glioblastome : protocole de Stupp

Une étude pivot dans le traitement du glioblastome repose sur la combinaison de traitements entre la radiothérapie adjuvante et témozolomide avec des résultats en terme de survie significatifs (Hottinger AF *et al.* 2008 ; Stupp R *et al.*, 2005 ; Stupp R *et al.*, 2009). Dans cette étude, les patients sont répondeurs (30 à 60 % des patients avec un glioblastome) au témozolomide du fait de la méthylation du promoteur du gène de la O⁶-Méthylguanine-methyl-transferase ou MGMT qui est alors sous silence. Celui-ci est un gène de réparation qui s'exprime lorsqu'il est nécessaire de réparer les dommages à l'ADN, cible du témozolomide. Cette action conduit à la mort cellulaire du fait de l'augmentation de susceptibilité des cellules tumorales au témozolomide par la diminution de réparation de l'ADN (Preusser M *et al.*, 2011 ; Wen PY *et al.* 2008). Ces patients répondeurs à l'agent chimiothérapeutique ont une médiane de survie de 21,7 mois et un taux de survie de 46% à 2 ans.

INTRODUCTION GENERALE

Depuis 2005, le traitement multimodal de première intention proposé, suit le principe du protocole de Stupp : traitement standard du glioblastome actuellement recommandé pour des patients avec un bon état général et âgé au maximum de 70 ans (Figure 6).

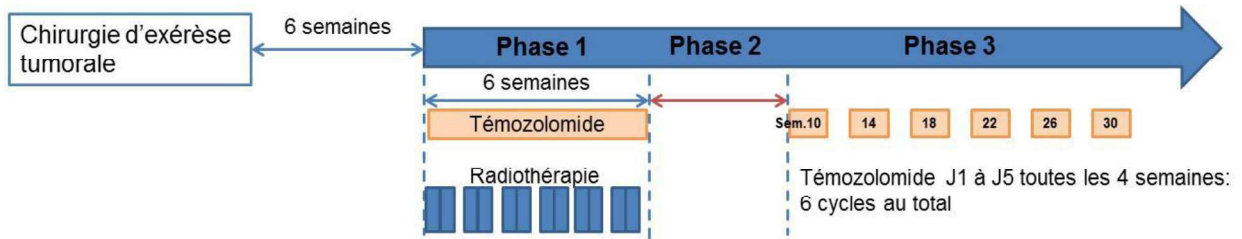


Figure 6: Chronologie du traitement de première intention du gliome.

Ce protocole de radio-chimiothérapie comprend 3 phases :

- L'induction (phase 1),
- Une pause de traitement de 4 semaines (phase 2),
- L'entretien/consolidation (phase 3).

Il allie, suite à la résection de la masse tumorale (lorsque celle-ci est possible), la chimiothérapie au Témzolomide ($75 \text{ mg/m}^2/\text{jour}$ par voie orale) en concomitance avec la radiothérapie externe (Figure 6). Une dose totale de 60 Gy est fractionnée en 5 séances d'irradiation externe de 2 Gy par semaine et ceci pendant 6 semaines. La chimiothérapie est administrée en adjuvant pendant 6 cycles supplémentaires de 28 jours ($150\text{-}200 \text{ mg/m}^2/\text{jour}$ les 5 premiers jours du cycle). Comme nous le montre le graphique (Figure 7), le protocole de Stupp fait passer la survie moyenne de 12,1 mois à 14,6 mois suite à la thérapie de base (chirurgie-radiothérapie externe post-opératoire) avec l'ajout de la chimiothérapie au protocole.

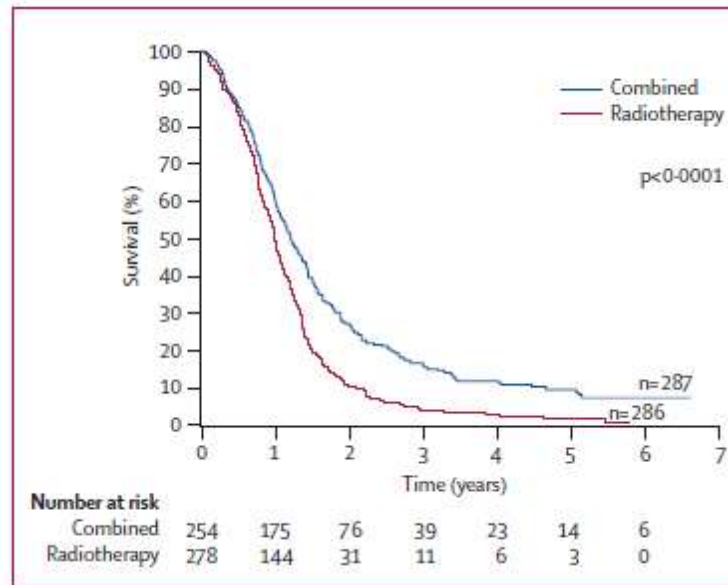


Figure 7: Probabilité de survie (estimation Kaplan-Meier) des patients après simple radiothérapie externe (rouge) ou en parallèle avec la chimiothérapie (bleu) (d'après Stupp R. et al., 2009).

Pour 90% des patients opérés et traités, une récurrence est visible dans les 2 cm de la marge de la cavité de résection (foyer tumoral initial). Il n'existe pas de thérapie standard pour les cas de récurrence. Différents traitements peuvent être proposés comme le gliadel, le bévacizumab avec une action anti-tumorale directe, comme nous allons pouvoir le voir dans le chapitre suivant.

V.2 Modalités thérapeutiques

V.2.1 Chirurgie

Le traitement de référence est la prise en charge chirurgicale quand elle est possible. En effet, la localisation tumorale dans certaines zones sensibles du cerveau (qui affectent les fonctions vitales et la qualité de vie du patient) n'autorise pas toujours l'acte chirurgical.

Dans tous les cas, la chirurgie permet de confirmer le diagnostic de glioblastome par une analyse histologique de la pièce opératoire complétée par des éléments immunohistochimiques et moléculaires. Elle permet également de diminuer l'expression des

INTRODUCTION GENERALE

symptômes dus à la taille de la tumeur (hypertension intracrânienne et compression d'une région cérébrale), et contribue aussi à améliorer l'efficacité des traitements associés. Ce qui en fait un facteur de bon pronostic. Les neurochirurgiens sont aidés dans leurs gestes par différentes techniques comme l'imagerie en temps réel. L'acte chirurgical est ainsi orienté par l'imagerie anatomique montrant la localisation tumorale obtenue par l'IRM (neuronavigation). La qualité de l'exérèse macroscopique a également été améliorée par le développement d'une technique de localisation de l'infiltrat tumoral par fluorescence à l'aide d'un acide aminé (5-acide amino-lévulinique (5-ALA)) incorporé uniquement par le tissu tumoral entraînant une fluorescence rose sous un éclairage dans le proche-ultraviolet (Stummer *et al.*, 2006 ; Schucht P *et al.* 2012 ; Roberts DW *et al.* 2012). Cette technique illustrée par la figure 8, a été validée par une étude de phase III.

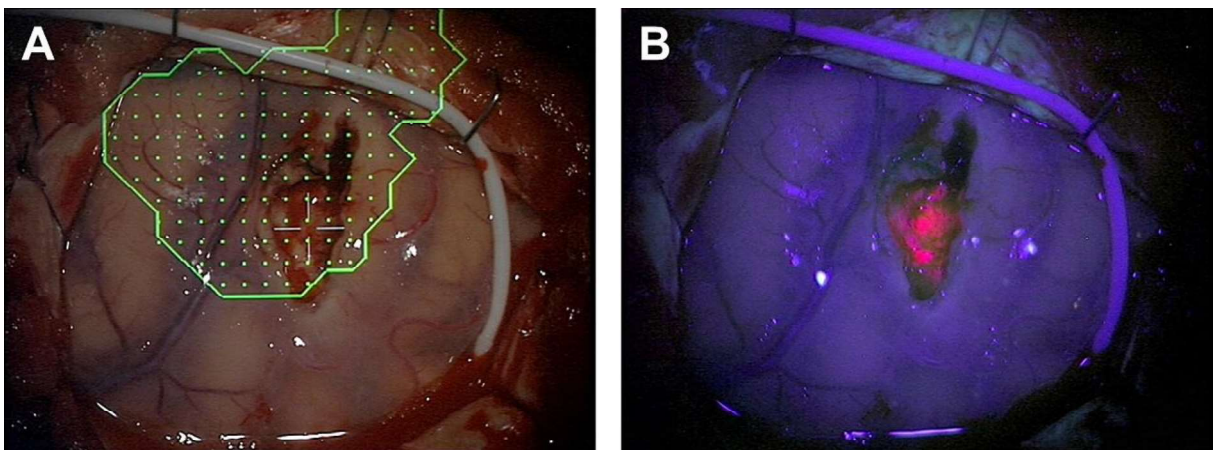


Figure 8: Illustration intra-opérative de l'optimisation de la chirurgie d'exérèse par la technique de fluorescence 5-ALA. (A) sous lumière blanche et (B) lumière bleue (d'après Li Y *et al.* 2014).

Suite à la chirurgie, les options thérapeutiques sont envisagées et précisées par les analyses anatomopathologiques obtenues à partir des biopsies pendant la chirurgie.

V.2.2 Traitement médical

V.2.2.1 Chimiothérapie

Le développement des gliomes est surtout local et impacte un organe vital majeur à la différence des autres cancers qui impliquent davantage la gestion de la dissémination métastatique. De nombreuses chimiothérapies ont été utilisées dans le traitement du glioblastome principalement par voie orale ou par voie intraveineuse.

La technique d'injection dite systémique consiste en l'administration d'agents anti-cancéreux dans la circulation sanguine. C'est le cas de la plupart des chimiothérapies.

Les agents anticancéreux les plus communément utilisés sont le témozolomide (Témodar ou Témodal) et le bévacizumab (Avastin®) (Hottinger AF. *et al.*, 2008). Le premier de ces traitements, comme nous l'avons vu, est un agent cytotoxique intervenant par un processus d'alkylation de l'ADN au niveau de la guanine inhibant la croissance et la prolifération et conduisant à la mort cellulaire (Castro MG. *et al.*, 2003). Le second, un traitement anti-angiogénique, est un anticorps agissant directement sur le récepteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) en ciblant le VEGF de façon à l'inactiver et à inhiber la néo-vascularisation. Il ne cible donc pas les cellules tumorales directement mais permet une diminution de l'œdème vasogénique péri-tumoral. A ce jour, il ne fait pas partie de l'arsenal thérapeutique en routine des glioblastomes, tout du moins pour ceux nouvellement diagnostiqués.

Une des limites de ces traitements réside dans la capacité de la molécule active à traverser la BHE. En effet le rôle protecteur de la barrière (qui limite et filtre l'entrée des molécules) est de prévenir tout dommage au cerveau par des substances toxiques. La dose optimale thérapeutique est donc souvent difficile à atteindre dans le cerveau suite à une administration systémique car le site tumoral a un système vasculaire désorganisé et un flux sanguin hétérogène (Jain RK *et al.*, 2010). D'autre part, cette dose peut s'avérer toxique pour d'autres organes. L'injection systémique est donc inappropriée. Par exemple, la carmustine (le BCNU appartient au groupe des nitroso-urées qui est un agent alkylant de

INTRODUCTION GENERALE

l'ADN et de l'ARN et empêche la réplication et la transcription), même si elle est capable de franchir la BHE, elle a une toxicité générale qui limite son usage par voie systémique malgré son efficacité sur les cellules de gliome (Juratli TA *et al.*, 2013).

La délivrance inefficace des molécules au site tumoral est donc la principale limite au traitement des gliomes par chimiothérapie (Healy AT *et al.*, 2015).

V.2.2.2 Thérapie locale : implants

Ainsi, les chimiothérapies par voie locale sont parfois tentées et les implants Gliadel au niveau du site opératoire en sont un exemple. Ce sont des polymères biodégradables contenant 7,7 mg de Carmustine ou BCNU (Figure 9). Ces implants permettent la libération prolongée du médicament cytotoxique sur une durée d'environ 50 jours. D'après une étude de Fung LK *et al.*, en 1998, le fait d'implanter directement le médicament sur le site lésionnel au lieu de l'injecter par la voie systémique permet :

- de diminuer la dose administrée au patient,
- d'augmenter sa pénétration tissulaire autour de la cavité,
- d'augmenter d'un facteur 1200 l'exposition du tissu tumoral au médicament.

Il est le seul traitement de chimiothérapie locale disposant de l'autorisation de mise sur le marché dans le cadre d'une récurrence.



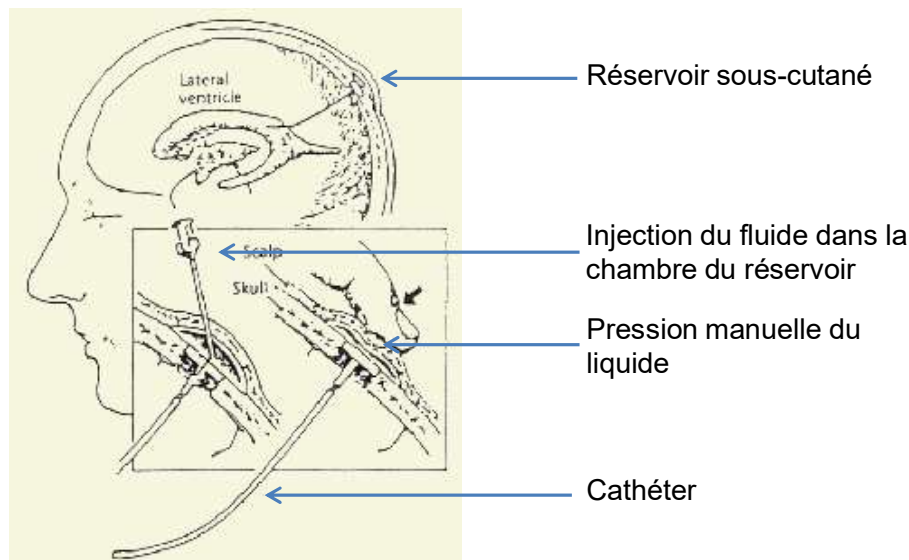
Figure 9: Implants de Gliadel placés dans la cavité tumorale (d'après Juratli TA *et al.* 2013).

Une autre possibilité d'administration locale consistant en l'emploi d'un système de réservoir, a également été développée et testée comme nous allons à présent le discuter.

INTRODUCTION GENERALE

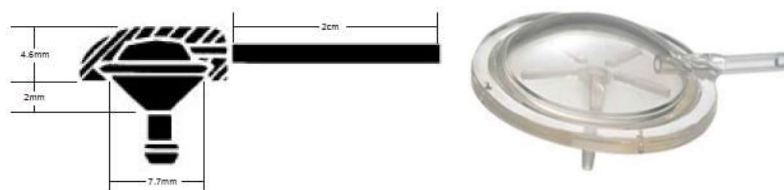
V.2.2.3 Thérapie locale-injection directe : systèmes de réservoir-cathéter

De manière générale, le réservoir d'Ommaya-Rickham disposé par chirurgie au niveau du crâne en sous-cutané est connecté à un cathéter qui permet d'administrer la chimiothérapie (ou des radioisotopes) directement dans le ventricule ou d'aspirer le liquide céphalo-rachidien (LCR). Son utilisation a été détournée en intra-cavitaire dans le cas des glioblastomes. Ce type d'injection, permet de délivrer par intermittence (facilité par la pompe manuelle) les agents anticancéreux à partir du réservoir (Bernstein M *et al.*, 2011 ; Bidros DS *et al.*, 2009).



(D'après Ommaya AK 1963)

Le type Rickham, illustré ci-dessous, est une variante plus petite, plate et rigide du réservoir d'Ommaya (réservoir en forme de dôme) et avec des fonctions d'injection comparables.



INTRODUCTION GENERALE

Ces deux modèles de réservoir ne sont pas sans complications telles que des infections notamment entre la zone de placement du réservoir et l'accès chirurgical (Mead PA *et al.*, 2014). Par conséquent, une manière alternative d'outrepasser la sélectivité de la barrière hémato-encéphalique est l'injection directe par convection.

V.2.2.4 Convection-Enhanced Delivery ou CED

Cette technique, dont les paramètres d'injection sont contrôlés (débit, durée, concentration et volume), crée un gradient de pression positif continu à l'extrémité du cathéter qui augmente le volume de distribution (Vd) dans la zone ciblée. L'injection ciblant directement le cerveau par CED a été décrit depuis les années 1990 par l'équipe de Bobo (Bobo RH *et al.* 1994). Cette technique consiste en l'injection d'un volume qui sous l'effet de la pression d'injection va aboutir à un volume de distribution modulable. L'étude de Bobo démontre que dans un cerveau sain d'un modèle expérimental, le volume de distribution est augmenté par la CED et délivre de plus grandes quantités dans le tissu cible que la technique systémique. Elle améliore également la distribution des molécules au sein de cet organe privilégié et protégé par la BHE (Pardridge *et al.* 2007).

En clinique, la CED est guidée par imagerie pour le placement direct d'un ou plusieurs cathéters dans la tumeur pendant que le médicament est infusé. Parmi les essais cliniques recensés, le paclitaxel est le premier agent chimique délivré par CED pour le traitement des gliomes malins récurrents (Lidar Z *et al.*, 2004 ; Yun J *et al.*, 2013). Cette étude en phase I-II sur 15 patients, montre quelques améliorations en terme de réponse.

Chez des patients atteints de glioblastomes, d'autres tests d'injection par CED en phase III d'immunotoxines (Vandergrift WA *et al.*, 2006), d'IL-13 (Kunwar S *et al.*, 2010) ont été menés.

En pré-clinique, l'injection d'adénovirus (AAV) (Idema S *et al.*, 2011), mais aussi des anticorps monoclonaux, de vecteurs comme les liposomes ou les nanoparticules est testée avec cette technique. La technique d'administration par CED a également été testée dans un

INTRODUCTION GENERALE

modèle murin de glioblastome pour une radiothérapie déposée directement au site tumoral (Vanpouille-Box C *et al.*, 2011).

V.2.3 Radiothérapie externe

La radiothérapie a été de longue date envisagée pour le traitement du glioblastome car les radiations peuvent pénétrer en profondeur pour atteindre la tumeur et y déposer de fortes énergies (Smulders B *et al.*, 2013).

La radiothérapie fait appel à différents types de rayonnements notamment les photons, les électrons et les protons, en fonction de la technologie utilisée. Ces différents types de rayonnements ont un effet biologique sur les cellules tumorales et les pratiques de radiothérapies tentent à limiter fortement leurs effets néfastes sur le tissu sain. Ils engendrent des réactions au niveau cellulaire qui sont influencées par la quantité d'énergie délivrée, le tissu ciblé, l'âge du patient, la sensibilité individuelle aux radiations (Szczepura K, 2013).

Ces réactions sont de deux types :

- ionisation directe des molécules : l'énergie transférée lors de l'ionisation induit des dommages biologiques à l'ADN (cassure du double brin) qui se répercutent sur la viabilité cellulaire si elles ne sont pas réparées.
- actions qualifiées de secondaires produisent des radicaux libres à partir de l'interaction avec les molécules d'eau.

La radiosensibilité des cellules dépend de 3 facteurs :

- la capacité mitotique des cellules,
- la phase du cycle cellulaire (la radiosensibilité est prononcée en phase précoce S ou tardive G2 /M),
- le stade de différenciation cellulaire (plus la cellule est différenciée, plus elle est radiorésistante).

INTRODUCTION GENERALE

La dose peut être également fractionnée et le schéma thérapeutique décrit par Stupp précédemment mentionné en est une illustration. D'autre part, celle-ci peut être issue d'une radiothérapie externe ou de radiothérapie interne. Ainsi pour les tumeurs non opérables et de taille inférieure à 5 cm, la technologie Gamma Knife utilise le cobalt (Co^{60}) comme source de plus de 200 faisceaux de rayons gamma qui convergent et se focalisent en un point précis. Elle est définie comme étant une radiochirurgie non-invasive (Figure 10).

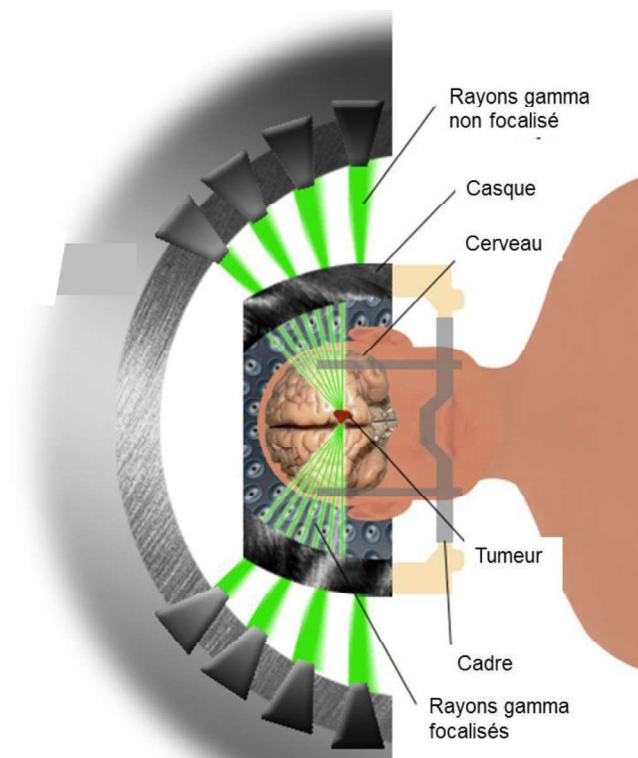


Figure 10: Principe du Gamma Knife

Le Cyber Knife (Figure 11) est un système de radiochirurgie robotisé également non-invasif qui délivre précisément de grandes doses de radiations. Il fait intervenir un accélérateur linéaire et l'imagerie en temps réel (2 caméras rayons X qui permettent le repositionnement du bras robotisé pour la précision du traitement) sans la nécessité d'un cadre de stéréotaxie indiquant à l'appareil les repères spatiaux contrairement à la technologie Gamma Knife.

INTRODUCTION GENERALE

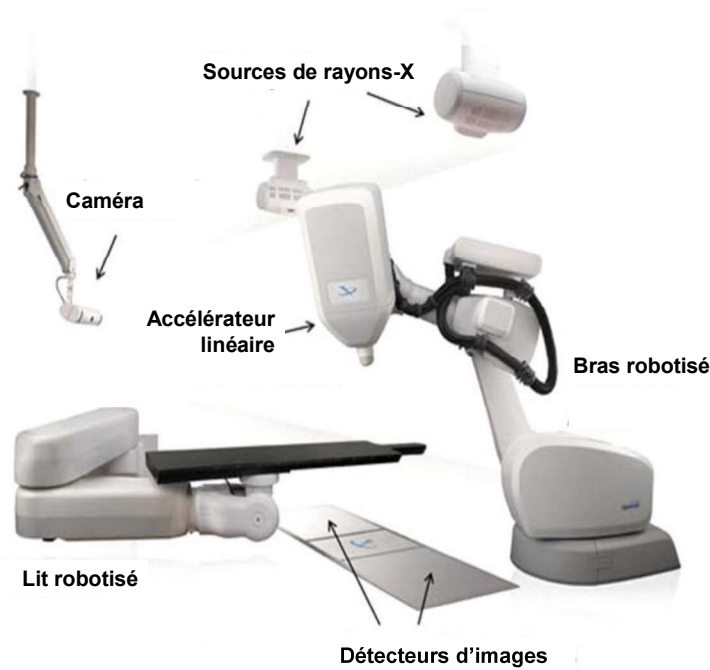


Figure 11: La technologie Cyber Knife.

L'irradiation directe par les rayons-X: External Beam Radiation Therapy (EBRT) utilise un accélérateur linéaire d'électrons. Les rayonnements de la dose délivrée pénètrent directement le tissu (Djedid R et al., 2010).

Le dépôt de dose, est défini selon trois marges à partir du foyer tumoral (GTV : gross target volume) (Figure 12). Une première marge de sécurité de 2 cm est prise. Elle correspond au volume ciblé en clinique ou CTV et tient compte des zones suspectes qui pourraient contenir

INTRODUCTION GENERALE

une étendue de cellules tumorales macroscopiquement invisibles. Enfin l'ajout d'une marge externe de 0,5 cm correspond aux aléas et aux incertitudes de la focalisation des rayons. Elle est nommée PTV (planning target volume) et est jour et machine dépendante (Moore AS, 2002 ; Gordon IK *et al.*, 2008).

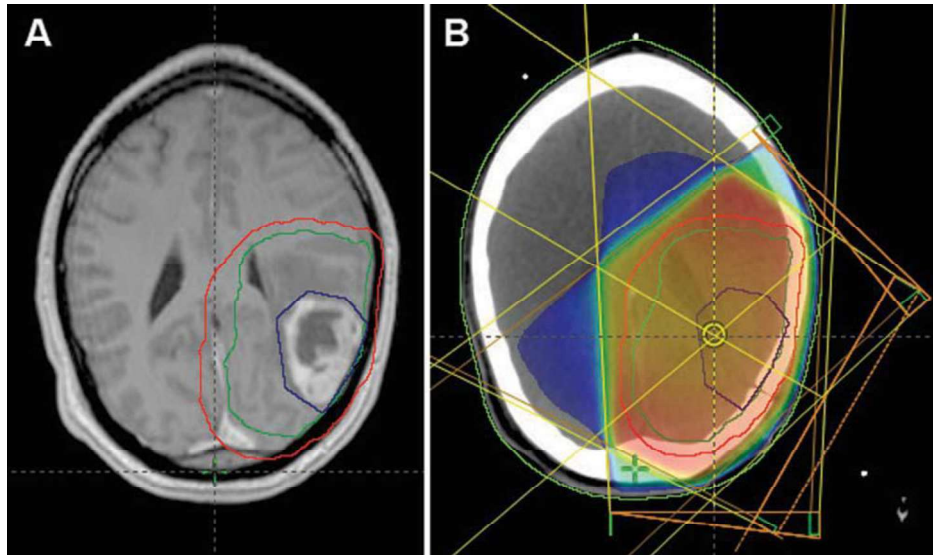


Figure 12 : (A) Image IRM avec la superposition du plan de ciblage de la radiothérapie externe. GTV en bleu, CTV en vert et PTV en rouge. (B) Considération de la dose déposée selon les volumes : PTV en rouge pour la forte dose et 50% de la dose prescrite pour la zone bleue (d'après Preusser M *et al.*, 2011).

La protonthérapie (Figure 13) est un système récemment développé qui délivre les protons. L'avantage de cette technologie est que la majorité de la quantité d'énergie est déposée à la tumeur, en fin de trajet des protons ce qui épargne les tissus sains présents sur la trajectoire du faisceau (Smulders B *et al.*, 2013). Cependant, cette technologie de pointe est très sensible aux mouvements du patient et peut alors présenter un défaut de précision vers la cible.

INTRODUCTION GENERALE



Figure 13: La proton thérapie.

La grande précision de la radiothérapie externe à cibler un volume donné peut toutefois être également un inconvénient pour le traitement des tumeurs à caractère infiltrant comme les glioblastomes. En effet, ces foyers secondaires généralement invisibles et considérés comme des zones macroscopiquement saines lors de la chirurgie, bien qu'infiltrées, ne reçoivent pas la dose thérapeutique nécessaire à leur éradication. Ceci peut expliquer en grande partie les échecs thérapeutiques : 90% des glioblastomes récidivent dans la zone marginale de la tumeur après les cycles de radiothérapie externe standard.

C'est pourquoi, les processus de la radiothérapie interne dont la curiethérapie (appelée parfois brachythérapie, terme plus utilisé par les anglophones) qui impliquent l'utilisation de sources radioactives placée dans la tumeur (brachythérapie interstitielle) ou dans la cavité de résection (brachythérapie intracavitaire) ont été développés sous forme d'implants radioactifs.

V.2.4 Radiothérapie interne

Cette optique de traitement est proposée à la suite des stratégies standards pour les glioblastomes primaires ou lors des récives (Goldlust SA *et al.* 2008) après une craniotomie. La figure 14 illustre un implant utilisé en brachythérapie.



Figure 14: Illustration d'un implant d'iode-125 comparé à un grain de café (d'après Ruge *et al.* 2012).

Un nombre limité d'implants temporaires délivrant de grandes doses sont laissés sur le site environ 1 mois avant d'être retirés. En ce qui concerne les implants permanents ils sont plus nombreux avec des activités plus faibles. Cependant, pour la moitié des patients traités, des effets non désirables se traduisent par de la nécrose des tissus sains induite par les radiations (de la Puente P *et al.* 2014).

Une manière alternative de limiter la radionécrose et de délivrer de manière uniforme (dosimétrie « contrôlée ») le radioélément consiste au dépôt d'un ballon relié à un cathéter dans la zone de résection tumorale. Il s'agit du GliaSite® (l'iode-125) ou du MammoSite dans le cas de l'Iridium-192 (Waters JD *et al.*, 2013). Dans le cas du GliaSite®, les radioéléments sont présents non plus à l'état de sources scellées (solides) mais de liquides (radiothérapie interne localisée). Pour la technologie MammoSite, l'implant d'iridium-192 est délivré via un cathéter dans le ballon rempli de solution saline.

L'effet anti-tumoral et radiobiologique des implants permanents est difficile à estimer et tient compte de la dose totale déposée dépendant elle-même de la demi-vie du radioélément. C'est encore un champ d'investigations largement ouvert.

INTRODUCTION GENERALE

Les essais thérapeutiques pour augmenter la dose délivrée à la tumeur par l'utilisation de la brachythérapie ont échoué et n'engendrent pas une meilleure survie (Wen PY *et al.*, 2008). Néanmoins, les avancées technologiques désormais disponibles permettent d'envisager de nouvelles modalités de radiothérapie interne localisée du gliome, notamment à l'aide de vecteurs moléculaires tels que des anticorps ou des peptides ou encore des systèmes particuliers. Celles-ci seront abordées dans la revue, constituant la deuxième partie du manuscrit.

VI. Présentation du projet

C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail de cette thèse qui se propose d'évaluer sur des modèles précliniques une nouvelle modalité de radiothérapie interne (administration locorégionale par CED) pour le glioblastome à l'aide de systèmes particuliers, les nanocapsules lipidiques (LNC) (Figure 15) encapsulant un radionucléide (rhénium-188).

VI.1 Les nanovecteurs

Ces nanovecteurs sont obtenus par un processus de formulation, par inversion de phase après au minimum trois cycles. Ils possèdent une taille modulable entre 25 et 100nm selon les composants d'origine (les excipients sont approuvés par la FDA) (Heurtault B *et al.* 2002). Les LNC peuvent être internalisées au niveau cellulaire par endocytose (Paillard A *et al.* 2010), ne sont pas toxiques en systémique (Hureauux J *et al.*, 2010), non-immunogènes, biodégradables, et biocompatibles, évitent la dégradation par le système réticulo endothélial (pas de prise en charge grâce au HS-PEG à leur surface) et peuvent être fonctionnalisés.

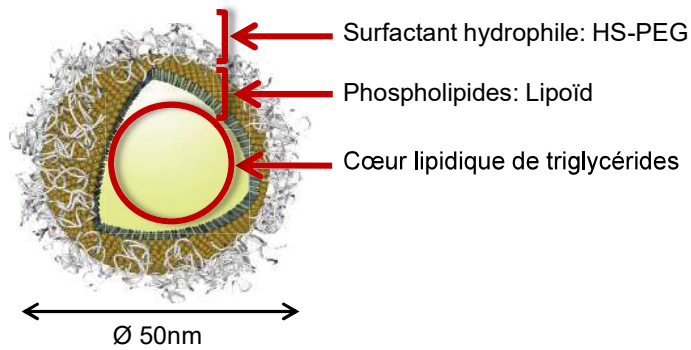


Figure 15: Caractéristiques générales des LNC.

Dans le cas de notre étude, nous proposons une stratégie utilisant: les LNC véhiculant un élément radioactif thérapeutique: le rhénium-188 (^{188}Re).

VI.2 Le rhénium-188

Les principales caractéristiques du rhénium-188 sont présentées dans le tableau IV. C'est un émetteur bêta moins (β^-) permettant l'action thérapeutique. L'émission de gamma (γ) confère la possibilité d'imagerie.

Tableau IV : Principales caractéristiques du rhénium-188.

Demi-vie (h)	Disponibilité	Emission énergie γ (keV) imagerie et dosimétrie	Emission énergie β^- (MeV) Thérapie	Parcours du rayonnement dans le tissu (mm)
16.9	générateur $^{188}\text{W}-^{188}\text{Re}$	155	2.12	4 à 10
Abondance d'émission par désintégration		15 %	85 %	

INTRODUCTION GENERALE

Nous obtenons l'élément radioactif suite à une élution saline à partir d'un générateur tungstène (^{188}W)/rhénium (^{188}Re); le générateur le fournissant sous forme d'ion perrhénate de sodium ReO_4^- de degré 7 qui caractérise les liaisons à l'oxygène.

Nous l'utilisons complexé par le dithiobenzoate de sodium, son ligand, sous sa forme d'oxydation au degré 5 (Figure 16).

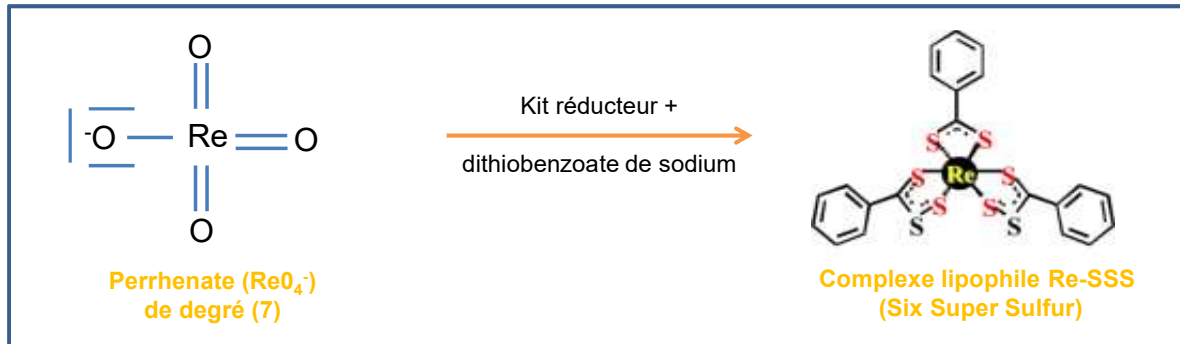


Figure 16: Schéma simplifié du changement de configuration et de complexation du rhénium dans notre étude.

Pour obtenir cette réduction de degré à partir du degré 7 du perrhénate, un kit de réduction spécialement conçu pour ce radioélément a été développé. Il est composé de l'agent réducteur le chlorure d'étain SnCl_2 dihydrate, de l'oxalate de potassium, de l'acide ascorbique et du sodium gluconate. L'oxalate de potassium change la configuration spatiale du perrhénate de sodium sans modifier son degré d'oxydation. Le sodium gluconate (l'agent chélateur) aide le perrhénate de sodium à le garder dans sa nouvelle configuration tout en le réduisant au degré 5. Enfin, l'acide ascorbique évite la réoxydation du rhénium.

Ce radionucléide complexé et rendu ainsi lipophile ($^{188}\text{Re-SSS}$), peut être incorporé aux LNC lors du procédé de formulation (Figure 17). Cette encapsulation évite également l'élimination rapide que nous pouvons observer dans le cas d'une administration du radioélément libre.

INTRODUCTION GENERALE

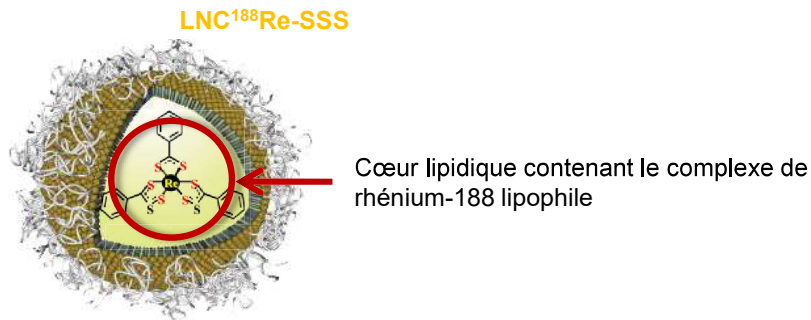


Figure 17: LNC¹⁸⁸Re-SSS

VI.3 L'administration du traitement

La voie d'administration retenue est donc la convection (Convection-Enhanced Delivery) dont les paramètres précédemment cités (débit, volume) seront adaptés aux modèles animaux utilisés. La figure 18 illustre le dispositif de stéréotaxie dédié aux modèles murins, couplé au système d'injection intracérébrale par CED. La stratégie expérimentale d'injection locale par CED des LNC¹⁸⁸Re-SSS est décrite par la figure 19.



Figure 18: Illustration du dispositif d'injection intracérébrale par Convection-Enhanced Delivery pour les modèles murins disposés sur le cadre de stéréotaxie (Pump 11 elite 70-4507INT, Harvard Apparatus®, Les Ulis, France).

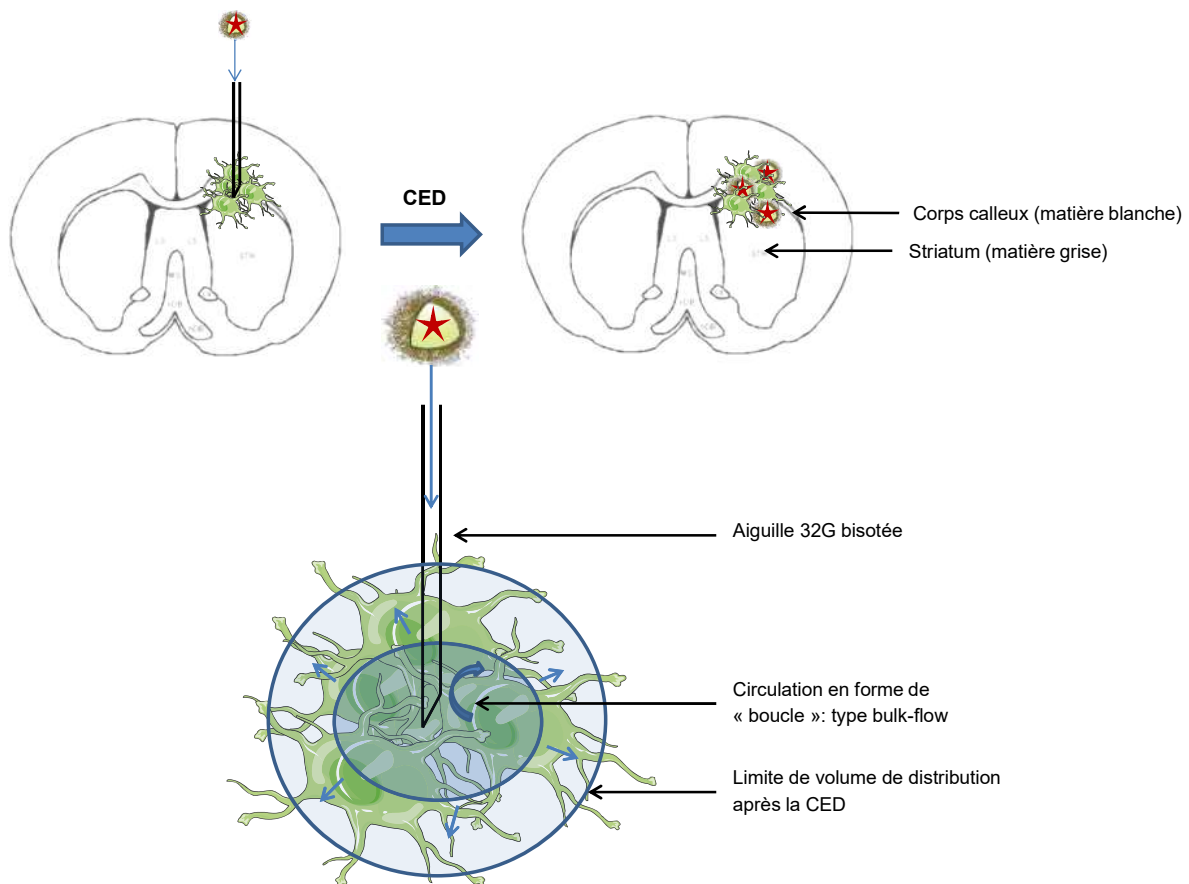


Figure 19: Représentation schématique d'une coupe axiale de cerveau de souris avec la pousse tumorale au niveau du corps calleux. Zoom sur le ciblage personnalisé en pré-clinique des LNC¹⁸⁸Re-SSS par CED.

VI.4 Plan

Ainsi, la première partie de ce manuscrit présente un état des lieux de la radiothérapie interne des glioblastomes en clinique, qui mène à une ouverture vers des systèmes innovants combinant les systèmes particuliers et les radionucléides. L'implication des différentes modalités d'administration et le choix des radioéléments pour ces pistes ont été établies avant d'élaborer le nouveau procédé thérapeutique utilisant la radiothérapie.

En effet, une précédente étude menée par Vanpouille-Box (2011) sur le modèle syngénique de gliome 9L chez le rat a démontré l'importance d'une injection vectorisée par les LNC et fractionnée du rhénium-188 complexé pour le traitement des glioblastomes. Une efficacité

INTRODUCTION GENERALE

thérapeutique significative (83% de réponse au traitement), la présence d'un infiltrat immun local et d'une mémoire immunitaire viennent souligner ces conclusions. Ainsi, les deuxième et troisième parties de ce manuscrit exposent les travaux réalisés à l'échelle pré-clinique par l'utilisation de deux modèles souris : le modèle de xélogreffe Nude-Lab1 et le modèle syngénique C57BL6J-GL261 pour approfondir les connaissances relatives à cette stratégie thérapeutique. L'utilisation d'un modèle permettant le développement d'un glioblastome issu d'un tissu humain d'exérèse semble nécessaire pour évaluer le potentiel thérapeutique des LNC¹⁸⁸Re-SSS. De plus, le statut immunitaire des patients immunodéprimés sera en partie illustré par ce modèle souris Nude dépourvu de thymus, organe immunitaire de production entre-autre de cellules lymphocyte T. Ces modèles ont permis dans un premier temps d'analyser l'implication des paramètres d'administration par CED (volumes injectés (Vi) et des débits) sur le volume de distribution (Vd) des LNC¹⁸⁸Re-SSS au site tumoral aux deux temps de traitement. Dans un second temps, nous avons établi l'efficacité de cette stratégie de radiothérapie interne fractionnée dans ces deux modèles. Quelques développements dans le domaine de l'immunité innée ont été abordés.

Enfin, une quatrième partie confrontera les possibles modèles gros animaux pré-cliniques pour l'étude de l'injection par CED, en vue d'une transposition à l'échelle humaine.

INTRODUCTION GENERALE

Références bibliographiques de l'introduction:

- Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*. 36(2):165-79.
- Altaner C. (2008) Glioblastoma and stem cells. *Neoplasma*. 55(5):369-74.
- Barua NU, Gill SS, Love S. (2013) Convection-enhanced drug delivery to the brain: therapeutic potential and neuropathological considerations. *Brain Pathol*. 2014 Mar;24(2):117-27.
- Beier D, Schulz JB, Beier CP. (2011) Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells – much more complex than expected. *Mol cancer*. 10:128.
- Bernstein M, Berger MS. (2011) *Neuro-oncology: the essentials (2nd ed)* [Book] New York : Thieme, c2008. xvii, 477 p.: ill.
- Bidros DS, Vogelbaum MA. (2009) Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. *Neurotherapeutics*. 6(3):539-46.
- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. (1994) CED of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(6):2076-80.
- Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, Barnholtz-Sloan JS, Davis FG, Il'yasova D, Kruchko C, McCarthy BJ, Rajaraman P, Schwartzbaum JA, Sadetzki S, Schlehofer B, Tihan T, Wiemels JL, Wrensch M, Buffler PA. (2008) Brain tumor epidemiology: consensus from the brain tumor epidemiology consortium. *Cancer* 1;113 (7 suppl): 1953-68.
- Castro MG, Cowen R, Williamson IK, David A, Jimenez-Dalmaroni MJ, Yuan X, Bigliari A, Williams JC, Hu J, Lowenstein PR. (2003) Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacology & Therapeutics*. 98(1):71-108.
- Chikui T, Obara M, Simonetti AW, Ohga M, Koga S, Kawano S, Matsuo Y, Kamintani T, Shiraishi T, Kitamoto E, Nakamura K, Yoshiura K. (2012) The principal of dynamic contrast enhanced MRI, the method of pharmacokinetic analysis and its application in the head and neck region. *Int J Dent*, 2012;480659.
- de la Puente P, Azab AK. (2014) Delivery systems for brachytherapy. *J Control Release*. 192:19-28.
- Del Burgos LS, Hernández RM, Orive G, Pedraz JL. (2014) Nanotherapeutic approaches of brain cancer management. *Nanomedicine*. 10(5):905-19.

INTRODUCTION GENERALE

- Djedid R, Tomasi O, Haidara A, Rynkowski M, Lefranc F. (2010) Traitement des glioblastomes à l'aube de 2010. *Rev Med Brux.* 30(5):496-505.
- Fung LK, Ewend MG, Sills A, Sipos EP, Thompson R, Watts M. (1998) Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroxyxyxlophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res.* 58(4):672-684.
- Goldlust SA, Turner GM, Goren JF, Gruber ML. (2008) Glioblastoma Multiforme: multidisciplinary care and advances in therapy. *Hospital Physician.* pp 9-22,39.
- Gordon IK. (2008) Veterinary radiation oncology: technology, imaging, intervention and future applications. *Cancer Therapy.* Vol 6, 167-176.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The Hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) The Hallmark of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5): 646-74
- Healy AT, Vogelbaum MA. (2015) Convection-enhanced delivery for glioblastomas. *Surg Neurol Int.* 6(Suppl 1): S59–S67.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. (2002) A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res.* 19(6): 875-80.
- Hottinger AF, Stupp R. (2008) Strategies thérapeutiques pour le traitement des gliomes. *Rev Neurol.* 164(6-7):523-530.
- Idema S, Caretti V, Lamfers ML, van Beusechem VW, Noske DP, Vandertop WP, Dirven CM. (2011) Anatomical Differences Determine Distribution of Adenovirus after Convection-Enhanced Delivery to the Rat Brain. *Plos One.* 6(10):e24396.
- Jain RK, Stylianopoulos T. (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors *Nat Rev Clin Oncol.* 7(11):653-64.
- Jessen KR (2004) Glial cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36(10):1861-7.
- Juhász C, Dwivedi S, Kamson DO, Michelhaugh SK, Mittal S. (2014) Comparison of amino acid positron emission tomographic radiotracers for molecular imaging of primary and metastatic brain tumors. *Mol Imaging.* 13.
- Juratli TA, Schackert G, Krex D. (2013) Current status of local therapy in malignant gliomas – a clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther.* 139(3):341-58.

INTRODUCTION GENERALE

- Kim JK, Jin X, Ham SW, Lee SY, Seo S, Kim SC, Kim SH, Kim H. (2015) IRF7 promotes glioma cell invasion by initiating AGO2 expression. *Tumour Biol.* [Epub ahead of print].
- Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW (eds) (1993) Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization international histological classification of tumours. Springer, Heidelberg.
- Kleihues P, Cavenee WK (eds) (2000) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system. IARC Press, Lyon.
- Kunwar S, Chang S, Westphal M, Vogelbaum M, Sampson J, Barnett G, Shaffrey M, Ram Z, Piepmeyer J, Prados M, Croteau D, Pedain C, Leland P, Husain SR, Joshi BH, Puri RK; PRECISE Study Group. (2010) Phase III randomized trial of CED of IL13-PE38QQR vs Gliadel wafers for recurrent glioblastoma. *Neuro-Oncol.* 12(8):871-81.
- Lemke D, Weiler M, Blaes J, Wiestler B, Jestaedt L, Klein AC, Löw S, Eisele G, Radlwimmer B, Capper D, Schmieder K, Mittelbronn M, Combs SE, Bendszus M, Weller M, Platten M, Wick W. (2014) Primary glioblastoma cultures: can profiling of stem cell markers predict radiotherapy sensitivity? *J Neurochem.* [Epub ahead of print].
- Li Y, Rey-Dios R, Roberts DW, Valde´s PA, Cohen-Gadol AA. (2014) Intraoperative Fluorescence-Guided Resection of High-Grade Gliomas: A Comparison of the Present Techniques and Evolution of Future Strategies. *WORLD NEUROSURGERY* 82 [1/2]: 175-185.
- Lidar Z, Mardor Y, Jonas T, Pfeffer R, Faibel M, Nass D, Hadani M, Ram Z. (2004) Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. *J Neurosurg.* 2004 Mar;100(3):472-9.
- Lim YC, Roberts TL, Day BW, Stringer BW, Kozlov S, Fazry S, Bruce ZC, Ensbey KS, Walker DG, Boyd AW, Lavin MF. (2014) Increased sensitivity to ionizing radiation by targeting the homologous recombination pathway in glioma initiating cells. *Mol Oncol.* 8(8):1603-15.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. (2007) The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2):97–109.
- Mead PA, Safdieh JE, Nizza P, Tuma S, Sepkowitz KA. (2014) Ommaya reservoir infections: a 16-year retrospective analysis. *J Infect.* 2014 Mar;68(3):225-30.
- Moore AS. (2002) Radiation therapy for the treatment of tumours in small companion animals. *Vet J.* 164(3):176-87.

INTRODUCTION GENERALE

- Ommaya AK. (1963) Subcutaneous reservoir and pump for sterile access to ventricular cerebrospinal fluid. *Lancet*. Nov 9;2(7315):983-4.
- Paillard A, Hindré F, Vignes-Colombeix C, Benoit JP, Garcion E. (2010) The important of endo-lysosomal escape with nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials*. 31(29):7542-54.
- Pardridge WM. (2007) Drug targeting to the brain. *Pharm. Res.* 24(9):1733–44.
- Preusser M, de Ribaupierre S, Wöhrer A, Erridge SC, Hegi M, Weller M, Stupp R. (2011) Current concepts and management of glioblastoma. *Ann Neurological* 70(1):9-21.
- Ratcheson RA, Ommaya AK. (1968) Experience with the subcutaneous cerebrospinal-fluid reservoir. Preliminary report of 60 cases. *N Engl J Med*. Nov 7;279(19):1025-31.
- Roberts DW, Valdés PA, Harris BT, Hartov A, Fan X, Ji S, Leblond F, Tosteson TD, Wilson BC, Paulsen KD. (2012) Glioblastoma multiforme treatment with clinical trials for surgical resection (aminolevulinic acid). *Neurosurg Clin N Am*. 23(3):371-7.
- Sahoo P, Rathore RK, Awasthi R, Roy B, Verma S, Rathore D, Behari S, Husain M, Husain N, Pandey CM, Mohakud S, Gupta RK. (2013) Subcompartmentalization of extracellular extravascular space (EES) into permeability and leaky space with local arterial input function (AIF) results in improved discrimination between high- and low-grade glioma using dynamic contrast-enhanced (DCE) MRI. *J Magn Reson Imaging*. 38(3):677-88.
- Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. (2005) Neural stem cells and the origin of gliomas. *New Engl J Med*. 353(8):811-22.
- Schucht P, Beck J, Abu-Isa J, Anderegg L, Murek M, Seidel K, et al. (2012) Gross total resection rates in contemporary glioblastoma surgery: results of an institutional protocol combining 5-aminolevulinic acid intraoperative fluorescence imaging and brain mapping. *Neurosurgery*. 71(5):927–936.
- Séhédic D, Cikankowitz A, Hindré F, Davodeau F, Garcion E. (2015) Nanomedicine to overcome radioresistance in glioblastoma stem-like cells and surviving clones. *Trends in Pharmacol Sci*. 36(4):236-252.
- Smulders B. (2013) Radiotherapy. in PET/CT radiotherapy planning, part 3, EANM 2013.
- Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ; ALA-Glioma Study Group. (2006) Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomized controlled multicenter phase III trial. *Lancet Oncol*, 7(5): 392-401.

INTRODUCTION GENERALE

- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10(5):459-66.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. (2005) Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New Engl J Med.* 352(10):987-96.
- Szczepura K. (2013) Biological effects of ionizing radiation. in *Radionuclide metabolic therapy*, EANM 2013.
- Szvalb AD, Raad II, Weinberg JS, Suki D, Mayer R, Viola GM. (2014) Ommaya reservoir-related infections: clinical manifestations and treatment outcomes. *J Infect.* 68(3):216-24.
- Tatsch K, et al., (2013) Clinical applications of PET/CT in neurology Brain tumours. in *Principles and practice of PET/CT, Part 2*, EANM 2013.
- Vandergrift WA, Patel SJ, Nicholas JS, Varma AK. (2006) Convection-enhanced delivery of immunotoxins and radioisotopes for treatment of malignant gliomas. *Neurosurg Focus.* 20(4):E13
- Vanpouille-Box C, Lacoëuille F, Roux J, Aubé C, Garcion E, Lepareur N, Oberti F, Bouchet F, Noiret N, Garin E, Benoît JP, Couturier O, Hindré F. (2011) Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model. *PLoS One.* 6(3):e16926.
- Vogelbaum MA, Aghi MK. (2015) Convection-enhanced delivery for the treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol.* 17(suppl 2):ii3-ii8.
- Waters JD, Rose B, Gonda DD, Scanderbeg DJ, Russell M, Alksne JF, Murphy K, Carter BS, Lawson J, Chen CC. (2013) Immediate post-operative brachytherapy prior to irradiation and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol.* 113(3):467-77.

INTRODUCTION GENERALE

- Wen PY, Kesari S. (2008) Malignant gliomas in adults. *New Engl J Med.* 359(5):492-507.
- Wrensch M., Minn Y., Chew T., Bondy M., Berger M.S. (2002) Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro-Oncology* 4(4): 278-99.
- Yun J, Rothrock RJ, Canoll P, Bruce JN. (2013) Convection-enhanced delivery for targeted delivery of antiglioma agents: the translational experience. *J Drug Deliv.* 2013:107573.
- Zhou W, Jiang Z, Li X, Xu Y, Shao Z. (2015) Cytokines: shifting the balance between glioma cells and tumor microenvironment after irradiation. *J Cancer Res Clin Oncol.* 141(4):575-89.
- Zülch KJ (2nd ed) (1979) *Histological typing of tumours of the central nervous system.* World Health Organization, Geneva (n°21).

PREMIERE PARTIE:

REVUE

PREMIERE PARTIE

Cette première partie déclinée en revue bibliographique a pour objectif de faire le point sur les stratégies thérapeutiques utilisant la radiothérapie interne pour les tumeurs cérébrales. Cette technologie innovante permet de délivrer localement, au plus près du foyer tumoral ou dans la cavité de résection, un élément radioactif associé à un vecteur plus ou moins spécifique (implants, anticorps peptides, nanoparticules). Généralement appliquées aux patients en récurrence dans les essais cliniques, différentes stratégies testées en phases précoces d'essais cliniques (étude pilote, étude de phase I, étude de phase II) sont présentées dans cette revue.

Outre un point sur l'état de l'art de cette nouvelle technologie (objet de la première partie de cette revue), les paragraphes suivants reprendront et discuteront les paramètres importants que sont : le choix du radioélément, le choix du vecteur et les modalités d'administration utilisées. Enfin, un dernier point développera les vecteurs et les radioéléments prometteurs faisant actuellement l'objet d'investigations pré-cliniques pour lesquels un passage en essai clinique est envisageable.

Internal radiation therapy for glioblastoma: management options and clinical applications.

Annabelle Cikankowitz¹, Delphine Séhédic, Emmanuel Garcion, Catherine Ibisch^{2#},
Claire Vanpouille-Box^{1,3#}, François Hindré^{1*#}

¹ LUNAM Université, Université d'Angers; INSERM U1066 MINT, Micro et Nanomedecines biomimétiques, Angers, France.
E-mail: annabelle.cikankowitz@etud.univ-angers.fr

² **Current address:**

Catherine Ibisch
Departement des Sciences Cliniques et Unité de Recherche AMaROC
Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'alimentation Nantes Atlantique
Atlanpole La Chantrerie
44 307 NANTES Cedex France
Phone: +33 (0)2 40 68 77 81
Fax:
E-mail: catherine.ibisch@oniris-nantes.fr

³ **Current address:**

Claire Vanpouille-Box
NYU School of Medicine
Department of Pathology
Alexandria Center for Life Sciences, 3rd floor Rm 319H
450 East 29th Street
New York, NY 10016
United States of America
Phone: 212-263-7306
Fax: 212-263-8211
E-mail: Claire.Vanpouille-Box@nyumc.org

*** For correspondance or reprints contact:**

François Hindré
LUNAM Université
Université d'Angers
INSERM U1066 MINT
Micro et Nanomedecines biomimétiques
49933 Angers cedex 9
France.
Phone: 33.2.44.68.85.29
Fax: 33.2.44.68.85.46.
E-mail: francois.hindre@univ-angers.fr

These authors contributed equally to this work.

PREMIERE PARTIE

Running title:

Keywords: Malignant brain tumor, glioblastoma, internal radiotherapy, brachytherapy, clinical trials, antibodies, peptides, nanomedicines.

Acknowledgments:

This work was supported by the French National Research Agency through the RADIOHEAD program (ANR), by “La Région Pays-de-la-Loire” through the Nuclear Technology for Health project (NucSan) and IRAD programs, by “La Ligue Nationale Contre le Cancer” through an “Equipe Labellisée 2012” grant, by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), by the “Axe Vectorisation and Radiothérapies” and the “Réseau Gliome Grand Ouest” (ReGGO) of the “Cancéropôle Grand-Ouest”. The co-authors of this manuscript are also members of the LabEx IRON “Innovative Radiopharmaceuticals in Oncology and Neurology” as part of the french government program “Investissements d’Avenir”. A.C. and D. S. received a fellowship from the NucSan program.

Highlights:

- ⇒ 1 Recent trends about clinical trials involving local internal radiation therapy for newly diagnosed and recurrent high grade gliomas.
- ⇒ 2 Modalities of administration of radiopharmaceuticals influencing biological targeting.
- ⇒ 3 Future prospects applying radio-medicines in pre-clinical trials.

Abstract

The development of effective internal radiotherapy strategies for malignant glioma requires adequate understanding of biological mechanisms underlying tumor progression and radiation physical characteristics in order to achieve clinical benefit for patients. Despite the many drugs' development that have been tested, none of them are curative. Beta- or alpha-emitting radionuclide-based therapy have significant potential to improve solid tumor therapy. This review covers major clinical trials to date for malignant glioma with a focus on the management of local and targeted radio-medicines (brachytherapy, radioimmunotherapy and peptide receptor therapy). A difficulty in this approach is to guarantee the adequate dose delivery of the radiopharmaceuticals to the tumor while sparing healthy tissues.

In this present paper, we also review parameters (delivery technique, radionuclide and vector) influencing the application and efficiency of radionuclide in glioblastoma therapy. Finally, novel interesting and promising internal radiotherapy approaches that have been tested in pre-clinical animals' models for application to gliomas will be reviewed.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is a grade IV tumor of the astrocytomas category, which is the most common and aggressive brain tumor with a incidence of 5/100000 and a median survival of less than 1 year (Gruber, June 2008, Mrugala, 2013).

Surgery is the first-line of treatment for patients with newly diagnosed resectable GBM. However, the invasive and infiltrative nature of GBM invariably leads to recurrence within the macroscopically healthy tumor margin zone. External-beam radiotherapy (EBRT) as post-operative treatment has been shown to improve survival from 3-4 months to 7-12 (Wen and Kesari, 2008) months and is therefore considered as a standard of care after surgery. However, despite this therapeutic strategy tumor relapse remains inevitable.

As the brain is endowed with a natural filter, the blood brain barrier (BBB), that prevents material crossing from blood to brain, systemic chemotherapy is not considered as a potent treatment option for GBM patients. As such, injecting chemotherapeutic agents through the systemic route does not provide any benefit as a sole treatment (Bredel, 2001). However, Temozolomide (TMZ - Temodal®) has been shown to improve patients outcome when combined with EBRT and is therefore considered as the standard protocol in GBM care (Burger and Green, 1987, Hsieh and Lesniak, 2005, Maher et al., 2001, Stupp et al., 2009, Stupp et al., 2005). Therefore, we cannot remain at this stage and the objective is to improve the conventional treatment so as to eliminate tumoral cells prepared to resist or escape these therapies.

Among new treatment approaches, locoregional therapies hold great promises for the management of GBM. They allow overcoming BBB while confining the therapeutic object and minimizing its systemic toxicity. In addition, the evolutions of stereotaxic neurosurgery methodologies together with the development of nanomedicines offer new opportunities in administration of therapeutics. As such, facilitated access to radionuclides dusted the concept of molecular radiotherapy that could benefit from these new technologies. Molecular radiotherapy (or internal radiation therapy, brachytherapy or curietherapy) aims at inserting

permanent or temporary radioactive implants within the tumor. Indeed, a new axis of molecular radiotherapy is based on the use of nanomedicine: monoclonal antibodies, peptides or even a biomimetic vector as potential carriers of radionuclides (alpha (α), beta (β) emitter or auger electron) to irradiate the tumor. This strategy allows to reach a specific target and/or confine radionuclides improving therefore the impact of radiations in a predictable fashion.

Consequently, this review presents the state of the art of molecular radiotherapy for GBM treatment that have already reached the clinical stage. Specific features of efficient radiotherapy, that are: (1) the choice of the radionuclide, (2) the route of administration and (3) the choice of the vector are discussed. In the light of preclinical research, new opportunities and innovations in applying radionuclide-combined particulate systems to GBM are also presented.

I. Internal radiotherapy for malignant glioma in clinical trials-State of the art

The development of neurosurgical technics including stereotaxy and neurosurgery navigation and the advent of molecular recognitions notably by use of monoclonal antibodies led to the establishment of internal radiation therapy for the Central Nervous Systems.

Available data on clinical trials with internal radiotherapy for GBM are reviewed with a special and focus on faisability, efficiency and toxicity.

I.1 Locoregional brachytherapy through sealed source

Brachytherapy is a short distance radiation therapy, maximizes irradiation to the tumor using radioactive implant (seeds, wires) or filled balloon devices whose can be implanted permanently or temporarily.

PREMIERE PARTIE

There are four important radionuclides used for interstitial or intracavitary brachytherapy: Iridium-192 (^{192}Ir), Gold-198 (^{198}Au), Cobalt-60 (^{60}Co) (Kumar et al., 1989, Kumar et al., 1986) and Iodine-125 (^{125}I). They allow both imaging and internal RT of GBM patients. To our knowledge, experiments concerning implantation of sealed radioactive source attracted significant attention since the early 1960s (Mundinger, 1967).

^{192}Ir -wires efficiency was compared to other radioisotopes seeds: Gold-198 (^{198}Au) and Iodine-125 (^{125}I) (Gutin et al., 1984, Hosobuchi et al., 1980). The difference between slow (^{192}Ir seeds) and fast growing (^{198}Au seeds) GBM and the different dose rate deposited in each case are highlighted. Moreover, a drawback was highlighted: gamma rays energies affect healthy tissues. This suggests that it is suitable to use less energetic gamma emission such as ^{125}I than the energies of radiation emitted by ^{198}Au or ^{192}Ir : 35.5 keV versus 412 keV for ^{198}Au . To date, there is a great interest for ^{125}I . The center of Iodine-125 seed emits not far than 2 cm margin where the radiations are very poorly damageable for brain and less radiation penetrate through the skull (Hu et al., 2012). Furthermore and compared with EBRT which lead to radiation necrosis with high doses, the use of temporary high-activity ^{125}I implant (catheter delivery) after EBRT spare surrounding tissue while concentrate the radiation in tumor area and much control the disease (Gutin et al., 1984). Now, brachytherapy with ^{125}I tends to low-activity permanent one (free or in absorbable suture) whose seems avoid complications that are reported with the use of high-activity temporary one (McDermott et al., 1998). Brachytherapy devices containing ^{125}I have evolved toward a FDA-approved inflatable balloon catheter containing the low dose-rate radionuclides in aqueous solution: GlioSite. With the development of this technology and the disponibility of radionuclides, an interest to MammoSite is performed. This device use high dose rate ^{192}Ir , and as far as we know, not a device used for GBM therapy but for breast tumors at present. However, it was for the first time tested by Waters et al. for GBM (Waters et al., 2013).

From all these brachytherapy devices, it can be concluded that implantation is feasible technique but the deposit of implants carrying a radioactive element in tumor bed was not

PREMIERE PARTIE

sufficient to specifically and efficiently target the global tumor volume at the doses that were tried. The choice of the radionuclide is depending on the use of permanent or temporary implant, the dose-rate and the tumor evolution. Device removal (seeds) is a risk of complication associated with infection for patients. This is not the case for the balloon-catheter system which present no adverse effect even if the patients want to keep it in place. Brachytherapy technologies need post implantation imaging (CT scanning) in order to validate the accuracy of the seeds' location and time after the deposit. The post-operative brachytherapy is safe, can boost initial EBRT GBM treatment and not yet curative as well as all treatment strategies tested in clinic.

I.2 Targeted internal radiation therapy – radioimmunotherapy (RIT) with mAb

In this part, global results from RIT clinical trials for MG will be presented. Targets and their specificities will be detailed later in chapter II c).

The systemic route of mAb administration was used until 1992. Then, mainly local deliveries were performed.

Efficacy of targeted radioimmunotherapy of recurrent glioblastomas using Auger electrons (^{125}I) or the β emitters ^{131}I , ^{90}Y or ^{188}Re , or the α emitter ^{211}At have been investigated in several clinical trials (Table V).

Epenetos *et al.* first published a case report showing in vivo activity of a first monoclonal Ab (9A) targeting EGFR which was also cross reactive with blood group A antigen, in a patient with recurrent grade IV glioma. The antibody was labeled with 1665 MBq of ^{131}I (^{131}I -9A). The authors showed that intra-arterial (carotid) injection of ^{131}I -9A resulted in tumor regression and improved the quality of life of this patient (Epenetos et al., 1985).

PREMIERE PARTIE

Five years later, in vivo efficiency of targeted radiotherapy using ^{125}I -MAb-425, also targeting EGFR, for MGs treatment was shown by Brady's team through a clinical trial on 15 patients with malignant astrocytomas. In this pilot study, the patient's benefits were observed after 1 to 3 intra-arterial injections of ^{125}I -MAb-425 with a total activity from 925 to 4810 MBq. This treatment led to an increase in median survival time of 8 ± 6.6 months (Brady et al., 1990). In a second study (phase II), Brady *et al.* investigated ^{125}I -MAb-425 radiolabeled mAb as an adjuvant treatment of malignant astrocytomas. Twenty-five patients received post-operative radiation therapy (mean dose 61 Gy in 6.5 weeks) before receiving ^{125}I -MAb-425. The average total dose of ^{125}I -MAb-425 was 5587 MBq and resulted in a median survival time up to 15.6 months (Brady et al., 1992).

The last clinical trial listed using ^{125}I -MAb-425 was mentioned in 2010. Li *et al.* studied a total dose of 5.4 MBq in a phase II trial (Li et al., 2010). TMZ combined to ^{125}I -MAb-425 gave the best median survival time with 20.4 months (vs control group: 10.2 months) and only 3.7% of patients developed acute toxicity.

However, intravenous or intra-arterial injections of ^{125}I -MAb-425 had shown several adverse effects, resulting from irradiation of healthy tissues (Brady et al., 1990, Epenetos et al., 1985). Indeed, hepatocytes and epithelial cells also express EGFR, which makes it inappropriate to treat malignant gliomas by systemic route with this vector.

Therefore, the next study involving an anti-EGFR Ab was conducted using local administration. Indeed, in order to avoid non-specific binding through systemic routes, Casaco *et al.* opted for stereotactic radiosurgery techniques using Ommaya reservoir and reported therapeutic effects of intracavitary single dose injection of nimotuzumab (h-R3) in adult recurrent high-grade glioma in a phase I trial (Casaco et al., 2008). Authors decided to use h-R3, an anti-EGFR humanized antibody, to circumvent the Human Anti-Mouse Antibodies (HAMA) response, already described in radioimmunotherapy (RIT) (Goldenberg, 2001, Wersall et al., 1997). Promising results were reported after a unique injection of 3 mg of h-R3 labeled with 370-555 MBq of rhenium-188 with a median survival up to 18.7 months for patients with recurrent high grade gliomas.

PREMIERE PARTIE

Biodistribution of nimotuzumab was then studied by Torres *et al* after a single injection of 3 mg of ^{188}Re -h-R3 (Torres et al., 2008). Dose-escalation was performed in order to determine Maximum Tolerated Dose (MTD) of ^{188}Re -h-R3 in recurrent high grade gliomas. Results demonstrated high retention in surgically created resection cavity (SCRC) with 85.5 ± 10.3 % injected dose 1h post-injection. Mean absorbed dose in the tumor area was 24.1 ± 2.9 Gy and 31.1 ± 6.4 Gy for patients receiving 370 MBq and 555 MBq respectively. Two patients receiving 555 MBq showed severe adverse effects, so MTD was set at 370 MBq. Locoregional single injection of ^{188}Re -nimotuzumab seems to be an effective and safe treatment at this dose for recurrent high grade gliomas and would need to be further investigated in a phase II study. To note, the radionuclide ^{188}Re have favorable characteristics. Its physical half-life of approximatively 17 hours has an influence in reducing the toxicity risks. However, it is also a limitation because the intravenous injected ^{188}Re is cleared fast, that's why a local reservoir administration is preferred for this radionuclide. The multi-dose delivery seems to be an easy therapy option too (decay, catheter-reservoir administration and generator production).

As described below, other GBM targets are considered and several antitenascin mAbs that bind to different epitope on the tenascin molecule have been investigated: BC-2, BC-4 and 81C6 (Bigner et al., 1998, Boiardi et al., 2005, Brown et al., 1996, Cokgor et al., 2000, Goetz et al., 2005, Merlo et al., 1997, Paganelli et al., 1999, Reardon et al., 2002, Reardon et al., 2006a, Reardon et al., 2008, Spaeth et al., 2006).

Most of the clinical trials involving BC-4 and BC-2 were conducted by the team of Riva *et al.* since 1994 (Riva et al., 1995, Riva et al., 1994a, Riva et al., 1994b, Riva et al., 1997, Riva et al., 1999b). They reported a pilot study of 24 patients with malignant gliomas which received BC-2 or BC-4 mAbs labeled with iodine-131 (^{131}I) (Riva et al., 1994b). A dose more than 3019.2 MBq of ^{131}I was administered through a subcutaneous Rickman reservoir connected to a catheter directed at the lesion. The volume injected did not exceed 1.5 mL, to prevent

PREMIERE PARTIE

from an increase of the intracranial pressure. This technique was not followed by any adverse effect due to ionizing radiations.

The number of patients (n=24) was small, these data were therefore completed with another trial in 1995. This second study was conducted in two categories of patients: group A with recurrent glioma lesion (n=12) and group B with a newly diagnosed glioma (n=4) (Riva et al., 1995). No adverse effects regarding ionizing radiations were noticed but 69% of patient produced human antimouse antibodies (HAMA).

Survival was increased compared to the previous study with a median survival up to 18 months (group A) and 23 months (group B). These data were confirmed by Riva *et al.* in 1997 which demonstrated the interest of intralesional RIT as an adjuvant therapy (Riva et al., 1997). However, in this study, patients with recurrent lesions did not respond as well as patients with newly diagnosed gliomas. The main explanation could be that recurrences take place within the margins and at distance from the injection site. Hence, further developments were conducted by Riva *et al.* with BC-2 and BC-4 monoclonal antibodies labeled with yttrium-90 (^{90}Y), a pure β^- -emitter with higher energy of 2.28 MeV and a mean path length in tissues of approximately 3,6 mm (Riva et al., 1999a).

In the contrary to ^{131}I (average range in tissue of 0.4 mm), the emission of ^{90}Y can penetrate tissues up to 0.5-0.7 cm; therefore, radiation can reach more distant neoplastic elements. No survival results have been reported, as it was an escalation dose study in advanced stage patients. However, maximum tolerated dose (MTD) to the brain was determined to be around 925 MBq. This biodistribution study demonstrated that these antibodies labeled with yttrium-90 and administrated locally, reached specifically the neoplastic areas.

In a phase II clinical trial of the same technique, authors reported an increase in median survival up to 31 months when RIT was associated to conventional therapies (neurosurgery, external beam radiation) (Riva et al., 2000).

Meanwhile the evaluation of BC-2 and BC-4 labeled antibodies, studies of the anti-tenascin Ab of 81C6 labeled with iodine-131 were carried out by a team from the University of Duke

PREMIERE PARTIE

(North Carolina, USA) and have demonstrated promising results in several clinical trials (Akabani et al., 2000, Bigner et al., 1998, Cokgor et al., 2000, McLendon et al., 2007, Reardon et al., 2002, Reardon et al., 2006a, Reardon et al., 2006b, Reardon et al., 2008). Patients were treated with ^{131}I -81C6 mAb directly administered through the Ommaya reservoir placed in the surgically created resection cavity (SCRC) (like the antibody against EGFR labelled with ^{188}Re). Results showed an increase in median survival up to 12.69 and 15.9 months for recurrent (Bigner et al., 1998) and newly diagnosed GBM (Cokgor et al., 2000) respectively. Dose escalation was also studied and showed a MTD of 3700 MBq (Bigner et al., 1998) and of 4440 MBq (Cokgor et al., 2000) for recurrent and newly diagnosed GBM respectively.

^{131}I -ch81C6, a human/mouse chimeric IgG2 anti-tenascin monoclonal antibody, exhibited higher tumor accumulation and enhanced stability compared with its murine parent (Reardon et al., 2006b). Maximum tolerated dose (MTD) was determined at 2960 MBq with a promising increase in median survival time of 20.4 and 15 months for respectively newly diagnosed and recurrent glioblastomas.

Zalutsky *et al.* from the same university, investigated the feasibility, safety, and efficacy of the administration of chimeric anti-tenascin mAb 81C6 (ch81C6) labeled with ^{211}At (^{211}At -ch81C6) into the resection cavity of patients with recurrent MG (Zalutsky et al., 2008). The injected volume (≤ 6 mL) was the same as in the previous study of his colleagues Reardon *et al.*. Authors reported a minimal toxicity with a promising outcome with a median survival time of approximately 14 months (Reardon et al., 2008).

The development of RIT for MG is still ongoing with many opened clinical trials. Notably Hdeid and colleagues investigated the use of another novel chimeric mAbs: chTNT-1/B for MG patients in a recent phase II study (Hdeib and Sloan, 2011). This approach targets with the engineered protein (150 kDa – 170 kDa), the necrotic cells whose localization inside the core of the tumor provides an opportunity to concentrate the mAb in the hypoxic areas.

PREMIERE PARTIE

Importantly, authors aimed at targeting more specifically DNA from glioma cells and particularly the histone H1 (intracellular antigen). This ongoing phase II clinical trial uses the newly developed 'convection enhancement delivery' (CED) method to directly inject iodine-131 radiolabeled chTNT-1/B within the brain tumor. To date, it is the only trial using this CED technique of administration for internal radiotherapy.

Besides mAb, another type of vector has been investigated in clinical trials for GBM internal radiotherapy: peptides as ligands for targeting cell surface receptors that we will describe now.

I.3 Targeted internal radiation therapy – peptide receptor therapy

Three main peptides were assessed in clinical trial for GBM peptide receptor therapy.

First, ⁹⁰Y-DOTATOC radiolabeled peptide was studied (Beutler et al., 2005, Bodei et al., 2003, Hofer et al., 2001, Schumacher et al., 2002). DOTATOC is a high-affinity ligand for SSTR-2, the somatostatin receptor-2 that is overexpressed in malignant gliomas (de Jong et al., 1997, Otte et al., 1997).

Many studies conducted by Merlo *et al.* have first demonstrated that ⁹⁰Y-DOTATOC competes specifically with somatostatin on the somatostatin receptor 2 in the low nanomolar range (Merlo et al., 1999). In this pilot study, 11 anaplastic astrocytoma patients received 1 to 4 fractions of direct injection of ⁹⁰Y-DOTATOC into the tumor via a Port-a-cath. Activity of ⁹⁰Y-DOTATOC per injection ranged between 185 and 1100 MBq and total cumulative activity per patient was between 370 MBq to 3330 MBq. Authors reported 1 patient with complete remission, 6 with disease stabilization, and 4 with poor outcome due to disease progression. Additionnal data were then reported by Schumacher *et al.*, (Schumacher et al., 2002) which demonstrated arrest of tumor progression during 13-45 months in all 5 patients with low-grade and anaplastic tumors.

PREMIERE PARTIE

More recently, Heute *et al.* (Heute et al., 2010) described another pilot study with the same peptide on 3 patients with recurrent glioblastoma. After locoregional injection of ^{90}Y -DOTATOC (cumulated dose of 1.7 to 2.2 GBq in 3 to 4 fractions), 1 patient had a complete remission and 2 a partial one. However, the small number of patients was a limit to the value of the study. Nevertheless, this study clearly highlighted the fact that somatostatin receptor 2 –targeted radionuclide therapy with ^{90}Y -DOTATOC was an attractive strategy for malignant gliomas.

In 2006, Kneifel *et al.* aimed at targeting somatostatin R2 in GBM with a catheter device loaded with 1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-A-GlutamicAcid-4,7,10-TriaceticAcid-SubstanceP radiolabeled vector (DOTAGA-Arg¹-SP) (Kneifel et al., 2006). The radiolabeling was performed with β^- (^{90}Y , ^{177}Lu) or α^- emitters (^{213}Bi). [^{90}Y]-DOTAGA-SP was used in first intention before surgery (Cordier et al., 2010b). Because of side effects due to Yttrium-90, Cordier *et al.* used the bismuth-213 (^{213}Bi) having a penetration length of an average of 81 μm , high energy (8,5 MeV) and very short decay. Interesting results were described for patients bearing small tumors treated with 1-2 GBq of ^{213}Bi : 10 months of stabilization after surgery was achieved (Cordier et al., 2010a).

The last peptide tested so far in clinical trials is the chlorotoxin peptide which targeted phosphatidyl inoside (on lamellipodia of tumor cells). In order to carry out a phase I clinical trial with a synthetic chlorotoxin named TM-601 for 19 recurrent GBM (18 GBM and 1 AA), Mamelak *et al.* (Mamelak et al., 2006) radiolabeled this peptide with iodine-131. The administration is performed through a Rickham or Ommaya subcutaneous reservoir in tumor cavity. Nonbound peptide was easily eliminated within a maximum of 48 hours after the unique intracranial injection of 370 MBq. After the treatment, two patients out of 19 were able to live for approximately 40 months. Consecutively, a phase II trial with multiple injections for high grade gliomas was initiated. However, to the best of our knowledge, no report has been published on this phase II trial so far.

PREMIERE PARTIE

Few phase I trials were followed by a phase II one and as far as we know, no phase II trial opened the way to an ongoing phase III so far. We contacted the authors of the phase II reports to try to understand why. The most frequent explanations were:

- fund limitation by the company conducting the phase II trial,
- data evaluated as too modestly promising,
- nonavailability of radioactive nuclide (transportation constraints...)
- difficulty in building the multidisciplinary team required and
- change in the team leadership.

Nuclear medicine trials are complicated to manage daily for other reasons than medical ones.

All clinical trials for GBM internal radiotherapy are summarized in table V. Even if there is a tendency now to use the same local administration route (with reservoir or catheter), investigators tested their own strategy with available radionuclide.

This review highlights the relatively high number of phase I trials with internal radiotherapy for GBM, showing globally low toxicity and manageable side effects. But few of these trials led to phase II or III clinical assays, even if the first responses observed concerning patient remission were promising. The lack of phase II and III trials is an important limitation on efficiency evaluation of these techniques. Moreover, the therapeutic responses to the strategies tested might not be identical in the different subgroups of patients (at diagnosis or after recurrence) and between the different subtypes of MG (AA or GBM). MG clinical trials need studies with more homogeneous disease groups.

With regard to the clinical results, none of them is curative. Potential explanations of the fact that all of these strategies led only to a transient stabilization of GBM are: (1) all early phase trials are always carried out on recurrent MG, (2) patients had another initial treatment strategy having possibly selected therapy-resisting GBM cells.

Now, we try to better understand how the localized radiotherapy act at the cellular level and then describe the choice of the radionuclide, the route of administration and the vector.

PREMIERE PARTIE

Tableau V : Chronological classification of MG clinical trials (RIT – peptide receptor therapy).

Authors	Trial	Patients	Radionuclide	Vector	Target	Route of administration	Activity	Results
Radioimmunotherapy								
Epenetos <i>et al.</i> , 1985		recurrent grade IV glioma (n=1)	¹³¹ I	9A	EGFR	intra-arterial injection (carotid), intravenous	1665 MBq (45 mCi)	tumor regression, improve the quality of life
Brady <i>et al.</i> , 1990	Pilot study	15 malignant astrocytomas, recurrent GBM	¹²⁵ I	mAb-425		1 to 3 intra-arterial injections	a total dose from 925 to 4810 MBq	IMS = 8 months n=1 complete response, n=2 partial, n= 5 stable disease
Brady <i>et al.</i> , 1992	Phase II	25 primary malignant astrocytomas (n=10 AA and n=15 GBM)	¹²⁵ I	mAb-425		intravenous or intra-arterial	one or multiple dose of 35 to 90 mCi per infusion	surgical resection + external radiotherapy prior mAb. MS = 15,6 months
Li <i>et al.</i> , 2010	Phase II	GBM (n=192): 132 RIT - 60 TMZ+RIT	¹²⁵ I	mAb-425		3 weekly intravenous injections	50 mCi (1,8 GBq) following surgery and RT	safe & well tolerated OMS=15,7 months - MS RIT=14,5 months - MS TMZ-RIT= 20,2 months
Casaco <i>et al.</i> , 2008	Phase I	11 recurrent high-grade glioma (n=3 AA and n=8 GBM)	¹⁸⁸ Re	Nimotuzumab (h-R3)		intracavitary injection (Ommaya reservoir) 2 mL	10 mCi (n=6) or 15 mCi (n=4) (555-740 MBq) unique injection of 3 mg of h-R3 labeled with 370-555 MBq	MTD = 10mCi : transitory worsening of pre-existing neurological symptoms --> 1 GBM 6months after RIT, n=2 (1GBM&1AA) 3months stable, 1GBM partial response for more than 1year and 1GBM+1AA= asymptomatic 3years after RIT. MeanST = 25,14 months - Median ST = 18,7months n=2 of 15mCi : early severe symptoms and 1 radionecrosis
Torres <i>et al.</i> , 2008	Phase I - MTD	9 recurrent high-grade glioma	¹⁸⁸ Re	h-R3	intra-cavitary: catheter with subcutaneous reservoir (bolus injection 2-4 mL)	single dose 3 mg of ¹⁸⁸ Re-h-R3 (370 MBq or 555 MBq)	safety MTD = 370 MBq	

PREMIERE PARTIE

	Riva <i>et al.</i> , 1995	Pilot study	newly diagnosed (n=24) or recurrent lesion (n=26)	¹³¹ I	BC-2 & BC-4	Antitemascin	Rickam reservoir catheter (16 removable - 34 permanent): 3 cycles (bolus injection <1,5 mL within 30s)	multiple RIT cycles: 3 therapeutic injections (30-60 days) + after 3-4 months (6 injections maxi)	MTD= 2405 MBq total MS= 20 months (18 recurrent - 23 newly)
	Riva <i>et al.</i> , 1997	RIT as an adjuvant	62 high-grade gliomas : n=58 GBM - n= 4 AA newly diagnosed (n=31) and recurrent (n=31)	¹³¹ I	BC-2 & BC-4		intra-lesional bolus injection did not exceed 1,5 mL (reservoir of Rickman + indwelling catheter)	external RT (55-60 Gy) and mean dose of 1998 MBq RIT: 3-6 cycles of 48,9 mCi	
	Riva <i>et al.</i> , 1999	Phase I and II	111 patients (n=20 phase I & n=91 phase II) 1 O, 7 AO, 2 DA, 10 AA and 91 GBM. --> 58 newly diagnosed and 53 recurrent tumours	¹³¹ I	BC-2 & BC-4		injected directly into the tumour site	after conventional therapy MID = 300 GY/cycle	phase II (74 GBM): 10 stable disease, 9 partial responses , 23 no evidence of disease and 1 complete response . MS = 19 months. Patients with small lesions, MS = 25 months. Better outcomes were recorded in cases with less aggressive diseases: oligodendroglioma, anaplastic oligodendroglioma and anaplastic astrocytoma.
	Riva <i>et al.</i> , 1999	Phase I - MTD	20 patients: n=18 GBM - n=2 AA	⁹⁰ Y	BC-4		Intra-lesional bolus injection (1mL) into tumor bed (reservoir + catheter)	patient with removal, external RT and chemotherapy before RIT MTD: dose escalation 5-30 mCi (185-110 MBq)	1mg - MTD = 25 mCi (925 MBq) No clinical responses were recorded because of the very advanced stage of disease at the time of RIT
	Riva <i>et al.</i> , 2000	Phase II		⁹⁰ Y	BC-4		Intra-lesional bolus injection (1mL) into tumor bed (reservoir + catheter)		
Duke University (North Carolina, USA)	Bignier <i>et al.</i> , 1998	Phase I	previously irradiated recurrent or metastatic brain tumor (n=34)	¹³¹ I	81C6		Ommaya reservoir into the cavity resection	up to 120 mCi	MTD = 100 mCi MS (GBM) = 56 weeks - MS (all) = 60 weeks
	Cokgor <i>et al.</i> , 2000	Phase I	42 patients newly diagnosed malignant gliomas	¹³¹ I	81C6		single injection: Rickham reservoir into the cavity resection	no prior external-beam therapy or chemotherapy dose escalation: 20mCi + increment of 20 mCi	MTD = 120 mCi MS (GBM)= 69 weeks MS (all)= 79 weeks
	McLendon <i>et al.</i> , 2007	neuropathology aspects	malignant gliomas (n=28) n=22 GBM, n=2 AA, n=3 AO and n=1 O	¹³¹ I	81C6		resection cavity: Ommaya reservoir	external RT or chemotherapy before mAb - external RT within one year of labeled mAb	earlier necrotic reaction in the tumor bed
	Reardon <i>et al.</i> , 2006	single-institution phase II	43 recurrent malignant glioma (n=2 AO, n=1 GS, n=6 AA; n=33 GBM and n=1 metastatic adenocarcinoma)	¹³¹ I	m81C6		into the 2cm thick cavity: Rickham reservoir + catheter accessed with a 25 gauge needle (<=6 mL)	100mCi + followed by chemotherapy	acceptable toxicity, average absorbed dose=46Gy MS greater than that of historical controls treated with surgery plus iodine-125 brachytherapy. Phase II: 44Gy delivery, phase III planned
	Reardon <i>et al.</i> , 2008	Pilot study	21 patients: n=5 AA - n=16 GBM	¹³¹ I	81C6		resection cavity: reservoir	44Gy resection cavity boost	external RT + chemotherapy median follow-up:151 weeks MOST= 96,6 weeks (90,6 weeks for GBM) 87% of GBM patients are alive at 1 year
	Reardon <i>et al.</i> , 2006	Phase I	35 newly diagnosed (untreated, newly+ RT), 12 recurrent MG	¹³¹ I	ch81C6 (chimeric)	single injection: Rickham reservoir into the cavity resection		MTD = 2,96 GBq (80mCi) MS (newly) = 88,6 weeks - MS (recurrent) = 65 weeks	
	Zalutsky <i>et al.</i> , 2008	Proof of concept (biodistribution, adverse events...)	recurrent GBM (n=18)	²¹¹ At	ch81C6 (chimeric)	resection: Rickham reservoir + catheter + 25 gauge butterfly needle (<=6 mL)	10mg - 71-347 mBq	feasible&safe&promising anti-tumor benefit MTD not identified - MSTGBM=54 weeks - MST AA=52 weeks - MST O=116 weeks	

PREMIERE PARTIE

Hbeid <i>et al.</i> , 2011	Phase I & II	high grade glioma (n=51: recurrent AA and GBM or non-resectable newly diagnosed GBM) + n=39 phase II	¹³¹ I	chTNT-1/B (chimeric)	Histon H1 complexed to DNA Tumor necrosis therapy	CED directly to the resection cavity (1-2 catheter) Between 4,5 and 18 mL was infused at a constant rate of 0,18 mL/h (average of 1 to 2 days through a microinfusion pump)	previous radiotherapy 13,2 – 71,1 mCi	well tolerated (safety&feasibility). phase I : CTV absorbed dose of 13,700cGy not enough patients treated at a consistent dose to determine the efficacy. MST= 37,9 weeks (12 patients) phase II still ongoing, not yet in phase III
Peptide receptor therapy								
Merlo <i>et al.</i> , 1999	Pilot study	7 low-grade and Anaplastic Astrocytoma (n=4) (Tumor volume >15mL)	⁹⁰ Y	DOTATOC	Somatostatin	1-3 direct injections into a Port-a-cath: capsule permanently implanted and catheter inserted by stereotactic navigation (1-1,5 mL within 60s)	1110 MBq = maximum activity per single injection	n=1 complete remission, n=6 stabilisations, n=4 progression
Schumacher <i>et al.</i> , 2002	Extended Pilot study	5 patients grade II (n=) and grade III (n=)	⁹⁰ Y	DOTATOC		single injection into the resection cavity or into solid tumor		arrest of tumor progression for 13-45 months
Heute <i>et al.</i> , 2010	Pilot study	recurrent GBM (n=3)	⁹⁰ Y	DOTATOC		Local injection (intracavitary): Rickham reservoir (4 mL injected slowly: over 10 min)	cumulated dose 1,7–2,2 GBq (3 or 4 cycles)	improved quality of life, n=1 complete remission, n=2 partial
Kneifel <i>et al.</i> , 2006	Pilot study (feasibility & biodistribution & toxicity)	GBM (n=14) and grade II to III (n=6)	⁹⁰ Y or ²¹³ Bi or ¹⁷⁷ Lu	DOTAGA-SP	Substance P	Implanted catheter system connected to a s.c. port (into the tumor or resection cavity: 2 mL over 1 minute)	375-7500 MBq for ⁹⁰Y	distributed according to tumor geometry. Disease stabilization, improved neurologic status (n=13) for GBM: MS=11 months - MOS=16 months
Cordier <i>et al.</i> , 2010	Prospective phase I study	newly diagnosed GBM (n=17) (criteria: maximal tumor diameter 7 cm...)	⁹⁰ Y	DOTAGA-SP		repetitive intratumoral injections: 1-3 catheter system stereotactically placed within the tumor margin (0,5-1,5 mL)	4440-12,765 MBq	neoadjuvant therapy, prolongs the time of recurrence, improves the survival time and quality of life PFS=5-23 months - OS=6-23 months
Cordier <i>et al.</i> , 2010	Pilot study	5 patients: 2 grade II; 1 grade III and 2 GBM	²¹³ Bi	DOTAGA-SP		intratumoral injection: 1-3 catheter system connected to a subcutaneous port (1 mL: 3 to 5 injections over 2 days-months)	1,07 – 1,92 GBq (comparison with ⁹⁰ Y)	benefit seen in the patients with relatively small tumors (12 and 17 cm ³)
Mamelak <i>et al.</i> , 2006	Phase I dosimetry & biodistribution	19 recurrent high-grade glioma (n=17 GBM and n=1 AA)	¹³¹ I	TM-601	Synthetic chlorotoxin	single injection into tumor cavity: Rickham or Ommaya subcutaneous reservoir + intracavitary catheter	10mCi; 1mg of peptide	few adverse effects (dose safe&well tolerated) 79% of the radioactivity leaves the cavity within 24h after administration. 2GBM (0,5mg-10mCi) with complete response (alive 37 and 39 months after surgery) phase II initiated (multiple injections for high-grade glioma)

II. Clinical trials for internal radiotherapy of malignant gliomas: technical choices

The concept of focusing ionizing radiation to treat GBM has emerged many years ago with the development of implants able to maintain radionuclides at the site of the tumor or its resection cavity. The main advantage of such an approach is to deliver higher radiation doses within the tumor and to prevent from irradiating of surrounding healthy tissues. Indeed, implants will irradiate during the whole isotope decay while EBRT acts only at a time-point (Hu et al., 2012). It is interesting to analyze and understand which kind of radionuclides, vectors/targets and route of administrations are used in order to manage these clinical trials.

II.1 Properties of radionuclides influencing their use in GBM therapy

Radionuclides that emit alpha (α), beta (β) particles and Auger electron have been considered for therapy purposes (Tableau VI). The biological effect is dependent on the type of emitted radiation and their physical properties.

Tableau VI: Common particles and their physical characteristics.

Particules	Isotope charge	Tissue penetration (path length)	Energy deposit	Energy	Energy deposition (LET)
Auger	Negative	nm	superficial	Low energy electrons eV order	High into the cell nucleus
Beta	Negative (e ⁻)	Few mm - cm	Strewn all along rays progress	Intermediate ionizing power 0,5-2,3 MeV	Low: 0,1-1 KeV/ μ m
Alpha	Positive (+2H ⁺)	50-100 μ m	Locally concentrate	High ionizing power 6-8 MeV	High: 100 keV/ μ m

They exhibit different physical properties such as the half-life, energy, linear energy transfer (LET) and tissue penetration or path length. The LET refers to the damage potential of the

PREMIERE PARTIE

radiation and its penetration in tissue (amount of energy deposited per unit path length). As a consequence, the biophysical characteristics of each radionuclide have to be considered to meet with successful treatment. Indeed, the distribution and penetration of ionizing radiation is decisive for an optimal tumor cell targeting. Ionizing radiation leads to cytotoxic effects on cells (free radical production, action on the DNA structure, cell death). The half-life of the radionuclide seems to be an important property for the choice of the element. Indeed, the radionuclide won't have decayed when the carrier reach the tumor site targeted. The choice of the proper radionuclide depends on its radiation properties but also on its availability and its stability with the implant that will deliver the radiation to the target.

Auger emitters such as Iodine-125 (^{125}I) have been studied for internal radiotherapy application (Bodei et al., 2003, Milenic et al., 2004). Auger electrons are delivered in very short ranges and are incorporated and concentrated in cell nucleus in order to induce radiotoxicity thanks to its high-ionization density ((Kampf, 1990, Volkert et al., 1991)). Auger emitter limits the radiation action and the amount of damaged cells (direct tumor cells targeting is needed). Therefore, focus has been made on β^- -emitters and α -emitters.

Historically, β^- -emitters (negatively charged electron emitted from the nucleus) received the greatest interest. Thanks to their physico-chemical properties, β^- -emitters are more suitable for solid tumor than α -emitters. Indeed, the emission path lengths of β^- -emitters are relatively long, yet sparse (mean range of 275 μm , maximum range of 500–600 μm for Yttrium-90; ^{90}Y), with low linear rate of loss of energy (Vanpouille-Box and Hindre, 2012). In the analysis of Volkert *et al.*, investigators have reported that the penetrating ability of beta particles can overcome the heterogeneity of uptake of the monoclonal antibody in the tumor (Volkert et al., 1991). Energy deposition takes place at some distance from the actual decay event (Brandes et al., 2006). Thus, the ionization is sparsely and weak and the therapeutic benefit results from 'crossfire'; that is, the cell targeted with the radionuclide is not necessarily the effective target of the decay event. Given this, some of the limitations of β^- -emitters become clearly

PREMIERE PARTIE

evident: treatment of single-cell metastatic diseases, leukaemias and disseminated diseases cannot be adequately addressed with β^- -emitters (Kushnir and Tzuk-Shina, 2011).

The α -particle-emitting radionuclides available for therapy are fewer compared to β^- -emitters largely because of the short half-life of many α -emitters. The α -particles produce high-energy particles (4–9 MeV) that travel relatively short distances (40–100 μm). They are characterized by dense emission path lengths of high LET, about 400 times greater than that of β^- -emitters (80 versus 0.2 keV per μm), with energy deposition taking place immediately at the decay site (Brandes et al., 2006). The therapy results from the direct emission of the α -particle, making the cell close to the radionuclide and the immediate adjacent cells the effective targets. Therefore, a main issue in α -internal radiotherapy is the requirement of an accurate and sustainable targeting. Inconveniences of these α -emitters is their relatively short physical half-life which is a disadvantage for the drug radiolabeling and clinical injection management, and its high toxicity with an inappropriate targeting. This, coupled with their emission path length, has generally been thought to limit the use of α -emitters to leukaemias, highly vascularized tumors and metastatic/disseminated disease in which adequate access and appropriate disease size converge. However, their clinical assessment is in the early stage (no phase III studies performed or yet started). ^{213}Bi and ^{211}At are the two nuclides that have been studied so far in therapeutic clinical trials for GBM.

Vaidyanathan *et al.*, mentioned that it is not suitable to link monoclonal antibodies with an alpha particle emitting- radionuclide and particularly ^{211}At . This observation is due to the systemic route of administration (Vaidyanathan and Zalutsky, 2011). Nevertheless, with local administration, it is not the case: two of the clinical trial using alpha emitters mentioned in the table V used a catheter system to deliver the therapeutic agent into the tumor with a mAb as the vector, without toxicity limitations.

Table VII summarizes, radionuclides used in locoregional therapies for GBM. As mentioned above, α -emitters are high-energy particles that travel short distance. Thus, energy deposition takes place immediately at the decay site which avoids excessive radiation of surrounding healthy tissues as compared with β^- -emitters (Humm, 1986). To summarize, a

PREMIERE PARTIE

limitation of having an alpha particle is that only few cells take up the radioactivity effectiveness. We can notice that the uses of radionuclides which offer the possibility to deliver high focal energy need a shorter physical half-life in order to leave healthy cells intact. Most of radionuclides used in clinical trials are beta-emitting-radionuclides. They are produced by nuclear reactor and few of them are easy available by a generator.

Efficiency is depending on the penetration range of the alpha or beta particules and closely linked with the vector guide combined with them.

Various combinations of targeting vehicles and radionuclides have been investigated in molecularly targeted radiotherapy and will now be developed.

PREMIERE PARTIE

Tableau VII: Chronological classification of available therapeutic radionuclides for MG clinical and pre-clinical trials (physical characteristics).

	Isotope	Nomenclature	Year of use	Particules rays	Radiation energy (Emax)	Mean β- range	Half-life	Method of production	
Brachytherapy	Iridium 192	¹⁹² Ir	1967, 1980,	β- and γ	672 keV – 317 keV		73,8 days	nuclear reactor	
	Gold 198	¹⁹⁸ Au	1980	β- and γ	961 keV - 412 keV	11 mm	2,7 days		
	Iodine 125	¹²⁵ I	1984, 1998, up to now	X, γ and Auger	27-35 keV	10 nm	59,9 days	nuclear reactor	
	Cobalt 60	⁶⁰ Co	1986, 1989	β- and γ	318 keV - 1,332 MeV		5,27 years	nuclear reactor	
Targeted internal radiotherapy	Iodine 131	¹³¹ I	1985, 1995, 1997, 1998, 2000, 2006, 2007, 2011	β- and γ; e ⁻	606 keV – 365 keV – 46 keV	0,4 mm	8,02 days	nuclear reactor	Monoclonal antibodies
	Iodine 125	¹²⁵ I	1990, 2010	X, γ and Auger	27-35 keV	10 nm	59,9 days	nuclear reactor	
	Yttrium 90	⁹⁰ Y	1999, 2000	pure β	2,28 MeV	3,6 mm	2,7 days	nuclear reactor or ⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y generator	
	Rhenium 188	¹⁸⁸ Re	2008	β- and γ	2,12 MeV – 155 keV	2,1 mm	16,9 hours	¹⁸⁸ W/ ¹⁸⁸ Re generator	
	Astate 211	²¹¹ At	2008	α	6,8 MeV	55-80 μm	7,2 hours	cyclotron	Peptides
	Yttrium 90	⁹⁰ Y	1999, 2002, 2006, 2010	pure β	2,28 MeV	3,6 mm	2,7 days	nuclear reactor or ⁹⁰ Sr/ ⁹⁰ Y generator	
	Bismuth 213	²¹³ Bi	2006, 2010	α	8,5 MeV	50-90 μm	45 minutes	²²⁵ Ac/ ²¹³ Bi generator	
	Lutetium 177	¹⁷⁷ Lu	2006	β- and γ	497 keV – 208 keV	0,7 mm	6,71 days	nuclear reactor	
	Iodine 131	¹³¹ I	2006	β- and γ; e ⁻	606 keV – 365 keV – 46 keV	0,4 mm	8,02 days	nuclear reactor	
Future prospects									New vectors
	Holmium 166	¹⁶⁶ Ho	2005	β- and γ	666 keV – 80 keV	3,2 mm	26,8 hours	nuclear reactor	
	Gold 198	¹⁹⁸ Au	2012	β- and γ	961 keV - 412 keV	11 mm	2,7 days		
	Rhenium 186	¹⁸⁶ Re	2012	β- and γ	1,07 MeV- 137 keV	1,2 mm	3,78 days	high flux reactor	

II.2 Technical procedures for applying radionuclides to the brain

The first route of administration used was the systemic injection. However, it was soon understood that this method had limitations (toxicity, insufficient concentration into the tumor due to BBB, poor penetration). To overcome this, direct methods were developed and tested in clinical trials.

Brachytherapy consists in an interstitial or intracavitary irradiation using radioactive material (seeds or wires) implanted in the tumor bed after a tumorectomy. The milimetric dimension seeds are manufactured as a titanium tube encapsulated an inner capsule containing silver wire with the adsorbed ^{125}I . Another material consists in a flexible iridium-platinum wire.

Liquid brachytherapy source exists as GlioSite®. It is a biocompatible material composed with an inflatable double-wall balloon catheter that is placed in the resection cavity at the time of surgical resection. Then it is filled temporary with low-dose rate ^{125}I solution (Iotrex™) and acts on the edge of the cavity. The balloon diameter is comprised between 2 cm and 4 cm and the outer balloon is a rupture caution. MammoSite® use high dose rate ^{192}Ir source.

Other techniques of vectors injection comprise reservoir or CED. The first one is usually used in clinic: the Ommaya or Rickham reservoirs are devices comprising 2 parts: a container placed under the skin on the head and a catheter connected to the container. It can be used to remove the cerebral spinal fluid from the ventricule for analyses or to inject drugs into the cavity. Multiple radiopharmaceutical injections can be administrated at different time point. Adverse effects were imputed to this mode of administration like infection, edema, fever, catheter obstruction...

CED is another local technique of administration for drug. One or more catheters allow a slower and higher distribution within tissue with a control flow rate.

The risks for all these procedures are the infection at the site of catheter insertion, the device deformation, the position deviation, and problems which can occur during the removal.

II.3 Molecular targeting of radionuclides in GB treatment

Significant progress has been made in our understanding of the molecular pathogenesis and signaling pathways that drive gliomagenesis and tumor cell invasion. This knowledge allows the identification of cellular targets and therefore dusted not only the concept of brachytherapy but also that of the “magic bullet” one described many years ago by Paul Ehrlich (Strebhardt and Ullrich, 2008). Based on the use of nanomedicine (monoclonal antibodies, peptides or even a biomimetic vector) as radionucleide carriers to focus radiation from a specific target, internal radiotherapy that harness nanomedicines can be designed from the beginning to reach a specific target overexpressed in GBMs and can therefore boost radiation of GBMs in a predictable fashion.

Now, functions for GBM targeting and therapy of vectors like monoclonal antibodies, peptides will be describe.

II.3.1 Monoclonal antibodies

Radiolabeled monoclonal antibody therapies were an important breakthrough 30 years ago or the treatment of glioma (Lee et al., 1988). A key step in the emergence of targeted radiotherapy was the development of hybridoma/monoclonal antibody (mAb) technology by Köhler and Milstein (Kohler and Milstein, 1975). During the 1980s, the generation of murine mAbs against tumour-associated antigens became a focal point of research. As a consequence, mAb guided radiation therapy, or radioimmunotherapy (RIT), was the first targeted radiotherapy approved by the US Food and Drug Administration (FDA) with two anti-CD20 mAb regimens involving radionuclides for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Zevalin (Biogen Idec) and Bexxar (Corixa/ GlaxoSmithKline), which are based on the radiolabelled mAbs ^{90}Y -ibritumomab and ^{131}I -tositumomab, respectively (Goldsmith, 2010, Milenic et al., 2004).

PREMIERE PARTIE

Regarding GBM treatment, the choice of the proper target is critical to achieve a local radiotherapy using radiolabelled mAbs to limit radiation of healthy brain tissue. Hence, several mAbs have been investigated but only two specific targets have led to relevant clinical trials: epidermal growth factor receptor (EGFR), and tenascin (TN).

EGFR was the first well-defined specific target which led to clinical trial for malignant gliomas (Milenic et al., 2004). EGFR is a tyrosine kinase transmembrane receptor that binds EGF and transforming growth factor α (Schlessinger, 2000). EGFR plays an important role in normal cell proliferation and in the genesis of several cancers. Indeed, it has been described that EGFR is overexpressed in malignant glioma cells (Carlsson et al., 2006, Ekstrand et al., 1991, Voelzke et al., 2008, Wong et al., 1987). Growth of glioma is angiogenesis-dependent. Thus, the effect on the vasculature has a direct impact on the tumor growth. Therefore, EGFR antagonist was firstly radiolabelled with iodine-125, then with rhenium-188 to generate a local radiotherapy of GBM. Among anti-EGFR mAb, h-R3 (nimotuzumab) has a high affinity for EGFR, particularly for its extracellular domain. After the inactivation of tyrosine kinase functions, it produces an antiproliferative effect and neutralizes the production of VEGF (antiangiogenic effect) (Crombet-Ramos et al., 2002). The mAb can be negatively influenced by changes occurred in the receptor like mutation, down-expression, a disorganized vascularization... Thanks to the high h-R3 retention in tumor site and its biological half-life of 22.7 ± 8.9 hours (Casaco et al., 2008), the radiolabeling with ^{188}Re (half-life of 17 hours) is optimal and seems efficient against gliomagenesis during this period.

Concerning TN, it is a 6-armed glycoprotein antigen that is present in the extracellular matrix in many cancer. In malignant brain tumors, tenascin is overexpressed in 90% of all gliomas and is correlated with high proliferation index and high vascularization (Behrem et al., 2005, Orend, 2005, Orend and Chiquet-Ehrismann, 2006). In addition, tenascin is located primarily around tumor blood vessels, with this feature becoming more predominant with advancing tumor grade (Herold-Mende et al., 2002). Hence, tenascin is a proper target for radioimmunotherapy of GBMs with the different choice of epitope. BC-2 mAb binds to an

PREMIERE PARTIE

epitope found both on the A1 and the A4 alternatively spliced fibronectin type III repeats, and BC-4 mAb reacts with an epitope in the epidermal growth factor-like repeat found on all tenascin isoforms (Balza et al., 1993). The 81C6 mAb interacts with an epitope present within the alternatively spliced fibronectin III CD segment (Bourdon et al., 1983). Antibodies reactive with alternatively spliced regions of the tenascin molecule instead of those present on all isoforms should be preferred because they should increase the relative reactivity with tumor compared with liver and spleen, normal organs that express tenascin. Ch81C6 labelled with alpha emitter provides an interesting pharmacokinetics. The antibody stays during all the radioisotope decay in the tumor cavity permitting a continuous action.

The indirect targeting with ^{131}I -chTNT-1/B mAb is active up to 46 hours in order to ionize GBM cells neighbor of dying targeted ones and at a maximal distance of beta particules of 2.4 mm.

The large molecular mass of antibodies and their low capacity to diffuse have led to the development of other targeting strategies such as the peptide receptor radiotherapy (Behr et al., 1998, Reubi, 2003, Waitz et al., 2011).

II.3.2 Peptides

Peptides are composed by a number of amino acids which can vary. They do not present a well-defined three-dimensional structure in contrast to proteins. Most peptides used for radiotherapy purposes are synthetic ones because of the instability of natural peptides. They bind to G-protein-coupled receptors that are located and overexpressed on the plasma membrane of tumor cells (Fani et al., 2012). Peptides can be hydrophilic with a good permeability property, which allows an easy and rapid access to tumor site after systemic injection. Moreover, their ability to diffuse to reach invading tumor cell clusters that migrate along vascular clefts. However, peptides cannot cross the BBB, except if the latter is disrupted which can be notably the case with malignant gliomas (Black and Ningaraj, 2004, Haldemann et al., 1995, Mehdipour and Hamidi, 2009). In this context, as developed

PREMIERE PARTIE

previously, pilot and phase I studies used a local injection into the tumor or an intracavitary administration through an implanted catheter system connected to a reservoir (Rickam or Ommaya).

The peptides have a role to play in nuclear medicine due to their easy synthesis, favorable pharmacokinetics and low antigenicity (Vaidyanathan and Zalutsky, 2011). Few radiolabeled-peptides have been engineered using a chelating agent for high affinities peptide receptor therapy. Indeed, some authors studied EGF (Sundberg et al., 2003), oxytocin (Chini et al., 2003), cholecystokinin, neurotensin, Arg-Gly-Asp (RGD) motif and chlorotoxin (CTX: ^{131}I -TM-601) (Hockaday et al., 2005, Mamelak et al., 2006, Shen et al., 2005) radiolabeled peptides but most relevant studies reported somatostatin (SST) and substance P (Fani et al., 2012) as specific vectors to target GBM.

SST is a natural small cyclic peptide hormone. Its activity is mediated through 5 specific receptors (SSTR-1 to SSTR-5) located on the membrane of the target cells. SSTR-3 mediates apoptosis in endocrine cells whereas inhibition of cell proliferation is mediated by activation of SSTR-1, SSTR-2 and SSTR-5 (Patel and Srikant, 1997). In addition to these biological actions, SST is known to be a neurotransmitter and neuromodulator in the brain (Cammalleri et al., 2009). SST is a proper target for peptide receptor therapy as GBMs contain SSTR (Haldemann et al., 1995, Reubi et al., 1987) with an overexpression of SSTR-2 (Barbieri et al., 2008, Lamszus et al., 1997, Reubi et al., 1989). However, the conformation of SST makes it extremely sensitive to peptidase (Patel, 1999). Therefore, stable analogs which incorporate a Phe-(D)Trp-Lys-Thr (or a similar sequence) and which metabolically stabilized at both the N- and C- terminals were developed for clinical application. With this modification, the rapid enzymatic degradation is minimized. Three commercially available SST analogs were developed: octreotide ($[(\text{D})\text{-Phe-Cys-Phe-(D)Trp-Lys-Thr-Cys-Thr(ol)}]$), lanreotide $[(\text{D})\beta\text{Nal-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Thr-NH}_2]$ and vapreotide $[(\text{D})\text{Phe-Cys-Tyr-(D)Trp-Lys-Val-Cys-Trp-NH}_2]$ (Fani et al., 2012). The main advantage of these compounds relies in a longer action and a prolonged half-life in plasma and tissues compares to SST (Pawlikowski and Melen-Mucha, 2004).

PREMIERE PARTIE

Radiolabelling was preferentially performed through the macrocyclic chelator DOTA (1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-1, 4, 7, 10-tetraacetic acid), the gold standard chelator able to encapsulate hard radiometals such as yttrium-90 or lutetium-177. Hence, octreotide, lanreotide and vapreotide peptides can be labeled with yttrium-90 (^{90}Y) resulting in stable radioconjugates such as ^{90}Y -DOTATOC ($[\text{}^{90}\text{Y}]\text{-DOTA}^0\text{-D-Phe}^1\text{-Tyr}^3\text{-octreotide}$) or ^{177}Lu -DOTA-TATE ($[\text{}^{177}\text{Lu}]\text{-DOTA}^0\text{-Tyr}^3\text{-octreotate}$) (Merlo et al., 1999, Otte et al., 1997, Otte et al., 1998).

Peptide receptor therapy tested another neuropeptide in order to target directly glioma cells. Substance P (SP) neuropeptide is a 1.8 kDa neurotransmitter from the tachykinin family. It is an undecapeptide: $\text{H-Arg}^1\text{-Pro}^2\text{-Lys}^3\text{-Pro}^4\text{-Gln}^6\text{-Phe}^8\text{-Gly}^9\text{-Leu}^{10}\text{-Met}^{11}\text{-NH}_2$ (Harrison and Geppetti, 2001). SP is involved in the growth and development of astrocytes (Palma et al., 1999) by reaching its cell membrane Neurokinin type1 Receptor (NK1R) which binds to the phospholipase C. This one hydrolyses PKI to second messengers: DAG and IP_3 . NK1R is divided in two isoforms (NK1R-Tr and NKR-FI) which are critical for SP cell internalization and for the therapy outcome (Cordier et al., 2014). Importantly, SP, as well as its receptor, has been shown to be highly expressed in MG cells and peritumoral vessels (Hennig et al., 1995, Kneifel et al., 2006). They support the tumor proliferation and growth thanks to functional responses cascades of Ca^{2+} signalization, channel voltage dependant (Ca^{2+} secretion from the endoplasmic reticulum and influx from extracellular) and PKC phosphorylation (Lazarczyk et al., 2007). Among them, there are the DNA synthesis and the modulation of the secretion of cytokines such as IL-6, TGF- β 1, GM-CSF... Thus, there is an immunosuppressive effect by avoiding the immune system action.

Radiolabeled SP, is administrated in GBM locally and therefore it can directly interact on tumor cells. Alpha radionuclide is a good choice by Costa et al. because of its physical characteristic and particularly the high LET concentrate in cells. The peptidic vector (DOTAGA-SP) is interesting for a stable local control up to 72 hours but quickly sensible to serum peptidase into systemic circulation (fast degradation) (Kneifel et al., 2006). It could be interesting to use antagonist rather than NK1R agonist (SP) in order to block the tumor

PREMIERE PARTIE

progression and vascularization in synergy with the ionizing effects of alpha or beta particles on astrocytoma cells.

The last peptide tested in clinical trials is the chlorotoxin peptide (CTX) and have two distinct and complementary inhibiting actions against glioma infiltration. The natural chlorotoxin peptide (4 kDa - 36 amino-acid) derives from the giant yellow Israeli scorpion *Leiutus quinquestratus*. It is also the ligand and inhibitor of the cell surface enzyme Matrix Metalloproteinase 2 Receptor (MMP-2) in MG infiltrative cells and doesn't bind to normal human tissues (Hockaday et al., 2005). CTX acts through the overexpressed chloride channel (correlated with glioma grade) too and inhibited this one. The channel will then be internalized in cells and the chloride flux stopped (Dardevet et al., 2015, Olsen et al., 2003). This channel seems helpful for glioma infiltration like the MMP-2 (use for the extracellular matrix degradation). *In vitro*, not all cells are sensitive to CTX and there are two binding receptors affinities (Kd values from 0.5 μ M to 9 nM) for this inhibitor (Soroceanu et al., 1998). TM-601 used in a phase I trial, is a high-affinity synthetic version (Mamelak and Jacoby, 2007). ^{131}I -TM-601 $t_{1/2}$ value calculated for the elimination from the Rickham reservoir and the brain are 39 ± 6 h and 45 ± 5 h respectively (Hockaday et al., 2005). At the binding site, up to 8 days, there is few degradation of ^{131}I -TM-601 via the enzymatic cleavage of iodine. Indeed, this peptide is resistant to peptidase. This is a good characteristic because of the half-life of ^{131}I of approximately 8 days. This β -emitter is available during its all period at the principle and secondary tumor sites with a maximal penetration range of 2.4 mm in tissues.

Chemistry works for radiolabeling haven't forget the peptide binding on receptor. Thus, it doesn't block the binding because of the radionuclide optimal position as far as possible from the cell surface receptor. The peptides are used as a guide for radionuclides to the glioma cells expressing a particular receptor in order to achieve higher cure rates in tumours.

Finally, radiolabelled peptides and radio-mAbs have the property to be visible during diagnostic imaging. It could also highlight specific sites of tumor cells infiltration that cannot be visible by routinely imaging technologies (Fani et al., 2012).

III. Opportunities and innovation in applying radionuclide-combined particulate systems to GB

During the last decades, many drug delivery systems have been developed but few of them were tested in clinical trial. This can mainly be ascribed to the novelty of this research field.

Progress in pharmaceutical research field has been exploited in the design of tumor-targeting nanoscale (Ting et al., 2009) and microscale (Salem et al., 2010) carriers able to deliver radionuclides. Indeed, encapsulation of drug improves biodistribution and bioavailability and so allows control tissular and cellular distribution profiles of drugs (Garcion et al., 2006). Thus, biomimetic approach is inspired by effects naturally designed and occurred in all biological categories. To date, treatment strategies for solid neoplasm are limited by the precise access and coverage of tumor site and lack of CT scan or MRI infiltrative cells visibility. Nanomedicine seems to be an interesting direction to study and overcome it. Nanodevice can take a lot of structural forms from linear to a spherical geometry one. For example, using particle systems like dendrimers, liposomes, lipid nanocapsules become a new vehicle of radionuclide by slow flow diffusion by convection for an uniform delivery. In clinical trial, their size is spread between 1 to 1000 nm and most of them are approved by Food and Drug Administration (biocompatible and degradable) (Jain and Stylianopoulos, 2010). Moreover, their size provide attractive characteristics that are the precision and the equal size-fight between glioma cells and high panel of nanotools (Leary, 2010).

Since many years, the development of nanovectors had progressed from a first to a third generation (passive to active state). Indeed, they become more sophisticated in order not to

PREMIERE PARTIE

be directly be eliminated by the body, to stay much longer in blood flow or to target more precisely specific tumor cells (Kamaly et al., 2012).

Moreover, with those new nanomedicine-tools, physician, chemist or nuclear scientists can easily link with few kDa fragment or load in sphere-vehicle suitable radioisotope in order to develop promising radionuclide delivery system. It will become anano-radio-medicine that widely limits uncontrolled and non-specific isotope diffusion in all healthy parts of patient body. The accuracy of this feature may allow reducing the radiation dose delivered into the tumor cavity and so decrease brachytherapy side effect like local radionecrosis.

To sum up, it combines medicine, science and radio-technology in order to develop internal nano-radiomedicine for MG imagery & therapy field.

Attractive progresses in radioprotection and chemist field ensure the access to new radionuclides. In this final part, we will discuss radionuclide-combined particulate systems (micro- and nano- particles systems) that are in development for a potential therapeutic application in neuro-oncology.

As described previously, among radioactive isotope-carrier possibilities, there is the field of nanotechnology that represents a nanometer scale for drug delivery. All of them have an adjustable surface or core in order to bind specifically the active tumor target for medical applications (McNeil, 2005).

Nanomedicine using particle systems such as liposomes becomes a promising carrier to improve the radionuclide biodistribution and bioavailability therefore controlling its tissular and cellular distribution profiles. This type of lipid nanoparticle loaded with Rhenium-186 or Technetium-99m (100nm diameter) was tested by Phillips *et al.* in 2012 for image tracking and therapy (Phillips et al., 2012). In U87MG glioma cells implanted nude rats, a local administrated volume of 25 μ L cover better the site without infiltration far from the injection site and toxicity. In this study, 100 Gy is the minimal effective dose with a significant greater Median Survival (MS) for treated animals. Indeed, there is a MS of 49 days for an injection of non-radioactive liposomes in control rats and a MS increased by 77 more days for liposomes

PREMIERE PARTIE

loaded with ^{186}Re group. Furthermore a mean dose of 1700 Gy shows efficacy on another model of more invasive xenografted GBM (rats bearing U251 GBM cells (Median Survival over 120 days)). More recently, Huang *et al.* (Huang *et al.*, 2015) have evaluated in an orthotopic F98 glioma model, the ^{188}Re -labeled PEGylated nanoliposome (Polyethylene Glycol) as an intravenously therapeutic agent. PEG endows a steric stabilization and limits the recognition by the reticuloendothelial system. The liposomal surface affects positively the Vd when it injected by CED.

Another prospect was mainly developed by Benoit *et al.* using tensioactive lipid nanocapsules (LNC). These nanocarriers are biomimetic, with a size ranging from 20 to 100 nm that mimic lipoproteins (Heurtault *et al.*, 2002). They are characterized by a hybrid structure between polymer nanocapsules and liposomes. LNC are prepared by solvent free, soft energy procedure conferring them a great stability.

The formulation is simple and based on phase inversion temperature (PIT) process (Shinoda K, 1969). All components are approved by the Food Drug Administration (FDA) for oral, topical and parenteral administration. A first approach by Beduneau *et al.* has functionalized LNC in order to deliver intracranial therapeutic agents. Thus various drugs; such as etoposide, docetaxel, paclitaxel, technetium-99m, rhenium-188; are encapsulated into these lipid nanovectors in order to create immuno or radionanocapsules (Allard *et al.*, 2008, Beduneau *et al.*, 2008, Beduneau *et al.*, 2007, Garcion *et al.*, 2006, Huynh *et al.*, 2009, Lacoeyille *et al.*, 2007, Morille *et al.*, 2010, Vanpouille-Box *et al.*, 2011a, Vanpouille-Box *et al.*, 2011b). Thus, loading a radioactive therapeutic isotope within LNC is possible only if the element has undergone chemical modifications to assign it lipophilic properties.

Recent progress in rhenium-188 chemistry led to the development of a patented lipophilic complex of rhenium-188 sodium dithiobenzoate (^{188}Re -SSS) (Lepareur *et al.*, 2005).

All in all, encapsulation of ^{188}Re -SSS within LNC creates high activity nano-objects for internal radiation application.

In 2008, ^{188}Re -lipid nanocapsules (LNC ^{188}Re -SSS) were injected into MG rat models by an interesting delivery system: CED for a better volume delivery. This method of administration

PREMIERE PARTIE

was first tested by Allard *et al.* (Vanpouille-Box *et al.*, 2011a). It is certified that more than 90% of the radioactive lipophilic complex was charged into LNC. Furthermore, this vehicle is essential for a retention and localization effect of ^{188}Re in brain: I.e because of weak retention on site for perrhenate alone (more than 90% in urine and faeces 72 h post-CED vs 10%). Internal LNC ^{188}Re -SSS administration feasibility was performed and was highly conclusive. A single 8 Gy dose of LNC ^{188}Re -SSS (with a 60 μL total infuse volume and a flow rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) six days after MG development shows a survival efficacy (MST of 80%) (Allard *et al.*, 2008). This study identifies the interest and the feasibility of this internal radiation strategy. Three years later, Vanpouille-Box *et al.* confirmed the importance of the LNC loaded ^{188}Re administration route and demonstrated that a multi-fractionated treatment (combination of two injection techniques (simple injection 10 μL with a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ and CED 60 μL during 2 h) was more efficient useful and effective in order to obtain promising results in term of rats long term survival (median survival up to 45 days). Previously, getting of long term survival was not significantly formally obtained. Thus, they optimized the strategy studied by Allard *et al.* for an early and/or a late stage GBM development with day six and day twelve or day twelve and day eighteen (MST of 83%) LNC ^{188}Re -SSS injection. Futhermore, it was found that the activity gradient revealed by the two injections methods (SI and CED) is indispensable for long-term survivors. 96 hours post treatment, the major part of the activity remains within the brain and this in any form of administration (small volume single injection or high volume CED). Internal LNC ^{188}Re -SSS administration feasibility was performed and was highly conclusive. The radioactive effect goes along with a local and peripheral immune response and immune protection up too.

From these results, it could be anticipated that rhenium would be a usefull radioisotope for solid tumor because it induces less radiation toxicity than other radionuclides because of its little tissue penetration. A new clinical trial supported by Andrew J Brenner and started in March 2014 (during three years: end March 2017) in The Cancer Therapy and Research Center at UTHSCSA (San Antonio, Texas) uses this characteristic and suggests to highlight

PREMIERE PARTIE

this effect with the improvement of the localization state directly in recurrent confirmed malignant brain tumor. Patients enrolled in this study are refractory to standard treatment. The objectives of this ongoing trial are: 1) test the nanoliposomes (~100nm) as Rhenium-186 (beta and gamma particules) vector (186RNL): 2) find the highest dose that could be injected and 3) evaluate how it is safe, this activity efficacy and patient become. They will follow rhenium behavior after a single CED injection through a catheter by SPECT-imaging (Andrew, 2014).

With the imaging capabilities (γ rays) of the radioactive isotope ^{177}Lu , Wilson et al (Wilson et al., 2012) studied in two GBM mice models the therapeutic potential of ^{177}Lu -DOTA-f-Gd₃N@C₈₀ (β emitters). This radionuclide-carrier is a metallofullerenes that was injected into the tumor by convection-enhanced delivery (CED). An approximately 1MBq single dose improves survival. Authors compared a xenograft model of U87MG with a more aggressive cell line GBM12 tumor in athymic Nude-Foxn1nu mice. They demonstrated that 1.35 mBq of ^{177}Lu -DOTA-f-Gd₃N@C₈₀ increase survival time (~80% day 100 vs 20,7 and 30,3 days for control mice) for both cell lines (Shultz et al., 2011). Furthermore, this vehicle is able to achieve a stable radiolabelling with the use of the DOTA chelate. It was demonstrated that the nanocarrier alone provide less therapeutical effects than the radiolabelled f-Gd₃N@C₈₀ one (2.51 times increased of ST).

This radioactive isotope was tested for a peptide therapy application too. Knottins 2,5D and F are an artificial ligand that highly interacts with MG cells whose overexpressed integrin receptors. Those receptors are important to ensure the continued existence of the tumor cells. The therapeutic assay in mice bearing U87MG tumors demonstrated encouraging responses to 2,5F DOTA- ^{177}Lu peptide therapy (Jiang et al., 2011). It is the best artificial peptide for *in vitro* cells-interaction and biodistribution studies compared with 2,5D. Furthermore, the blank carrier binds specifically to their receptor as well as radiolabeled carrier.

PREMIERE PARTIE

As described above (peptide receptor therapy part), TM-601 chlorotoxin (CTX) extract peptide can be labeled with Iodine-131. It shows great local results for imagery (SPECT) and therapy fields (Hockaday et al., 2005).

Recently, Costa *et al.* try to use a 180nm neutral stable nucleic acid lipid particle (SNALP) in mice xenograft (U87MG) or syngeneic model (GL261) (Costa et al., 2013). This protective carrier limits enzyme damage and allows the engraftment of chlorotoxin on its surface. However, in this study, the carrier was injected in peripheral vein and not directly into the tumor mass. The results for this guided therapy are promising, indeed, thanks to chlorotoxin labeling, tumor cells internalized well the drug-carrier (Fu et al., 2012).

In perspective it can be suggest to try to radiolabel this chlorotoxin strategy or incorporate directly ^{177}Lu -DOTA-TM-601 instead of CTX. In that case, it can not only target specifically the tumor mass with the ligand but also, it will provide two more advantages 1) the cells degradation through the isotope radiation and 2) deliver a drug or a silencing RNA.

Of Note, dendrimers have also shown great promises for carrying radionuclides (He et al., 2011, Sarin et al., 2008). Sarin *et al.* used a biocompatible polyamidoamine (PAMAM) dendrimers that allows the imaging of GBM by gadolinium MRI and bypass the BBB. This carrier was recently developed and characterized for brachytherapy application after the load of ^{198}Au nanoparticles (Ritawidya et al., 2012). However, it is not test *in vivo* yet.

Recently, Chen et al., evaluated a radio-photothermal therapy based on ^{131}I reduced graphene oxide (^{131}I RGO-PEG). This two dimensional sp² carbon nanocarrier, permits tumor gamma imaging tracking too. After a subcutaneous injection of breast cancer cells in femel Balb/c mice and when the tumor volume reaches approximately 100 mm³, ^{131}I RGO-PEG is intravenously injected. 24 h post injection, ^{131}I RGO-PEG accumulated in tumor site. Furthermore, a localized heating in the tumor region was shown under 808 nm laser irradiation (0.2W/cm²) during 20 min and inhibited growth. It is highlighted that the

PREMIERE PARTIE

radionuclide acts during its radioactivity decay half-life ($^{131}\text{I} = 8$ days), then the tumor regain its growth speed. It will be interesting to test this internal activated radio-photothermal nanocarrier on glioma (Chen et al., 2015).

An evolution of the brachytherapy seed system with a radioactive solution which becomes gelatinized in vivo was tested in C6 glioma cells – rat model. It is the holmium-166 chitosan complex (Huh et al., 2005). We don't need to remove this biomaterial. Thus, it avoids another surgery and some complications like infection and hemorrhages. Holmium-166 is a beta (94%) and gamma (6%) emitters. In this pre-clinical model, it induced cytonecrosis. However, this study needs more investigations concerning the optimal injected dose and benefit effects.

All these new experimental results are strong foundations that strengthen the idea of a translation toward a clinical trial. However, before translating these technologies to clinic, investigators have to plan an enlarge evaluation of their radio-strategy against MG in other preclinical model for example a large naturally occurring MG canine model.

Although therapeutic pre-clinical trials in cancer-bearing dogs are not routinely integrated in anti-cancer drug development process, interest for these new “spontaneous” cancer models is growing. One of the major concerns in oncology translational research is to improve predictive value of models used for innovating therapeutic studies.

Important work of the American National Cancer Institute, published in prestigious journals (Khanna et al., 2009), have shown that companion animals could represent relevant model for human cancer research, under following conditions: 1) homology between the human cancer of interest and the canine tumor is established, 2) presence of the therapeutic target is assessed in the dog and 3) compatibility of the question that researchers want to address in the dog with higher veterinary oncology standards and ethics.

The canine model was chosen because it exhibits wide similarities with the human glioblastomas such as epidemiologic (share the same environmental life as humans),

PREMIERE PARTIE

neuroanatomy, physiology (the glioma grade is linked with high expression of epidermal growth factor receptor EGFR, p53 mutation, vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor receptor and insulin-like growth factor-binding protein 2: (Higgins et al., 2010, Lipsitz et al., 2003, Rowell et al., 2011, Stoica et al., 2011) and response to conventional therapy (Kimmelman and Nalbantoglu, 2007). This realistic canine model was already used to develop and set up brachytherapy and surgery protocols many years ago because of its dimension allowing a surgical approach like in human patients and in which the distance separating the brachytherapy seed from the remaining tumor cells would be similar to the situation in the human patient (Dickinson et al., 2010, Platt et al., 2012, Pradilla et al., 2006, Stubbs et al., 2002, Valles et al., 2009, Varenika et al., 2008). It provides a great alternative to rodent models and might contribute to predict the toxicity, efficiency of a new treatment strategy (Porrello et al., 2004, Porrello et al., 2006).

Therefore, evaluation of brachytherapy for the treatment of dog malignant gliomas was firstly described in 1983 by Ostertag *et al.* (Ostertag et al., 1983). They used healthy Beagle to investigate 131.35 MBq Iodine-125 titanium seeds and their incidence in surrounding tissues. Secondly, in 1984, *in vivo* dosimetry studies were already done in canine with 4,5 to 229.4 MBq iridium-192 non-permanent implants (Sewchand et al., 1984). Two years later, the effects (25 to 362 days analyses) of this same radioisotope was tested for a permanent use (Janzer et al., 1986). More recently, dog brain was used to deliver 125-Iodine brachytherapy directly into resection cavity through a balloon catheter to test the administration technique (Stubbs et al., 2002). In this pre-clinical application, dogs tolerated the apparatus well and the apparatus played its role of retention of ^{125}I at the site. This is also an important concern for radioprotection. There were some limitations with this balloon procedure such as cavity size, neurological risks and leakage in ventricle compartment that could compromise the therapeutic dose delivery.

Companion model gives the opportunity to have a better approach for the glioma therapeutical interest. Thus, it is a key model for a transition between laboratory and clinic.

CONCLUDING REMARKS

We have shown that, although a wide variety of internal radiation therapy agents have been tested in early clinical trials phases for the malignant gliomas management, there is a real need for developing new modalities since there is no curative treatment for this pathology so far. It becomes fundamental to explore multidisciplinary approach in order to find the appropriate innovative high grade astrocytoma therapeutic concept. The results from pilot studies, phases I and II trials were not followed by phase III trials. Potent pre-clinical results are needed to manage an appropriate trial in human scale. Even if progress obtained in animal models can sometimes be inconclusive at a human scale application, strategies will be revised, completely reinvented or change tack for another disease. All new medicines are constructive and of interest for a future application. Thanks to his analogy with human brain neoplasms, the canine model is the first key approved step before manage a phase I trial. With his large scale analysis, this spontaneous glioma model will give more informations which can be easily translate to human application.

Dose deposited depend on radionuclide and our knowledge on an optimal dosimetry is very restricted and not well comprehend in clinical trial. This parameter is indispensable because it determines the radionuclide pertinence and not least the therapeutical efficiency. But no cure was achieved.

Evolution from a simple injected device to a more sophisticated that specifically target malignant glioma cells have emerged since a hundred years. We can highlight that for the majority of trials reviewed in this work, there is a tendency for using Ommaya/Rickham reservoir in the tumor cavity. We can define this strategy like a deposit in an empty space where molecules have to reach their target sites on glioma cells. The localized delivery is highly complex and is difficult to be predictable. Indeed, the radioactive medicine dispersion is influencing by many biological and technical parameters (ability of penetration, distance,

PREMIERE PARTIE

cavity, tissue, pressure, volume of injection, flow rate, catheter design, placement, trajectory...).

As analyzed in this review, there are many available radionuclides. Although there are still many challenges, the choice of the effective radionuclide for malignant gliomas internal radiation therapy must be well consider and patient dependent.

References

1. Akabani, G., Cokgor, I., Coleman, R.E., Gonzalez Trotter, D., Wong, T.Z., Friedman, H.S., . . . Zalutsky, M.R. (2000) Dosimetry and dose-response relationships in newly diagnosed patients with malignant gliomas treated with iodine-131-labeled anti-tenascin monoclonal antibody 81C6 therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46, 947-958.
2. Allard, E., Hindre, F., Passirani, C., Lemaire, L., Lepareur, N., Noiret, N., . . . Benoit, J.P. (2008) 188Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35, 1838-1846.
3. Andrew, B. (2014) Maximum Tolerated Dose, Safety, and Efficacy of Rhenium Nanoliposomes in Recurrent Glioblastoma. clinicaltrials.gov.
4. Balza, E., Siri, A., Ponassi, M., Caocci, F., Linnala, A., Virtanen, I., and Zardi, L. (1993) Production and characterization of monoclonal antibodies specific for different epitopes of human tenascin. *FEBS letters* 332, 39-43.
5. Barbieri, F., Pattarozzi, A., Gatti, M., Porcile, C., Bajetto, A., Ferrari, A., . . . Florio, T. (2008) Somatostatin receptors 1, 2, and 5 cooperate in the somatostatin inhibition of C6 glioma cell proliferation in vitro via a phosphotyrosine phosphatase-eta-dependent inhibition of extracellularly regulated kinase-1/2. *Endocrinology* 149, 4736-4746.
6. Beduneau, A., Hindre, F., Clavreul, A., Leroux, J.C., Saulnier, P., and Benoit, J.P. (2008) Brain targeting using novel lipid nanovectors. *J Control Release* 126, 44-49.
7. Beduneau, A., Saulnier, P., and Benoit, J.P. (2007) Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials* 28, 4947-4967.
8. Behr, T.M., Memtsoudis, S., Sharkey, R.M., Blumenthal, R.D., Dunn, R.M., Gratz, S., . . . Becker, W. (1998) Experimental studies on the role of antibody fragments in cancer radio-immunotherapy: Influence of radiation dose and dose rate on toxicity and anti-tumor efficacy. *Int J Cancer* 77, 787-795.
9. Behrem, S., Zarkovic, K., Eskinja, N., and Jonjic, N. (2005) Distribution pattern of tenascin-C in glioblastoma: correlation with angiogenesis and tumor cell proliferation. *Pathology oncology research : POR* 11, 229-235.
10. Beutler, D., Avoledo, P., Reubi, J.C., Macke, H.R., Muller-Brand, J., Merlo, A., and Kuhne, T. (2005) Three-year recurrence-free survival in a patient with recurrent medulloblastoma after resection, high-dose chemotherapy, and intrathecal Yttrium-90-labeled DOTA0-D-Phe1-Tyr3-octreotide radiopeptide brachytherapy. *Cancer* 103, 869-873.

PREMIERE PARTIE

11. Bigner, D.D., Brown, M.T., Friedman, A.H., Coleman, R.E., Akabani, G., Friedman, H.S., . . . Zalutsky, M.R. (1998) Iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with recurrent malignant gliomas: phase I trial results. *J Clin Oncol* 16, 2202-2212.
12. Black, K.L. and Ningaraj, N.S. (2004) Modulation of brain tumor capillaries for enhanced drug delivery selectively to brain tumor. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* 11, 165-173.
13. Bodei, L., Kassis, A.I., Adelstein, S.J., and Mariani, G. (2003) Radionuclide therapy with iodine-125 and other auger-electron-emitting radionuclides: experimental models and clinical applications. *Cancer Biother Radiopharm* 18, 861-877.
14. Boiardi, A., Bartolomei, M., Silvani, A., Eoli, M., Salmaggi, A., Lamperti, E., . . . Paganelli, G. (2005) Intratumoral delivery of mitoxantrone in association with 90-Y radioimmunotherapy (RIT) in recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 72, 125-131.
15. Bourdon, M.A., Wikstrand, C.J., Furthmayr, H., Matthews, T.J., and Bigner, D.D. (1983) Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. *Cancer research* 43, 2796-2805.
16. Brady, L.W., Markoe, A.M., Woo, D.V., Rackover, M.A., Koprowski, H., Steplewski, Z., and Peyster, R.G. (1990) Iodine-125 labeled anti-epidermal growth factor receptor-425 in the treatment of malignant astrocytomas. A pilot study. *Journal of neurosurgical sciences* 34, 243-249.
17. Brady, L.W., Miyamoto, C., Woo, D.V., Rackover, M., Emrich, J., Bender, H., . . . et al. (1992) Malignant astrocytomas treated with iodine-125 labeled monoclonal antibody 425 against epidermal growth factor receptor: a phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22, 225-230.
18. Brandes, A.A., Compostella, A., Blatt, V., and Tosoni, A. (2006) Glioblastoma in the elderly: current and future trends. *Critical reviews in oncology/hematology* 60, 256-266.
19. Bredel, M. (2001) Anticancer drug resistance in primary human brain tumors. *Brain research. Brain research reviews* 35, 161-204.
20. Brown, M.T., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., McLendon, R.E., Reiman, R., . . . Bigner, D.D. (1996) Intrathecal 131I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with leptomeningeal neoplasms or primary brain tumor resection cavities with subarachnoid communication: phase I trial results. *Clin Cancer Res* 2, 963-972.
21. Burger, P.C. and Green, S.B. (1987) Patient age, histologic features, and length of survival in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer* 59, 1617-1625.

PREMIERE PARTIE

22. Cammalleri, M., Martini, D., Timperio, A.M., and Bagnoli, P. (2009) Functional effects of somatostatin receptor 1 activation on synaptic transmission in the mouse hippocampus. *Journal of neurochemistry* 111, 1466-1477.
23. Carlsson, J., Ren, Z.P., Wester, K., Sundberg, A.L., Heldin, N.E., Hesselager, G., . . . Nister, M. (2006) Planning for intracavitary anti-EGFR radionuclide therapy of gliomas. Literature review and data on EGFR expression. *J Neurooncol* 77, 33-45.
24. Casaco, A., Lopez, G., Garcia, I., Rodriguez, J.A., Fernandez, R., Figueredo, J., . . . Suarez, N. (2008) Phase I single-dose study of intracavitary-administered Nimotuzumab labeled with 188 Re in adult recurrent high-grade glioma. *Cancer biology & therapy* 7, 333-339.
25. Chen, L., Zhong, X., Yi, X., Huang, M., Ning, P., Liu, T., . . . Yang, K. (2015) Radionuclide (¹³¹I) labeled reduced graphene oxide for nuclear imaging guided combined radio- and photothermal therapy of cancer. *Biomaterials* 66, 21-28.
26. Chini, B., Chinol, M., Cassoni, P., Papi, S., Reversi, A., Areces, L., . . . Bussolati, G. (2003) Improved radiotracing of oxytocin receptor-expressing tumours using the new [¹¹¹In]-DOTA-Lys8-deamino-vasotocin analogue. *British journal of cancer* 89, 930-936.
27. Cokgor, I., Akabani, G., Kuan, C.T., Friedman, H.S., Friedman, A.H., Coleman, R.E., . . . Bigner, D.D. (2000) Phase I trial results of iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 treatment of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J Clin Oncol* 18, 3862-3872.
28. Cordier, D., Forrer, F., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Good, S., . . . Merlo, A. (2010a) Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ²¹³Bi-DOTA-[Thi8, Met(O2)11]-substance P: a pilot trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37, 1335-1344.
29. Cordier, D., Forrer, F., Kneifel, S., Sailer, M., Mariani, L., Macke, H., . . . Merlo, A. (2010b) Neoadjuvant targeting of glioblastoma multiforme with radiolabeled DOTAGA-substance P--results from a phase I study. *J Neurooncol* 100, 129-136.
30. Cordier, D., Gerber, A., Kluba, C., Bauman, A., Hutter, G., Mindt, T.L., and Mariani, L. (2014) Expression of different neurokinin-1 receptor (NK1R) isoforms in glioblastoma multiforme: potential implications for targeted therapy. *Cancer Biother Radiopharm* 29, 221-226.
31. Costa, P.M., Cardoso, A.L., Mendonca, L.S., Serani, A., Custodia, C., Conceicao, M., . . . Pedroso de Lima, M.C. (2013) Tumor-targeted Chlorotoxin-coupled Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery to Glioblastoma Cells: A Promising System for Glioblastoma Treatment. *Molecular therapy. Nucleic acids* 2, e100.

PREMIERE PARTIE

32. Crombet-Ramos, T., Rak, J., Perez, R., and Vilorio-Petit, A. (2002) Antiproliferative, antiangiogenic and proapoptotic activity of h-R3: A humanized anti-EGFR antibody. *Int J Cancer* 101, 567-575.
33. Dardevet, L., Rani, D., Aziz, T.A., Bazin, I., Sabatier, J.M., Fadl, M., . . . De Waard, M. (2015) Chlorotoxin: a helpful natural scorpion peptide to diagnose glioma and fight tumor invasion. *Toxins* 7, 1079-1101.
34. de Jong, M., Bakker, W.H., Krenning, E.P., Breeman, W.A., van der Pluijm, M.E., Bernard, B.F., . . . Macke, H.R. (1997) Yttrium-90 and indium-111 labelling, receptor binding and biodistribution of [DOTA0,d-Phe1,Tyr3]octreotide, a promising somatostatin analogue for radionuclide therapy. *European journal of nuclear medicine* 24, 368-371.
35. Dickinson, P.J., LeCouteur, R.A., Higgins, R.J., Bringas, J.R., Larson, R.F., Yamashita, Y., . . . Bankiewicz, K.S. (2010) Canine spontaneous glioma: a translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro Oncol* 12, 928-940.
36. Ekstrand, A.J., James, C.D., Cavenee, W.K., Seliger, B., Pettersson, R.F., and Collins, V.P. (1991) Genes for epidermal growth factor receptor, transforming growth factor alpha, and epidermal growth factor and their expression in human gliomas in vivo. *Cancer research* 51, 2164-2172.
37. Epenetos, A.A., Courtenay-Luck, N., Pickering, D., Hooker, G., Durbin, H., Lavender, J.P., and McKenzie, C.G. (1985) Antibody guided irradiation of brain glioma by arterial infusion of radioactive monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor and blood group A antigen. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290, 1463-1466.
38. Fani, M., Maecke, H.R., and Okarvi, S.M. (2012) Radiolabeled peptides: valuable tools for the detection and treatment of cancer. *Theranostics* 2, 481-501.
39. Fu, Y., An, N., Li, K., Zheng, Y., and Liang, A. (2012) Chlorotoxin-conjugated nanoparticles as potential glioma-targeted drugs. *J Neurooncol* 107, 457-462.
40. Garcion, E., Lamprecht, A., Heurtault, B., Paillard, A., Aubert-Pouessel, A., Denizot, B., . . . Benoit, J.P. (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Molecular cancer therapeutics* 5, 1710-1722.
41. Goetz, C.M., Rachinger, W., Decker, M., Gildehaus, F.J., Stocker, S., Jung, G., . . . Reulen, H.J. (2005) Distribution of labelled anti-tenascin antibodies and fragments after injection into intact or partly resected C6-gliomas in rats. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII 54, 337-344.

PREMIERE PARTIE

42. Goldenberg, D.M. (2001) The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Critical reviews in oncology/hematology* 39, 195-201.
43. Goldsmith, S.J. (2010) Radioimmunotherapy of lymphoma: Bexxar and Zevalin. *Seminars in nuclear medicine* 40, 122-135.
44. Gruber, S.A.G.G.M.T.J.F.G.M.L. (June 2008) Glioblastoma Multiforme: Multidisciplinary Care and Advances in Therapy. *Clinical Review article Hospital Physician*, 9-22, 39.
45. Gutin, P.H., Phillips, T.L., Wara, W.M., Leibel, S.A., Hosobuchi, Y., Levin, V.A., . . . Lamb, S. (1984) Brachytherapy of recurrent malignant brain tumors with removable high-activity iodine-125 sources. *J Neurosurg* 60, 61-68.
46. Haldemann, A.R., Rosler, H., Barth, A., Waser, B., Geiger, L., Godoy, N., . . . Reubi, J.C. (1995) Somatostatin receptor scintigraphy in central nervous system tumors: role of blood-brain barrier permeability. *J Nucl Med* 36, 403-410.
47. Harrison, S. and Geppetti, P. (2001) Substance p. *The international journal of biochemistry & cell biology* 33, 555-576.
48. Hdeib, A. and Sloan, A.E. (2011) Convection-enhanced delivery of ¹³¹I-chTNT-1/B mAB for treatment of high-grade adult gliomas. *Expert opinion on biological therapy* 11, 799-806.
49. He, H., Li, Y., Jia, X.R., Du, J., Ying, X., Lu, W.L., . . . Wei, Y. (2011) PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors. *Biomaterials* 32, 478-487.
50. Hennig, I.M., Laissue, J.A., Horisberger, U., and Reubi, J.C. (1995) Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer* 61, 786-792.
51. Herold-Mende, C., Mueller, M.M., Bonsanto, M.M., Schmitt, H.P., Kunze, S., and Steiner, H.H. (2002) Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression. *Int J Cancer* 98, 362-369.
52. Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., and Benoit, J.P. (2002) A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharmaceutical research* 19, 875-880.
53. Heute, D., Kostron, H., von Guggenberg, E., Ingorokva, S., Gabriel, M., Dobrozemsky, G., . . . Virgolini, I.J. (2010) Response of recurrent high-grade glioma to treatment with (90)Y-DOTATOC. *J Nucl Med* 51, 397-400.
54. Higgins, R.J., Dickinson, P.J., LeCouteur, R.A., Bollen, A.W., Wang, H., Corely, L.J., . . . Fuller, G.N. (2010) Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR,

PREMIERE PARTIE

- PDGFRalpha and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *J Neurooncol* 98, 49-55.
55. Hockaday, D.C., Shen, S., Fiveash, J., Raubitschek, A., Colcher, D., Liu, A., . . . Mamelak, A.N. (2005) Imaging glioma extent with ¹³¹I-TM-601. *J Nucl Med* 46, 580-586.
 56. Hofer, S., Eichhorn, K., Freitag, P., Reubi, J.C., Muller-Brand, J., Maecke, H., and Merlo, A. (2001) Successful diffusible brachytherapy (dBT) of a progressive low-grade astrocytoma using the locally injected peptidic vector and somatostatin analogue [90Y]-DOTA0-D-Phe1-Tyr3-octreotide (DOTATOC). *Swiss medical weekly* 131, 640-644.
 57. Hosobuchi, Y., Phillips, T.L., Stupar, T.A., and Gutin, P.H. (1980) Interstitial brachytherapy of primary brain tumors. Preliminary report. *J Neurosurg* 53, 613-617.
 58. Hsieh, J.C. and Lesniak, M.S. (2005) Surgical management of high-grade gliomas. *Expert Rev Neurother* 5, S33-39.
 59. Hu, X., Qiu, H., Zhang, L., Zhang, W., Ma, Y., Qiao, Z., . . . Zhang, F. (2012) Recurrent gliomas: comparison of computed tomography (CT)-guided ¹²⁵I seed implantation therapy and traditional radiochemotherapy. *Cancer biology & therapy* 13, 840-847.
 60. Huang, F.Y., Lee, T.W., Chang, C.H., Chen, L.C., Hsu, W.H., Chang, C.W., and Lo, J.M. (2015) Evaluation of ¹⁸⁸Re-labeled PEGylated nanoliposome as a radionuclide therapeutic agent in an orthotopic glioma-bearing rat model. *Int J Nanomedicine* 10, 463-473.
 61. Huh, R., Park, Y.S., Lee, J.D., Chung, Y.S., Park, Y.G., Chung, S.S., and Chang, J.W. (2005) Therapeutic effects of Holmium-166 chitosan complex in rat brain tumor model. *Yonsei medical journal* 46, 51-60.
 62. Humm, J.L. (1986) Dosimetric aspects of radiolabeled antibodies for tumor therapy. *J Nucl Med* 27, 1490-1497.
 63. Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., and Benoit, J.P. (2009) Lipid nanocapsules: a new platform for nanomedicine. *International journal of pharmaceutics* 379, 201-209.
 64. Jain, R.K. and Stylianopoulos, T. (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews. Clinical oncology* 7, 653-664.
 65. Janzer, R.C., Kleihues, P., and Ostertag, C.B. (1986) Early and late effects on the normal dog brain of permanent interstitial iridium-192 irradiation. *Acta neuropathologica* 70, 91-102.

PREMIERE PARTIE

66. Jiang, L., Miao, Z., Kimura, R.H., Liu, H., Cochran, J.R., Culter, C.S., . . . Cheng, Z. (2011) Preliminary evaluation of (177)Lu-labeled knottin peptides for integrin receptor-targeted radionuclide therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 38, 613-622.
67. Kamaly, N., Xiao, Z., Valencia, P.M., Radovic-Moreno, A.F., and Farokhzad, O.C. (2012) Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation. *Chemical Society reviews* 41, 2971-3010.
68. Kampf, G. (1990) Steps towards cancer therapy with radionuclides--a review including radiation biophysical aspects. *Radiobiologia, radiotherapia* 31, 215-229.
69. Khanna, C., London, C., Vail, D., Mazcko, C., and Hirschfeld, S. (2009) Guiding the optimal translation of new cancer treatments from canine to human cancer patients. *Clin Cancer Res* 15, 5671-5677.
70. Kimmelman, J. and Nalbantoglu, J. (2007) Faithful companions: a proposal for neurooncology trials in pet dogs. *Cancer research* 67, 4541-4544.
71. Kneifel, S., Cordier, D., Good, S., Ionescu, M.C., Ghaffari, A., Hofer, S., . . . Merlo, A. (2006) Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance p. *Clin Cancer Res* 12, 3843-3850.
72. Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
73. Kumar, P.P., Good, R.R., Jones, E.O., Patil, A.A., Leibrock, L.G., and McComb, R.D. (1989) Survival of patients with glioblastoma multiforme treated by intraoperative high-activity cobalt 60 endocurietherapy. *Cancer* 64, 1409-1413.
74. Kumar, P.P., Good, R.R., Jones, E.O., Skultety, F.M., and Leibrock, L.G. (1986) Intraoperative remote afterloading endocurietherapy with high-activity 60cobalt for treatment of glioblastoma multiforme. *American journal of clinical oncology* 9, 209-216.
75. Kushnir, I. and Tzuk-Shina, T. (2011) Efficacy of treatment for glioblastoma multiforme in elderly patients (65+): a retrospective analysis. *Isr Med Assoc J* 13, 290-294.
76. Lacoeyille, F., Hindre, F., Moal, F., Roux, J., Passirani, C., Couturier, O., . . . Benoit, J.P. (2007) In vivo evaluation of lipid nanocapsules as a promising colloidal carrier for paclitaxel. *International journal of pharmaceutics* 344, 143-149.
77. Lamszus, K., Meyerhof, W., and Westphal, M. (1997) Somatostatin and somatostatin receptors in the diagnosis and treatment of gliomas. *J Neurooncol* 35, 353-364.
78. Lazarczyk, M., Matyja, E., and Lipkowski, A. (2007) Substance P and its receptors -- a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-

PREMIERE PARTIE

- review). *Folia neuropathologica* / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences 45, 99-107.
79. Leary, J.F. (2010) Nanotechnology: what is it and why is small so big? *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie* 45, 449-456.
 80. Lee, Y.S., Bullard, D.E., Zalutsky, M.R., Coleman, R.E., Wikstrand, C.J., Friedman, H.S., . . . Bigner, D.D. (1988) Therapeutic efficacy of antiglioma mesenchymal extracellular matrix 131I-radiolabeled murine monoclonal antibody in a human glioma xenograft model. *Cancer research* 48, 559-566.
 81. Lepareur, N., Mevellec, F., Noiret, N., Refosco, F., Tisato, F., Porchia, M., and Bandoli, G. (2005) Syntheses and reactivity of 'sulfur rich' Re(iii) and Tc(iii) complexes containing trithioperoxybenzoate, dithiobenzoate and dithiocarbamate ligands. *Dalton Trans*, 2866-2875.
 82. Li, L., Quang, T.S., Gracely, E.J., Kim, J.H., Emrich, J.G., Yaeger, T.E., . . . Brady, L.W. (2010) A Phase II study of anti-epidermal growth factor receptor radioimmunotherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 113, 192-198.
 83. Lipsitz, D., Higgins, R.J., Kortz, G.D., Dickinson, P.J., Bollen, A.W., Naydan, D.K., and LeCouteur, R.A. (2003) Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Veterinary pathology* 40, 659-669.
 84. Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., and DePinho, R.A. (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15, 1311-1333.
 85. Mamelak, A.N. and Jacoby, D.B. (2007) Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601). *Expert opinion on drug delivery* 4, 175-186.
 86. Mamelak, A.N., Rosenfeld, S., Bucholz, R., Raubitschek, A., Nabors, L.B., Fiveash, J.B., . . . Gonda, M.A. (2006) Phase I single-dose study of intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. *J Clin Oncol* 24, 3644-3650.
 87. McDermott, M.W., Sneed, P.K., and Gutin, P.H. (1998) Interstitial brachytherapy for malignant brain tumors. *Semin Surg Oncol* 14, 79-87.
 88. McLendon, R.E., Akabani, G., Friedman, H.S., Reardon, D.A., Cleveland, L., Cokgor, I., . . . Zalutsky, M.R. (2007) Tumor resection cavity administered iodine-131-labeled antitenascin 81C6 radioimmunotherapy in patients with malignant glioma: neuropathology aspects. *Nuclear medicine and biology* 34, 405-413.
 89. McNeil, S.E. (2005) Nanotechnology for the biologist. *Journal of leukocyte biology* 78, 585-594.

PREMIERE PARTIE

90. Mehdipour, A.R. and Hamidi, M. (2009) Brain drug targeting: a computational approach for overcoming blood-brain barrier. *Drug discovery today* 14, 1030-1036.
91. Merlo, A., Hausmann, O., Wasner, M., Steiner, P., Otte, A., Jermann, E., . . . Macke, H.R. (1999) Locoregional regulatory peptide receptor targeting with the diffusible somatostatin analogue 90Y-labeled DOTA0-D-Phe1-Tyr3-octreotide (DOTATOC): a pilot study in human gliomas. *Clin Cancer Res* 5, 1025-1033.
92. Merlo, A., Jermann, E., Hausmann, O., Chiquet-Ehrismann, R., Probst, A., Landolt, H., . . . Gratzl, O. (1997) Biodistribution of 111In-labelled SCN-bz-DTPA-BC-2 MAb following loco-regional injection into glioblastomas. *Int J Cancer* 71, 810-816.
93. Milenic, D.E., Brady, E.D., and Brechbiel, M.W. (2004) Antibody-targeted radiation cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 3, 488-499.
94. Morille, M., Montier, T., Legras, P., Carmoy, N., Brodin, P., Pitard, B., . . . Passirani, C. (2010) Long-circulating DNA lipid nanocapsules as new vector for passive tumor targeting. *Biomaterials* 31, 321-329.
95. Mrugala, M.M. (2013) Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discovery medicine* 15, 221-230.
96. Munding, F. (1967) [Iridium 192, "Gamma Med", a new radiation instrument for localized brachytherapy of brain tumors]. *Acta neurochirurgica* 16, 313-314.
97. Olsen, M.L., Schade, S., Lyons, S.A., Amaral, M.D., and Sontheimer, H. (2003) Expression of voltage-gated chloride channels in human glioma cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 5572-5582.
98. Orend, G. (2005) Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1066-1083.
99. Orend, G. and Chiquet-Ehrismann, R. (2006) Tenascin-C induced signaling in cancer. *Cancer letters* 244, 143-163.
100. Ostertag, C.B., Weigel, K., Warnke, P., Lombeck, G., and Kleihues, P. (1983) Sequential morphological changes in the dog brain after interstitial iodine- 125 irradiation. *Neurosurgery* 13, 523-528.
101. Otte, A., Jermann, E., Behe, M., Goetze, M., Bucher, H.C., Roser, H.W., . . . Maecke, H.R. (1997) DOTATOC: a powerful new tool for receptor-mediated radionuclide therapy. *European journal of nuclear medicine* 24, 792-795.
102. Otte, A., Mueller-Brand, J., Dellas, S., Nitzsche, E.U., Herrmann, R., and Maecke, H.R. (1998) Yttrium-90-labelled somatostatin-analogue for cancer treatment. *Lancet* 351, 417-418.
103. Paganelli, G., Grana, C., Chinol, M., Cremonesi, M., De Cicco, C., De Braud, F., . . . Veronesi, U. (1999) Antibody-guided three-step therapy for high grade glioma with yttrium-90 biotin. *European journal of nuclear medicine* 26, 348-357.

PREMIERE PARTIE

104. Palma, C., Nardelli, F., Manzini, S., and Maggi, C.A. (1999) Substance P activates responses correlated with tumour growth in human glioma cell lines bearing tachykinin NK1 receptors. *British journal of cancer* 79, 236-243.
105. Patel, Y.C. (1999) Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in neuroendocrinology* 20, 157-198.
106. Patel, Y.C. and Srikant, C.B. (1997) Somatostatin receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 8, 398-405.
107. Pawlikowski, M. and Melen-Mucha, G. (2004) Somatostatin analogs - from new molecules to new applications. *Current opinion in pharmacology* 4, 608-613.
108. Phillips, W.T., Goins, B., Bao, A., Vargas, D., Gutierrez, J.E., Trevino, A., . . . Brenner, A.J. (2012) Rhenium-186 liposomes as convection-enhanced nanoparticle brachytherapy for treatment of glioblastoma. *Neuro Oncol* 14, 416-425.
109. Platt, S., Nduom, E., Kent, M., Freeman, C., Machaidze, R., Kaluzova, M., . . . Hadjipanayis, C.G. (2012) Canine model of convection-enhanced delivery of cetuximab-conjugated iron-oxide nanoparticles monitored with magnetic resonance imaging. *Clinical neurosurgery* 59, 107-113.
110. Porrello, A., Cardelli, P., and Spugnini, E.P. (2004) Pet models in cancer research: general principles. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 23, 181-193.
111. Porrello, A., Cardelli, P., and Spugnini, E.P. (2006) Oncology of companion animals as a model for humans. an overview of tumor histotypes. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 25, 97-105.
112. Pradilla, G., Wang, P.P., Gabikian, P., Li, K., Magee, C.A., Walter, K.A., and Brem, H. (2006) Local intracerebral administration of Paclitaxel with the paclimer delivery system: toxicity study in a canine model. *J Neurooncol* 76, 131-138.
113. Reardon, D.A., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Herndon, J.E., 2nd, . . . Bigner, D.D. (2002) Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas. *J Clin Oncol* 20, 1389-1397.
114. Reardon, D.A., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., Herndon, J.E., 2nd, . . . Bigner, D.D. (2006a) Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results. *J Clin Oncol* 24, 115-122.
115. Reardon, D.A., Quinn, J.A., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., . . . Zalutsky, M.R. (2006b) Novel human IgG2b/murine chimeric antitenascin

PREMIERE PARTIE

- monoclonal antibody construct radiolabeled with ¹³¹I and administered into the surgically created resection cavity of patients with malignant glioma: phase I trial results. *J Nucl Med* 47, 912-918.
116. Reardon, D.A., Zalutsky, M.R., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Herndon, J.E., 2nd, . . . Bigner, D.D. (2008) A pilot study: ¹³¹I-antitenascin monoclonal antibody 81c6 to deliver a 44-Gy resection cavity boost. *Neuro Oncol* 10, 182-189.
 117. Reubi, J.C. (2003) Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocrine reviews* 24, 389-427.
 118. Reubi, J.C., Horisberger, U., Lang, W., Koper, J.W., Braakman, R., and Lamberts, S.W. (1989) Coincidence of EGF receptors and somatostatin receptors in meningiomas but inverse, differentiation-dependent relationship in glial tumors. *The American journal of pathology* 134, 337-344.
 119. Reubi, J.C., Lang, W., Maurer, R., Koper, J.W., and Lamberts, S.W. (1987) Distribution and biochemical characterization of somatostatin receptors in tumors of the human central nervous system. *Cancer research* 47, 5758-5764.
 120. Ritawidya, R., Pujiyanto, A., Setiawan, H., Ramli, M., and Kurniasih, D. (2012) Synthesis and Characterization of Poly (Amidoamine) Dendrimers Encapsulated ¹⁹⁸Au Nanoparticles. *Atom Indonesia* 38, 118-126.
 121. Riva, P., Arista, A., Franceschi, G., Frattarelli, M., Sturiale, C., Riva, N., . . . Rossitti, R. (1995) Local treatment of malignant gliomas by direct infusion of specific monoclonal antibodies labeled with ¹³¹I: comparison of the results obtained in recurrent and newly diagnosed tumors. *Cancer research* 55, 5952s-5956s.
 122. Riva, P., Arista, A., Sturiale, C., Tison, V., Lazzari, S., Franceschi, G., . . . et al. (1994a) Glioblastoma therapy by direct intralesional administration of I-¹³¹ radioiodine labeled antitenascin antibodies. *Cell biophysics* 24-25, 37-43.
 123. Riva, P., Arista, A., Tison, V., Sturiale, C., Franceschi, G., Spinelli, A., . . . Frattarelli, M. (1994b) Intralesional radioimmunotherapy of malignant gliomas. An effective treatment in recurrent tumors. *Cancer* 73, 1076-1082.
 124. Riva, P., Franceschi, G., Arista, A., Frattarelli, M., Riva, N., Cremonini, A.M., . . . Casi, M. (1997) Local application of radiolabeled monoclonal antibodies in the treatment of high grade malignant gliomas: a six-year clinical experience. *Cancer* 80, 2733-2742.
 125. Riva, P., Franceschi, G., Frattarelli, M., Lazzari, S., Riva, N., Giuliani, G., . . . Maeke, H.R. (1999a) Loco-regional radioimmunotherapy of high-grade malignant gliomas using specific monoclonal antibodies labeled with ⁹⁰Y: a phase I study. *Clin Cancer Res* 5, 3275s-3280s.

PREMIERE PARTIE

126. Riva, P., Franceschi, G., Frattarelli, M., Riva, N., Guiducci, G., Cremonini, A.M., . . . Kairemo, K.J. (1999b) ¹³¹I radioconjugated antibodies for the locoregional radioimmunotherapy of high-grade malignant glioma--phase I and II study. *Acta Oncol* 38, 351-359.
127. Riva, P., Franceschi, G., Riva, N., Casi, M., Santimaria, M., and Adamo, M. (2000) Role of nuclear medicine in the treatment of malignant gliomas: the locoregional radioimmunotherapy approach. *European journal of nuclear medicine* 27, 601-609.
128. Rowell, J.L., McCarthy, D.O., and Alvarez, C.E. (2011) Dog models of naturally occurring cancer. *Trends in molecular medicine* 17, 380-388.
129. Salem, R., Lewandowski, R.J., Mulcahy, M.F., Riaz, A., Ryu, R.K., Ibrahim, S., . . . Kulik, L. (2010) Radioembolization for hepatocellular carcinoma using Yttrium-90 microspheres: a comprehensive report of long-term outcomes. *Gastroenterology* 138, 52-64.
130. Sarin, H., Kanevsky, A.S., Wu, H., Brimacombe, K.R., Fung, S.H., Sousa, A.A., . . . Hall, M.D. (2008) Effective transvascular delivery of nanoparticles across the blood-brain tumor barrier into malignant glioma cells. *Journal of translational medicine* 6, 80.
131. Schlessinger, J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
132. Schumacher, T., Hofer, S., Eichhorn, K., Wasner, M., Zimmerer, S., Freitag, P., . . . Merlo, A. (2002) Local injection of the ⁹⁰Y-labelled peptidic vector DOTATOC to control gliomas of WHO grades II and III: an extended pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29, 486-493.
133. Sewchand, W., Amin, P.P., Drzymala, R.E., Salazar, O.M., Salcman, M., Samaras, G.M., and Botero, E. (1984) Removable high intensity iridium-192 brain implants. Technique and in vivo measurements in canine brain. *J Neurooncol* 2, 177-185.
134. Shen, S., Khazaeli, M.B., Gillespie, G.Y., and Alvarez, V.L. (2005) Radiation dosimetry of ¹³¹I-chlorotoxin for targeted radiotherapy in glioma-bearing mice. *J Neurooncol* 71, 113-119.
135. Shinoda K, S.H. (1969) The Stability of O/W type emulsions as functions of temperature and the HLB of emulsifiers: The emulsification by PIT-method. *Journal of Colloid And Interface Science* 30, p. 258-263.
136. Shultz, M.D., Wilson, J.D., Fuller, C.E., Zhang, J., Dorn, H.C., and Fatouros, P.P. (2011) Metallofullerene-based nanoplatform for brain tumor brachytherapy and longitudinal imaging in a murine orthotopic xenograft model. *Radiology* 261, 136-143.
137. Soroceanu, L., Gillespie, Y., Khazaeli, M.B., and Sontheimer, H. (1998) Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. *Cancer research* 58, 4871-4879.
138. Spaeth, N., Wyss, M.T., Pahnke, J., Biollaz, G., Trachsel, E., Drandarov, K., . . . Buck, A. (2006) Radioimmunotherapy targeting the extra domain B of fibronectin in

PREMIERE PARTIE

- C6 rat gliomas: a preliminary study about the therapeutic efficacy of iodine-131-labeled SIP(L19). *Nuclear medicine and biology* 33, 661-666.
139. Stoica, G., Levine, J., Wolff, J., and Murphy, K. (2011) Canine astrocytic tumors: a comparative review. *Veterinary pathology* 48, 266-275.
140. Strebhardt, K. and Ullrich, A. (2008) Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer* 8, 473-480.
141. Stubbs, J.B., Frankel, R.H., Schultz, K., Crocker, I., Dillehay, D., and Olson, J.J. (2002) Preclinical evaluation of a novel device for delivering brachytherapy to the margins of resected brain tumor cavities. *J Neurosurg* 96, 335-343.
142. Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., . . . Mirimanoff, R.O. (2009) Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10, 459-466.
143. Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., . . . Mirimanoff, R.O. (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.
144. Sundberg, A.L., Almqvist, Y., Orlova, A., Blomquist, E., Jensen, H.J., Gedda, L., . . . Carlsson, J. (2003) Combined effect of gefitinib ('Iressa', ZD1839) and targeted radiotherapy with ²¹¹At-EGF. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30, 1348-1356.
145. Ting, G., Chang, C.H., and Wang, H.E. (2009) Cancer nanotargeted radiopharmaceuticals for tumor imaging and therapy. *Anticancer research* 29, 4107-4118.
146. Torres, L.A., Coca, M.A., Batista, J.F., Casaco, A., Lopez, G., Garcia, I., . . . Fernandez, R. (2008) Biodistribution and internal dosimetry of the ¹⁸⁸Re-labelled humanized monoclonal antibody anti-epidermal growth factor receptor, nimotuzumab, in the locoregional treatment of malignant gliomas. *Nuclear medicine communications* 29, 66-75.
147. Vaidyanathan, G. and Zalutsky, M.R. (2011) Applications of ²¹¹At and ²²³Ra in targeted alpha-particle radiotherapy. *Current radiopharmaceuticals* 4, 283-294.
148. Valles, F., Fiandaca, M.S., Bringas, J., Dickinson, P., LeCouteur, R., Higgins, R., . . . Bankiewicz, K.S. (2009) Anatomic compression caused by high-volume convection-enhanced delivery to the brain. *Neurosurgery* 65, 579-585; discussion 585-576.
149. Vanpouille-Box, C. and Hindre, F. (2012) Nanovectorized radiotherapy: a new strategy to induce anti-tumor immunity. *Frontiers in oncology* 2, 136.
150. Vanpouille-Box, C., Lacoueille, F., Belloche, C., Lepareur, N., Lemaire, L., LeJeune, J.J., . . . Hindre, F. (2011a) Tumor eradication in rat glioma and bypass of

PREMIERE PARTIE

- immunosuppressive barriers using internal radiation with (188)Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* 32, 6781-6790.
151. Vanpouille-Box, C., Lacoeyille, F., Roux, J., Aube, C., Garcion, E., Lepareur, N., . . . Hindre, F. (2011b) Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model. *PLoS One* 6, e16926.
 152. Varenika, V., Dickinson, P., Bringas, J., LeCouteur, R., Higgins, R., Park, J., . . . Bankiewicz, K. (2008) Detection of infusate leakage in the brain using real-time imaging of convection-enhanced delivery. *J Neurosurg* 109, 874-880.
 153. Voelzke, W.R., Petty, W.J., and Lesser, G.J. (2008) Targeting the epidermal growth factor receptor in high-grade astrocytomas. *Current treatment options in oncology* 9, 23-31.
 154. Volkert, W.A., Goeckeler, W.F., Ehrhardt, G.J., and Ketring, A.R. (1991) Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *J Nucl Med* 32, 174-185.
 155. Waitz, D., Putzer, D., Kostron, H., and Virgolini, I.J. (2011) Treatment of high-grade glioma with radiolabeled peptides. *Methods* 55, 223-229.
 156. Waters, J.D., Rose, B., Gonda, D.D., Scanderbeg, D.J., Russell, M., Alksne, J.F., . . . Chen, C.C. (2013) Immediate post-operative brachytherapy prior to irradiation and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *J Neurooncol* 113, 467-477.
 157. Wen, P.Y. and Kesari, S. (2008) Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492-507.
 158. Wersall, P., Ohlsson, I., Biberfeld, P., Collins, V.P., von Krusenstjerna, S., Larsson, S., . . . Boethius, J. (1997) Intratumoral infusion of the monoclonal antibody, mAb 425, against the epidermal-growth-factor receptor in patients with advanced malignant glioma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 44, 157-164.
 159. Wilson, J.D., Broaddus, W.C., Dorn, H.C., Fatouros, P.P., Chalfant, C.E., and Shultz, M.D. (2012) Metallofullerene-nanoplatfrom-delivered interstitial brachytherapy improved survival in a murine model of glioblastoma multiforme. *Bioconjugate chemistry* 23, 1873-1880.
 160. Wong, A.J., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Kinzler, K.W., Hamilton, S.R., and Vogelstein, B. (1987) Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 6899-6903.
 161. Zalutsky, M.R., Reardon, D.A., Akabani, G., Coleman, R.E., Friedman, A.H., Friedman, H.S., . . . Bigner, D.D. (2008) Clinical experience with alpha-particle emitting 211At: treatment of recurrent brain tumor patients with 211At-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J Nucl Med* 49, 30-38.

DEUXIEME PARTIE:

ARTICLE

DEUXIEME PARTIE

Comme présentée dans la dernière partie de la revue bibliographique, la stratégie thérapeutique locale utilisant les nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 ou LNC¹⁸⁸Re-SSS présente un potentiel pour le traitement des glioblastomes.

Cette deuxième partie déclinée en article scientifique a pour objectif d'analyser à l'échelle pré-clinique et pour la première fois l'efficacité anti-tumorale des LNC¹⁸⁸Re-SSS sur des cellules humaines de glioblastomes de haut grade.

Ceci est étudié dans un modèle murin de xénogreffe de GB humain Lab1 suite au protocole de fractionnement de la radiothérapie interne nanovectorisée. Les souris nudes ayant un système immunitaire particulier (déplété en cellule lymphocyte T), nous permettent d'apprécier le rôle des cellules impliquées dans l'action immunitaire innée pour la réponse au traitement. Notamment sur l'infiltration au site tumoral irradié.

Enfin, la problématique majeure de l'étude consiste en l'évaluation de la distribution des LNC après leur administration par Convection-Enhanced Delivery ou CED au niveau du site tumoral par l'évaluation de la rétention de la radioactivité au sein du cerveau.

Titre 1: Analysis of the distribution, the retention and the efficacy of internal radiation with ^{188}Re -lipid nanocapsules in an immunocompromised human glioblastoma model.

Auteurs : Annabelle Cikankowitz^{1,2,7,8}, Anne Clavreul^{1,3}, Clément Tétaud^{1,7,8}, Laurent Lemaire¹, Audrey Rousseau⁴, Nicolas Lepareur⁵, Djamel Dabli⁶, Francis Bouchet⁶, Philippe Menei^{1,3}, Olivier Couturier^{1,6,8}, François Hindré^{1,7,8}

¹INSERM U1066 MINT (Micro et Nanomédecines Biomimétiques), University of Angers, France

²AMaROC, ONIRIS, Veterinary school of Nantes, France

³Neurosurgery department, CHU of Angers, France

⁴Laboratoire de Pathologie Cellulaire et Tissulaire, CHU of Angers, France

⁵Centre Régional de Lutte Contre le Cancer (CRLCC) Eugène Marquis, Rennes, France

⁶Nuclear medicine department, CHU d'Angers, France

⁷PRIMEX (Plateforme de Radiobiologie et d'Imagerie Expérimentale), University of Angers, France

⁸Labex IRON, Nantes-Angers, France

DEUXIEME PARTIE

Abstract:

Patients diagnosed with glioblastoma (GB) have no curative option and usually obtain the improvement of the median survival time to 15 months given by the Stupp standard therapy. Recently, we developed a radiopharmaceutical carrier based on ^{188}Re -lipid nanocapsules (LNC ^{188}Re -SSS) which showed promising results in the rat hepatocellular carcinoma and glioma models. In this study, we tested the distribution, the retention and the efficacy of LNC ^{188}Re -SSS through their administration by convection-enhanced delivery (CED) in a recurrent human GB model (Lab1) implanted in the striatum of immunocompromised mice to be closer of a clinical situation. We demonstrated that an infusion of 3 μL of LNCs with a flow rate at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ induced a complete distribution of LNCs in the tumor without a leakage into the contralateral hemisphere. The analysis of the activity retention of LNC ^{188}Re -SSS in mouse brains showed that about 70 % of the activity is present in the tumor region at least until 24 h after LNC injection. Considering the ^{188}Re half-life of 17 h, this retention time is sufficient for this radionuclide to emit lethal β radiations against the tumor. Accordingly, a double fractionated internal radiotherapy with LNC ^{188}Re -SSS triggered survival responses in the human GB model with cure rates of 50% which was not observed with an external radiotherapy. Tumors treated with LNC ^{188}Re -SSS presented a lower proportion of Ki67+ proliferative cells and a disorganization of vessels in comparison with tumors treated with Blank-LNCs. An increase of macrophages, granulocytes and B lymphocytes infiltration was observed but insufficient to induce a memory response able to protect re-challenged long-term survivor mice with Lab1 cells. Atypical cells with a bigger nucleus were also observed in tumors treated with LNC ^{188}Re -SSS. These cells could be endopolyploid cells already describe to confer resistance to environmental and genotoxic stress and further studies are necessary to consider their implications in the recurrence of the tumor after the LNC ^{188}Re -SSS treatment. In conclusion, we showed that LNC ^{188}Re -SSS could induce long-term survivors in an immunosuppressive environment and highlight their potential for GB therapy knowing the inter-individual heterogeneity of the immune status of GB patients.

DEUXIEME PARTIE

Keywords: Internal radiotherapy, human glioblastoma, Rhenium-188, lipid nanocapsules, xenograft, autoradiography

Introduction

Glioblastoma (GB) is the most frequent and aggressive tumor of the central nervous system. To date, the standard strategy encompasses a maximal surgical removal of tumor mass followed by fractionated external radiotherapy of a total of 60 Gy, with concomitant and adjuvant chemotherapy with temozolomide ([1]Stupp et al. 2005, [2]Stupp et al. 2009). However, the prognosis remains poor, with a mean progression-free survival of 7 months and an average survival of 12 to 15 months ([2]Stupp et al., 2009). In recent years, various radiation therapy modalities have emerged to target more precisely the GB site without create adverse effects on healthy tissue ([3]Vanpouille-Box et al., 2012). In our laboratory, we developed a nanovectorized radiotherapy that consists in lipid nanocapsules (LNCs) loaded with a lipophilic complex of Rhenium-188 (LNC¹⁸⁸Re-SSS; half-life: 16.9 h; β^- emitter: 2.12 MeV and γ emitter: 155 keV) ([4]Allard et al., 2008; [5]Vanpouille-Box et al., 2011a; [6]Vanpouille-Box et al., 2011b). This nanovectorized radiotherapy presents the main advantage of being a low-cost and simple technology providing its high availability and accessibility to patient. LNCs were obtained by a low-energy emulsification method and can be formulated in the absence of organic solvent with only generally recognized as safe (GRAS) excipients ([7]Hureaux et al., 2010). The ¹⁸⁸Re radionuclide can be easily eluted from the ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re generator ([8]Lepareur et al., 2011). The emission of this radionuclide allows to check the accuracy of the targeting, to follow the behavior and to predict the treatment efficacy with the dose distribution of the ¹⁸⁸Re within or in the area of the tumor. Such dual purpose (imaging/therapy) of the ¹⁸⁸Re named theranostic will become the future of oncology and nuclear medicine ([9]Guo 2014, [10]Srivastava 2012).

DEUXIEME PARTIE

We previously showed the interest of LNC¹⁸⁸Re-SSS for the treatment of GB and hepatocellular carcinomas ([5]Vanpouille-Box et al., 2011a; [6]Vanpouille-Box et al., 2011b). We observed in the 9L glioma rat model that fractionated internal radiation with LNC¹⁸⁸Re-SSS triggered remarkable survival responses (cure rates of 83%) ([6]Vanpouille-Box et al., 2011b). The treatment of rats bearing the 9L glioma with free-¹⁸⁸Re did not induce an improvement of their survival probably due to its rapid elimination in urine and feces after its intracranial delivery ([6]Vanpouille-Box et al., 2011b). Despite these promising results, the use of the 9L glioma model may be critical because of its highly immunogenic characteristic not representative of the human situation which may increase the efficacy of the LNC¹⁸⁸Re-SSS ([11]Barth R.F. et al., 2009, [12]Stojiljkovic M. 2003). Indeed, in the 9L glioma model, LNC¹⁸⁸Re-SSS stimulated tumor-specific immune response resulting in tumor rejection with high production of IFN- γ cytokine, increase recruitment of immune effector T cells within the tumor and memory response in long-term survivor animals. These immune responses could not be triggered in patients with GB whose immune status are heterogeneous ([13]Sughrue et al., 2009; [14]Kmiecik et al., 2014). For this reason, we investigated in this study the efficacy of LNC¹⁸⁸Re-SSS in an immunocompromised GB model consisting of human GB cells implanted in nude mice in which T cell effectors were absent. The distribution and tissue retention of LNC¹⁸⁸Re-SSS were also analyzed in this model.

I. Materials and methods

I.1 Glioblastoma cell culture

As previously described ([15]Clavreul et al., 2009), human Lab1 cell line was derived from a primary culture of a GB biopsy (Department of Neurosurgery, CHU, Angers, France). Cells were grown to 80% confluence in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Verviers, Belgium) containing 10% fetal calf serum (FCS) and 1% antibiotics (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at 37°C in a humidified incubator under a 5% CO₂ atmosphere. All experiments were performed with cells between passages 29 and 31.

I.2 The orthotopic Lab1 GB model

Female nude-NMRI mice, aged 9 weeks, were obtained from Janvier-Labs (Le Genest Saint Isle, France). Experiments were approved by the committee on the Ethics of Animal Experiments of the 'Pays de la Loire' (Permit No. CEEA. 2012.56). The animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of xylazine (Rompun®, Bayer, Puteaux, France: 13mg/kg body weight) and ketamine (Clorketam®, Vétoquinol, Lure, France: 100mg/kg body weight) and were positioned in stereotactic head frame (Stoelting apparatus).

On day zero (D0), mice received an intracranial injection into the right striatum (coordinates: + 0.5 mm anterior from the bregma, - 2.1 mm lateral and - 3 mm deep from the outer border of the cranium) of 5000 Lab1 cells in 5 µL HBSS containing Ca²⁺ and Mg²⁺ and using a 10 µL Hamilton® syringue (700 series RN) with a 1.5 cm 26 gauge needle.

The animals were kept in polycarbonate cages in a room with controlled temperature (20-22°C), humidity (50-70%) and 12h light/dark cycles. Tap water and diet were provided *ad libitum*.

I.3 Production and characterization of LNC¹⁸⁸Re-SSS complex

Blank-LNCs (50 nm) were obtained using a phase inversion process according to the description of the formulation methodology by Heurtault et al. [16]. As previously described ([5]Vanpouille-Box et al., 2011), the lipophilic complex (¹⁸⁸Re-SSS) was added to the LNCs formulation components of the emulsion. After three cycles of progressive heating and cooling, LNC¹⁸⁸Re-SSS were stabilized with an irreversible shock of 0°C deionized water which was added to the mixture at 78°C. Before intracranial injection, LNCs were filtered (0.2 µm) and 1 mL of the formulation was measured with the dose calibrator in order to have precisely the volumic activity. The mean size, polydispersity index and zeta potential were determined using a Malvern Zetasizer® Nano Serie DTS 1060 (Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK) one week after the formulation.

I.4 LNC distribution analysis: comparison of two techniques

The distribution of LNCs in the orthotopic GB Lab1 model was followed through immunofluorescence and autoradiography analyses (Figure 21).

DEUXIEME PARTIE

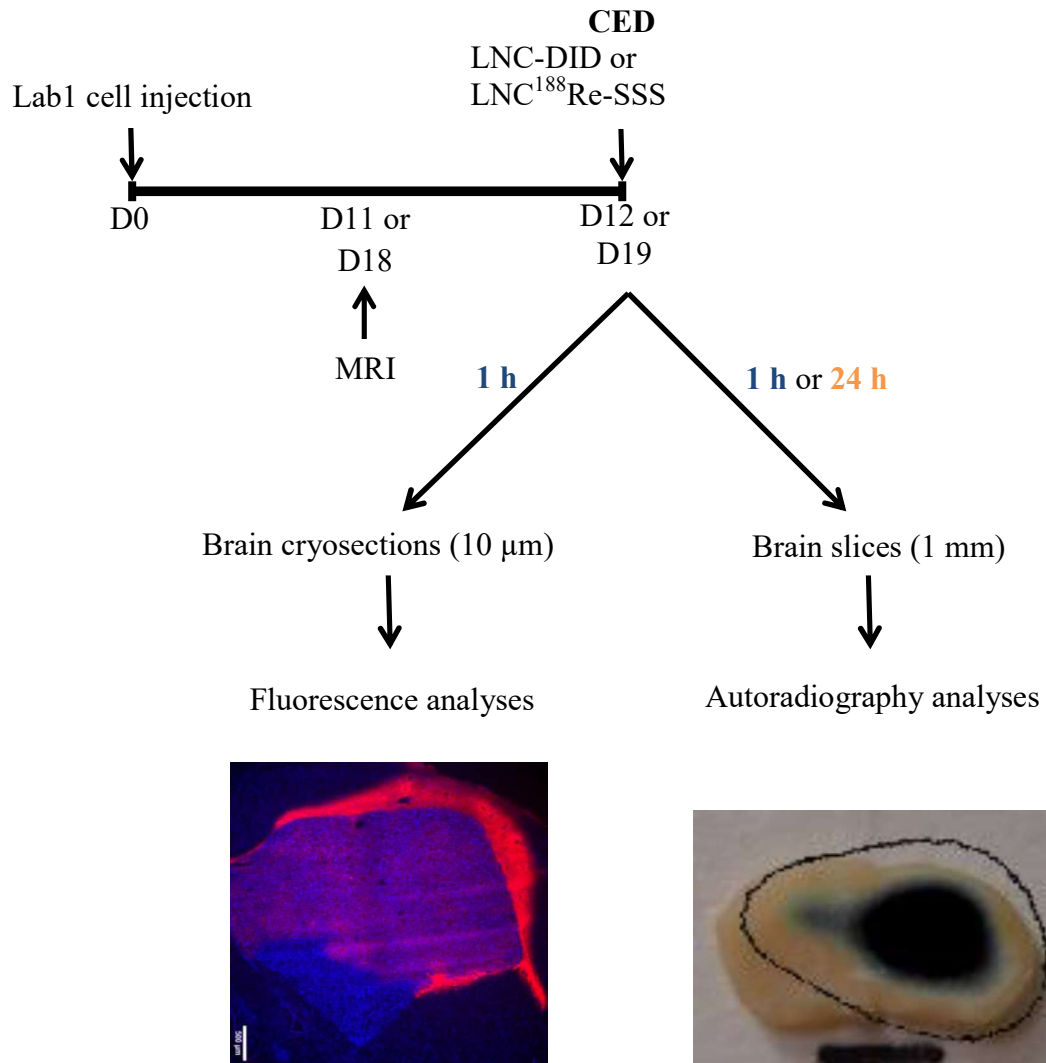


Figure 20: Experimental design to analysis LNCs distribution in the orthotopic GB Lab1 model through fluorescence (LNC-DID) and autoradiography (LNC¹⁸⁸Re-SSS).

DEUXIEME PARTIE

I.4.1 Fluorescence analysis of LNC distribution

For fluorescence analysis, LNCs loaded with a stably incorporated fluorescent lipophilic dye, DID, were produced as previously described ([17]Lainé AL et al., 2014). Briefly, DID (25 mg/mL) is added to the LNC formulation components in accordance with the Labrafac® concentration. LNC-DID were injected via CED (Pump 11 elite 70-4507INT, Harvard Apparatus®, Les Ulis, France) at the center of the Lab1 tumor at D12 using a Hamilton® syringue (700 series RN) with a 1.5 cm 32 gauge needle. Two parameters of LNC injection were tested: the volume of injection (V_i) and the flow rate. Four different V_i (3 μ L, 5 μ L, 10 μ L and 15 μ L) with a same flow rate (0.5 μ L/min) and a same V_i (3 μ L) with two flow rates (0.25 μ L/min and 0.5 μ L/min) were performed (n=3 for each condition).

One hour after the injection of LNC-DID, brains were harvested and snap-frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen and stored at -80°C. Brain coronal sections were cut (10 μ m thick) and collected onto silanized slides. Cryosections were fixed for 10 min in 4% PFA pH 7.4 at 4°C and nuclei were counterstained with DAPI (Sigma). Cryosections were then analyzed under a fluorescence microscope (Axioscope® 2 optical, Zeiss, Le Pecq, Germany). The volume of distribution (V_d) of LNC-DID was determined using a computerized image-analysis system (MetaView, Roper Scientific, Evry, France). V_d was determined with the following equation: V_d (μ L or mm³) = Σ slice fluorescence surface (μ m²) x slice thickness (μ m).

I.4.2 Autoradiography analysis of LNC distribution

LNCs are loaded with ¹⁸⁸Re-SSS complex (3 MBq) as described above. The blue dye DID was added in the formulation to get a visual of the LNC distribution in the brain slices. Two CED injection protocols of LNC¹⁸⁸Re-SSS-DID in the center of the Lab1 tumor with a same flow rate of 0.5 μ L/min were carried out: group 1 was injected at D12 with 3 μ L of LNC¹⁸⁸Re-SSS (n = 8) and group 2 was injected at D19 with 5 μ L of LNC¹⁸⁸Re-SSS (n = 8).

DEUXIEME PARTIE

One hour and 24 hours after the CED injection, mice were dripped with NaCl 0.9% (10 min) and with 8% PFA pH 7.4 (10 min). Then, brains were harvested and placed overnight in 8% PFA pH 7.4 at 4°C.

Each brain was cut with a slicer in order to obtain 8 slices (1 mm thick). Brain slices were exposed 5 min in a Super Resolution storage phosphor screen. The screen is scanned with a Phosphorimager device - Cyclone® under the following acquisition characteristics: 600 DPI (42 micron pixels), (PerkinElmer®). Autoradiography images were analyzed with OptiQuant™ software to obtain Digital Light Unit values of each brain print.

Whole brains were also analyzed in a Gamma Counter to have a direct access to counts in CPM. CPM are translating in activity unit (MBq) in order to have a link between the Digital Light Unit (DLU) proportions in each brain slices and the activity. ImageJ analysis software was used to determine the area of each brain slice autoradiogram (thresholding method) and the Vd was calculated.

I.5 Evaluation of LNC¹⁸⁸Re-SSS therapy on the orthotopic Lab1 GB model and comparison with an external radiotherapy

On D0, 5000 Lab1 cells, in 5 µl HBSS with Ca²⁺ and Mg²⁺, were implanted into the striatum of mice as described above (n=20). On D12, either 3 µL of Blank-LNCs (n=7) or 3 µL of LNC¹⁸⁸Re-SSS (n=8) were injected into the center of the tumor via CED with a flow rate at 0.5 µL/min. This injection protocol was repeated at D19 with a volume of 5 µL of Blank-LNCs or LNC¹⁸⁸Re-SSS. For the external beam radiation protocol, a fractionated regimen of 6 Gy (whole brain targeting – dose rate of 2.9 Gy/min with a X-ray irradiation system XRAD 225 Cx; 225 keV, 13 mA – collimator 15 mm - Nantes) at D12 and D19 following Lab1 cell implantation was performed on five isoflurane/oxygen anesthetized mice. This irradiator provides 3D image-guided placement. Tumor volume was measured by MRI every week and the mice were killed when they had lost more than 10% of their body weight.

DEUXIEME PARTIE

Long-term survivors obtained from fractionated internal radiation therapy (D12 and D19) were re-challenged with 5000 Lab1 cells in the left striatum (coordinates: + 0.5 mm anterior from the bregma, + 2.1 mm lateral and - 3 mm deep from the outer border of the cranium) at D104.

I.6 MRI

Tumor progression and volume were checked and measured by μ MRI the day previous LNC injection: D11 and D18 and weekly after the treatment protocol. Mice were manipulated under isoflurane/oxygen anesthesia (1.5-0.5% O₂, 0.5 L/min).

A Bruker Biospec 70/20 device operating at a magnetic field of 7T and equipped with a 1H cryoprobe was used in order to obtain T2 rapid anatomical proton images: rapid acquisition relaxation enhancement (RARE) sequence [TR = 3200 ms; mean echo time (T_{em}) = 21.3 ms; RARE factor = 4; FOV = 2 x 2 cm; matrix 256 x 256; 11 contiguous slices of 0.5 mm, Nex = 1]. Tripilot multi sequence: sagittal, axial and coronal view.

Mouse body temperature was maintained at 36.5-37.5°C by a feedback-regulated heating pad throughout the imaging protocol.

Tumor volume was determined in each brain slices with the region of interest (ROI) in the PV.5 software.

I.7 Evaluation of LNC¹⁸⁸Re-SSS CED effect on tumor growth and its microenvironment

As describe above, on D0, mice were injected with Lab1 cells and received on D12 Blank-LNCs (n=4) or LNC¹⁸⁸Re-SSS (n=8) via CED. They were killed on D19 and brains were snap-frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen as described above to assess in the tumor, the apoptosis, the intratumoral Ki67+ proliferative cells, CD31+ vessels and the immune reaction. Another group of mice (n=4) was killed on D26 to analyze the histology of

DEUXIEME PARTIE

the brain. For histological analysis, formalin-fixed, paraffin-embedded sections of brains were stained with hematoxylin-phloxin-saffron.

I.8 Immunofluorescence

Briefly, cryosections were fixed with ethanol (95%)/acetic acid (5%) or acetone and washed three times with PBS. In order to block nonspecific binding, sections were incubated in PBS containing 4% BSA and 10% normal goat serum. All incubations with isotype controls and primary antibodies directed against endothelial cells (anti-mouse CD31 clone G4.18, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), macrophages (anti-mouse F4/80 clone R73, affymetrix eBioscience, Paris, France), B lymphocytes (anti-mouse CD45R clone 341, eBioscience), granulocytes [anti-mouse Ly6-G (GR-1) clone RB6-8C5, eBioscience], NK cells (anti-mouse CD335 (NKp46) clone 29A1.4, OZYME, Saint Quentin en Yvelines, France) and proliferative cells (anti-human Ki67, clone OX-62, Dako, Trappes, France) were performed overnight at 4°C. Primary antibodies were detected using biotinylated secondary antibodies and the signal was amplified with streptavidin-FITC (Dako) in dark room. Nuclei were counterstained with DAPI 1/1000 (Sigma). All slides are keeping at 4°C before the analyses under a fluorescence microscope (Axioscope® 2 light microscope).

Apoptotic cells were detected based on the Trevigen® kit protocol: TACS 2 TdT-Fluor In Situ Apoptosis detection kit according to the manufacturer's instructions (R&D systems, Lille, France).

I.9 Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD. Comparisons between Blank-LNCs and LNC¹⁸⁸Re-SSS groups for the internal radiotherapy efficacy study were made using the log-rank test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

II. Results

II.1 Analysis of LNC distribution in the orthotopic Lab1 GB model

Two technical approaches were used to follow the distribution of LNCs in the orthotopic Lab1 GB model: fluorescence (LNC-DID) and autoradiography (LNC¹⁸⁸Re-SSS). At D12, the tumor volume of Lab1 evaluated by MRI and fluorescence, was about 2-3 μL . The injection in the tumor of 3 μL of LNC-DID with a flow rate at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ resulted in a V_d of $10.2 \pm 1.9 \mu\text{L}$ 1 h after the injection (Table VIII). This V_d increased to a value of $15.7 \pm 1.6 \mu\text{L}$ when the flow rate was at 0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$. An injection of 10 μL or 15 μL of LNC-DID induce a V_d around 36 μL resulting in a large distribution of LNCs in the whole hemisphere and a leakage into the left hemisphere by the corpus-callosum. At D18-19, the tumor volume of Lab1 was 23-24 μL and an injection by CED of 5 μL of LNC-DID in the tumor with a flow rate at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ induced a volume of distribution of $32.1 \pm 7.1 \mu\text{L}$. The analysis of LNC distribution through autoradiography showed higher V_d values in comparison with immunofluorescence V_d values (Table VIII). These values are not representative and may be explained by the difficulty to eliminate the background influence on the radiation emission print in this small tumor model. Following these data, for the therapeutic protocol, a V_i of 3 μL with a flow rate at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ was chosen at D12 and a V_i of 5 μL with a flow rate at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ was chosen at D19 to target optimally the tumor.

DEUXIEME PARTIE

	Vi (µL)	Flow rate	Vd at 1 h (µL)				Vd at 24 h (µL)		
			LNC-DID (10 µm)	LNC-DID (1 mm)	LNC ¹⁸⁸ Re-SSS (without threshold)	LNC ¹⁸⁸ Re-SSS (with threshold)	LNC-DID (1 mm)	LNC ¹⁸⁸ Re-SSS (without threshold)	LNC ¹⁸⁸ Re-SSS (with threshold)
D12	3 µL	0.5 µL/min	10.2 ± 1.9	12.6 ± 3.8	148.5 ± 31.2	40.9 ± 17.1	24.4 ± 5.5	153.9 ± 7.9	54.1 ± 7.3
		0.25 µL/min	15.7 ± 1.6	-	-	-	-	-	-
	5 µL	0.5 µL/min	12.6 ± 7.8	-	-	-	-	-	-
	10 µL		39.2 ± 7.6	-	-	-	-	-	-
	15 µL		33.9 ± 14.6	-	-	-	-	-	-
D18	5 µL		32.1 ± 7.1	26.9 ± 6.9	168.5 ± 68.6	44.6 ± 18.1	54.4 ± 11.8	283.4 ± 44.3	75.4 ± 10.0

Tableau VIII: Determination of LNC distribution with fluorescence (LNC-DID) and autoradiography (LNC¹⁸⁸Re-SSS) analyses following their CED injection into the Lab1 GB model (mean ± SD).

Infusion volume (Vi)	Injected dose (MBq)	Time after injection	Expected activity (MBq)	Expected activity with 15% distribution at 24 h	Mean brain activity (MBq)	Lost activity (%)	Lost activity with biodistribution (%)	% total activity in right hemisphere	% total activity in left hemisphere
3 µL	3,2	1 h (n=4)	2.8	-	1.9 ± 0.4	29	-	69.4 ± 9.7	30.5 ± 9.7
		24 h (n=4)	1.1	0.9	0.8 ± 0.03	24	9	76.0 ± 5.4	24.0 ± 5.4
5 µL	3,5	1 h (n=2)	3.02	-	1.9 ± 0.6	36	-	82.7 ± 8.4	17.3 ± 8.4
		24 h (n=3)	1.2	1	0.9 ± 0.1	25	10	61.7 ± 10.0	38.3 ± 10.0

Tableau IX: Autoradiography analysis: injection and distribution characteristics.

II.2 Analysis of the retention of ^{188}Re -SSS activity within mice brain

We analyzed the activity of LNC ^{188}Re -SSS in each brain hemisphere and slices at D12 (3 μL , 3 MBq, 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) and D19 (5 μL , 3 MBq, 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) 1 h and 24 h after their injection in the Lab1 tumor localized in the right brain hemisphere. One hour after the CED infusion, 71% of the expected activity was present in the mice brain and 70% of this activity was confined in the right brain hemisphere where the tumor was present. At 24 h, 79% of the expected activity was still present in the brain and 76% are in the right brain hemisphere (Table IX). The activity distribution of LNC ^{188}Re -SSS in brain slices are presented in Figure 21. As previously described ([5]vanpouille et al., 2011), approximately 15% of the LNCs are distributed in the body 24 h after the CED administration (Figure 22).

DEUXIEME PARTIE

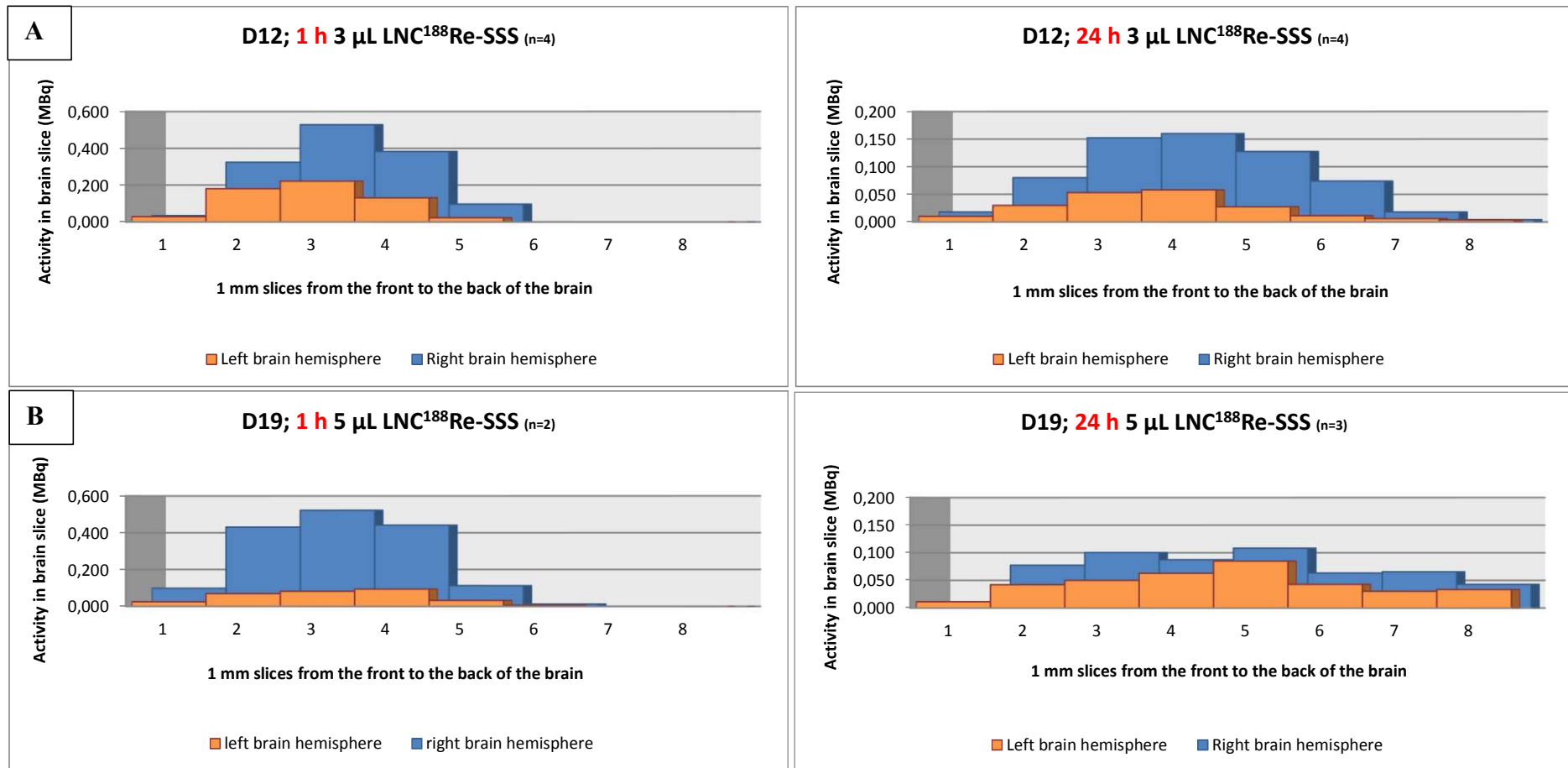
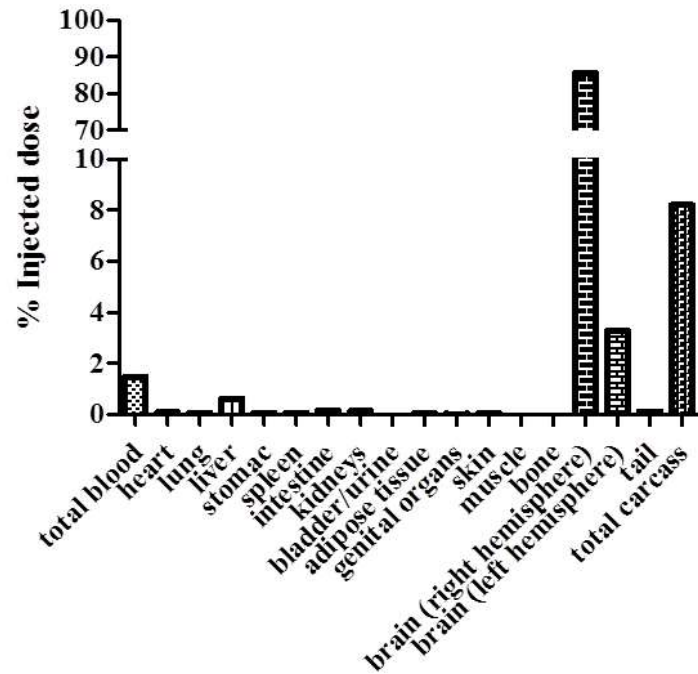


Figure 21: (supplementary data) Distribution of the LNC¹⁸⁸Re-SSS activity (MBq) through the whole mice brain. A Vi of 3 μL (A) or 5 μL (B) of LNC¹⁸⁸Re-SSS was injected at D12 and D19 after Lab1 cell implantation respectively. After 1 h and 24 h, brains were cut in 8 slices of 1 mm: [from the front (number 1) to the back (number 8)]. The graphs represent the mean of the ¹⁸⁸Re activity measured in the left and right brain hemispheres of animals (n = number of mice analyzed).

DEUXIEME PARTIE

1 h after 5 μ L LNC¹⁸⁸Re-SSS injection by CED in the right brain hemisphere



24 h after 5 μ L LNC¹⁸⁸Re-SSS injection by CED in the right brain hemisphere

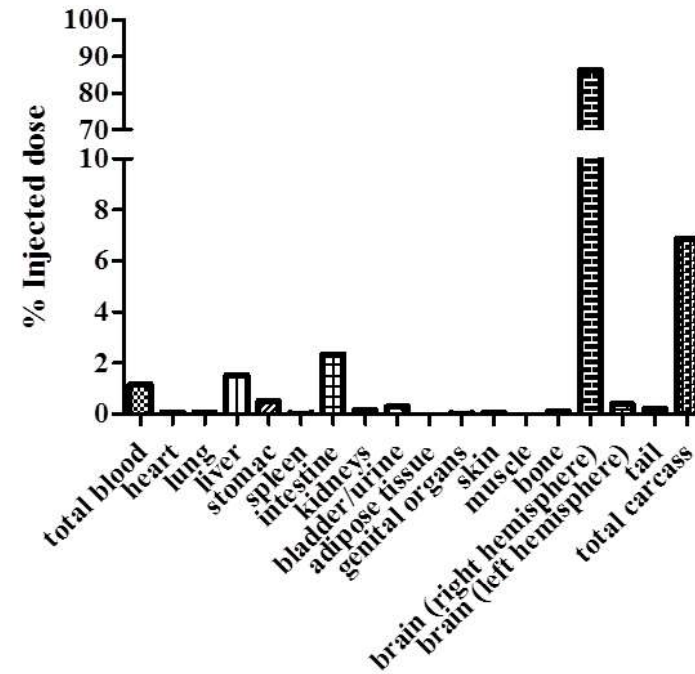


Figure 22: (supplementary data) Biodistribution of the LNC¹⁸⁸Re-SSS 1 h (n=1) and 24 h (n=1) after their CED injection in mice bearing GB (Vi = 5 μ L). Results are expressed as a percentage of the injected dose. (n = number of mice analyzed).

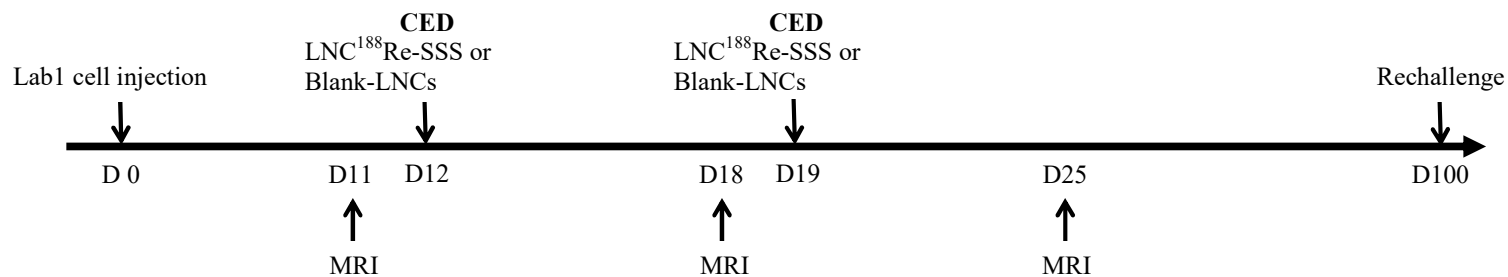
II.3 Analysis of the efficacy of the internal radiotherapy on the Lab1 GB model and comparison with an external radiotherapy

Lab1 tumor-bearing mice were treated by a CED injection of LNC¹⁸⁸Re-SSS or Blank-LNCs at D12 (3 μ L, 3 MBq, 0.5 μ L/min) and D19 (5 μ L, 3MBq, 0.5 μ L/min) (Figure 23, A). Mice receiving no treatment and Blank-LNCs died within 27 days with a median survival of 21 and 20 days respectively (Figure 23 B, D). By contrast, mice treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS showed an increased median survival time of 180% when compared to mice treated with Blank-LNCs. In addition, 4 mice (50%) treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS were long-term survivors (Figure 23, D). The monitoring of Lab1 tumor growth by MRI showed that the tumor volume was about 2 μ L at D11. For control mice (no treatment and Blank-LNCs), the Lab1 tumor grew up until D25 with a diffuse morphology (Figure 23, C). For mice treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS, there is a significant reduction of Lab1 tumor growth (approximately twice less) six days after the first injection of LNC¹⁸⁸Re-SSS (12.72 ± 5.28 μ L) compared to Blank-LNCs (30.00 ± 4.60 μ L) (Figure 23, C and D). For long-term survivor animals, MRI or histological analysis did not show a detectable brain tumor at D100. These long-term animal survivors were re-challenged with implantation of 5000 Lab1 cells in the left striatum. We did not observe for these animals an increase in their median survival time. They died within 27 days as the control group animal.

To investigate whether these results of fractionated D12 – D19 internal radiotherapy might prove to be relevant compared with the external beam radiation, mice bearing intracranial Lab1 tumor were irradiated with 6 Gy at D12 and D19. This treatment slowed down the tumor progression but unlike internal radiotherapy, none of the tumor-bearing mice was cured by the external radiation (Figure 23, D).

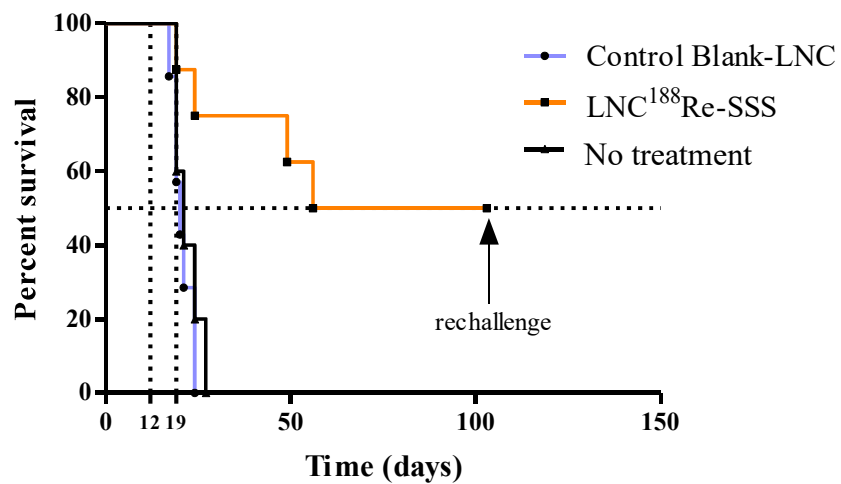
DEUXIEME PARTIE

A



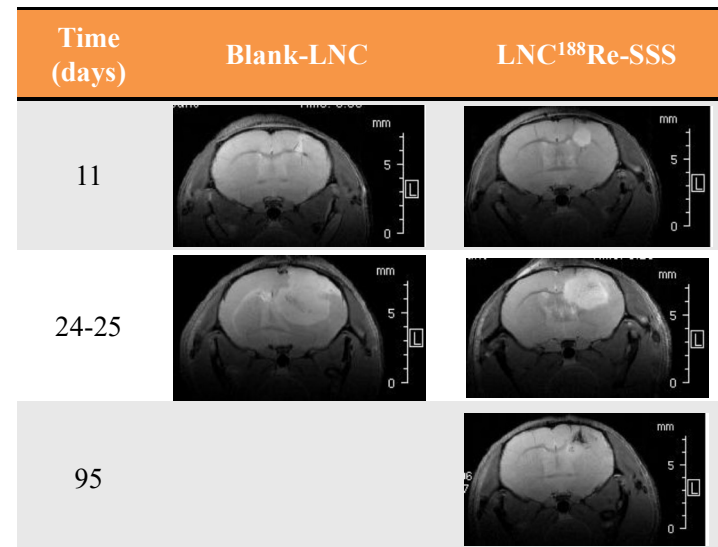
B

Survival proportions: Kaplan Meier curves



** Log-rank test P = 0,0027

C



DEUXIEME PARTIE

Protocol	n	Survival Time (days)		Increase life time (%)		Tumor volume (μL)	
		Range	Median	Long term survivors	IST median	D11	D18
No treatment	5	19-27	21	-	-	-	-
Blank-LNCs	7	17-24	20	0	-	2.0 \pm 0.2	30.0 \pm 4.6
LNC ¹⁸⁸ Re-SSS	8	19-104	56 **	4	180	1.9 \pm 0.2	12.7 \pm 5.3 *
Rechallenge	3	19-33	27	-	35	-	-
ext RT 6 Gy	5	25-47	44 *	-	120	1.9 \pm 0.8	12.2 \pm 7.7 *

Figure 23: Efficacy of fractionated D12 – D19 internal radiotherapy using LNC¹⁸⁸Re-SSS after their CED administration in the Lab1 GB model. A) Experimental design of the treatment of the Lab1 GB model with LNC¹⁸⁸Re-SSS. The presence and the localization of the Lab1 tumor were verified at D11 after Lab1 cell injection by MRI. Animals that presented a wrong localization of the tumor or a tumor insufficiently developed (< 1.5 μL) were excluded from the study. At D12, mice were infused with 3 μL of Blank-LNCs or LNC¹⁸⁸Re-SSS (3 MBq,) with a flow rate at 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$. This protocol was repeated at D19 with an infusion of 5 μL of Blank-LNCs or LNC¹⁸⁸Re-SSS with the same flow rate. The tumor progression was checked by MRI images weekly. B) Kaplan-Meier survival curves for Lab1 tumor-bearing mice with indicated treatments. [No treatment (n=5, black line), Blank-LNCs (n=7, blue line), LNC¹⁸⁸Re-SSS (n=8, orange line). Fifty percent of mice treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS were long term survivors. C) Representative T2-weighted MRI images of mice treated with Blank-LNCs or LNC¹⁸⁸Re-SSS. D) Table representing the efficacy of LNC¹⁸⁸Re-SSS therapy on the xenograft Lab1 GB model and the comparison with an external radiotherapy. The external radiotherapy (2x 6 Gy) was done at D12 and D19 after Lab1 cell injection. The increase in median survival time (IST median) is calculated in comparison to the control Blank-LNCs group (%). The mean tumor size (μL) at D11 and D18 after the intracerebral injection of Lab1 cells was measured with the analysis of ROI by MRI (mean values \pm SD; * p = 0.03 < 0.05). (n = number of animals).

II.4 Effect of LNC¹⁸⁸Re-SSS treatment on the tumor and its microenvironment

At D19 (7 days after the first intratumoral injection of LNC¹⁸⁸Re-SSS), we observed a modification of the histology of the tumor treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS in comparison with the injection of Blank-LNCs. The Lab1 tumor treated with Blank-LNCs presented a high cellularity while the tumor treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS was smaller and was composed of atypical cells with a bigger nucleus. Some Ki67+ cells were present in the tumor treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS and disorganized CD31+ vessels were also observed (Figure 24). Apoptosis cells were present in tumors treated with Blank-LNCs or LNC¹⁸⁸Re-SSS and no significant difference was observed between the tumors. The injection of LNC¹⁸⁸Re-SSS induced an intratumoral infiltration of CD45R+ lymphocytes B and an increase in the infiltration of F4/80+ macrophages and Ly6-G+ granulocytes (Figure 24). No NK cell was identified. At D26 (7 days after the second intratumoral injection of LNC¹⁸⁸Re-SSS), the tumoral tissue is more weakened and disintegrated and composed with more atypical cells (approximately ten-fold with respect to the untreated tumor) (data not shown). As indicated above, for long-term survivors, no tumor was observed at D100 and the tissue was considered normal by histology.

The periphery of the tumor was also analyzed. The structure of this area was similar to that observed in the contralateral hemisphere and the vessels were well organized after the first or second injection of LNC¹⁸⁸Re-SSS. No figure of apoptosis cells was observed (data not shown).

DEUXIEME PARTIE

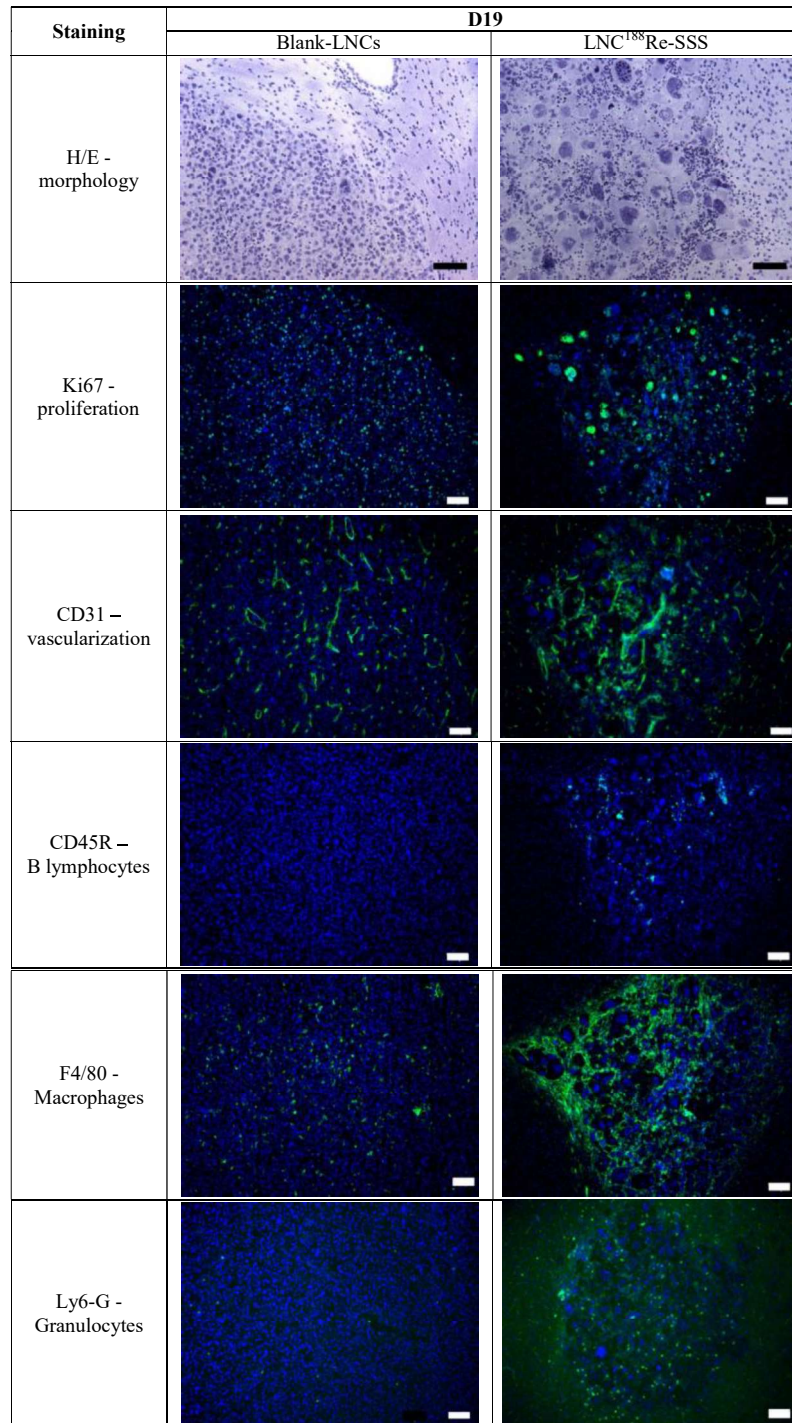


Figure 24: Evaluation of LNC¹⁸⁸Re-SSS CED effect on tumor growth and its microenvironment. At D19, seven days after the treatment of Lab1 bearing mice with Blank-LNCs or LNC¹⁸⁸Re-SSS, the following parameters were analyzed in the brain tumor: histology, Ki67+ proliferative cells, CD31+ vessels and the immune reaction (B lymphocytes, macrophages and granulocytes). For these analyses, 3 brains for each group were used. Ki67, CD31, CD45R, F4/80 and Ly6-G markers are in green fluorescence and nuclei were in blue. Scale bars = 100 μ m.

III. Discussion

Nuclear medicine and nanotechnologies are at the leading edge of interest for the domain of oncology. To overcome external radiation limitations and the necessity of a local prolonged radiation action, great advances led to the development of new radiolabelled delivery-systems used for a local therapeutic strategy. This confined theranostic concept links radionuclide-based therapy and imagery diagnostic to promote a personalized GB treatment. Consequently in this work, we developed the local CED infusion of LNC¹⁸⁸Re-SSS that combine LNCs and the radionuclide ¹⁸⁸Re. This potent radionuclide can directly kill tumor cells through its beta radiations. Furthermore, it is easily available through a generator and it doesn't need radionuclide pairs because its decay is accompanied by imageable gamma-emission (155 keV). On the other hand, the combination with LNCs avoids its rapid elimination. As can be seen previously, we demonstrated that only 35% of the ¹⁸⁸ReO₄-administered into the rat striatum stay in the brain after 4 days compared with retention of 96% for the LNC¹⁸⁸Re-SSS. Finally, the well-established and easy optimized encapsulating procedures show the safety of ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules. In this study, we investigated the efficacy of LNC¹⁸⁸Re-SSS on the orthotopic Lab1 GB model implanted in immunocompromised mice to be closer of a clinical situation. The Lab1 GB cells came from a recurrent GB that has relapsed 6 months after the treatment of the initial tumor with a fractionated radiotherapy (59.4 Gy). The immunocompromised mice were nude mice in which T cell effectors were absent. Such animal model is interesting and mimics a part of the well-known immunobiology of GB. Indeed, GB patients are immunosuppressed and show a tumor microenvironment immune escape which contribute to the infiltrative development of the tumor ([18]Castro 2003; [19]Dix 1999; [20]Grauer 2007, [21]Ooi 2014). Particularly, this observation was supported by the suppressive immune factors like TGF β , IL-10 and PGE₂ secreted by the tumor and the recruitment of CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ regulatory T-cells (Treg) which inhibit and delayed effector T-cell proliferation and functions (lymphopenia) ([22]Roszman et al., 1991; [19]Dix et al., 1999; [23]Tada et al., 1996; [24]Sonabend et al.,

DEUXIEME PARTIE

2008; [25]Rolle et al., 2012; [26]Thomas et al., 2012). Before initiating the therapeutic efficacy of LNC¹⁸⁸Re-SSS in Lab1 GB model, we addressed the analysis of the distribution and the retention of the LNC¹⁸⁸Re-SSS in the Lab1 tumor. The intratumoral injection of LNC¹⁸⁸Re-SSS was performed through CED technology. This method which permits a direct intracranial drug-transfer technique bypassing the blood-brain barrier is well described. It uses a bulk-flow mechanism to convey and distribute macromolecules to clinically significant volumes of solid tissues ([27]Bobo et al., 1994; [28]Morrison et al., 1994; [29]Saito et al., 2004). The fluorescence analysis of LNC distribution suggested an excellent distribution pattern of LNCs in the tumor via CED. We observed that 1 h after the injection of 3 μ L of LNC-DID at a flow rate of 0.5 μ L/min in the Lab1 tumor presenting a volume about 2-3 μ L, the Vd of LNCs was 3 fold greater. According with previous studies ([30]Chen et al., 1999; [31]Krauze et al., 2006), we noted that this Vd increased with a lower flow rate fixed at 0.25 μ L/min. An injection beyond 5 μ L resulted in a large distribution of LNCs in the whole hemisphere and a leakage into the left hemisphere by the corpus-callosum. Surprisingly, such volumes are frequently used in intracerebral tumor models and do not seem realistic ([32]Shultz MD et al., 2011). Due to the small tumor model and the difficulty to eliminate the background influence on the radiation emission print, the distribution data obtained through fluorescence could not be validated through autoradiography. Actually, we developed in the laboratory a non-invasive quantitative SPECT imaging in spontaneous canine glioma models to evaluate the infusion volume of LNC¹⁸⁸Re-SSS in order to be as close as possible to the human and to obtain relevant data before the translation to a phase I clinical trial. According to our previous results in the 9L rat model ([5]Vanpouille-Box et al., 2011), the analysis of the activity retention of LNC¹⁸⁸Re-SSS in mouse brains showed that about 70 % of the activity is present in the interest region at least until 24 h after LNCs injection. The ¹⁸⁸Re half-life being of 17 h, this retention time is sufficient for this radionuclide to have a continuous radiobiologic action at a maximal distance of 10 mm (mean penetration range of 3.1 mm) while reducing the toxicity risks. This good retention highlights the interest of LNC¹⁸⁸Re-SSS in GB therapy

DEUXIEME PARTIE

which avoids a rapid radioactivity clearance and a non-specific binding generally encountered with radiolabeled monoclonal antibodies.

We demonstrated that the fractionated internal radiotherapy of LNC¹⁸⁸Re-SSS triggered survival responses in the Lab1 model with cure rates of 50%. The tumors treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS present a lower proportion of Ki67+ proliferative cells and a disorganization of vessels in comparison with tumors treated with Blank-LNCs. It is well known that ionizing radiation leads to mitotic catastrophe, apoptosis or necrosis, senescence, cell stress and enhances the anti-tumoral immune response ([33]Lorimore et al. 2001, [34]Moore 2002, [35]Mekid 2003, [36]Formenti et al. 2009, [37]Holland et al. 2012, [38]Balagamwala et al. 2012, [39]Park et al. 2014, [40]Ewald et al. 2010). In this study, we did not observe a significant increase of apoptotic cells in the tumors treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS in comparison with tumors treated with Blank-LNCs but we noted the presence of multinucleated giant cells with flattened morphology. These non-apoptotic giant cells could be endopolyploid cells that have been already described after severe genotoxic insult with irradiation or chemotherapy ([41]Illidge et al., 2000; [42]Kaur E et al., 2015). It is highlighted in the literature that the majority of these cells stop endoreduplication and undergo senescence, while some release para-diploid mitotic sub-cells, starting clonogenic regrowth and reenter the mitotic cell cycle before a disease recurrence ([43]Iranov et al., 2003; [44]Erenpreisa et al., 2008; [45]Erenpreisa et al., 2011; [46]Mirzayans et al., 2013; [47]Schwarz-Finsterle et al., 2013).. The induction of such cells through the LNC¹⁸⁸Re-SSS treatment could explain why 50% of animals bearing Lab1 tumor showed only a prolonged median survival. Further studies are needed to determine the implication of the giant cells in the LNC¹⁸⁸Re-SSS ionizing radiation resistance. The analysis of the immune response in tumors treated with LNC¹⁸⁸Re-SSS showed an increase of the infiltration of innate cells such as macrophages and granulocytes and of B lymphocytes in comparison with tumors treated with blank LNCs. Such immune tumor infiltration has already been observed after radiation ([5]Vanpouille-Box et al.; [49]Candolfi et al. 2007, [33]Lorimore et al. 2001; [50]Ma et al 2011). In comparison with the 9L glioma model, the rechallenging of the long-term survivors with Lab1 GB cells did not

DEUXIEME PARTIE

prolonged the median survival of mice indicating the importance of T cells in the induction of a memory response against the tumor. For interest, the peritumoral zone presented a normal histology without neither immune infiltration nor apoptosis highlighting limited side effects after local delivery of LNC¹⁸⁸Re-SSS on healthy brain.

IV. Conclusion

In conclusion, we validated in this study the interest for a clinical application of LNC¹⁸⁸Re-SSS for GB therapy. This nano-radio-therapeutic system can be distributed in the tumor through CED and can be retained in the interest region at least until 24 h with no toxicity on healthy brain. LNC¹⁸⁸Re-SSS are functional in an immunosuppressive environment which has a great importance knowing the inter-individual heterogeneity of the immune status of GB patients.

Acknowledgements:

Supplementary data:

LNCs body distribution study (figure 22)

A distribution study was carried out using two female nude-NMRI mice at day 19 following Lab1 cell injection. A Vi of 5 μ L of LNC¹⁸⁸Re-SSS was performed with a flow-rate of 0.5 μ L/min. the animals were sacrificed at post-injection interval times of 1 hour (n=1) and 24 hours (n=1). The organs were removed, washed, and weighed. The content activity of each organ was determined using a gamma counter (Packard Auto-Gamma 5000 series).

References

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-996.
2. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 459-466.
3. Vanpouille-Box C, Hindre F. Nanovectorized radiotherapy: a new strategy to induce anti-tumor immunity. *Front Oncol* 2012; 2: 136.
4. Allard E, Hindre F, Passirani C, et al. ¹⁸⁸Re-loaded lipid nanocapsules as a promising radiopharmaceutical carrier for internal radiotherapy of malignant gliomas. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35: 1838-1846.
5. Vanpouille-Box C, Lacoeyille F, Belloche C, et al. Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with (¹⁸⁸)Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* 2011; 32: 6781-6790.
6. Vanpouille-Box C, Lacoeyille F, Roux J, et al. Lipid nanocapsules loaded with rhenium-188 reduce tumor progression in a rat hepatocellular carcinoma model. *PLoS One* 2011; 6: e16926.
7. Hureaux J, Lagarce F, Gagnadoux F, et al. Toxicological study and efficacy of blank and paclitaxel-loaded lipid nanocapsules after i.v. administration in mice. *Pharm Res* 2010; 27: 421-430.
8. Lepareur N, Ardisson V, Noiret N, et al. Automation of labelling of Lipiodol with high-activity generator-produced ¹⁸⁸Re. *Appl Radiat Isot* 2011; 69: 426-430.
9. Guo R, Zhang M, Xi Y, et al. Theranostic studies of human sodium iodide symporter imaging and therapy using ¹⁸⁸Re: a human glioma study in mice. *PLoS One* 2014; 9: e102011.
10. Srivastava SC. Paving the way to personalized medicine: production of some promising theragnostic radionuclides at Brookhaven National Laboratory. *Semin Nucl Med* 2012; 42: 151-163.
11. Barth RF, Kaur B. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 2009; 94: 299-312.
12. Stojiljkovic M, Piperski V, Dacevic M, et al. Characterization of 9L glioma model of the Wistar rat. *J Neurooncol* 2003; 63: 1-7.
13. Sughrue ME, Yang I, Kane AJ, et al. Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors. *J Transl Med* 2009; 7: 84.

DEUXIEME PARTIE

14. Kmiecik J, Zimmer J, Chekenya M. Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J Neurooncol* 2014; 116: 1-9.
15. Clavreul A, Jean I, Preisser L, et al. Human glioma cell culture: two FCS-free media could be recommended for clinical use in immunotherapy. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2009; 45: 500-511.
16. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, et al. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res* 2002; 19: 875-880.
17. Laine AL, Clavreul A, Rousseau A, et al. Inhibition of ectopic glioma tumor growth by a potent ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules. *Nanomedicine* 2014; 10: 1667-1677.
18. Castro MG, Cowen R, Williamson IK, et al. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 71-108.
19. Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, et al. Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J Neuroimmunol* 1999; 100: 216-232.
20. Grauer OM, Nierkens S, Bennink E, et al. CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *Int J Cancer* 2007; 121: 95-105.
21. Ooi YC, Tran P, Ung N, et al. The role of regulatory T-cells in glioma immunology. *Clin Neurol Neurosurg* 2014; 119: 125-132.
22. Roszman T, Elliott L, Brooks W. Modulation of T-cell function by gliomas. *Immunol Today* 1991; 12: 370-374.
23. Tada M, de Tribolet N. Immunobiology of malignant gliomas. *J Clin Neurosci* 1996; 3: 102-113.
24. Sonabend AM, Rolle CE, Lesniak MS. The role of regulatory T cells in malignant glioma. *Anticancer Res* 2008; 28: 1143-1150.
25. Rolle CE, Sengupta S, Lesniak MS. Mechanisms of immune evasion by gliomas. *Adv Exp Med Biol* 2012; 746: 53-76.
26. Thomas AA, Ernstoff MS, Fadul CE. Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Cancer J* 2012; 18: 59-68.
27. Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, et al. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 2076-2080.
28. Morrison PF, Laske DW, Bobo H, et al. High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am J Physiol* 1994; 266: R292-305.
29. Saito R, Bringas JR, McKnight TR, et al. Distribution of liposomes into brain and rat brain tumor models by convection-enhanced delivery monitored with magnetic resonance imaging. *Cancer Res* 2004; 64: 2572-2579.

DEUXIEME PARTIE

30. Chen MY, Lonser RR, Morrison PF, et al. Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 1999; 90: 315-320.
31. Krauze MT, Noble CO, Kawaguchi T, et al. Convection-enhanced delivery of nanoliposomal CPT-11 (irinotecan) and PEGylated liposomal doxorubicin (Doxil) in rodent intracranial brain tumor xenografts. *Neuro Oncol* 2007; 9: 393-403.
32. Shultz MD, Wilson JD, Fuller CE, et al. Metallofullerene-based nanoplatform for brain tumor brachytherapy and longitudinal imaging in a murine orthotopic xenograft model. *Radiology* 2011; 261: 136-143.
33. Lorimore SA, Coates PJ, Scobie GE, et al. Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects? *Oncogene* 2001; 20: 7085-7095.
34. Moore AS. Radiation therapy for the treatment of tumours in small companion animals. *Vet J* 2002; 164: 176-187.
35. Mekid H, Tounekti O, Spatz A, et al. In vivo evolution of tumour cells after the generation of double-strand DNA breaks. *Br J Cancer* 2003; 88: 1763-1771.
36. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. *Lancet Oncol* 2009; 10: 718-726.
37. Holland AJ, Cleveland DW. Chromoanagenesis and cancer: mechanisms and consequences of localized, complex chromosomal rearrangements. *Nat Med* 2012; 18: 1630-1638.
38. Balagamwala EH, Chao ST, Suh JH. Principles of radiobiology of stereotactic radiosurgery and clinical applications in the central nervous system. *Technol Cancer Res Treat* 2012; 11: 3-13.
39. Park B, Yee C, Lee KM. The effect of radiation on the immune response to cancers. *Int J Mol Sci* 2014; 15: 927-943.
40. Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, et al. Therapy-induced senescence in cancer. *J Natl Cancer Inst* 2010; 102: 1536-1546.
41. Illidge TM, Cragg MS, Fringes B, et al. Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell Biol Int* 2000; 24: 621-633.
42. Kaur E, Rajendra J, Jadhav S, et al. Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis* 2015; 36: 685-695.
43. Ivanov A, Cragg MS, Erenpreisa J, et al. Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J Cell Sci* 2003; 116: 4095-4106.

DEUXIEME PARTIE

44. Erenpreisa J, Ivanov A, Wheatley SP, et al. Endopolyploidy in irradiated p53-deficient tumour cell lines: persistence of cell division activity in giant cells expressing Aurora-B kinase. *Cell Biol Int* 2008; 32: 1044-1056.
45. Erenpreisa J, Salmina K, Huna A, et al. Polyploid tumour cells elicit paradiploid progeny through depolyploidizing divisions and regulated autophagic degradation. *Cell Biol Int* 2011; 35: 687-695.
46. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, et al. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 22409-22435.
47. Schwarz-Finsterle J, Scherthan H, Huna A, et al. Volume increase and spatial shifts of chromosome territories in nuclei of radiation-induced polyploidizing tumour cells. *Mutat Res* 2013; 756: 56-65.
48. Erenpreisa J, Cragg MS. Mitotic death: a mechanism of survival? A review. *Cancer Cell Int* 2001; 1: 1.
49. Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol* 2007; 85: 133-148.
50. Ma Y, Conforti R, Aymeric L, et al. How to improve the immunogenicity of chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30: 71-82.

TROISIEME PARTIE

Evaluation de la toxicité et du potentiel thérapeutique des LNC¹⁸⁸Re-SSS sur un modèle pré-clinique de gliome syngénique

Objectifs

L'étude sur un modèle syngénique est incontournable. Avec notre modèle précédent Lab1, nos résultats montrent que la radiothérapie interne fractionnée est toujours bien efficace dans un modèle immunodéprimé. L'implication du système immunitaire inné et notamment des macrophages/cellules microgliales, acteurs de la réponse inflammatoire, dans l'éradication de la masse tumorale est également soulignée. Tout ceci, en parallèle aux effets de la radiothérapie interne utilisant les LNC¹⁸⁸Re-SSS.

La figure 25 illustre de manière schématique l'impact de la radiothérapie interne par les LNC¹⁸⁸Re-SSS, 7 jours après son administration intra-tumorale (analyses au jour 19), sur les cellules tumorales et l'infiltration immunitaire innée dans son environnement.

TROISIEME PARTIE

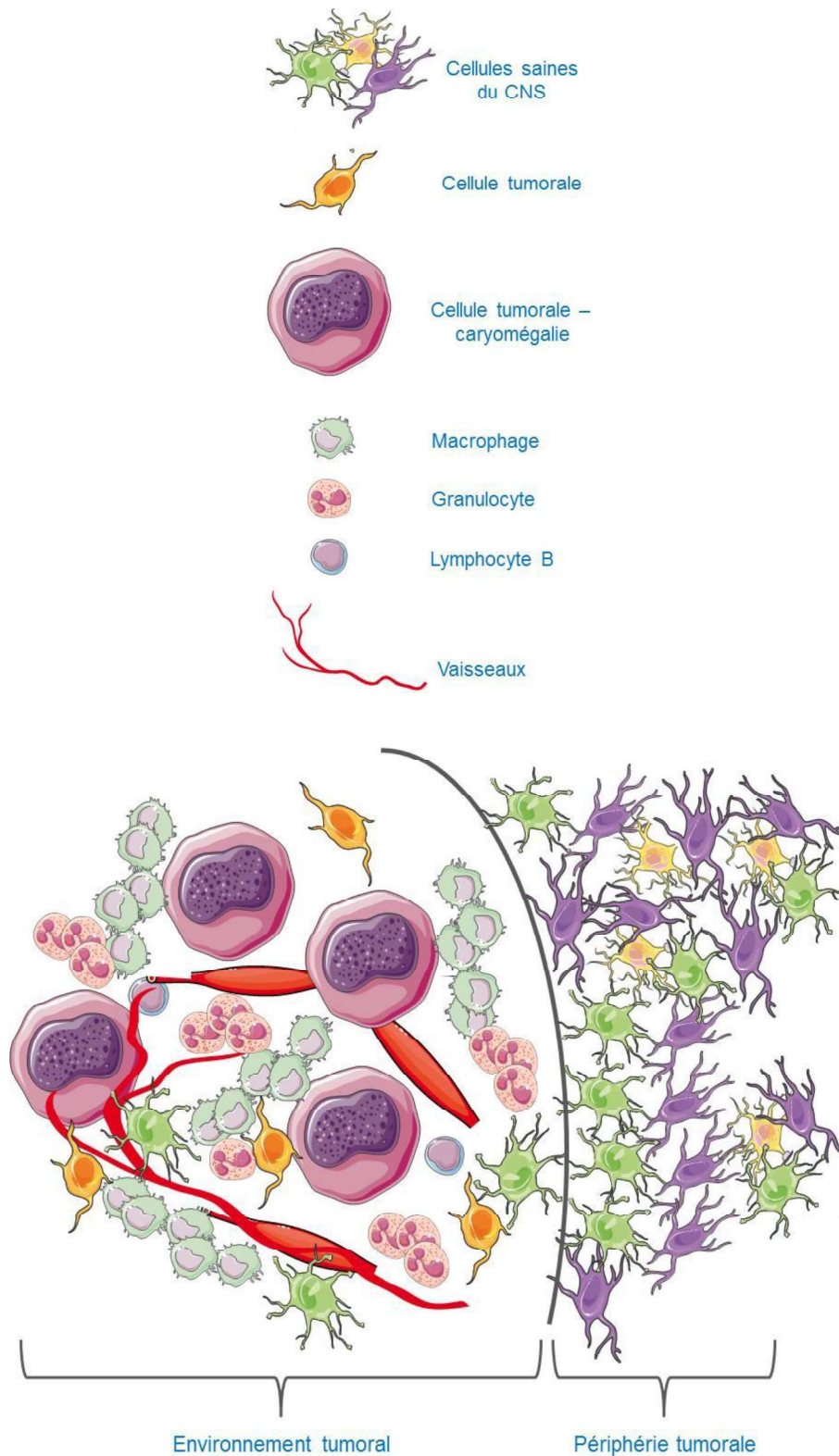


Figure 25 : Représentation schématique de l'environnement tumoral et de sa périphérie 7 jours après l'injection de 3 MBq de LNC¹⁸⁸Re-SSS au sein de la masse tumorale. Désorganisation des vaisseaux sanguins, infiltration de cellules de l'immunité innée, réponse inflammatoire et atypie des cellules tumorales.

TROISIEME PARTIE

Une étude précédente menée par Claire Vanpouille-Box a montré l'importance d'une synergie entre l'effet de la radiothérapie et l'activation des acteurs de l'immunité anti-tumorale spécifique. En effet, un recrutement des effecteurs du système immunitaire adaptatif (lymphocytes T CD4 et CD8), inné et inflammatoire (cellules Natural Killer, macrophages) a été mis en évidence. Cependant, ce modèle « rat Fisher 9L » est considéré comme étant très immunogène. De plus, les outils disponibles à l'étude de l'immunité sont moindres pour le rat comparé à ceux pour la souris. Dans ce contexte, il nous a paru intéressant de travailler avec le modèle syngénique murin GL261, peu immunogène. Il semble approprié pour étudier la réelle contribution des acteurs du système immunitaire combiné à d'autres radiothérapies internes. Cependant une bonne efficacité anti-tumorale non retrouvée, ne nous a pas permis de continuer vers cet objectif. En revanche, une étude en radiobiologie a abouti à la mise en évidence d'effets du rayonnement sur le tissu tumoral comme le décrit le travail suivant. L'investigation de la toxicité en pré-clinique est un point important pour les données nécessaires à la mise en place d'un essai clinique de phase I.

La partie III de ce mémoire est consacrée à la description des résultats expérimentaux pour le modèle GL261, à leur interprétation et à la discussion dans un dernier chapitre.

I. Matériels et méthodes

I.1 Culture des cellules GL261

Comme précédemment décrit, la population de cellules adhérentes GL261 est une lignée cellulaire bien établie en laboratoire. Les cellules sont cultivées en présence de milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Verviers, Belgique) complet et maintenue à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Le milieu de culture contient de la L-Glutamine et complété avec 10% de Sérum de veau foetal (SVF), 1% pyruvate de sodium, 1% Hépès, 1% acides aminés essentiels et 1% antibiotiques (Sigma-Aldrich, France). Le milieu est renouvelé entièrement tous les 2-3 jours. Une proportion des cellules ensemencées est non adhérente et est éliminée lors des renouvellements de milieu de culture. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 80%, elles sont traitées par 5 mL de trypsine/EDTA. Après 2 min d'incubation à 37°C, la solution de trypsine/EDTA contenant les cellules en suspension est collectée puis ajoutée à deux volumes de DMEMc. L'échantillon est centrifugé pendant 5 minutes à 10000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire est remis en suspension dans du DMEMc. Les cellules sont ensuite dénombrées sur cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan. Enfin, elles sont réensemencées à une densité de 5 000 cellules/cm² en présence de DMEMc.

Toutes les expérimentations sont réalisées avec des cellules dont le passage est compris entre 7 et 10.

I.2 Le modèle syngénique de gliome GL261

Les souris femelles C57BL6/J, âgées de 6 semaines, sont obtenues de Janvier-Labs (Le Genest Saint Isle, France). Les expérimentations sont approuvées par le comité d'éthiques des Pays de la Loire (permis N° CEEA 2012.56). Les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale de xylazine (Rompun®, Bayer, Puteaux, France: 13mg/kg) et de

TROISIEME PARTIE

kétamine (Clorketam®, Vétquinol, Lure, France: 100mg/kg), et sont positionnés sur une cadre de stéréotaxie (Stoelting apparatus).

Au jour zéro (J0), une injection intracrâniale de 10 000 GL261 en suspension dans 2 μ L de DPBS est réalisée dans le striatum droit des souris. Les coordonnées (+ 0.5 mm antérieur au bregma, - 2.5 mm latéral et - 3 mm de profondeur par rapport à la surface du cerveau) sont illustrées ci-dessous par la figure 26 :

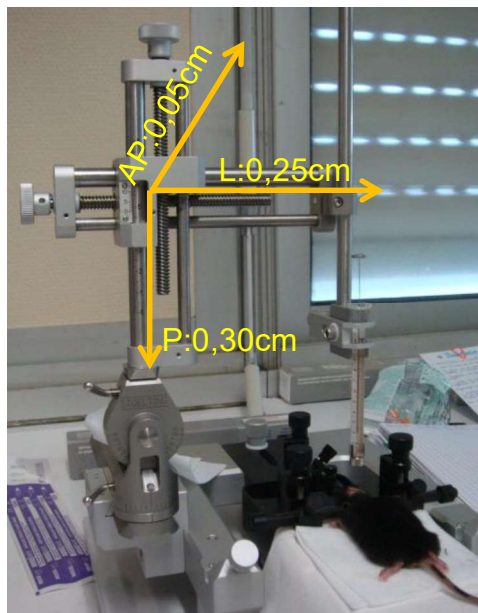


Figure 26: Dispositif de stéréotaxie dédié au modèle murin pour l'injection des cellules.

Cette opération est faite avec une aiguille de 32 gauge (1.5 cm) fixée à une seringue Hamilton de 10 μ L (700 series RN).

Les animaux sont hébergés dans des cages de polycarbonate dans une pièce dont la température est contrôlée (20-22°C), ainsi que l'humidité (50-70%) et les cycles de lumière/obscurité de 12h. L'eau et la nourriture sont délivrées *ad libitum*.

I.3 Mise en place du modèle GL261 *in vivo*

Un groupe de souris est sacrifié aux jours 12 (n=3) et 18 (n=3) de croissance tumorale dans le but de comparer pour la première fois l'analyse histologique aux images IRM. Les temps d'analyses ont été définis selon le fractionnement du traitement.

I.4 Production des LNC¹⁸⁸Re-SSS

Les LNCs et les 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS de taille de 50 nm sont formulées comme précédemment décrit dans le matériel et méthodes du modèle Lab1 (Deuxième partie du manuscrit).

I.5 Analyse de la toxicité des LNCs

Une étude histopathologique sur cerveaux sains a été élaborée afin d'étudier la toxicité des vecteurs radioactifs ou non. 3 souris par groupe ont été utilisées pour les conditions suivantes :

- LNC blanches : volume d'injection constant de 5 µL pour deux débits testés : 0.25 et 0.5 µL/min.
- 3 MBq de LNC¹⁸⁸Re-SSS : débit constant de 0.5 µL/min pour les deux volumes d'injection appliqués lors de l'étude d'efficacité : 3 et 5 µL.

Les prélèvements des cerveaux sont réalisés 48 h et 14 jours après l'injection intra-striatale et une souris saine (n'ayant pas subi d'injection) est considérée comme contrôle d'un tissu cérébral normal.

TROISIEME PARTIE

I.6 Analyses des effets des LNC¹⁸⁸Re-SSS dans le modèle syngénique

GL261 : études d'efficacité

Au jour J0, 10 000 cellules GL261, dans 2 µL de DPBS, sont implantées dans le striatum des souris comme décrit ci-dessus. Au jour 12, 3 µL de LNCs blanches contrôles ou 3 µL de LNC¹⁸⁸Re-SSS sont injectées au centre de la tumeur par CED avec un débit d'injection de 0.5 µL/min. ce protocole d'injection est répété au jour 19, avec un volume de 5 µL de LNCs blanches contrôles ou 3 µL de LNC¹⁸⁸Re-SSS.

Compte-tenu du nombre insuffisant de long survivants, le rechallenge a été non concluant et les études de l'apport de l'immunité adaptative et mémoire n'ont donc pas été menées.

I.7 Analyses de l'effet des LNC¹⁸⁸Re-SSS sur la croissance tumorale

Le volume tumoral est mesuré par IRM chaque semaine. Les souris sont sacrifiées dès la perte de plus de 10% de leur poids.

Les souris sont sacrifiées 2 jours (48h) et 14 jours (J26) après la première fraction de 3 µL de 3 MBq e LNC¹⁸⁸Re-SSS ou 3 µL de LNCs blanches (contrôles). Les cerveaux sont fixés dans le formol afin d'examen histopathologique sur coupes de 4 µm après coloration Hémalun-Eosine-Safran (HES) (ONIRIS, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes).

I.8 IRM

La progression tumorale et son volume sont suivis et mesurés par micro-IRM le jour qui précède (J11 et J18) les injections des LNCs puis chaque semaine après le protocole de traitement. Les souris sont manipulées sous l'anesthésie composée d'isoflurane/oxygène (1.5-0.5%, O₂ 0.5 L/min). A la suite de l'injection intra-veineuse de l'agent de contraste DOTA-gadolinium, les images sont directement acquises. Un appareil Bruker Biospec 70/20 opérant avec un champ magnétique de 7T et équipé d'une cryosonde 1H est utilisé afin

TROISIEME PARTIE

d'obtenir une image anatomique pondérée T1 : séquence RARE FLASH [TE = 3.3 ms, TR = 107 ms, RARE factor = 4av, mean echo time (Tem) = 1min21s, alpha = 60°, FOV = 2 x 2 (cm), matrix 192², 11 contiguous slices of 0,5 mm].

La figure 27 présente les équipements d'imagerie par résonance magnétique et d'anesthésie des souris.

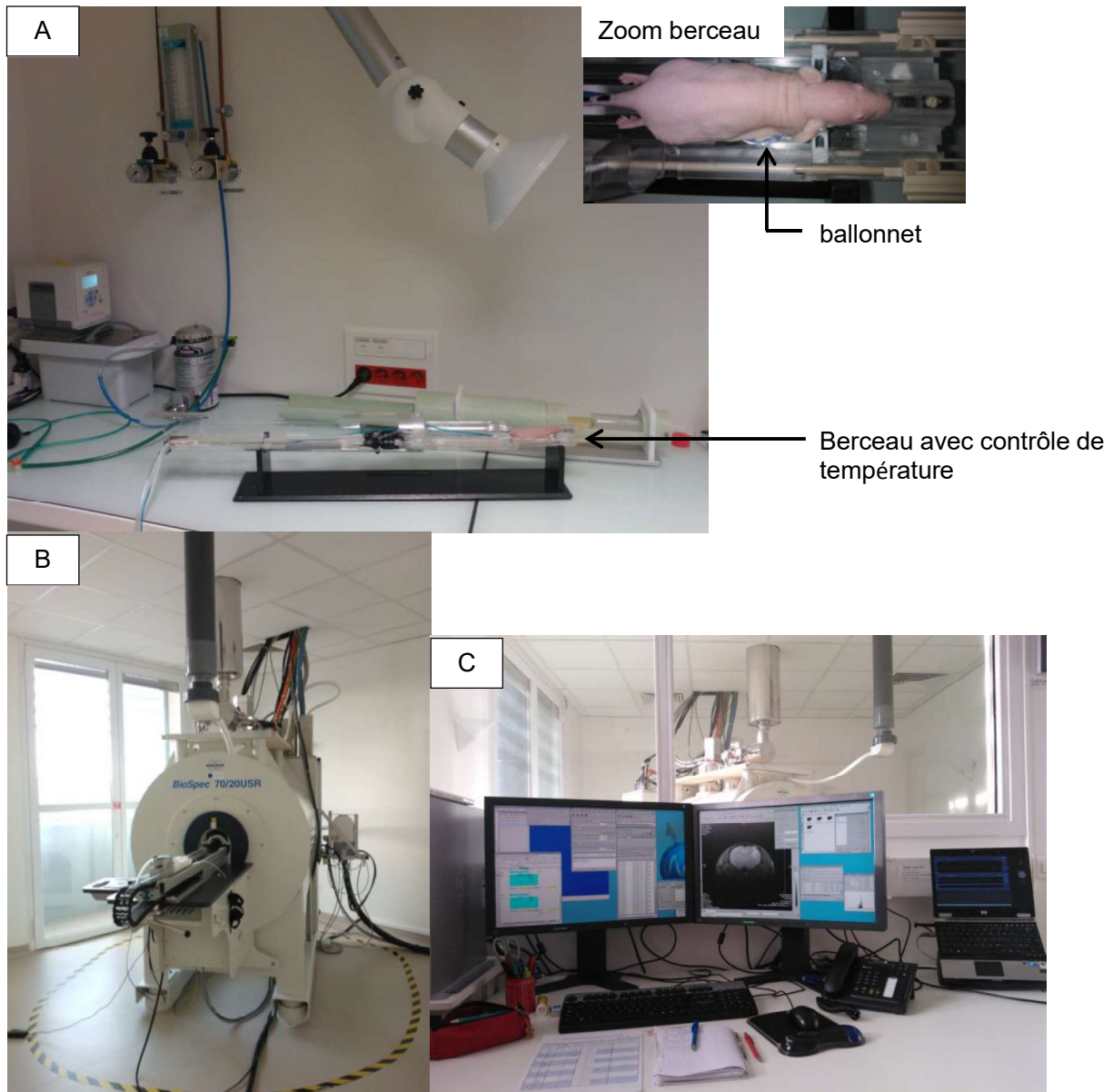


Figure 27 : A : Agencement du dispositif anesthésique-berceau chauffé utilisé pour l'antenne cryo et ayant un ballonnet pour le suivi en temps réel de la respiration de l'animal imagé ; B : Photo de la micro IRM BioSpec 70/20USR de Bruker ; C : Poste de contrôle respiratoire et

TROISIEME PARTIE

d'acquisition des imageries (une coupe axial en T2-echo1 du cerveau d'une souris nude-NMRI) obtenues avec le logiciel d'analyse PV.5.1.

La température de l'animal est maintenue à 36.5-37.5°C pendant toute la durée du protocole d'imagerie.

Le volume tumoral est déterminé sur chaque coupe de cerveau par le biais de la région d'intérêt (ROI) du logiciel PV.5.1.

I.9 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SEM. Pour l'étude d'efficacité de la radiothérapie interne, les comparaisons entre les groupes contrôles (LNCs blanches) et traités (LNC¹⁸⁸Re-SSS) sont faites en utilisant le test log-rank. Les résultats sont considérées significativement différents pour $p < 0.05$.

II. Résultats

II.1 Le modèle de gliome murin syngénique : souris C57BL/6J / cellules GL261

La mise en place il y a plus d'une vingtaine d'année de ce modèle expérimental de gliome syngénique a débuté par l'injection d'un carcinogène chimique, le 3-methylcholantrene dans le cerveau des souris C57BL/6J (Ausman JI *et al.* 1970, Zimmerman HM *et al.* 1947, Szatmari T *et al.* 2006, Maes W *et al.* 2011). A partir de cette tumeur, des lignées cellulaires GL261 ont été établies *in vitro*. Celles-ci ont été étudiées principalement pour les expérimentations en immunologie.

Notre travail a permis de présenter et de valider par deux techniques (imagerie et histologie) sa description après son induction *in vivo*. Deux temps d'analyses (jours 12 et 18) ont été choisis et correspondent à des points clés pour l'étude d'efficacité. La tumeur GL261 a comme caractéristique de développement d'être un gliome de type diffus et infiltrant qui a une croissance rapide (Figure 28). En effet, le volume tumoral 18 jours après l'implantation des cellules GL261 atteint environ $24 \mu\text{L} \pm 1,9 \mu\text{L}$ soit 4.8% de la surface d'un cerveau de souris (environ 500 μL).

Pour la première fois, une comparaison entre l'imagerie (IRM) et les coupes histologiques a contribué à suivre la progression tumorale de ce modèle. Ce dernier nécessite une injection intra-veineuse d'un agent de contraste – le gadolinium – pour visualiser la masse tumorale convenablement à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) en séquence de pondération T1. En effet, cet agent pallie la difficulté de délimiter de manière adéquate le volume tumoral qui présente une particularité infiltrante. Ce paramètre a été validé en comparant l'acquisition par la pondération T2 ou T1 avec ou sans injection d'agent de contraste. La masse tumorale apparaît plus nettement dans le cas d'une observation directe : T1-DOTA-gadolinium.

TROISIEME PARTIE

D'un point de vue histopathologique, la lésion induite correspond à une infiltration tumorale au site d'injection, installée dans le striatum, et ayant tendance à suivre le trajet de l'aiguille pour se développer. La masse tumorale, déjà bien développée à 12 jours, poursuit sa croissance à 18 jours, avec une augmentation marquée de la cellularité tumorale associée à la présence de nombreuses figures de mitoses visibles 18 jours après l'injection des cellules GL261.

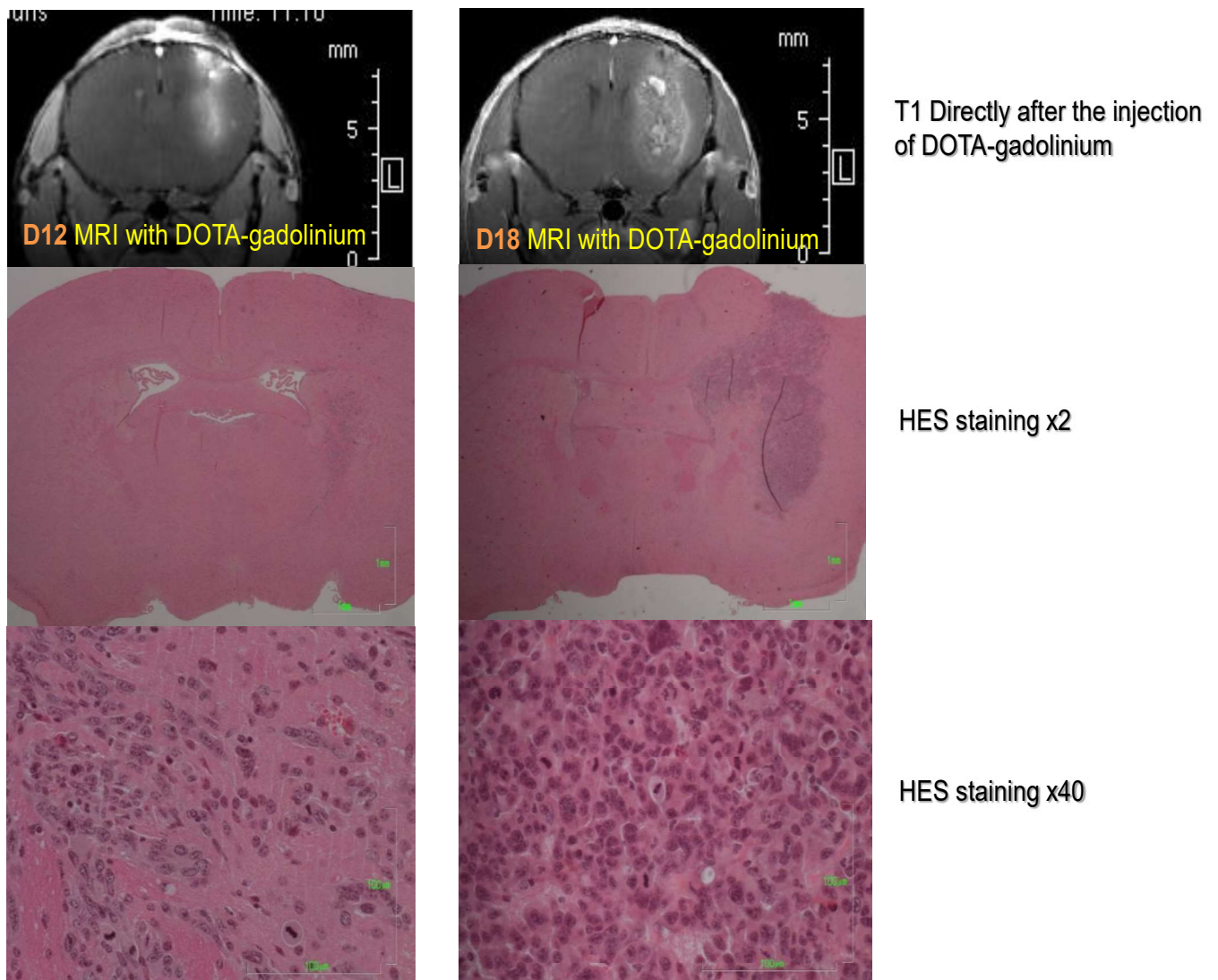


Figure 28: Images IRM comparées à l'aspect histopathologique des lésions : validation du caractère infiltrant du modèle tumoral GL261.

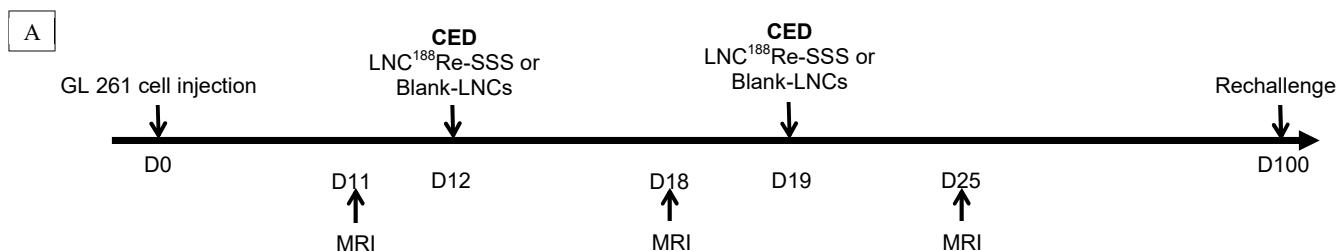
II.2 Efficacité de la radiothérapie interne fractionnée et délivrée aux jours 12 et 19 post injection des cellules de gliome GL261

Le schéma expérimental est identique à celui du modèle Lab1 précédent, avec un volume d'injection de 3 μL de 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS au jour 12 et de 5 μL de LNC¹⁸⁸Re-SSS au jour 19 (Figure 29 A). Tous les animaux traités avec les LNCs blanches meurent dans les 34 jours post injection des cellules GL261, avec une médiane de survie de 28.5 jours (Figure 29 B et C). En comparant avec ces souris contrôles, nous observons une augmentation de la médiane de survie de 79 % pour les souris traitées avec LNC¹⁸⁸Re-SSS.

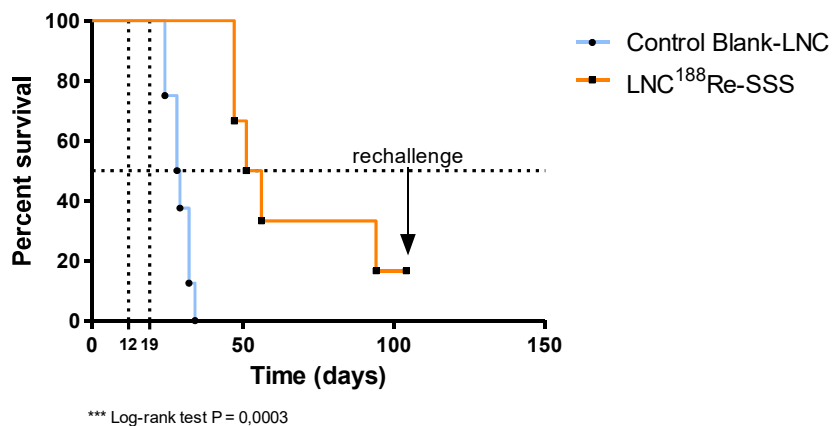
Notons que seulement deux animaux longs survivants (20%) traités avec le fractionnement de LNC¹⁸⁸Re-SSS sont sans tumeur résiduelle (Figure 29 C). Un seul a été rechallengé avec 10 000 cellules GL261 dans le striatum controlatéral gauche.

Cependant, lorsque comparé avec les résultats obtenus dans la première partie de ce chapitre, l'efficacité thérapeutique est moins probant avec le modèle GL261.

TROISIEME PARTIE



B **Survival proportions: Kaplan Meier curves**



C

Protocol	n	Survival Time (days)		Increase life time (%)	
		Range	Median	Long term survivors	IST median
Blank-LNCs	8	24-34	28,5	0	-
LNC ¹⁸⁸ Re-SSS	6	47-100	51*	2	78,9
Rechallenge	1			-	-

Figure 29: Efficacité de la radiothérapie interne fractionnée (jours 12 – 19). A) Design expérimental du traitement du modèle de gliome GL261 avec les LNC¹⁸⁸Re-SSS. B) Courbes de Kaplan-Meier des souris GL261 contrôles (n=8 Blank-LNCs) et des souris GL261 traitées (n=6 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS). et C) Tableau récapitulatif des résultats de l'étude de survie.

II.3 Effets des radiations dans le striatum sain des souris immunocompétentes

Le travail sur les cerveaux sains a permis d'établir la non toxicité du vecteur LNC seul injecté suivant les modalités d'injection pré-établis. Cette observation est révélée par examen histopathologique après coloration HES de cerveaux injectés avec un débit de 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Figure 30). Ainsi, cette analyse valide l'utilisation de ce débit pour la poursuite des études. Le débit plus faible (0.25 $\mu\text{L}/\text{min}$) ne montre également pas de lésion.

La figure 30 montre qu'il n'y a pas de toxicité majeure 48 heures ou 14 jours après l'injection de 3 MBq de LNC¹⁸⁸Re-SSS (activité utilisée lors de l'étude d'efficacité). En effet, deux jours après l'injection des LNC¹⁸⁸Re-SSS, l'analyse révèle des lésions de vacuolisation du tissu nerveux (spongieuse du neuropile) au niveau du trajet de l'aiguille d'injection, correspondant à des lésions de nécrose neuronale sans doute secondaire au traumatisme mécanique de l'injection. Quatorze jours plus tard, sont observés quelques hémorragies, du matériel granuleux évoquant des débris cellulaires et nucléaires en cours d'élimination phagocytaire et une minéralisation multifocale discrète post-nécrotique de quelques cellules neuronales et gliales sans impact majeur sur le tissu environnant. L'effet sur les tissus peut être caractérisé d'effet volumique. En effet, celui-ci est bien délimité par l'espace occupé par le volume de distribution. Par ailleurs, à long terme, les souris gardent des conditions de vie normales et la totalité des souris sont vivantes plus d'un an après l'injection de LNCs blanches ou de sérum physiologique ou de 3 MBq de LNC¹⁸⁸Re-SSS (n=4 souris par condition).

Par conséquent, l'ensemble de ces expérimentations valident l'utilisation des LNC¹⁸⁸Re-SSS sans toxicité notable.

TROISIEME PARTIE

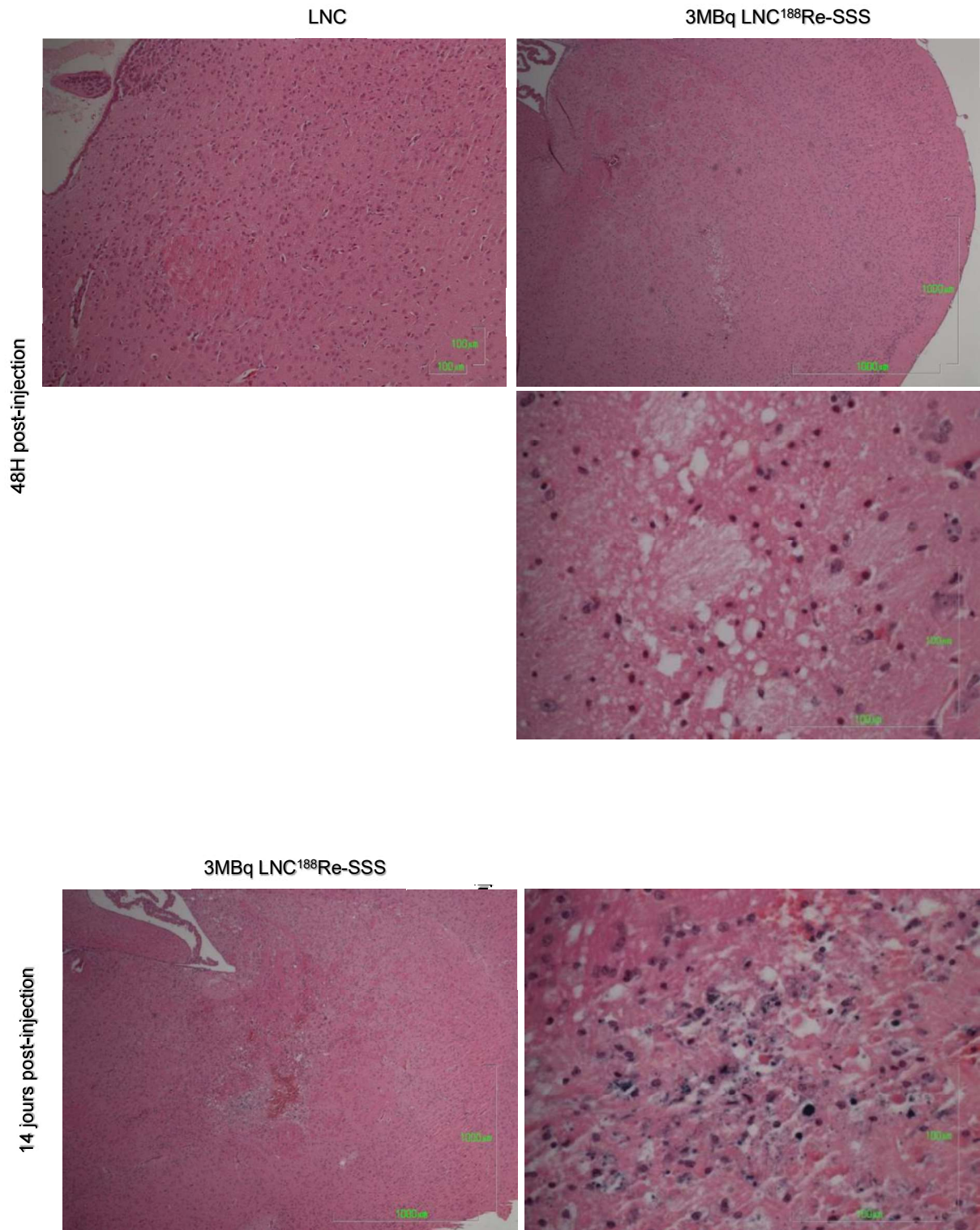


Figure 30: Images histologiques de coupes des cerveaux sains 48h et 14 jours après l'injection de LNCs blanches ou de 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS. Lésion de nécrose parenchymateuse nerveuse d'extension légère post-traumatique (trajet d'injection). Coloration Hemalun-Eosine-Safran; grandissement x10 et zoom x40.

II.4 Effets des radiations sur la tumeur

D'une manière générale, 48 heures (J14) et 14 jours (J26) après la première injection intratumorale des LNC¹⁸⁸Re-SSS, nous observons une modification de la morphologie microscopique de la tumeur en comparaison avec l'aspect observé lors de l'injection des LNCs blanches (Figure 31). La figure 31, illustre les images histologiques obtenues à la suite de colorations HES des coupes de cerveau GL261 fixés au formol suite au protocole d'injection des LNC¹⁸⁸Re-SSS.

Suite à la première injection de LNC¹⁸⁸Re-SSS, le volume tumoral apparaît réduit et le tissu est fragilisé par d'intenses remaniements de nécrose tissulaire. Cependant, malgré l'effet radiobiologique et du fait d'une seule injection de LNC¹⁸⁸Re-SSS au jour 12 (donc non suivie de la seconde au jour 19), l'effet de réduction du volume tumoral apparaît comme temporaire et le développement tumoral semble reprendre au vu de la densité cellulaire GL261 importante à J26 post-injection. Ceci est en accord avec la nécessité d'une répétition de traitement 7 jours plus tard. Comme pour les Lab1, la tumeur présente de très importantes atypies cytologiques avec des cellules de très grande taille (cytomégalie) contenant des noyaux de très grande taille (caryomégalie) aboutissant à des monstruosité cellulaires évocatrices, de cellules polyploïdes après endomitose sans division cellulaire (Figure 31 B à D).

Les remaniements nécrotiques pourraient révéler, au moins en partie, un effet radiobiologique (Figure 31 A). Toutefois, ces dommages tissulaires sont localisés au tissu tumoral et ne s'étendent pas au tissu sain environnant. De plus, il est intéressant de souligner que nous n'avons pas mis en évidence d'infiltrats significatifs de cellules immunitaires au site ou dans l'environnement tumoral.

TROISIEME PARTIE

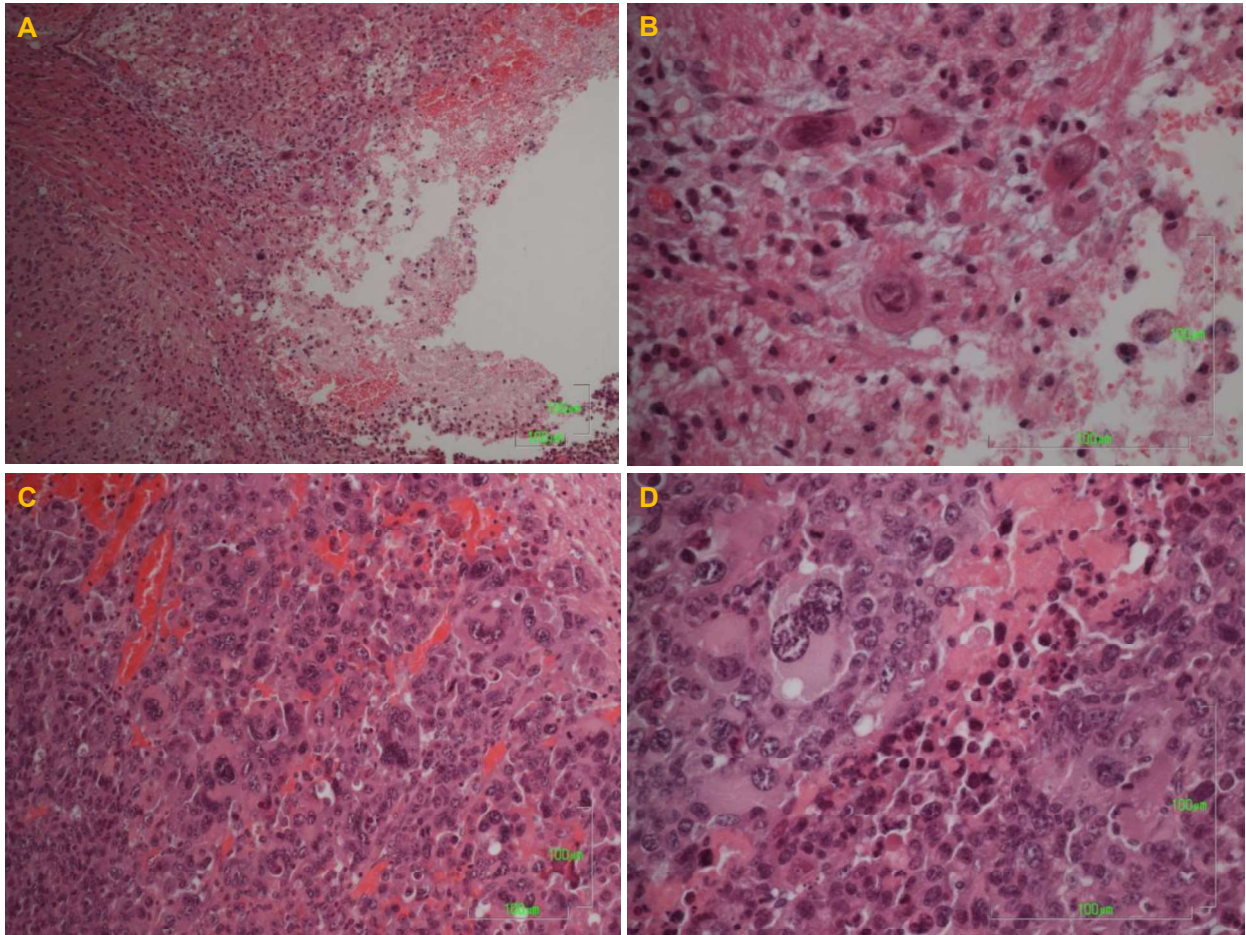


Figure 31: Images histologiques des gliomes GL261 14 jours après l'injection de 3 μL de 3 MBq LNC¹⁸⁸Re-SSS. Colorations HES des coupes fixées au formol ; (A) vue en périphérie de la tumeur dont le tissu est remanié par nécrose x10 ; (B et D) zoom x40 des atypies de cellules tumorales et (C) zoom x20 sur l'atypie morphologique.

III. Discussion – Conclusion

Cette étude sur un modèle murin syngénique menée en parallèle au modèle de xénogreffe a permis de répondre aux problématiques suivantes :

- Tout d'abord analyser l'effet tissulaire *in vivo* dans un cerveau sain d'une injection du radioélément rhénium-188 contenu dans les nanocapsules lipidiques
- Dans un second temps, nous avons montré que, sur nos deux modèles de glioblastome ayant un statut immunitaire différent, le protocole de radiothérapie interne fractionné présente une efficacité anti-tumorale.

De cette manière, nous nous sommes appliqués à étudier la toxicité du radioélément *in vivo* dès sa première injection dans un modèle immunocompétent.

D'après la bibliographie en clinique humaine, le fractionnement de dose pour la thérapie du gliome est la stratégie de base combinée à la chimiothérapie. Dans l'optique d'appliquer l'administration fractionnée de la radiothérapie et notamment celle par les LNC¹⁸⁸Re-SSS, notre équipe a préalablement démontré par le biais de l'étude de Claire Vanpouille-Box le bénéfice thérapeutique dans le modèle de rat 9L. L'étude avait utilisé deux modes d'injection dits « injection simple » (volume d'injection de 10 µL en 10 minutes) et injection par CED (Vi 60 µL en 2 heures). Pour notre part et compte-tenu du modèle étudié, nous avons optimisé au mieux l'injection par CED afin de concerner le plus grand volume de la masse tumorale. Nous avons dans un premier temps défini les paramètres du processus de CED. Depuis les années 1990, (Bobo RH *et al.*, 1994, Mamot C *et al.*, 2004, Bidros DS *et al.*, 2009, Carty N *et al.*, 2010; Debinski W *et al.*, 2009, Yun J *et al.*, 2013) un grand intérêt est porté sur les études de la technique d'injection par CED et sur le devenir des molécules injectées dans le cerveau. Cependant, de par la complexité de délivrer les médicaments correctement dans le cerveau, le choix des paramètres de CED est primordial. En effet, les variables comme le débit, le tissu ciblé, la technique, le volume infusé, affectent la CED dans le striatum (Chen MY *et al.*, 1999). Il est essentiel d'utiliser des modalités d'injection qui limitent le reflux au

TROISIEME PARTIE

long de l'aiguille et les fuites vers les compartiments anatomiques environnants comme les ventricules. Dans nos études, nous avons suivi les suggestions de l'équipe de Chen d'utiliser une petite aiguille de 32 gauge. De plus, de par notre étude de fluorescence sur le modèle Lab1, nous confirmons un débit maximal de 0,5 μ L/min permettant de minimiser le reflux de l'infusat (Chen MY *et al.*, 1999 – Krauze MT *et al.*, 2005). Nous avons donc été capables de prédire la distribution des LNCs par CED suite à l'application de différents volumes d'injections et de débits. Ceci, pour les deux temps de développement tumoral intéressants pour notre protocole de thérapie: le jour 12 et le jour 19. De par cette étude de distribution des nanovecteurs, nous sommes ici confrontés aux limites du choix du volume d'injection pour ce petit modèle expérimental animal qui est le modèle murin. En effet, un volume maximal d'injection de 5 μ L semble convenable. Dans le cerveau des souris, des volumes aberrants (beaucoup trop importants) y sont injectés dans de nombreuses études pré-cliniques. Nos résultats de mesure par IRM du volume d'un striatum de souris révèlent en effet que celui-ci représente un volume d'environ 8 μ L. Par cette observation, nous pouvons essayer d'expliquer par exemple les difficultés survenues lors de la procédure de CED dans l'étude de Shultz et son équipe. Le striatum de la souris n'a certainement pas pu contenir tout le volume d'injection de 18 μ L sans éviter les fuites (Shultz MD *et al.*, 2011).

Ce travail de thèse a validé la non toxicité de nos modalités d'administration des LNC¹⁸⁸Re-SSS et plus particulièrement un Vi de 5 μ L (volume convenable) avec un débit d'injection de 0.5 μ L/min dans le cerveau sain d'un modèle murin immunocompétent : C57BL6/J.

Le modèle GL261 est décrit pour mimer la croissance des gliomes humains en développant des caractéristiques comme la nécrose et l'invasion du tissu cérébral ou morphologiques (Newcomb *et al* 2004, Smith K.E *et al* 2009).

Comme nous l'avons vu dans la première étude avec le modèle Lab1, le fractionnement est indispensable pour obtenir une réponse favorable au traitement. Pour le modèle GL261, du fait de sa réponse anti-tumorale moindre, il semble nécessaire d'adapter l'administration du traitement et probablement nécessiter une activité du radioélément supérieure à celle

TROISIEME PARTIE

administrée au modèle Lab1. La réponse au traitement plus faible pour le modèle GL261 (décrit comme étant peu voir non immunogène (Candolfi *et al* 2007)) pourrait également s'expliquer par un manque de soutien par un infiltrat immunitaire au site de la tumeur. Ceci est observé par examen histopathologique jusqu'à 14 jours après l'injection de LNC¹⁸⁸Re-SSS. Ce modèle entièrement immunocompétent, contient tout le matériel de l'immunité adaptatif et donc des lymphocytes T, contrairement au modèle de souris nude précédemment décrit.

Parallèlement, ce deuxième modèle pré-clinique de gliome semble valider l'hypothèse de l'importance de l'effet radiobiologique sur la réponse à la radiothérapie interne.

En effet, dans cette étude, plusieurs faits sont en faveur d'un effet radiobiologique dans les groupes ayant été injectés en LNCs encapsulant le rhénium-188 avec notamment les anomalies morphologiques phénotypiques observées au microscope au niveau des cellules tumorales des tumeurs injectées (cytomégalie, caryomégalie), monstruosité cellulaire évocatrice d'une augmentation avec aberration du matériel chromosomique (polyploïdie supposée). Une unique injection des LNC¹⁸⁸Re-SSS n'engendre pas de régression tumorale accompagnant l'effet radiobiologique morphologique. Donc cette action est réversible et permet la reprise de la prolifération des cellules tumorales et sa progression après l'arrêt stress dû aux radiations. Ceci peut être expliqué par l'état de senescence cellulaire (rôle dans la réponse cellulaire à la radio et chimiothérapie : Ewald *et al* 2010) qui est souvent lié à la polyploïdisation (Sharma *et al*, 2014, Wu *et al*, 2012), accompagnée à l'absence de division cellulaire (Cohen-Jonathan E. *et al*, 1999 ; Kuilman T. *et al* 2010, Roninson I.B *et al* 2001). Une unique injection de LNC¹⁸⁸Re-SSS semblerait être une stratégie qui inhibe la progression tumorale, phase de latence qui persiste au moins 7 jours. Afin d'obtenir une éradication, au moins deux injections sont nécessaires d'après le modèle de xenogreffe Lab1. Les effets de la radiothérapie et de la chimiothérapie sur la cytomorphologie sont également décrits dans des études portant sur des cancers touchant d'autres organes comme les poumons (Idowu 2010), le sein, les tumeurs solides malignes (Wu P.C. 2012).

TROISIEME PARTIE

Ces changements reliés aux effets de la thérapie engendrent des atypies sur les cellules bronchiales semblables à celles que nous décrivons suite à l'irradiation par les LNC¹⁸⁸Re-SSS comme l'hyperchromosomie nucléaire, l'élargissement du cytoplasme et des membranes cellulaires par exemple. Ces atypies cellulaires radio-induites ne sont donc pas une propriété propre et réservée au radioélément (ici le ¹⁸⁸Re incorporé dans les nanovecteurs) ou à un seul type de rayonnement.

In vitro, les cellules GL261 13 jours après l'irradiation externe à 80% de confluence, montrent un impact sur la viabilité des cellules par une dégradation de la clonogénicité, accompagnée de modifications de la morphologie cellulaire (4 Gy à 64 Gy ; 1.5 Gy/min ou 4 Gy/min) (résultats non montrés). Ceci a également récemment été décrit dans une étude de Kaur (2015) dans lequel des échantillons de gliome humain soulignent la formation de cellules géantes multinucléées induites par la fusion cellule-cellule et le mécanisme de sénescence pour contrecarrer le stress induit par des doses d'irradiation externe allant de 6.5 Gy à 8 Gy. La dose létale dépend du type de cellules irradiées. La phase non proliférative dure environ 10 jours. Ce qui expliquerait la reprise de prolifération des cellules GL261 irradiées au-delà de 14 jours *in vitro*.

Il serait intéressant de valider ces observations de polyploidie par un marquage FISH (en ciblant le centromère d'une des 22 paires de chromosomes - hors les chromosomes sexuels) pour démontrer le possible caractère polyploïde des cellules tumorales et de l'associer à un effet direct des radiations ionisantes sur l'ADN des cellules gliales.

De futures expérimentations sont prévues pour le modèle canin spontané de tumeur gliale pour augmenter le volume des LNCs injecté et définir ainsi un protocole d'administration pouvant être appliqué à l'homme. La partie suivante développe les différents modèles gros animaux pré-cliniques de gliomes induits ou spontanés et pouvant être envisagés pour étudier les modalités d'administration et l'efficacité des agents thérapeutiques.

TROISIEME PARTIE

Références bibliographiques de la troisième partie :

- Ausman JI, Shapiro WR, Rall DP. (1970) Studies on the chemotherapy of experimental brain tumors: development of an experimental model. *Cancer Res* 30(9): 2394-400.
- Bidros DS, Vogelbaum MA. (2009) Novel drug delivery strategies in neuro-oncology. *Neurotherapeutics*. 6(3):539-46.
- Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. (1994) CED of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(6):2076-80.
- Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF, Lerner J, Lowenstein PR, Castro MG. (2007) Intracranial glioblastoma modes in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol* 85(2):133-48.
- Carty N, Lee D, Dickey C, Ceballos-Diaz C, Jansen-West K, Golde TE, Gordon MN, Morgan D, Nash K. (2010) Convection-enhanced delivery and systemic mannitol increase gene product distribution of AAV vectors 5, 8, and 9 and increase gene product in the adult mouse brain. *J Neurosci Methods* 194(1):144-53.
- Chen MY, Lonser RR, Morrison PF, Governale LS, Oldfield EH. (1999) Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 90 :315-320.
- Cohen-Jonathan E, Bernhard EJ, McKenna WG. (1999) How does radiation kill cells? *Current Opinion in Chemical Biology*, 3:77-83.
- Debinsky W, Tatter SB. (2009) Convection-enhanced delivery for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother*. 9(10):1519-27.
- Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. (2010) Therapy-Induced Senescence in Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 102:1536–1546.
- Idowu, M. O. and C. N. Powers. (2010) "Lung cancer cytology: potential pitfalls and mimics - a review." *Int J Clin Exp Pathol* 3(4): 367-385.
- Kaur E, Rajendra J, Jadhav S, Shridhar E, Goda JS, Moiyadi A, Dutt S. (2015) Radiation-induced homotypic cell fusions of innately resistant glioblastoma cells mediate their sustained survival and recurrence. *Carcinogenesis*, 36: 6, 685–695.
- Krauze MT, Saito R, Noble C, Tamas M, Bringas J, Park JW, Berger MS, Bankiewicz K. (2005) Reflux-free cannula for convection-enhanced high-speed delivery of therapeutic agents. *J Neurosurg*. 103(5):923-9.

TROISIEME PARTIE

- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, and Peeper DS. (2010) The essence of senescence. *GENES & DEVELOPMENT* 24:2463–2479
- Maes W, Van Gool SW. (2011) Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model. *Cancer Immunol Immunother* 60(2):153-60.
- Mamot C, Nguyen JB, Pourdehnad M, Hadaczek P, Saito R, Bringas JR, Drummond DC, Hong K, Kirpotin DB, McKnight T, Berger MS, Park JW, Bankiewicz KS. (2004) Extensive distribution of liposomes in rodent brains and brain tumors following convection-enhanced delivery. *J Neurooncol.* 68(1):1-9.
- Newcomb E, Tamasdan C, Entzminger Y, Arena E, Schnee T, Kim M, Crisan D, Lukyanov Y, Miller DC, Zagzag D. (2004) Flavopiridol inhibits the growth of GL261 gliomas in vivo. *Cell Cycle.* 3:2, 230-234.
- Roninson IB, Broude EV, Chang B-D. (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resistance Updates* 4, 303-313.
- Sharma S, Yao HP, Zhou YQ, Zhou J, Zhang R, Wang MH. (2014) Prevention of BMS-777607-induced polyploidy/senescence by mTOR inhibitor AZD8055 sensitizes breast cancer cells to cytotoxic chemotherapeutics. *Molecular Oncology* 8:469-482
- Shultz MD, Wilson JD, Fuller CE, Zhang J, Dorn HC, Fatouros PP. (2011) Metallofullerene-based nanoplatform for brain tumor brachytherapy and longitudinal imaging in a murine orthotopic xenograft model. *Radiology.* 261(1):136-43.
- Smith KE, Fritzell S, Badn W, Eberstål S, Janelidze S, Visse E, Darabi A, Siesjö P. (2009) Cure of established GL261 mouse gliomas after combined immunotherapy with GM-CSF and IFN γ is mediated by both CD8 $^{+}$ and CD4 $^{+}$ T-cells. *Int. J. Cancer* 124, 630-637.
- Szatmari T, Lumniczky K, Désaknai S, Trajcevski S, Hídvégi EJ, Hamada H, Sáfrány G. (2006) Detailed characterization of the mouse glioma 261 tumor model for experimental glioblastoma therapy. *Cancer Sci* 97(6):546-553.
- Wu PC, Wang Q, Grobman L, Chu E, Wu DY. (2012) Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy. *Exp Oncol* 34(3): 298-305.
- Yun J, Rothrock RJ, Canoll P, Bruce JN. (2013) Convection-enhanced delivery for targeted delivery of antiglioma agents: the translational experience. *J Drug Deliv.* 2013:107573.
- Zimmerman HM, (1941) Experimental brain tumors. *Cancer Res* 1:919-938.

QUATRIEME PARTIE:

LES MODELES TRANSLATIONNELS

Introduction

L'ensemble des expériences réalisées sur l'injection des LNC¹⁸⁸Re-SSS ont montré que les résultats de leur distribution sont primordiaux au devenir et efficacité des nanocapsules. Par ailleurs, la distribution des molécules suite à la technique de CED n'est pas simple à prédire et à mettre en œuvre sur des petits modèles tels que les souris. De manière à appréhender et contrôler les facteurs influençant la bonne distribution des agents thérapeutiques par la technique de CED, 3 modèles animaux pré-cliniques sont principalement utilisés.

Cette cinquième et dernière partie de ce manuscrit présente suite à un bref rappel de la technique de CED, les différents modèles pré-cliniques disponibles pour la mise au point de la technique de distribution par CED des médicaments testés. Contrairement aux modèles murins classiquement étudiés, cette évaluation est généralement effectuée dans des cerveaux sains. Quelques rares modèles gros animaux sont porteurs de gliome. La tumeur se développe spontanément (modèle canin) ou elle est implantée artificiellement au sein du cerveau (modèle porcin).

I. Rappels sur la CED

La distribution adéquate des agents thérapeutiques par CED est influencée par la pharmacocinétique de la molécule injectée ainsi que par les variables techniques (cathéter utilisé, débit d'injection...) et mécaniques du tissu cible (pression, zone anatomique...). Cette modalité d'administration nécessite de faire ses preuves d'un point de vue logistique, technique (précision, matériaux utilisées...) et d'efficacité sur des modèles animaux permettant de fournir des conditions de travail proches de celles qui sont présentés par l'homme.

QUATRIEME PARTIE

Pour le modèle murin, l'étude de Chen *et al.*, en 1999 précise que pour ce modèle animal (rats femelles Sprague-Dawley) l'aiguille utilisée pour l'injection dans la matière grise (striatum) ne doit pas excéder 32 gauge. La CED doit être réalisée avec un débit compris dans l'intervalle suivant : 0.1-0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, afin d'obtenir une injection optimale sans reflux. En effet, l'utilisation de grosses canules et un débit important engendrent plus de fuites (environ 30%) comparé aux faibles débits (5%). Cependant l'utilisation d'un matériel aussi fin à l'échelle humaine n'est pas réalisable du fait du risque de déformation et d'occlusion. De plus, un débit lent n'est pas envisageable en clinique.

On voit bien d'après toutes ces études dans les modèles murins que pour les traitements in situ, rien que la question du volume optimal à injecter et du débit est complexe et ne fait pas consensus aujourd'hui. Pour pouvoir envisager de tels traitements chez l'Homme, il faut d'abord pouvoir déterminer le volume et le débit d'injection optimal dans un cerveau de taille humaine, d'un ordre de grandeur très différent de celui des souris et rats. D'où l'intérêt de disposer de modèles animaux à échelle représentative du cerveau humain.

De plus, faire le lien entre efficacité d'un traitement et modalités d'injections est difficile dans les modèles murins car on ne peut pas facilement et très précisément déterminer la concentration en principe actif dans la tumeur et dans les tissus environnants. Même en utilisant un équipement de type micro TEP ou micro SPECT, la taille de l'animal et de son cerveau (et bien sûr du foyer tumoral, quasi « microscopique ») limitent grandement la portée de telles études et reste difficilement transposable directement à l'Homme. Dans les modèles souris, on se contente donc souvent (y compris dans la littérature) d'une évaluation d'efficacité basée sur la survie. Dans les rares études avec imagerie détectant le radiopharmaceutique injecté chez le rat, aucune évaluation dosimétrique précise n'a été réalisée concernant la dose reçue par la tumeur.

Les modèles « gros animaux » qui commencent à être utilisés pour ce type de traitement pourraient avoir l'intérêt de permettre des suivis plus précis par imagerie nucléaire de la

QUATRIEME PARTIE

diffusion locale du radiopharmaceutique. De plus, les modalités d'injection se rapprochent davantage en pratique de celles envisageables en clinique humaine (matériel d'injection, de fixation au crâne...).

La taille du cerveau permet aussi de cibler plus précisément le site à traiter. Enfin, les modèles gros animaux porteurs de tumeurs pourraient présenter l'intérêt que le tissu injecté soit de la « bonne consistance » par rapport aux GBM de l'Homme : la diffusion du médicament y reflèterait mieux la réalité que dans un tissu cérébral sain, à la fois généralement moins dense mais aussi sans foyer de nécrose ni néovascularisation.

Etant donné l'intérêt potentiel des modèles « gros animaux » pour la transposition à l'Homme de la technique que nous avons étudiée chez la souris, nous proposons de présenter une revue synthétique des modèles gros animaux dans une cinquième partie ainsi que les études préliminaires qui ont été débutées à Nantes chez le chien, auxquelles nous avons participé.

II. Les modèles gros animaux pré-cliniques

II.1 Le modèle porcin

Du fait de la difficulté à cibler précisément la zone cérébrale à traiter, les modèles gros animaux (chiens, cochons, primates non humains), plus proches des dimensions du cerveau humain que les modèles murins, sont d'une grande importance afin d'améliorer et d'optimiser l'approche technique. En effet, les outils développés ne nécessiteront pas ou peu de modifications pour la transposition à l'homme.

Pour l'instant, il y a surtout eu des tests techniques sur porc avec cerveau sain et peu de modèles tumoraux.

QUATRIEME PARTIE

A partir de 2011, l'intérêt pour le modèle porcin autre que le Gottingen mini-pig s'est développé. Ce dernier est facile à manipuler grâce à sa petite morphologie. Cependant, du fait de sa petite taille cérébrale, de sa faible épaisseur crânienne, et de son large sinus frontal qui complique l'implantation des électrodes et des cathéters, est moins propice au développement des techniques d'injection localisée telle que la CED, capable de distribuer les molécules dans de grands volumes cérébrales (Bjarkam *et al.* 2004 ; White E *et al.* 2011). Une première étude menée par White et al. en Angleterre, a permis de mettre au point le modèle porcin issu du croisement Large White/Landrace pigs (White E. *et al.* 2011). Cette étude a pour but d'analyser des problèmes liés au cadre de stéréotaxie adapté à la manipulation de l'animal lors de la chirurgie ou de l'imagerie et l'utilisation des cathéters/canules (nombre implanté, caractéristiques) adéquats pour des injections intra crânielles uniques ou répétées. Les compromis pour l'étude de la CED ont permis de choisir le modèle cochon Large White/Landrace « optimal » suivant : six mâles de 45 kg (4-5 mois), âge dont la croissance permet une fixation du cathéter au crâne et la visualisation de la matière blanche à l'IRM. En effet, à un âge inférieur à 4 mois, le crâne est trop fin pour pouvoir correctement fixer le cathéter et la matière blanche n'est pas entièrement myélinisée, ce qui la rend difficile à observer par imagerie. Le développement des cochons Large White/Landrace dès 6 mois d'âge rend impossible leur manipulation (poids important, fixation de la tête au cadre de stéréotaxie compliquée...). Cette étude met en évidence la nécessité des modèles gros animaux pour faire évoluer les équipements de stéréotaxie et les procédures de chirurgie incluant la modalité d'administration par CED. L'année suivante, la même équipe présente une nouvelle étude évaluant la CED délivrée par un système de cathéters implantables (Bienemann A. *et al.*, 2012). Ceci, de manière ponctuelle/intermittente ou récurrentes sur trois modèles pré-cliniques : le rat Wistar, le Large White Landrace pig et le NIH Miniature pig. Un système de cathéters implantable correct, doit présenter les caractéristiques suivantes : robustesse, biocompatibilité, facilité d'accès pour des injections répétées et diamètre qui ne permette pas de reflux et qui ne s'occlura pas entre les périodes d'injections. Les essais chez 4 Large White Landrace pigs ont permis de confirmer à échelle

QUATRIEME PARTIE

de taille humaine le choix d'un cathéter de carbothane (5 mm de long, diamètre interne de 0,35 et un diamètre externe de 0,6 mm) montrant préalablement le moins d'obstruction et ceci comparé à l'implantation d'autres matériaux de diamètres variables (PolyEther Ether Ketone, silice fondue) chez 6 rats (Figure 32).

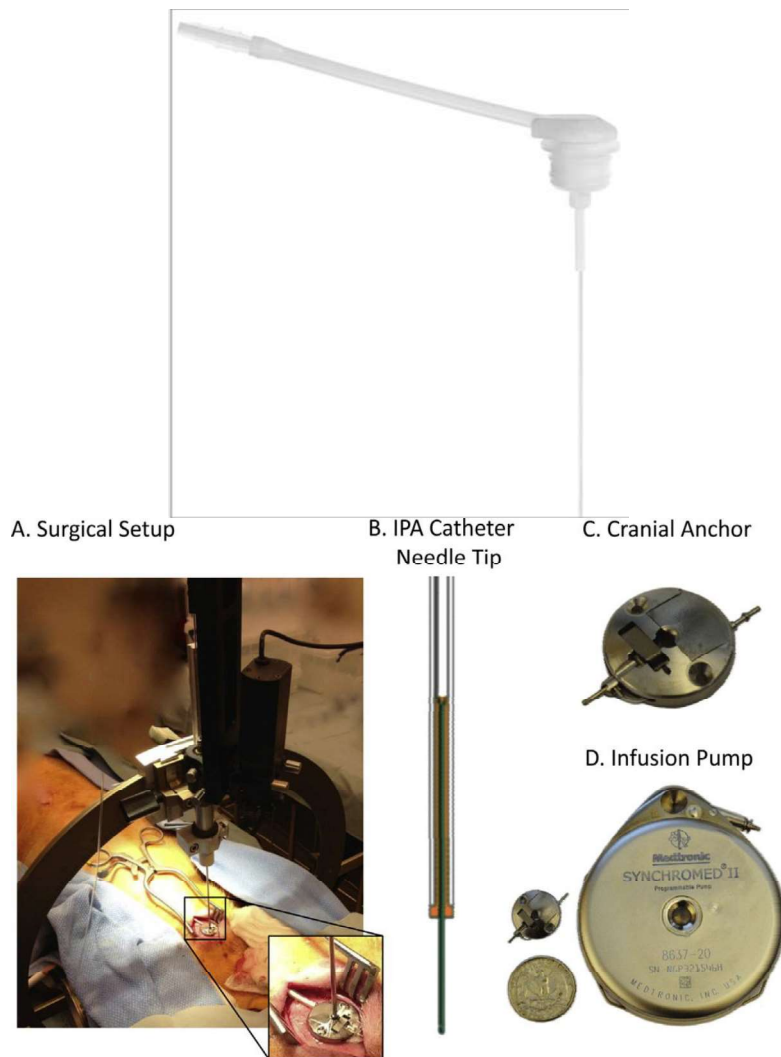


Figure 32 : Illustration du cathéter (A) et de la pompe Medtronic Synchronomed II (D) (d'après Bienemann A. *et al.*, 2012 et Kim I. *et al.*, 2014).

Cependant, du fait de la problématique de la croissance des porcs (augmentation du volume de la boîte crânienne) et des conséquences engendrées au cathéter (changement de position, torsions, déconnection, expulsion du cerveau), 3 NIH miniature pigs sont utilisés

QUATRIEME PARTIE

pour 14 injections avec un cathéter implanté en sous-cutané (SoloPort™) pendant la période de l'essai. Les auteurs ne donnent pas d'indication sur les données du volume de distribution. Il y est seulement mentionné la reproductibilité de l'injection et le reflux engendré en fonction de la zone infusée par le cathéter (antérieur et en profondeur dans le putamen droit). Le matériel et le diamètre interne du cathéter, la solution infusée sont des facteurs de risque importants à prendre en compte pour minimiser les occlusions.

L'injection prolongée d'un agent thérapeutique cytotoxique (Topotecan) pour les cellules prolifératives des gliomes par l'intermédiaire d'une pompe placée Medtronic Synchronomed II en sous-cutanée (approuvée par la FDA) a été validée pour le parenchyme cérébral de cochons (Sonabend A.M. *et al.*, 2011). Cette injection intracérébrale de manière continue sur une longue durée (pendant une période de 10 jours) administre localement une concentration stable de l'agent chimiothérapeutique. La pompe Medtronic Synchronomed II utilisée dans quelques études dont celle de Kim chez le porc (Kim I. *et al.*, 2014) est illustrée par la figure 27 (D). Elle est déjà utilisée en clinique pour le GBM (Kunwar *et al.*, 2007).

Une autre évaluation d'un agent thérapeutique potentiel et vectorisé dans un liposome (MGMT-siRNA/cationic liposome) a été réalisé chez le porc et les rats sprague dawley (Tsujiuchi T. *et al.*, 2014). Les auteurs ont répondu à la problématique de savoir si l'administration par CED était concevable pour leur vecteur. L'étude conclut que la CED n'est pas la voie d'administration idéale et qu'elle n'est donc pas à recommander pour tous les médicaments à visée locale dans le tissu cérébral. En effet, dans ce cas, la distribution n'était pas idéale et limitée que ce soit dans la matière grise ou la matière blanche dès le modèle pré-clinique rat. Le modèle porc le confirme. Ceci peut être en partie expliqué par la charge positive des liposomes à leur surface qui est un facteur limitant pour la distribution dans le cerveau.

QUATRIEME PARTIE

Récemment (en 2014) et pour la première fois, une équipe française a réussi à induire un glioblastome à partir de deux souches cellulaires différentes (U87 MG et G6) chez un cochon (Selek L *et al.*, 2014). Le temps de développement d'1 mois est gérable avec la lignée U87 MG couramment utilisée en laboratoire (Figure 33). A ce timing de pousse tumorale, la masse présente un volume d'environ 10 000 mm³. La nature de gliome d'origine astrocytaire a été validée par le marquage GFAP. De plus, la tumeur présente des caractéristiques anatomopathologiques présentées dans la classification WHO comme par exemple la présence d'évènements mitotiques, d'angiogenèse et d'infiltration en périphérie de la masse mère.

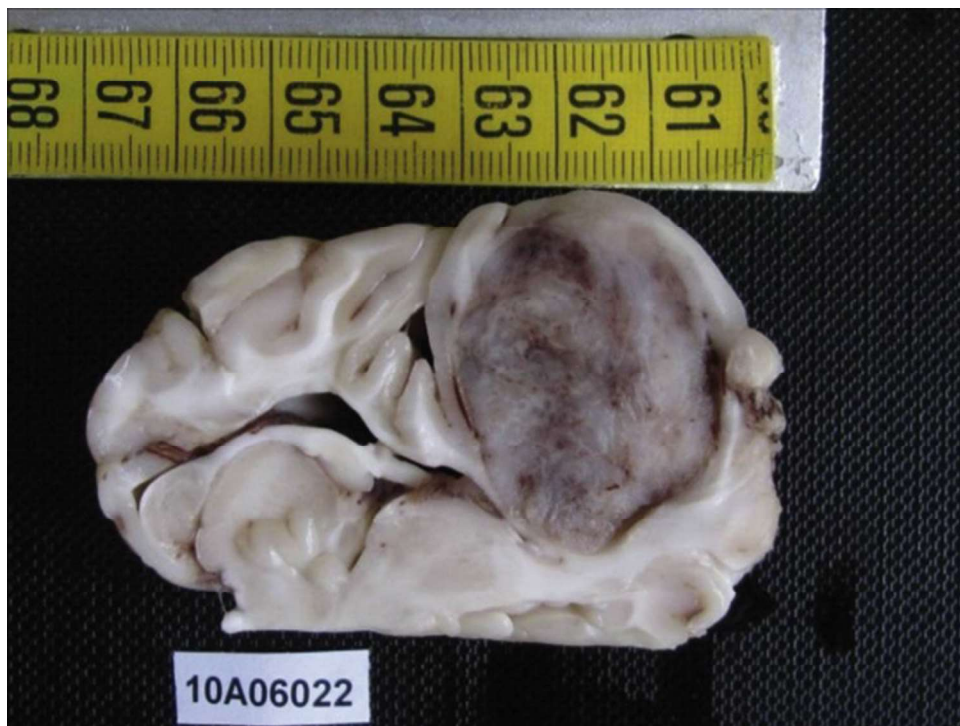


Figure 33 : Examen macroscopique d'une coupe coronale du cerveau d'un cochon avec une masse tumorale développée à partir de cellules U87 MG (d'après Selek *et al.*, 2013).

QUATRIEME PARTIE

Il a déjà été démontré dans les modèles murins (souris, rats) de CED intracérébrale que la distribution n'était pas identique lorsque l'injection était réalisée dans un tissu sain ou dans un tissu tumoral. En effet, la composition de la masse et la densité du tissu tumoral sont des paramètres non négligeables à prendre en compte. Du fait des améliorations techniques concernant la CED précédemment présentées, ce nouveau modèle gros animal de xénogreffe orthotopique est par conséquent idéal pour tester les stratégies locales qui montrent déjà un intérêt thérapeutique chez les modèles murins.

Il serait une bonne simulation des conditions retrouvées dans le cerveau de l'homme avant une transposition à la clinique humaine. De plus, il est une alternative au modèle primate qui va maintenant être présenté.

Le Tableau X suivant est un récapitulatif des articles concernant les études sur les améliorations techniques de la CED chez le cochon.

QUATRIEME PARTIE

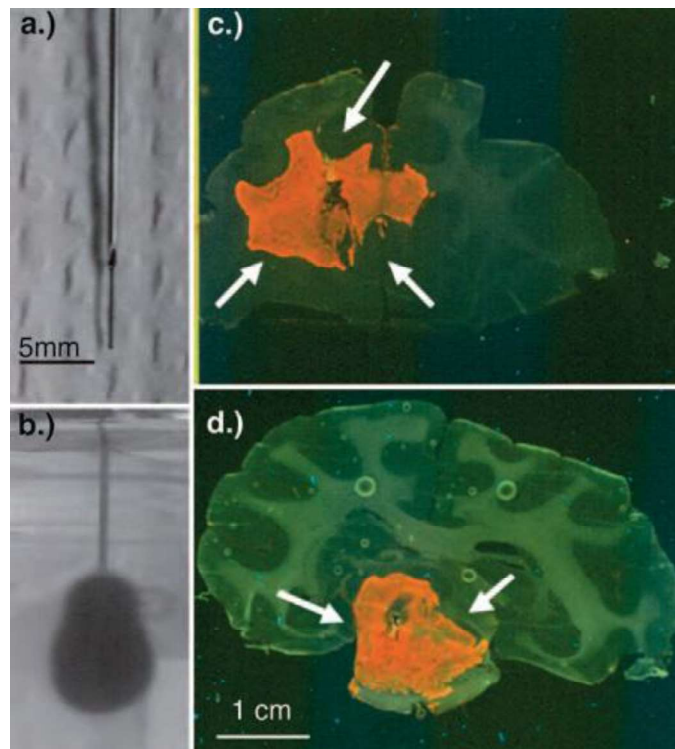
Auteurs	Modèle pré-clinique	Caractéristiques de l'injection				Animal	Résultats	Limites / compromis
			débit (µL/mL)	volume injecté	localisation			
White E. <i>et al.</i> , 2011 (UK)	n=6 mâle issus du croisement Large White Landrace pigs sains (45 kg)	plan chirurgical pour déterminer la localisation des cannules: logiciel ACCISS-II cadre de stéréotaxie initial = Leksell D mais modifié pour l'étude pour être compatible à l'IRM bras robotique pour la stéréotaxie cathéter = tube carbothane avec un diamètre externe de 0,4 mm inséré au travers d'un tube guide en carbothane (0,6 mm), guidé par une pièce en carbothane implanté dans le trou trépanation de 8 mm	0,5 µL/min (5 min), 1 µL/min (5 min), 2,5 µL/min (5 min) et 5 µL/min (20 min)	120 µL gadolinium-DTPA	putamen sain	Cochons	Large W/L pig données transposables en clinique besoin d'une immobilisation totale de la tête pour IRM ACCISS II plus précis que l'atlas du cerveau standard grâce au bras robotisé = un trou percé bien rond et non oval > pas besoin de ciment pour fixer la pièce au trou > pas de réaction exothermique qui endommagerait le cathéter implantation des cathéters avec une erreur inférieure à 0.623 mm. widespread distribution dans le putamen des hémisphère gauche et droit	Gottingen minipigs "non autorisé" en UK prise de poids rapide du Large W/L pigs pendant sa croissance > idéal: 4-5 mois artefacts à l'imagerie dûs à la respiration de l'animal résolution faible car: unité de neurochirurgie avec un 1.5 T plutôt qu'un 3 T
Bienemann A. <i>et al.</i> , 2012 (UK)	n=57 rats mâles Wistar n=4 Large White Landrace pigs n=4 NIH miniature pigs sains	système de cathéter implantable (4 composants cf. figure) pour des injections chroniques et intermittentes coordonnées de positionnement par rapport au bregma chez les rats: AP=0.5mm, L=3mm	rats: 5µL/min (pas d'incrémentations) Large WL pigs: 0.5µL/min (5min), 1µL/min (5min), 2.5µL/min (5min) et 5µL/min (20min) NIH pigs: 0.5µL/min (5min), 1µL/min (5min), 1.5µL/min (5min), 2µL/min (5min), 2.5µL/min (5min), 3µL/min (5min) et 3.5µL/min (2min)	rats: 4µL 1% BSA pigs: 120µL gadolinium-DTPA, 15 µL dans aCSF pour vérifier la position des cathéters par IRM	cerveau sain, matière grise (J1, J42; J80 et J161)		choix du cathéter carbothane (diamètres: externe 0.6 mm, interne 0.35 mm) > 28 jours en place sans injection: pas obstrué. 1 cochon avec une hémorragie lors de l'ouverture de la dura (pas d'implantation du cathéter) 1 cochon avec 1 cathéter dans le putamen gauche; 1 avec 2 cathéters dans le putamen droit, le 3ième avec 1 cathéter dans chaque putamen. injections sur une période supérieure à 163 jours reflux quand le cathéteur positionné en antérieur n'a pas eu de débit graduel.	croissance du Large WL pigs > déplacement et déformation du cathéter laissé en place > NIH miniature pigs problème de contrôle du débit: manque d'incrémentations pour 1 cochon
Sonabend A.M. <i>et al.</i> , 2011 (USA)	preuve de concept n=6 cochons mâles sains (20 kg)	pompe sous-cutanée Medtronic Synchromed-II cathéter de diamètre interne de 0.7mm, terminaison coupée pour avoir un seul trou pour l'injection suivis par IRM	0.7 mL/24h pendant 3 ou 10 jours	Topotecan	cerveau sain		CED topotecan/gadolinium bien tolérée 3 jours après l'injection = distribution maxi et stable si l'injection est poursuivie pendant 10 jours	la perte de l'infusate limite le volume de distribution
Barua N.U. <i>et al.</i> , 2013 (UK)	n=6 NIH miniature pigs sains	idem White et Bienemann cathéter guide de diamètre interne de 0.6mm et externe 0.7mm cathéter central de diamètre interne de 0.4mm et externe de 0.6mm (septum seal: SoloPort) 2 cathéters dans la matière blanche antérieure et postérieure	grand débit: 10µL/min 0.5L/min (5min), 1.0 L/min (5min), 2.5 L/min (5min), 5L/min (10min) ± 10L/min	grand volume: 182,5 à 700µL par cathéter gado-DTPA (IRM) AAV (thérapie génique)	cortex cérébral (matière blanche)		pas de reflux, ratio Vd/Vi: souligne la différence de distribution en fonction de la zone infusée (matière blanche ou matière grise): plus grandes élasticité dans la matière blanche comparée à la matière grise	
Kim I. <i>et al.</i> , 2014	n=5 cochons mâles domestiques sains (environ 30 kg)	système pour injection chronique en intraparenchyme fait de 4 parties: pompe sous-cutanée Medtronic Synchromed-II	BOLUS					
Tsujiuchi T. <i>et al.</i> , 2014 (Japon)	n= 25 rats sprague dawley (mâles, 5 sem) ou rats mâles Wistar (essais CED), cochons sains	étude pilote chez le rat avant de passer au porc coordonnées de positionnement par rapport au bregma chez les rats: AP=5mm, L=3mm, P=5mm cathéter cochon: diamètre externe 0.2mm	rats CED: 0.5 ou 2.5 ou 5µL/min pigs: 0.5µL/min à 1µL/min puis 2.5µL/min et 5µL/min après des intervalles de 10 et 5 min	rats: 10µL LipoTrust avec ou sans siRNA rats CED: liposomes+fluo pigs: 140µL	cerveau sain matière blanche (frontal droit)		pas effet délétère chez les rats (avec ou sans TMZ en intrapéritonéal en plus), CED non concluante dans chacun des deux modèles rats: grand débit (5µL/min) = reflux significatif dans la matière blanche	CED = distribution dépendante de la molécule infusée
Selek L. <i>et al.</i> , 2014 (France)	n=15 White large Landrace female pigs (3 mois) avec tumeur induite	teste de 2 lignées cellulaires: U87 MG et G6 (cellules souches qui reproduisent l'hétérogénéité des GBM) coordonnées: 1cm de la suture centrale, 3cm antérieur à la crête occipitale suivi de la progression tumorale par IRM	20µL de suspension cellulaire (10x10 ⁶)	-	gliome induit pour la première fois dans un grand modèle pré-clinique > cellules placées dans parietal coronariata		succès de l'induction des GBM > mise en place d'un nouveau grand modèle animal opérationnel n=14/(15 cochons) avec développement U87MG en 30 jours > signes cliniques (apathie, épilepsie) n=1/(5 cochons) avec développement G6 en 60 jours	attention à ne pas percer la dura! Traitement immunosuppresseur (oral, 2 fois/jours)

QUATRIEME PARTIE

II.2 Le modèle primate non humain

Le modèle primate non humain, proche de l'anatomie humaine est l'animal le plus compliqué à manipuler et contraignant d'entretien. Il nécessite au moins 1 mois de quarantaine avant de débiter l'étude, de locaux spécialisés à son hébergement qui occasionne entre autre, des hauteurs de plafond, une cage dimensionnée par primate et donc un nombre limité de d'animaux pris en charge pour une étude (environ 6 singes). Mise à part qu'il faille attendre environ 10 ans pour que le singe atteigne sa taille adulte, son utilisation est controversée pour des questions éthiques. A priori, en CED on n'a jamais utilisé de modèle tumoral induit chez le singe. L'ensemble des études de distribution sont basées sur des cerveaux sains.

Une équipe américaine de l'université de Californie, contribue largement à la recherche concernant la CED sur les Cynomolgus monkeys (*Macaca Fascicularis*). A partir des études préliminaires (Krauze *et al.*, 2005) avec du gel d'agarose, puis des rats et enfin des singes sains, ils ont conçu une canule combinée à un tube de silice fondu ne permettant pas le reflux. La canule est montée d'une aiguille 27 gauge (Figure 34a).



QUATRIEME PARTIE

Figure 34 : (A) photographie illustrant la cannule anti-reflux développée dans l'étude the step-design cannula used (B) Distribution de 100 μL de bleu trypan dans le gel d'agarose à un débit de 5- $\mu\text{L}/\text{minute}$. (C) Coupe du cerveau d'un singe (épaisseur 40 μm) révélant la distribution de 700 μL de liposomes couplés à la rhodamine dans la corona radiata (flèches). (D) idem dans le tronc cérébral (flèches). (d'après Krauze *et al.*, 2005).

L'injection est unique et est administrée à un débit augmenté toutes les 10 minutes pour atteindre un débit maximal de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Il est à souligner que ces caractéristiques d'injections sont identiques pour chaque étude permettant la confrontation des études entre-elles (ce qui n'est pas le cas dans les modèles murins et porcins, ce qui rend presque impossible leur comparaison).

La figure 35 illustre le dispositif utilisé par Krauze pour la CED intracérébrale.

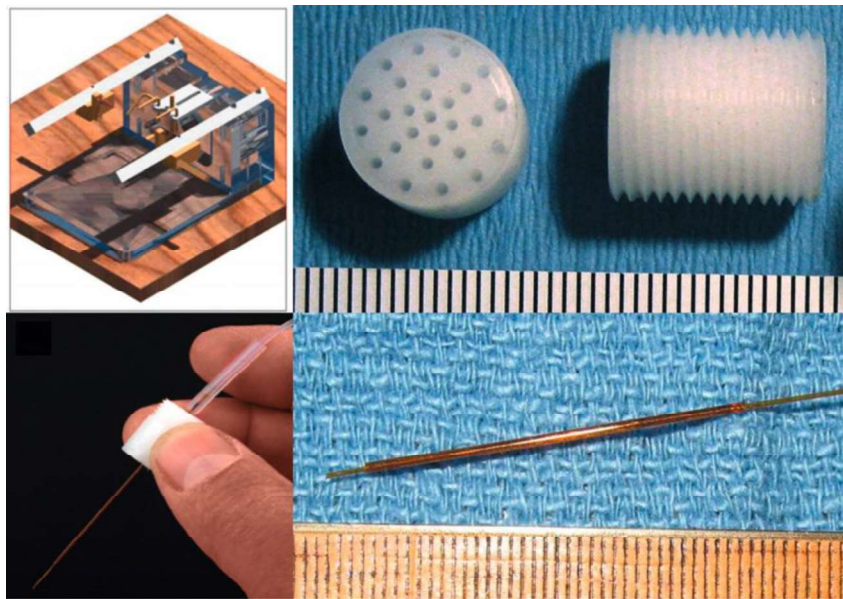


Figure 35 : (A) photographie illustrant le cadre de stéréotaxie compatible IRM pour le singe (B) Vue détaillée du guide de la canule. (C) Tube de silicone + guide + canule. (D) Zoom sur la canule avec ses composants internes et externes, conçue pour l'étude. Echelle millimétrique (d'après Krauze *et al.*, 2009).

Le modèle primate non humain a permis de tester la distribution dans différentes zones anatomiques du cerveau (matière blanche : corona radiata, la matière grise : putamen ou le tronc cérébral).

QUATRIEME PARTIE

Outre la volonté d'approfondir les connaissances sur la CED administrée dans les différents tissus cérébraux sains et par conséquent d'optimiser la technique de distribution, la toxicité des agents thérapeutiques comme le CPT-11 a été évaluée (Krauze *et al* 2009). Les équipes testent les liposomes chargés avec le CPT-11 (ou Irinotécan), analogue de la camptothecin comme le topotecan, un inhibiteur spécifique de l'enzyme nucléaire la topoisomérase I. L'action de la CPT-11 entraîne la mort cellulaire après la cassure de l'ADN. Les liposomes augmentent la demi-vie de l'agent thérapeutique dans le cerveau et réduit la toxicité systémique.

Le Tableau XI suivant est un récapitulatif des articles concernant les études sur les améliorations techniques de la CED chez le primate non humain.

QUATRIEME PARTIE

Auteurs	Modèle pré-clinique	Caractéristiques de l'injection			Animal	Résultats	Limites / compromis
			débit (µL/mL)	volume injecté			
Bankiewicz K.S. <i>et al.</i> , 2000 (USA)	primates non-humains	cadre de stéréotaxie compatible IRM canule multiple aiguilles (abaissée manuellement au site), 6 cannules (3/portoirs), aiguille 27 gauges	0.1 et 0.2 puis 0.4µL/min	30µL (60min puis 30min) à chaque site	striatum (2 in caudate et 4 dans le putamen) AAV avec LacZ	temps total de la chirurgie par animal = 4,5h	
Krauze M.T. <i>et al.</i> , 2005 (USA)	n=3 adultes mâles Cynomolgus monkeys (<i>Macaca Fascicularis</i>) 2.8-3.5 kg	singes: 15 minutes après l'injection: canule retirée du cortex	singes: débit initial de 0.1µL/min puis augmentation toutes les 10min pour atteindre 5µL/min	singes: volume maximal de 700µL/site rhodamine-liposome	corona radiata (matière blanche) et putamen (matière grise) (tronc cérébral)	singe: le système canule permet de ne pas avoir de reflux quelque soit la localisation de l'infusate (débit maximal de 5µL/min)	rats ne permet pas d'étudier de grands débits
Varenika V. <i>et al.</i> , 2008 (USA)	n=5 mâles Cynomolgus monkeys (<i>Macaca Fascicularis</i>) 3-10 kg	aiguille en verre de silice + canule connectée à une ligne de chargement contenant les liposomes et à une ligne d'injection d'huile. Une seringue 1mL remplie d'huile génère la pression d'infusion et est connectée à la pompe microinfusion (BeeHive, Bioanalytical Systems) et régule le débit du fluide au travers du système. guide des cannules par IRM et insertion manuelle. Quantification et monitoring en temps réel par IRM attente de 15 minutes après l'injection pour retirer la canule.	0.1 puis augmentation toutes les 10min à 0.2-0.5- 0.8 et 1µL/min	300µL et 700µL	putamen et corona radiata liposome (124 ± 24,4 nm) + gado ± CPT-11 injection plus de 3 fois par animal > intervalle de 4 semaines	la distribution des liposomes n'augmente pas plus malgré l'injection en continue	fuite de l'injection dans les ventricules > impact sur le volume injecté qui cesse directement.
Krauze M.T. <i>et al.</i> , 2008 (USA)	n=6 adultes mâles Cynomolgus monkeys (<i>Macaca Fascicularis</i>) 3-5 kg, âge moyen de 10 ans	CED en temps réel système d'injection: fused-silica needle cannula that was connected to a loading line (containing liposomes) and an oil-infusion line. A 1-ml syringe (filled with oil), mounted onto a Bee Hive® micro-infusion pump (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN), regule le flux de fluide tout au long du système	IRM en continu pendant l'injection 0.1µL/min puis augmentation toutes les 10min à 0.2-0.5- 0.8-1 jusqu'à 5µL/min	2-4 mois d'attente entre les injections volume total jusqu'à 700µL par hémisphère injections multiples au même site (300- 400 et 700µL)	putamen, corona radiata, tronc cérébral liposomes Gd (124 ± 24,4 nm) ou rhodamine (115 ± 40,1 nm)	attente de 15min après l'injection avant de retirer la canule distribution du GDL non affecté par sa concentration relation linéaire entre Vd et Vi (ratio Vd/vi important dans le brainstem > distribution tend vers la direction caudale) pas de nécrose ni de réaction inflammatoire suite à l'injection	
Krauze M.T. <i>et al.</i> , 2009 (USA)	n=6 adultes mâles Cynomolgus monkeys (<i>Macaca Fascicularis</i>) 3-10 kg	CED 2 à 4 semaine après implantation du guide des cannules pompe microinfusion (bioanalytical Systems, Lafayette, IN)	0,1µL/min avant l'injection pour éviter l'occlusion puis augmentation toutes les 10min à 0.2-0.5- 0.8-1 jusqu'à 5µL/min	> 400µL	putamen, corona radiata et tronc cérébral liposome + gado ± rhodamine ± CPT- 11	le positionnement du cathéter est important pour la distribution: canule dans la matière grise>fuite vers la matière blanche. la distribution est significativement augmentée si l'injection est hydrophile. L'encapsulation et le PEG en surface augmentent la distribution. > nouveau design de la canule pour n'avoir aucun reflux à 5µL/min.	la distribution se fait là où il y a le moins de résistance. Les canules de petit diamètre font une meilleure distribution mais le débit ne doit pas excéder 0.5µL/min. ne pas retirer directement la canule après l'injection.
Valles F. <i>et al.</i> , 2009 (USA)	n=10 adultes mâles Cynomolgus monkeys (<i>Macaca Fascicularis</i>) 3-10 kg	système guide de cannules laissé en place pour les injections répétées plus de 3 injections par animal (intervalle de 4 semaines)	0,1µL/min avant l'injection pour éviter l'occlusion puis augmentation toutes les 10min à 0.2-0.5- 0.8-1 jusqu'à 5µL/min	entre 700 et 40µL de GDL par cible	putamen, corona radiata et tronc cérébral liposome + gadoteridol (GDL) (124 ± 24,4 nm)	9,3% des injections = compression des ventricules NHP tolère le volume injecté -> pas d'effet de masse ni de compression des ventricule (si compression = retour à la normale après l'injection) seuil de visualisation de la compression anatomique 352 ± 77 µL	complete compression est atteinte pour un Vi 672 ± 52 µl voir les limites avec le modèle canin porteur de tumeur
Jimenez F. <i>et al.</i> , 2011 (USA)	n=6 adultes mâles Cynomolgus monkeys (<i>Macaca Fascicularis</i>) 3-5 kg, âge moyen de 8.5 ± 1.5 ans	système d'injection: fused-silica needle cannula that was connected to a loading line and a 1-ml syringe containing infusate, mounted onto a micro-infusion pump (BeeHive; Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN)	IRM en continu pendant l'injection 0.1µL/min puis augmentation toutes les 10min à 0.2-0.5- 0.8-1 et 1.5µL/min	52-178µL/site	putamen liposomes (GDL) (124 ± 24,4 nm) ± Gadoteridol (Gd) ± protéine GDNF	2 méthodes pour définir le Vd: avec Gd et GDL par IRM mise en évidence du transport perivasculaire et le long des axones de la protéine	grand volume injecté = fuite dans le corps calleux et CSF pour la plupart des primates pour la maladie de Parkinson

II.3 Les carnivores domestiques : chats et chiens

Les modèles pré-cliniques sont nécessaires pour démontrer l'efficacité du ciblage et l'innocuité des procédures d'imagerie nucléaire. Les modèles murins sont le plus souvent et facilement utilisés pour répondre à ces questions mais ils ont des limites, particulièrement en imagerie du fait de leur petite taille. De récents travaux menés par l'American National Cancer Institute ont montrés que les pathologies des animaux domestiques pourraient être d'une grande importance comme modèles pertinents pour la recherche en oncologie humaine (Khanna C. *et al.* 2006, 2009). Les modèles spontanés de cancer présentent de nombreux avantages. Tout d'abord, les tumeurs apparaissent et se développent de manière spontanée. Elles sont décrites comme des tumeurs syngéniques dans des animaux immunocompétents. Le séquençage complet du génome canin a démontré un haut niveau d'homologies génétiques entre les chiens et les humains. Les humains sont plus phylogénétiquement proches des chiens que des souris. L'enrichissement des connaissances à propos des voies de signalisations oncogénique et sur les mutations impliquées dans les cancers survenant chez les animaux font de ces modèles des modèles exploitables. D'un point de vue clinique, les récurrences sont fréquentes (comme chez les hommes), et le développement de métastases est similaire. Actuellement, la réponse à la chimiothérapie conventionnelle est bien décrite pour la plupart des cancers félines et canins. Elle est souvent identique à ce que nous pouvons observer chez les humains avec l'apparition d'une résistance au traitement similaire. Chez les animaux, l'histoire naturelle des cancers est plus rapide, permettant ainsi des études cliniques rapides. Ceci aide également la médecine vétérinaire à progresser, est éthiquement plus justifiable par rapport à l'utilisation d'un gros animal et permet de récolter des données précliniques fiables et précieuses avant une transposition en clinique humaine. Enfin, la réalisation de celles-ci laisse plus de place à la flexibilité que celles menées chez l'homme (les conditions de GMP ne sont pas requises, les procédures d'autorisations éthiques sont simplifiées...).

QUATRIEME PARTIE

Le modèle chats sains expérimentaux a été utilisé une fois, par Bobo et son équipe en 1994 (Bobo *et al.*, 1994). Les auteurs ne justifient pas clairement le recours à ce modèle félin (taille supérieure au rat ?). Dans cette étude, la distribution des macromolécules ^{111}In -Transferryl et ^{14}C -sucrose a été évaluée dans la corona radiata. Le paramètre du débit est important pour obtenir une bonne distribution et restreindre les fuites. Après l'augmentation du flux délivrée pendant 2 heures, les molécules se dispersent à environ 2 cm au maximum en autoradiographie. De plus, il est noté que la concentration de ces molécules est 100 fois plus importante au site comparée à une administration en systémique. Ceci renforce donc le choix d'utiliser la CED pour un dépôt direct.

Pour la plupart des modèles canins, ce sont des cas de tumeurs spontanées diagnostiquées en clientèle vétérinaire auxquels le traitement à l'étude est proposé. Certaines études font également appel à des chiens sains d'expérimentation.

Le gliome spontané se développe plus souvent chez les races canines brachycéphales (museau plat) comme le sont par exemple les Boxers, les Boston Terriers. L'incidence est faible (elle varie de 14,5 pour 100 000 à environ 1 à 3%) et la tumeur, malgré une base génétique certaine, n'est pas du tout systématiquement transmise à la génération suivante, d'où l'absence d'élevage expérimental de chiens atteints. Au diagnostic, la pathologie est à un stade avancé. Il n'y a pas en routine de chirurgie possible pour la résection de la masse tumorale souvent trop profonde dans l'encéphale. Ce développement tumoral est décrit comme présentant des caractéristiques analogues aux gliomes humains (Candolfi M. *et al.*, 2007 ; Stoica G. *et al.*, 2010 ; Chen L. *et al.*, 2013).

Les administrations par CED testées dans ce modèle seront réalisées dans des conditions réelles de traitement avec la tumeur en place. Ceci est différent des modèles singes et la plupart des modèles porcs présentés ci-dessus.

QUATRIEME PARTIE

Préalablement étudié chez le modèle singe sain, l'administration du CPT-11 par CED est appliquée au modèle de gliome spontané chez le chien (Varenika V. *et al.*, 2008, Valles F. *et al.*, 2009, Dickinson PJ. *et al.*, 2008 et 2010).

L'étude de Valles (Valles F. *et al.*, 2009) est menée sur deux modèles gros animaux : le modèle canin porteur de gliome spontané et le modèle primate non-humain sain. Le contrôle de l'injection par la CED et la visualisation du volume de distribution (Vd) sont réalisés en temps réel à l'IRM grâce au Gadotéridol (traceur) contenu dans les liposomes. Ce contrôle est très utile en cas de mauvais placement des cathéters ou de fuites dans d'autres compartiments anatomiques du cerveau par exemple et permet alors une rectification ou un arrêt immédiat de l'administration.

Dans cette étude, il y est précisé l'impact de la nature du tissu infusé sur la distribution des liposomes (tumeur intracrânienne dans le cas canin : flux/ pression des fluides interstitiels à partir du centre de la tumeur vers l'extérieur). Cette problématique a déjà été soulevée dans les modèles murins. La même équipe a ensuite montré, lors de l'injection des liposomes chargés en CPT-11 dans la tumeur chez le chien, l'effet de masse exacerbé. Cet effet se traduit par la compression de compartiments cérébraux, non présent chez les singes sains. De plus, l'injection de grands volumes par CED pendant une courte période de temps augmenterait la pression intracrânienne pour les cas où les animaux sont porteurs d'une tumeur.

L'année suivante, Dickinson travaille uniquement sur le modèle de gliome spontané canin pour l'administration des liposomes chargés avec le traceur Gadotéridol et le CPT-11 (Dickinson PJ. *et al.*, 2010). Dans cet essai clinique vétérinaire et pré-clinique pour l'homme, les 9 chiens sont accueillis à l'école vétérinaire de l'université de Californie. De manière générale, les procédures d'injection monitorée toutes les 15 minutes par IRM et de placement des canules dans la masse tumorale sont tolérées par tous les chiens (Figure 36). L'IRM est un outil fiable pour déterminer le volume tumoral (en moyenne 4 cm³) et le Vd (en moyenne 38% de la tumeur est couverte par l'infusé), ce qui est validé par l'analyse en

QUATRIEME PARTIE

histopathologie. De plus, il y a un lien entre le volume distribué et la réponse au traitement par le CPT-11. Cette réponse est traduite par la régression de la tumeur ou la stagnation de sa croissance, accompagnée par l'apparition des zones de nécrose. Les limitations à la méthode d'administration par CED sont les mêmes que celles décrites dans les modèles précédents (reflux le long du trajet du cathéter et fuites vers les ventricules ou l'espace arachnoïdien).

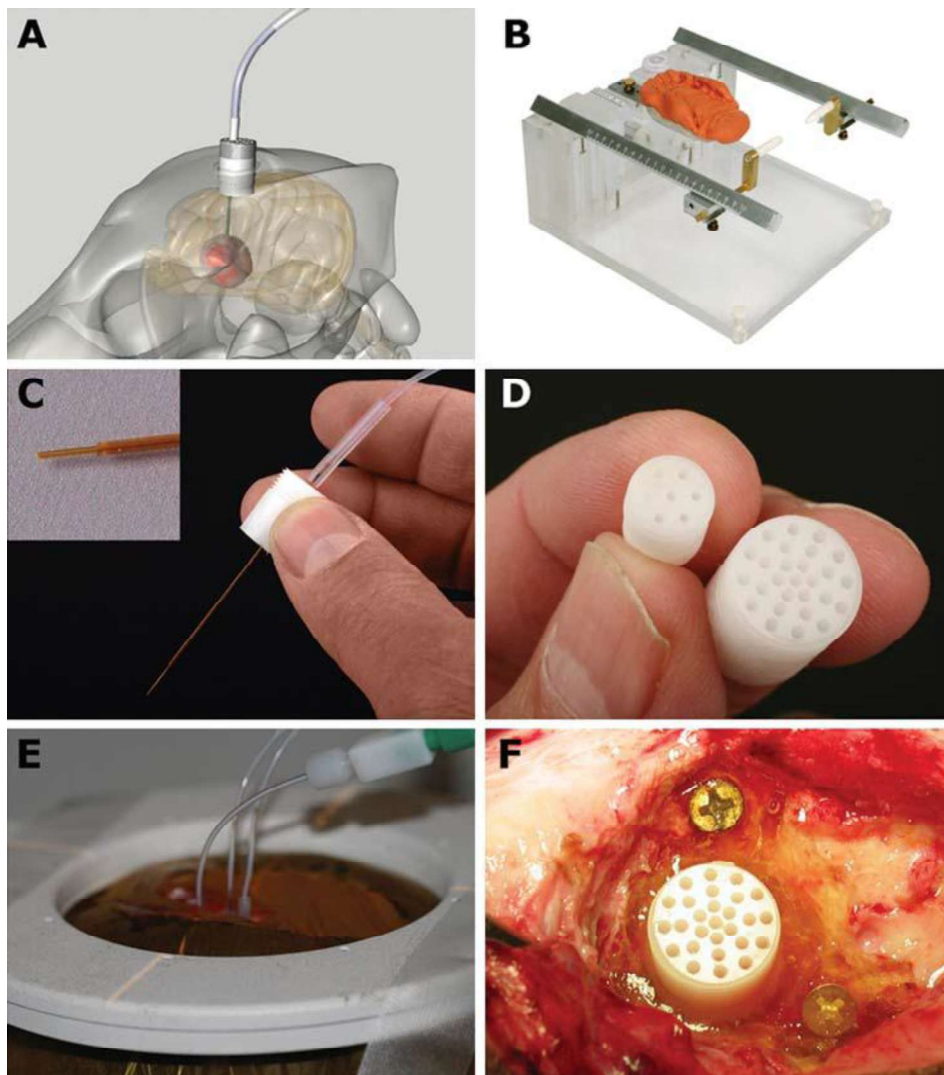


Figure 36 : (A) photographie illustrant le système de CED (B) Cadre destiné chien, compatible à l'IRM. (C) Guide + canule d'infusion de silice. (D) Zoom sur le guide multipores. France Mise en place de 3 canules d'injection de liposomes et (F) Guide *in situ* (d'après Dickinson *et al.*, 2010).

QUATRIEME PARTIE

Le modèle de gliome spontané canin apporte un réel avantage à la recherche thérapeutique en permettant d'apprécier des conditions de traitement presque réelles malgré la non résection de la masse tumorale qui est, lorsque celle-ci est possible, réalisée chez l'homme. Parallèlement, quelques études ont été menées chez le chien sain expérimental : récemment, une étude de toxicité et de distribution a été élaborée sur des chiens sains de race Beagle en leur administrant des nanoparticules IONP (Iron-Oxide Nanoparticles) couplées au cetuximab (anticorps monoclonal spécifique de l'EGFR) (Platt L. *et al.*, 2012). Après 24h, une distribution uniforme de 289 μ L des particules est obtenue avec un débit d'injection de 0.5 μ L/min. Un mois après l'injection par un seul cathéter, la seule lésion tissulaire observée en histopathologie est celle due au trajet de pénétration du cathéter. Ce travail conclut sur la validation de la technique (non toxique pour le tissu sain) qui favorise l'utilisation d'un débit lent pour une meilleure distribution de l'agent thérapeutique. Cependant, les conclusions sur un modèle sain sont à prendre avec du recul car comme démontré à plusieurs reprises sur les autres modèles animaux, les résultats de dispersion seront certainement différents dans une situation où la tumeur est présente.

En ce qui concerne le sujet d'étude de la thèse, les nanoparticules lipidiques chargées en rhénium-188, une collaboration tout d'abord entre l'unité INSERM MINT d'Angers et Oniris a été établie, avec pour objectif de tester la faisabilité, la tolérance et dans un deuxième temps l'efficacité de ce traitement innovant dans le modèle canin spontané vétérinaire de GBM.

Dans un premier temps, ce projet a nécessité de développer à Oniris les compétences et équipements vétérinaires pour envisager cette étude. Oniris s'est donc d'une part équipé d'une caméra SPECT-CT pour le gros animal. Parallèlement, un dispositif permettant de biopser pour diagnostic et d'administrer un traitement par voie intracrânienne a été mis au point. Ce matériel a consisté en un cadre de stéréotaxie adapté au chien et compatible à l'IRM. Non disponible à priori commercialement, son cahier des charges a été défini par l'équipe de cancérologie clinique dirigée par le Dr Catherine Ibisch, sa réalisation quant à elle, a été confiée à un groupe d'étudiants de l'IUT de génie mécanique de Nantes. Nous

QUATRIEME PARTIE

avons participé à sa validation technique sur cadavres de chiens avec l'aide de deux étudiants en thèses de Doctorat Vétérinaire sur le sujet (Gaël Chassain puis Anne-Laura Potelle) et de l'équipe technique du CRIP (Centre de Recherche et d'Investigation Préclinique) d'Oniris (Dr B. Fellah, Dr C. Ibisch, Dr Fusellier...).

Une innovation technique a été réalisée lors de la création du cadre, permettant de s'affranchir d'un calcul fastidieux après repérage du site à l'IRM (cadre « clone », demande de Brevet déposée en 2014 par Oniris et l'IUT de Nantes n° 1453757). Le cadre de stéréotaxie compatible IRM (Figure 37) est ajustable à différentes races de chiens.

Le principal avantage de ce cadre est qu'il n'y a pas besoin de repositionner l'animal après l'imagerie. En effet, il reste positionné tout au long de la procédure qui comprend l'imagerie, la biopsie ou l'injection intracrâniale et la vérification de la cible à l'imagerie. Tout le dispositif (cadre + support corps entier de l'animal) permet un transport facile de l'animal couché ventralement.

QUATRIEME PARTIE

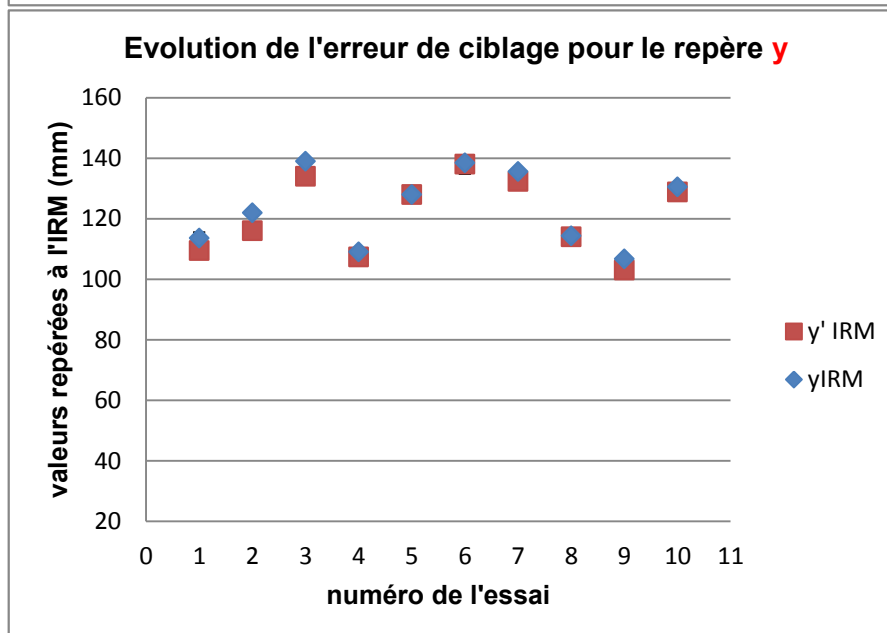
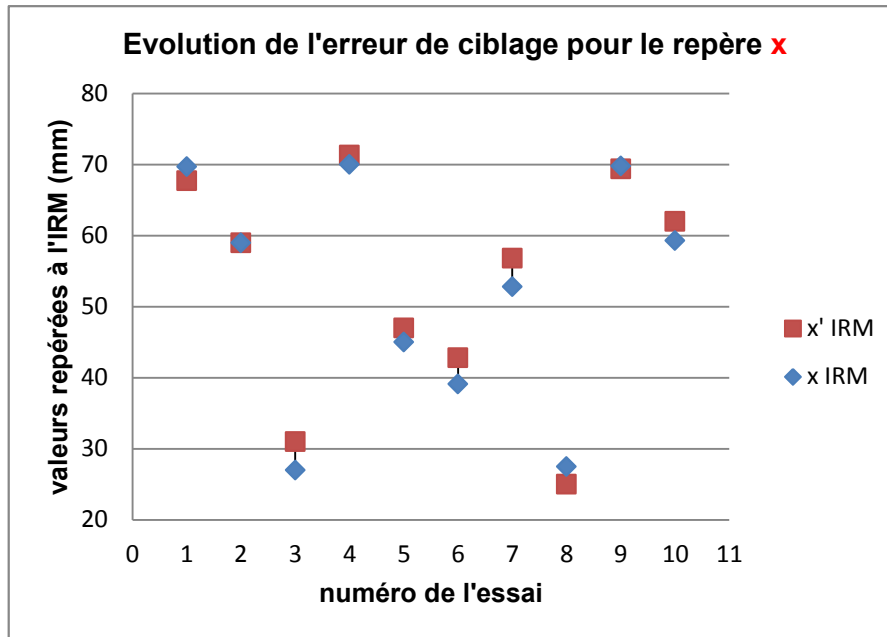


Figure 37 : Photographies du cadre de stéréotaxie dédié chien, compatible IRM avec son support de transport et du positionnement d'un trocart de biopsie au travers d'une fenêtre osseuse.

La répétabilité et la précision des biopsies du cadre ont été testées sur des cadavres de chiens (thèse de Doctorat Vétérinaire de Gaël Chassain).

Les résultats de la précision des biopsies sont présentés graphiquement de telle sorte qu'ils confrontent les coordonnées cibles (x, y et z) définies à l'IRM à celles obtenues après la stéréotaxie. De manière générale, seules les valeurs pour la profondeur z sont identiques entre les deux temps de repérage (3 essais sur 10 sous-estiment d'1 mm la profondeur). En ce qui concerne les valeurs x et y, elles sont surestimées d'environ 1.3 mm ou sous-estimées d'environ 2.6 mm respectivement.

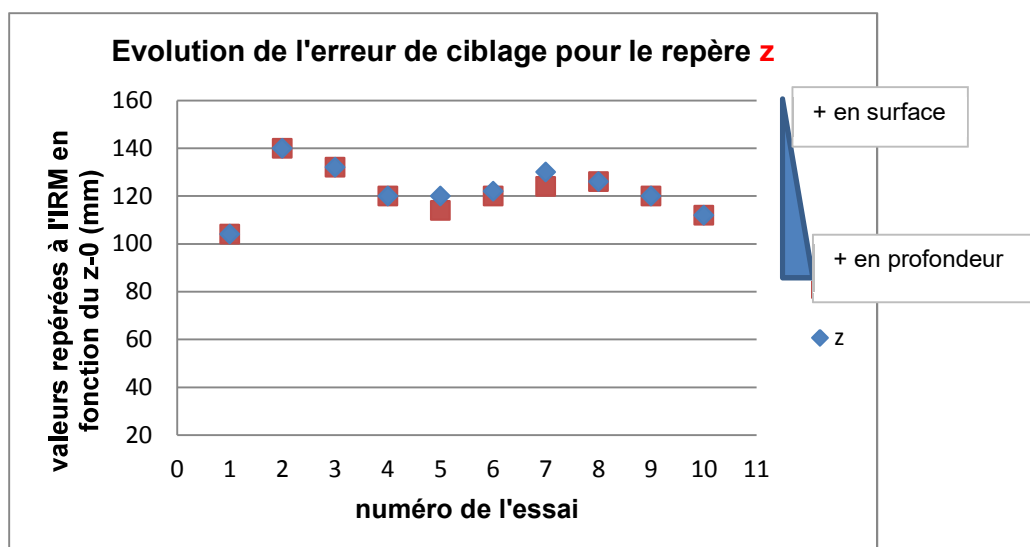
QUATRIEME PARTIE



x IRM = premier repérage à l'IRM

x' IRM = 2^{ème} IRM = après la biopsie ou l'injection d'eau

QUATRIEME PARTIE



En conclusion de la première phase de mise au point du cadre de stéréotaxie compatible IRM et dédié chien, une précision de 4.02 mm (distance entre le repérage initial à l'IRM et la biopsie) est obtenue. Celle-ci a été jugée acceptable et satisfaisante compte tenu de la taille tumorale envisagée à injecter. Toutefois, elle a encore été améliorée grâce à quelques modifications ultérieures (Anne-Laura Potelle et Dr Roussel). La précision est désormais de 1.02 mm. Ce dispositif est actuellement utilisé pour l'étude de mise au point de la technique de CED (détermination du volume d'injection, des canules utilisées) et de la procédure d'injection des LNC¹⁸⁸Re-SSS chez le modèle de gliome spontané canin.

La démarche de combinaison des compétences entre différents pôles de recherches a déjà permis de regrouper l'ensemble de la banque de biopsies de tumeur cérébrale canin disponibles à l'école nationale vétérinaire de Nantes (Oniris) et de conclure avec l'aide d'un neurochirurgien, d'anapathologistes et de scientifiques que ces tumeurs sont en générale de dominante oligodendrogliome anaplasique. Ceci pour les 15 cas de races différentes (Boxer, Fox Terrier, Berger Allemand, Bouledogue Français...) analysés ce jour et qui présentent les caractéristiques que l'on retrouve chez l'homme. L'âge de diagnostic moyen est de 8.5 ans, sans déséquilibre entre les mâles et les femelles.

QUATRIEME PARTIE

De plus, une prédisposition raciale forte est observée. Celle-ci liée au type de tumeur, influence la localisation de la tumeur.

Le Tableau XII suivant est un récapitulatif des articles concernant les études sur les améliorations techniques de la CED chez le modèle spontané canin.

QUATRIEME PARTIE

Auteurs	Modèle pré-clinique	Caractéristiques de l'injection			Animal	Résultats	Limites / compromis
		débit (µL/mL)	volume injecté	localisation			
Varenika V. <i>et al.</i> , 2008 (USA)	n=7 chiens: 4 expérimentaux (8 mois-3 ans) et 3 chiens cliniques (3-8 ans)	système d'injection en 4 parties: (1) canule de silice fondue de 22 gauge moulée à un guide (2) canule d'infusion de 28 gauge (3) ligne de chargement des liposomes en Teflon stérile (diamètre interne de 0,03) (4) ligne d'infusion non stérile contenant de l'huile d'olive. La canule interne est 2mm plus longue que la canule guide (laissé en place pour les injections répétées). guide des cannules par IRM et insertion manuelle. Quantification et monitoring en temps réel par IRM et attente de 15 minutes après l'injection pour retirer la canule.	0.1 puis augmentation toutes les 10min à 0.2-0.5-0.8-1-1.5-2-2.5 et 3µL/min pendant 60min	300µL (injection sur une période de 2.5h)	corona radiata ou tumeur: liposome + gado ± CPT-11 injection répétée 4-8 semaines après la première	la distribution des liposomes n'augmente pas plus malgré l'injection en continue	perte de l'injection dans les ventricules.
Olson J.J. <i>et al.</i> , 2008 (USA)	n=10 chiens	1 cathéter + ballon bolus = 1min et CED = 30min IRM après l'injection puis 1h, 2h, 48h et 96h après.	83µL/h = 2mL/jours	0.5mL	75% saline, 25% gado et 1,5mg/mL BCNU	le Vd est variable selon les individus. En injection continue avec le ballon gonflé = meilleure pénétration dans le cerveau par rapport au bolus.	
Valles F. <i>et al.</i> , 2009 (USA)	n=7 chiens porteurs de tumeurs, 6-34 kg, 6-11 ans	système guide par stéréotaxie de cannules laissé en place pour les injections répétées 4 à 8 semaines après la première injection	0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 µL/min. (augmentation toutes les 10min)	varie selon la localisation et la taille de la tumeur: de 2100 µL pendant 230 min à 70 µL pendant 60 min	tumeur: liposome + gadoteridol (GDL) + CPT-11 sain: thalamus et putamen seulement GDL	effet de masse dû à la tumeur	effet de masse dû à la tumeur augmenté lors de l'injection intra-tumoral complete compression est atteinte pour un Vi 407 ± 59 µl threshold for visible anatomical compression 186 ± 17 µl
Dickinson P.J. <i>et al.</i> , 2008 (USA)	n= 11 chiens (n=4 pour la détection après la CED, n=4 pour la distribution après la CED et n=3 pour la corrélation Vd et Vi)	cadre de stéréotaxie pour primates IRM en temps réel pour guider l'injection 2 sites, le guide est laissé en place pour les injections répétées (4 semaines après la première injection-> euthanasie après)	0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 µL/min (1h), (augmentation toutes les 10min) pendant 2.5h	300µL (essais avec 15, 90 et 211µL)	corona radiata ou thalamus rostral tumeur: liposome + gadoteridol (GDL) ± rhodamine 11	Fluorescence et IRM donnent les mêmes indications pour quantifier le volume. Corona radiata: Vd/Vi=2.8 et thalamus = de 1.2 à 3.4 rflux et fuite dépendent de la taille du cathéter, de sa forme, de son placement et du débit utilisé > <u>ici taille petite et débit lent.</u>	propriété de convection dépend de ce qui est injecté: ≠ gado seul et gado+liposome. Attention au ventricule latéral gauche, au placement de la canule. CED tissu tumoral ≠ CED tissu normal car: grande pression interstitielle, distribution hétérogène de la vascularisation, oedème péritumorale et hétérogénéité du tissu tumoral.
Dickinson P.J. <i>et al.</i> , 2010 (USA)	n=9 chiens (astrocytome ou oligodendrogliome, grades II ou III)	cadre de stéréotaxie compatible à l'IRM + moule dentaire > infusion monitorée système de canule en 4 composants: (1) guide cylindrique de 27 trous (diamètre 12mm) ou de 6 trous (8mm), (2) canule d'injection en silice (canule externe = 22gauge et une 2mm plus longue en interne = 28 gauge), (3) ligne de chargement des liposomes en teflon stérile (diam. int. 0.508 mm), (4) ligne d'injection non-stérile contenant l'huile d'olive. pompe microinfusion connectée à une seringue 1mL d'huile pour la pression d'injection. 1 à 4 canules sont insérées par chien (taille de la tumeur et placement du guide dépendant). Injection répétée en fonction du volume tumoral.	0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0 µL/min, (augmentation toutes les 10min) durée de l'injection de 135 à 290min (1 à 4h)	au maximum = 2.125mL pendant une procédure (50µL minimum)	tumeur: liposome + gadoteridol (GDL) + CPT-11	le Vd varie beaucoup en fonction de la procédure d'injection et entre les cathéters	attention au reflux et à la fuite dans les ventricules et l'espace sous arachnoïdien
Platt S. <i>et al.</i> , 2012 (USA)	n=8 Beagle sains (4 mâles et 4 femelles)	monitoring par IRM. 1 cathéter connecté à une pompe externe programmable (Medtronic Synchromed II), pas d'anesthésie pendant la CED	0.5, 1.0, 3.0, ou 5.0 mL/min pendant 1, 6, 12, ou 24h.	Vi de 180 à 720 mL.	nanoparticule (10nm): IONP seul ou avec cetuximab	pompe Medtronic Synchromed II déjà utilisée en essai clinique pour GBM. pas de signe de toxicité après pa CED de l'IONP 0.5µL/min= diffusion uniforme dans la matière grise et blanche de 2 chiens. Vd = linéairement proportionnel à Vi. meilleure Vd à 24h: 289mm ³ . 1-3 et 5µL/min= fuite le long du cathéter.	
Bobo R.H. <i>et al.</i> , 1994 (USA)	n=12 chats (3,5-4kg)	coordonnées: AP=12.6mm, L=8.5mm et P=5mm canule de 23 gauge connectée à une seringue de 3mL + tubing de 60cm (PE-50). animaux sacrifiés le jour même, 2h et 24h après l'injection	0.5µL/min puis 1-2-3 et 4µL/min toutes les 10min (durée de 30min, 1h à 4h)	75 ou 300 ou 600µL/hémisphère	Corona radiata (bilatéralement) macromolécules: ¹¹¹ In-Tf ou ¹⁴ C sucrose	autoradiographie quantitative pour le Vd. ¹¹¹ In: Vd/Vi=6:1 ¹⁴ C-sucrose: Vd/Vi= 13:1 le Vd augmente de manière linéaire avec le Vi.	

III. Conclusion

Pour conclure sur ce chapitre, chaque modèle pré-clinique doit être envisagé en sachant que des compromis sont inévitables. Le modèle parfait n'existe pas. Néanmoins, en oncologie comparée, nous pouvons étudier des modèles présentant une anatomie voire une pathologie proches de celles de l'homme. Les modèles murins ont fourni la plupart des données sur la technique de CED. Il semble que nous arrivons à la limite des connaissances techniques que ce modèle petit animal puisse nous apporter. Il est évident que le modèle murin est inadapté pour la mise au point des techniques d'injection mais il est cependant incontournable pour le développement des nouvelles stratégies thérapeutiques. Il est du devoir des scientifiques de poser les bonnes problématiques et hypothèses de travail afin de réaliser au mieux les recherches sur le modèle pré-clinique adéquat. Le modèle gros animal est lourd à prendre en charge d'un point de vue logistique (aménagements, entretiens, mains d'œuvre et compétences spécifiques vétérinaires) et leur accessibilité en France semble restreinte. Toutefois, le nombre de cas de gliomes canins diagnostiqués chaque année (quelques dizaines) dans les centres d'oncologie et d'imagerie spécialisés en France laisse espérer la faisabilité d'une étude pré-clinique sur un petit nombre de cas. D'autant plus qu'en cas d'étude thérapeutique démarrante, le réseau professionnel vétérinaire français peut être alerté et ce nombre de cas pourrait alors être un peu élargi. L'ensemble des articles présentés précédemment soulignent la plupart des avantages, inconvénients et compromis choisis pour chacune des applications. Il est souligné que l'optimisation des systèmes de délivrance doit être poursuivie pour que la CED puisse être utilisée en routine en clinique, ce qu'elle n'est toujours pas actuellement. En effet, l'arrêt des études semble pour la plupart être dû au manque d'efficacité des molécules mais il pourrait y avoir un souci de délivrance sous-optimale non envisagée en général.

QUATRIEME PARTIE

Références bibliographiques de la quatrième partie :

- Bankiewicz KS., Eberling JL, Kohutnicka M, Jagust W, Pivrotto P, Bringas J, Cunningham J, Budinger TF, Harvey-White J. Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; in vivo detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. (2000) *Exp Neurol*. 164(1):2-14.
- Barua N.U., Woolleya, M., Bienemann A.S., Johnsona, D., Wyatt M.J, Irvinga, C., Lewisa, O., Castrique E., Gill S.S. (2013) Convection-enhanced delivery of AAV2 in white matter—A novel method for gene delivery to cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 220 1-8.
- Bienemann A., White E., Woolley M., Castrique E., Johnson D.E., Wyatt M., Murray G., Taylor H., Barua N., Gill S.S. (2012) The development of an implantable catheter system for chronic or intermittent convection-enhanced delivery. *Journal of Neuroscience Methods* 203 284-291.
- Bjarkam CR, Cancian G, Larsen M, Rosendahl F, Ettrup KS, Zeidler D (2004) A MRI-compatible stereotaxic localizer box enables high-precision stereotaxic procedures in pigs. *J Neurosci Methods*; 139:293-8.
- Bobo R.H., Laske D.W., Akbasak A., Morrison P.F., Dedrick R.L., Oldfield E.H. (1994) Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2076-2080.
- Candolfi M., Curtin J.F., Nichols W.S. (2007) Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *J Neurooncol* 85: 133-148.
- Chassain Gaël. Validation expérimentale d'un cadre de stéréotaxie adapté au chien pour des biopsies cérébrales. Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur Vétérinaire : Oniris, Faculté de Médecine de Nantes : 2013.

QUATRIEME PARTIE

- Chen L., Zhang Y., Yang J., Hagan J.P., Li M. (2013) Vertebrate animal models of glioma : understanding the mechanisms and developing new therapies. *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Chen M.Y., Lonser R.R., Morrison P.F., Governale L.S., Oldfield E.H. (1999) Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg* 90: 315-320.
- Dickinson P.J., LeCouteur R.A., Higgins R.J., Bringas J.R., Larson R.F., Yamashita Y., Krauze M.T., Forsayeth J., Noble C.O., Drummond D.C., Kirpotin D.B., Park J.W., Berger M.S., Bankiewicz K.S. (2010) Canine spontaneous glioma: a translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro-Oncology* 12(9):928-940.
- Dickinson P.J., LeCouteur RA, Higgins RJ, Bringas JR, Roberts B, Larson RF, Yamashita Y, Krauze M, Noble CO, Drummond D, Kirpotin DB, Park JW, Berger MS, Bankiewicz KS. (2008) Canine model of convection-enhanced delivery of liposomes containing CPT-11 monitored with real-time magnetic resonance imaging: laboratory investigation. *J Neurosurg*. 108(5):989-98.
- Gimenez F. , Krauze M.T., Valles F., Hadaczek P., Bringas J., Sharma N., Forsayeth J., Bankiewicz K.S. (2011) Image-guided convection-enhanced delivery of GDNF protein into monkey putamen. *NeuroImage* 54 S189–S195.
- Khanna C., Lindblad-Toh K, Vail D, London C, Bergman P, Barber L, Breen M, Kitchell B, McNeil E, Modiano JF, Niemi S, Comstock KE, Ostrander E, Westmoreland S, Withrow S. (2006) The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol*. 24(9):1065-6.
- Khanna C., London C, Vail D, Mazcko C, Hirschfeld S. (2009) Guiding the optimal translation of new cancer treatments from canine to human cancer patients. *Clin Cancer Res*. 15(18):5671-7.
- Kim I., Paek S., Nelson B.D., Knight E.J., Marsh M.P., Bieber A.J., Bennet K.E., Lee K.H. (2014) Implementation of a chronic unilateral intraparenchymal drug delivery system in a swine model. *Journal of Neuroscience Methods* 227 29-34.

QUATRIEME PARTIE

- Krauze M.T., Vandenberg S.R., Yamashita Y., Saito R., Forsayeth J., Noble C., Park J., Bankiewicz K.S. (2008) Safety of real-time convection-enhanced delivery of liposomes to primate brain: a long-term retrospective. *Exp Neurol.* 210(2):638-644.
- Krauze M.T., Forsayeth J., Yin D., Bankiewicz K.S. (2009) Convection-enhanced delivery of liposomes to primate brain. *Methods in Enzymology*, 465: 349-361.
- Krauze M.T., Saito R., Noble C., Tamas M., Bringas J., Park J.W., Berger M.S., Bankiewicz K. (2005) Reflux-free cannula for convection-enhanced high-speed delivery of therapeutic agents. *J Neurosurg* 103:923-929.
- Kunwar S, Prados M.D, Chang S.M, et al. (2007) Direct intracerebral delivery of cintredekin besudotox (IL13-PE38QQR) in recurrent malignant glioma: a report by the Cintredekin Besudotox Intraparenchymal Study Group. *J Clin Oncol.* 25(7):837-844.
- Olson J.J., Zhang Z, Dillehay D, Stubbs J. (2008) Assessment of a balloon-tipped catheter modified for intracerebral convection-enhanced delivery. *J Neurooncol.* 2008 Sep;89 (2):159-68.
- Platt S., Nduom E, Kent M, Freeman C, Machaidze R, Kaluzova M, Wang L, Mao H, Hadjipanayis CG. (2012) Canine model of CED of cetuximab-conjugated iron-oxide nanoparticles monitored with magnetic resonance imaging. *Clin Neurosurg.* 59: 107-113.
- Selek L., Seigneuret E, Nogue G, Wion D, Nissou MF, Salon C, Seurin MJ, Carozzo C, Ponce F, Roger T, Berger F. (2013) Imaging and histological characterization of a human brain xenograft in pig: the first induced glioma model in a large animal. *Journal of Neuroscience Methods* 221:159-65.
- Sonabend AM, Stuart RM, Yun J, Yanagihara T, Mohajed H, Dashnaw S, Bruce AA, Brown T, Romanov A, Bruce JN. (2011) Prolonged intracerebral convection-enhanced delivery of topotecan with a subcutaneously implantable infusion pump. *Neuro-Oncology* 13(8):886-893.

QUATRIEME PARTIE

- Stoica G, Levine J, Wolff J, Murphy K. (2010) Canine astrocytic tumors: a comparative review. *Vet Pathol* 48: 266.
- Tsujiuchi T., Natsume A., Motomura K, Kondo G, Ranjit M, Hachisu R, Sugimura I, Tomita S, Takehara I, Woolley M, Barua NU, Gill SS, Bienemann AS, Yamashita Y, Toyokuni S, Wakabayashi T. (2014) Preclinical evaluation of an O6-methylguanine-DNA methyltransferase-SiRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains. *Am J Transl Res* 6(2):169-178.
- Valles F., Fiandaca M.S., Bringas J., Dickinson P., LeCouteur R., Higgins R., Berger M., Forsayeth J., Bankiewicz K.S. (2009) Anatomic compression due to high volume convection-enhanced delivery in the brain. *Neurosurgery* 65(3): 579-586.
- Varenika V. Dickinson P., Bringas J., LeCouteur R., Higgins R. Park J., Fiandaca M., Berger M., Sampson J., Bankiewicz K. (2008) Detection of infusate leakage in the brain using real-time imaging of convection-enhanced delivery. *J Neurosurg.* 109(5):874-880.
- White E., Woolley M., Bienemann A., Johnson D.E., Wyatt M., Murray M., Taylor H., Gill S.S. (2011) A robust MRI-compatible system to facilitate highly accurate stereotactic administration of therapeutic agents to targets within the brain of a large animal model. *Journal of Neuroscience Methods* 195 78-87.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Actuellement, la thérapie des gliomes de haut grade ou comme dans ce présent travail la thérapie du glioblastome (grade IV) est toujours un sujet essentiel d'investigation. En effet, aucun protocole thérapeutique n'est curatif.

Dans le domaine de la médecine nucléaire, les actions envisagées pour améliorer la simple curiethérapie et de développer la radiothérapie interne ciblée des glioblastomes passent entre autre par la mise en avant de nouvelles cibles au niveau tumoral et les choix techniques pertinents. Ceux-ci testés en premières phases d'essais cliniques ont été décrits dans la première partie de ce mémoire. D'une façon globale, l'optimisation de l'approche de la thérapie requiert trois notions majeures qui doivent être prises en compte:

- Le choix du système d'administration,
- Le choix des vecteurs thérapeutiques (anticorps monoclonaux, peptides, système particulaire...) et
- Le choix des radionucléides thérapeutiques.

La plupart de ces stratégies a été testée pour des cas de récurrences, lorsque la sélection des cellules tumorales résistantes au traitement initial a opéré et que l'agressivité tumorale est majorée. Or, les nouvelles pistes d'investigations proposées n'ont pour la plupart jamais dépassé la deuxième phase d'essai clinique concernant les études de dose maximale tolérée et optimale chez le patient. Les raisons de l'arrêt des tests cliniques précocement sont pour la plupart d'ordre financier.

En s'appuyant sur l'étude concluante des nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 comme nouvel outil pour la radiothérapie interne du gliome et ainsi que sur les données d'efficacité prometteuses obtenus à partir du modèle rat syngénique 9L à la suite d'une

CONCLUSION GENERALE

administration fractionnée de LNC¹⁸⁸Re-SSS, nous nous sommes interrogés sur l'efficacité de ce protocole thérapeutique sur un gliome d'origine humaine. La technique d'administration des LNC¹⁸⁸Re-SSS étudiée a été la convection-enhanced delivery pour une injection intra tumorale localisée. Ce nouveau travail de recherche a défini les modalités d'injection des LNC¹⁸⁸Re-SSS dans le modèle murin de gliome orthotopique (Lab1) et appliquées au modèle murin syngénique (GL261). Ces derniers du fait de leur petite taille nécessitent des études préalables pour déterminer le volume cérébral recouvert après l'injection des nano vecteurs tout en limitant la distribution le plus possible à la zone tumorale à traiter. Grâce au modèle souris immunodéprimé, nous étudions l'effet anti-tumoral sans contribution de la réponse immunitaire de type lymphocytaire. Au cours de cette étude, une deuxième approche a été valorisée : l'application du traitement fractionné Jour 12 – Jour 19 à une tumeur d'origine humaine Lab1 et xénogreffée à ces souris nues. Il s'avère que 3 MBq de LNC¹⁸⁸Re-SSS administrés à 7 jours d'intervalle est efficace. Il a été montré que des effets radiobiologiques sur les cellules tumorales sont responsables de ces résultats curatifs pour la moitié des souris traitées. Du fait de l'action limitée de l'immunité dans ce modèle (déficit de production de cellules immunitaires de type lymphocytes T), nous suspectons surtout un effet radio-induit par les LNC¹⁸⁸Re-SSS. Néanmoins, l'environnement tumoral semble être sujet à l'infiltration immunitaire innée. Ses acteurs se situent à proximité des atypies cytologiques des cellules tumorales (cytomégalie, caryomégalie). Nous pouvons nous demander quel est son rôle et sa contribution au succès du protocole de radiothérapie interne fractionnée chez la souris nude. Ceci pourrait être utile pour renforcer cette réponse chez l'homme. L'arrêt de la progression tumorale accompagné par l'apparition des mécanismes de résistance (lésions cellulaires : atypie, senescence...) observés après le traitement sont connus pour être présents en cas de stress et représenter un mécanisme de défense cellulaire d'échappement à ce stress. Ceux-ci semblent être à l'origine de la récurrence et donc de l'effet radiobiologique temporaire. Il serait intéressant de bloquer l'échappement des cellules à la mort cellulaire en essayant d'empêcher la reprise de la capacité de division cellulaire. Nous pouvons également chercher à majorer le stress cellulaire ce qui donnerait

CONCLUSION GENERALE

du temps au traitement d'être efficace pendant l'arrêt de la progression tumorale. Ce serait une orientation de recherche intéressante pour éviter la récurrence chez l'homme.

Voici quelques perspectives de recherche pour les études pré-cliniques:

- vérifier l'hypothèse proposée sur les cellules atypiques évoquant des cellules endopolyploïdes en processus de sénescence (état d'échappement cellulaire et de résistance au stress environnemental, qui expliquerait également l'absence d'apoptose après la première fraction de LNC¹⁸⁸Re-SSS): analyses de l'état de polyploïdie cellulaire avec la technique de sondes FISH et test du marquage SA-beta-galactosidase (enzyme cytoplasmique) à partir de coupes de tissus pour éventuellement révéler la sénescence des cellules tumorales,
- faire l'étude comparative entre l'irradiation interne et le protocole de radiation externe (utilisé actuellement en clinique) pour le traitement des gliomes Lab1 par un examen histopathologique pour déterminer les conséquences morphologiques microscopiques sur la tumeur précédemment décrites avec les LNC¹⁸⁸Re-SSS,

Dans ce travail de thèse, face aux données actuelles quant aux modèles pré-cliniques utilisés et leurs faiblesses, nous avons développé les modalités d'injection par CED des LNC¹⁸⁸Re-SSS reflétant leur devenir et les conséquences chez le modèle murin avant tout. Ces paramètres d'injection sont décrits dans les deuxième et troisième parties et tiennent compte du volume tumoral présent aux temps d'administration du protocole thérapeutique (jour 12 et jour 19 de croissance tumorale).

Dans le cadre du projet IRAD et le travail de plusieurs équipes, il a été d'une part permis d'initier la mise au point d'un cadre de stéréotaxie dédié chien pour les expérimentations futures dans le but de passer en première phase d'étude clinique. Cette démarche a déjà

CONCLUSION GENERALE

permis de regrouper l'ensemble de la banque de biopsies de tumeur cérébrale canine disponibles à l'Ecole Nationale vétérinaire de Nantes et de conclure que ces tumeurs sont en général de dominante oligodendrogliome anaplasique. D'ores et déjà, la mise en place du cadre de stéréotaxie dédié chien constitue une première étape vers le développement des protocoles d'approches chirurgicales et d'administrations des LNC¹⁸⁸Re-SSS.

D'autre part, la dernière partie de ce mémoire de thèse a été l'occasion de faire le point sur les modèles gros animaux existants par rapport à notre technique d'administration par CED puis dans le cas des tumeurs cérébrales. Les résultats de cette synthèse bibliographique ont confirmé la nécessité d'élaborer une approche réfléchie sur les points suivants et pouvant être directement appliquée, et ceci sans modification majeure, à l'homme après sa validation pour le modèle canin :

- Le choix du matériel d'injection par CED (injecteur, système guide des canules...),
- Les conditions de radioprotectives à appliquer,
- Le choix du volume d'injection,
- Le choix du nombre d'administration et
- Le choix de l'activité à délivrer.

Nous retenons la mise en évidence des avantages de ces modèles gros animaux précliniques. En revanche, une des limites à l'utilisation du modèle canin est la difficulté de recrutement des cas cliniques pour lesquels notre stratégie thérapeutique peut être proposée. Il serait nécessaire de communiquer auprès des vétérinaires praticiens pour valoriser notre projet qui mènerait à un recrutement de chiens avec un gliome à grande échelle (locale, régionale...), et ceci même si les tests d'injection avec le matériel transposable à l'homme, sur cadavre et beagles sains viennent tout juste de débuter. Cette étape permettrait notamment d'augmenter la réactivité des vétérinaires en sachant que la survie des chiens au diagnostic est de quelques jours, d'optimiser le transfert de l'animal

CONCLUSION GENERALE

vers Nantes en fonction de sa provenance et d'élargir nos cas inclus pour des tests d'injection des LNC¹⁸⁸Re-SSS et d'imagerie sur tumeur en place.

L'actuelle formulation des LNC¹⁸⁸Re-SSS est manuelle, ce qui peut apporter des variabilités à la conception finale du radiopharmaceutique. Un travail en cours de réalisation porte sur la mise en place d'un automate de formulation des LNC¹⁸⁸Re-SSS. Le but de cette démarche est d'être conforme aux exigences réglementaires du développement du médicament pour les lots cliniques reproduits à l'identique pour des données fiables. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) (version 3.0, Janvier 2004) souligne le point suivant : « Le produit utilisé pour l'essai clinique proposé doit être comparable à celui utilisé dans les études de toxicité en termes de profils d'impureté quantitatifs et qualitatifs ». Ainsi, une nouvelle étape vers l'application clinique est en cours afin de compléter le dossier de demande d'autorisation d'essai clinique de médicament. Plus particulièrement une de ces pièces constitutives : le dossier de médicament expérimental (DME).

D'après l'étude bibliographique de notre revue, nous pouvons conclure que les essais cliniques chez l'homme sont disparates et mal standardisés, ce qui complique la comparaison des résultats entre eux. Il faudrait collecter des données plus précises d'imagerie et de dosimétrie afin de pouvoir mieux expliquer la réponse du patient au traitement et ainsi mieux cerner la dose à administrer selon la progression tumorale.

Finalement, notre travail aura contribué au transfert vers la clinique humaine d'un traitement innovant et prometteur utilisant les LNC¹⁸⁸Re-SSS d'après les études menées chez la souris. Par ailleurs, suite à nos réflexions, le modèle chien de gliome spontané permettrait également d'optimiser le transfert vers l'essai clinique concernant ce cancer qui est encore incurable aujourd'hui.

ANNEXE

Nanomedicine to overcome radioresistance in glioblastoma stem-like cells and surviving clones

Delphine Séhédic^{1,2}, Annabelle Cikankowitz^{1,2}, François Hindré^{1,2,3}, François Davodeau^{4,5}, and Emmanuel Garcion^{1,2}

¹INSERM U1066, Bio-Inspired Micro and Nanomedicines (MINT), Angers, France

²L'Université Nantes Angers Le Mans (LUNAM), Université d'Angers, Angers, France

³L'Université Nantes Angers Le Mans (LUNAM), PRIMEX, Université d'Angers, Angers, France

⁴INSERM U892, Centre Régional de Recherche en Cancérologie Nantes/Angers (CRCNA), Nantes, France

⁵L'Université Nantes Angers Le Mans (LUNAM), Université de Nantes, Nantes, France

Radiotherapy is one of the standard treatments for glioblastoma, but its effectiveness often encounters the phenomenon of radioresistance. This resistance was recently attributed to distinct cell contingents known as glioblastoma stem-like cells (GSCs) and dominant clones. It is characterized in particular by the activation of signaling pathways and DNA repair mechanisms. Recent advances in the field of nanomedicine offer new possibilities for radiosensitizing these cell populations. Several strategies have been developed in this direction, the first consisting of encapsulating a contrast agent or synthesizing metal-based nanocarriers to concentrate the dose gradient at the level of the target tissue. In the second strategy the physicochemical properties of the vectors are used to encapsulate a wide range of pharmacological agents which act in synergy with the ionizing radiation to destroy the cancerous cells. This review reports on the various molecular anomalies present in GSCs and the predominant role of nanomedicines in the development of radiosensitization strategies.

Fundamental basis of the radiotherapeutic approach of glioblastoma

Glioblastoma (GBM) is the most lethal primary brain cancer in adults. The World Health Organization (WHO) classifies central nervous system (CNS) tumors into four grades: I, II, III, and IV. Grade IV GBM is the most frequent, devastating, and malignant astrocytic glioma [1]. The current treatment of GBM consists of surgical resection of the tumor followed by radiotherapy with X-rays and/or chemotherapy with temozolomide (TMZ). Despite these very aggressive strategies, median survival is less than 15 months and 5 year survival remains below 2% in advanced stages because of inevitable tumor reappearance [2].

Corresponding author: Garcion, E. (emmanuel.garcion@univ-angers.fr).

Keywords: glioblastoma; radioresistance; radiosensitization; nanomedicine; targeted therapies.

0165-6147/

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.002>

While surgery is the most effective treatment against cancer, surgical resection in the case of GBM is limited by the localization of the tumor in the brain, the seat of consciousness. Depending on the tumor site, not all tumors are resectable and, even when possible, the surgical resection margin is limited. Thus, poor survival is due to a high rate of tumor recurrence, mainly within 2–3 cm of the original resection cavity, suggesting insufficient killing of tumorigenic cells takes place even in the case of macroscopically complete resection of *de novo* tumors.

As a result, an essential, and still unavoidable, therapeutic strategy against GBM remains radiotherapy, which preferentially target cells with high division rates such as tumor cells. While radiation acts on cell membrane permeability by causing the degradation of phospholipids, as well as on ribosomes and mitochondria in the cytoplasm [3], the biological effects of irradiation are mainly due to DNA lesions, including highly toxic double-strand (ds) breaks [4,5]. They can be direct, resulting from interactions between particles (e.g., photons for external beam radiation) and DNA molecules, or indirect following interactions with reactive oxygen species (ROS) generated by cell water radiolysis [4,5]. As such, both constitutive cellular DNA damage checkpoint activation and DNA repair capacity in well-prepared cells contribute to their survival to irradiation. These include the non-homologous end-joining recombination pathway [6], activation of the ataxia-telangiectasia mutated kinase (ATM) signaling cascade [7], and a contribution of the L1 cell adhesion molecule (L1CAM) [8]. Furthermore, with new irradiation technologies it is possible to specifically target the tumor site and limit the irradiation of healthy surrounding tissue. Those procedures include stereotactic radiosurgery [γ -rays produced from the decay of cobalt 60 (γ -knife) or X-rays from a linear accelerator (Cyberknife®, Novalis®)] [9], hadrontherapy which uses heavy particles (protons or ions) presenting a ballistic advantage (Bragg Peak) [10], and brachytherapy for which the radiation source is placed in the close vicinity of the area requiring treatment [11,12].

Finally, the therapeutic arsenal of GBM relies also on chemotherapy with the alkylating agent TMZ, conferring a

clinical advantage [2]. However, and although debatable [13–15], damage caused to DNA by TMZ and its effectiveness seem to be inversely correlated to the expression of the DNA repair enzyme *O*-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) [16]. Hence, *MGMT* promoter methylation may predict a favorable outcome in patients in response to TMZ [17] but also to irradiation [18]. Similarly to other chemotherapeutic agents, TMZ must reach the tumor, and more particularly the nucleus of GBM cells, to be effective, but in the case of brain tumors access is notably limited by the blood–brain barrier (BBB) and abnormal tumor vascularization [19]. Oral administration of TMZ requires the use of an increased dose that is not specific and can give rise to systemic side effects.

Nevertheless, current radiation-combined therapies are inefficient for the total eradication of GBM tumor cells. This therapeutic failure raises the question of the identification of relevant GBM targets affected by the treatment and the by the tumor resistance to radiochemotherapy that can itself result from the infiltrating nature of GBM cells, from the high expression of intrinsic and extrinsic survival factors, and from suboptimal administration and/or delivery of drugs. As such, and although controversial, the GBM-initiating or GSC hypothesis suggest that, while focusing on the tumor cell mass, conventional radiochemotherapeutic protocols may neglect some GBM cell populations. Those cells, with self-renewal capacities, are able to resist or to repair damage caused by the treatment, and are thus able to recapitulate later a hierarchically derived tumor mass, similar or distinct from the initial tumor, as a result of abnormal and multilineage differentiation [20–23]. Alternatively, because one of the characteristics of the GBM cell populations is their genetic instability, intracloonal genetic and epigenetic evolution may represent GBM subclones at different stages of neoplastic transformation, each having a growth and survival advantage when exposed to radiochemotherapeutic treatments [24]. Hence, tumor heterogeneity may not only result from differentiation but also from clonal evolution. It is therefore important to find common denominators of resistance in all these cell subpopulations. As such, a relationship has been established between GBM radioresistance and CD133⁺ GSCs that are capable of activating signaling pathways that confer a survival benefit and induce DNA damage repair mechanisms more efficiently than in non-GBM stem cells [7,25,26]. GSC-associated markers including AC133 [27,28], α -6 integrin [29], JAM-1 [30], CXCR4 [31], A2B5 [32,33], EGFR [34], and CD171 (L1CAM) [8] are also involved in specific processes that can be modulated to reinforce the beneficial impact of radiation therapy. Thus, a clear understanding of signaling pathways implicated in radioresistance has led to the development of new targeted therapies offering the advantage of a selective inhibition of well-defined mechanisms such as notch, sonic hedgehog, and Wnt in the GSCs or dominant clones [35,36]. Alternatively, considering the relationship between pathways, a wider influence of targeted therapies could be obtained as exemplified by the modulation of Gli1 isoforms [37]. Pleiotropic effects could also be obtained on distinct cell contingents such as radioresistant GBM cells and stromal cells involved in GBM progression, including

bone marrow-derived cells (by targeting the CXCL12/CXCR4 axis [38]) and endothelial cells (by targeting integrin [39]). As such, hypofractionated radiation therapy may reinforce the synergistic impact of radiation on the tumor vasculature and the tumor cells themselves [40].

In addition, drug administration within or to the brain faces significant problems including systemic toxicity and crossing the BBB, as well as rapid metabolism and elimination. In this context, the development of local/regional therapeutic systems for administration of the drug directly into the brain tumor site using convection-enhanced delivery (CED), osmotic minipumps, or wafers is of great interest [41–43]. In line with this, the development of new nanomedicine represents a significant therapeutic opportunity. Owing to their small size (nanometer scale) and versatility of structure, nanocarriers can represent the object of radiotherapy (α or β vectorized radiotherapy) [11,44] or, instead, actively participate in radiosensitizing therapy either by enhanced dose deposition or by a synergistic effect involving vectorizing a radiosensitizer drug [45,46].

In this review we present how the GSCs and surviving clones activate signaling pathways to resist ubiquitous radiation damage. In pointing out the important role of nanocarriers we also discuss the development of radiosensitizing therapies.

Signaling pathways implicated in radioresistance in GSCs and surviving clones

Wnt signaling pathway

In the absence of Wnt signals, β -catenin forms a complex with E-cadherin and participates in cell–cell adherence junction formation. Excess β -catenin is degraded by the proteasome after ubiquitination by β -Trcp (Figure 1). In the presence of Wnt ligand, free β -catenin can enter in the nucleus, thus forming a transcriptionally active complex on target genes (Figure 1).

During carcinogenesis, activation of Wnt/ β -catenin signaling is often involved through upregulation of Wnt ligands or FZD receptors. In parallel, β -catenin degradation is stopped as a result of failure of upstream members of the signaling pathway, or β -catenin is mutated [47,48].

It has been shown that established-GBM cell lines and patient-derived dissociated GBM specimens are more clonogenic and enriched in GSCs after irradiation compared with non-irradiated cells [49]. Transcriptomic analyses and RT-PCR reveal that the Wnt pathway is preferentially activated in post-irradiated GBM cells. As such, active β -catenin (ABC)- and Sox2-positive cell populations are increased following *in vitro* radiation treatment, suggesting that the radioresistance of GBM is due, in part, to the activation of stem cell associated pathways including Wnt. Finally, pharmacological and siRNA inhibition of the Wnt pathway significantly decreases survival and clonogenicity of GBM cells, and reduces the ABC⁺/Sox2⁺ subpopulation [49].

Many inhibitors have been developed or could be used to inhibit the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Figure 1). Some inhibitors directly target effectors of this pathway. For example, phosphorylation of GSK3 by p38 MAPK at Thr390 reduces the activity of the GSK3 kinase. Accordingly, small-molecule inhibitors of p38 MAPK (SB203580

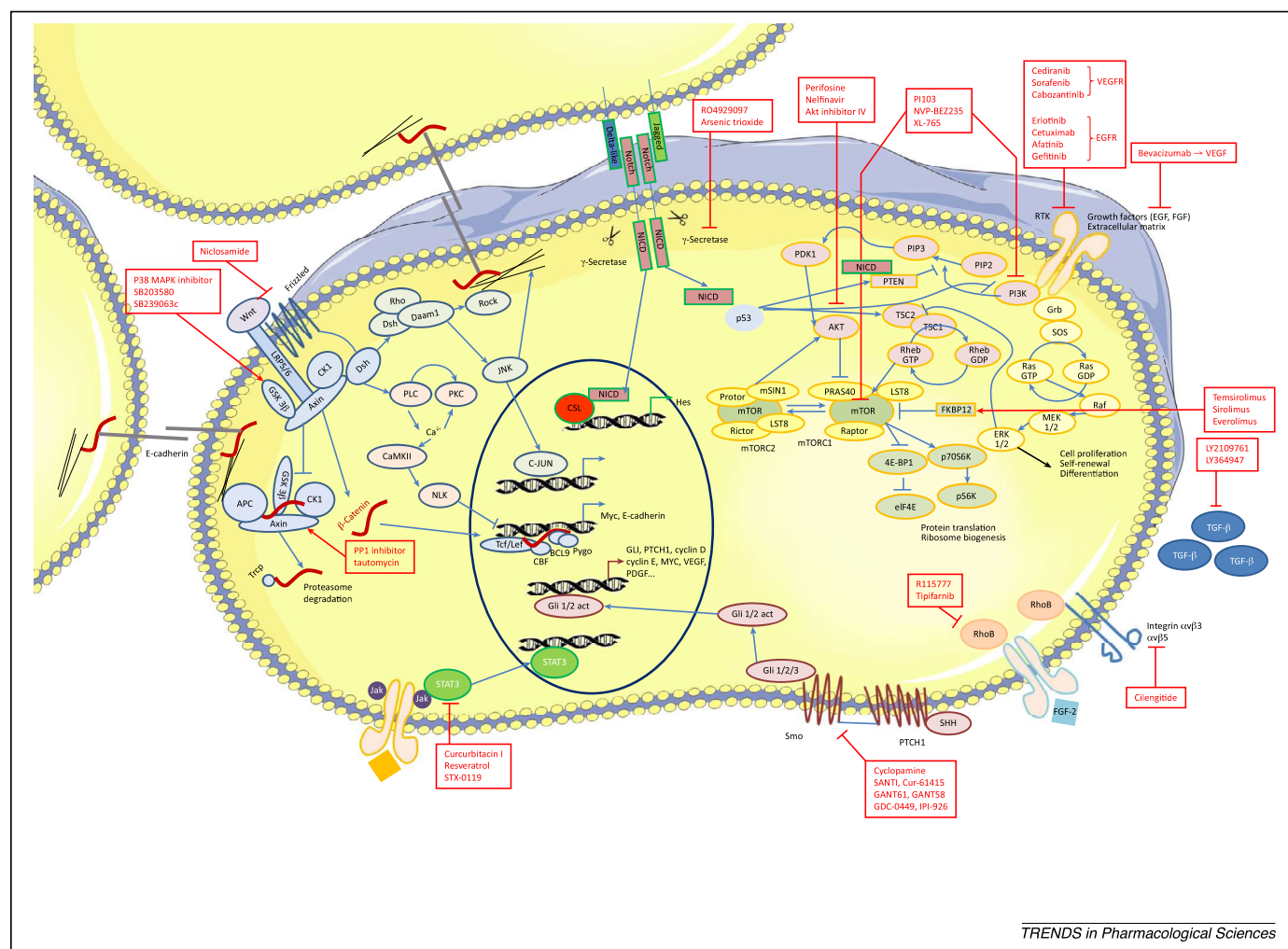


Figure 1. Signaling pathways implicated in radioresistance and corresponding inhibitors tested in association with radiotherapy. Wnt/ β -catenin (blue outlines), Notch (green outlines), PI3K/Akt and MAPK (yellow outlines), and SHH (red outlines) are the main pathways implicated in radioresistance and are associated with STAT3, TGF β , and integrins α v β 3 and α v β 5.

The Wnt pathway is represented by blue outlines (left side). The Wnt glycoproteins are produced by the cells present in the tumor microenvironment. The secreted Wnt ligands bind to the receptors of the seven-membrane-spanning frizzled (FZD) family and the single-spanning LRP family. Three main branches are activated downstream from Wnt: (i) canonical Wnt/ β -catenin signaling, (ii) the noncanonical Jun kinase pathway, and (iii) Wnt/ Ca^{2+} pathways. The central component of the canonical Wnt signaling is β -catenin. In the absence of Wnt signals, β -catenin forms a stable complex with E-cadherin and participates in adherens junction formation. Excess β -catenin is captured by a destruction complex containing GSK3 β , axin1, axin2/conductin, and APC, where it becomes N-terminally phosphorylated and, following ubiquitination by β -Trcp, is then targeted for proteasome-mediated degradation. By contrast, in the presence of Wnt ligands, disassembly of the destruction complex occurs through phosphorylation of LRP5/6 by GSK3 β and CK1 α , together with binding of axin to LRP, thereby preventing β -catenin degradation. Free cytoplasmic β -catenin can then enter the nucleus, where it forms a transcriptionally active complex with the Tcf/Lef family of transcription factors that interact with other coactivators such as CBP, BCL9, and pygopus. The three pathways branch at the level of dishevelled (Dsh) protein. In the noncanonical Jun kinase pathway, Dsh is connected via Daam1 to downstream effectors, such as Rho, and regulates cytoskeletal organization and cell polarity. The Wnt/ Ca^{2+} pathway leads to the release of intracellular calcium, and involves activation of phospholipase C (PLC) and protein kinase C (PKC). Ca^{2+} can activate calmodulin-dependent protein kinase C (CaMKII) and Nemo-like kinase (NLK), while also suppressing canonical Wnt signaling. The PI3K/Akt/mTOR pathway is represented by yellow outlines (right side). The activation of this pathway results in activation of a receptor tyrosine kinase (RTK) by a cytokine or growth factor which drives a sequential activation of PI3K, Akt, and mTOR. PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) is a heterodimer with a regulator subunit p85 and a catalytic subunit p110. After activation of the RTK, PI3K migrates to the cell membrane, p110 is activated and phosphorylates PIP2 (phosphatidylinositol bisphosphate). PIP3 (phosphatidylinositol trisphosphate) recruits the serine/threonine kinase Akt to the membrane, and Akt is then phosphorylated and activated by PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase 1). Akt has many downstream targets, mainly represented by mTOR (mammalian target of rapamycin) which regulates translation and protein synthesis, the cell cycle, and apoptosis. The mTORC1 complex (composed of mTOR, Raptor, and PRAS40) activates eIF4E-binding protein, releasing the transcription factor eIF4 and the kinase S6K1 (or p70S6K) implicated in translation. Thus, mTOR regulates the translation of cyclin D1, HIF1/2, and GLUT-1. The Notch pathway is represented by green outlines (center). Notch receptors interact with five ligands (Delta-like 1, 3, 4, and Jagged-1, 2). Activation of Notch-1 occurs after binding to Delta-like or Jagged ligands at the epidermal growth factor region of the Notch-1 extracellular domain. Two sequential enzymatic cleavages by the γ -secretase complex release the Notch intracellular domain (NICD) from the membrane to the nucleus. The NICD translocates into the nucleus, where it binds to the CBF1/RBP-Jk/Su(H)/Lag1 (CSL) transcription factor family. The CSL family can either activate or repress transcription via histone acetylases and deacetylases, respectively. The hedgehog signaling pathway is represented by red outlines (at the bottom). In mammals, there are three types of secreted glycoprotein ligands: sonic hedgehog (SHH), indian hedgehog (IHH), and desert hedgehog (DHH). They bind to the receptor patched (PTCH) associated with a second transmembrane receptor, smoothened (SMO), and activate the signaling pathway. Target genes (*GLI*, *PTCH1*, *cyclin D*, *cyclin E*, *MYC*, *VEGF*, *PDGF*, etc.) are able to control tissue patterning, differentiation, proliferation, and migration. Transcription factors GLI1 and GLI2 serve as positive regulators of hedgehog signaling pathways, but GLI3 is a negative regulator.

or SB239063) can lead to increased GSK3 activity and, as a result, reduced Wnt/ β -catenin signaling [50,51]. Axin can be dephosphorylated by the serine/threonine phosphatase PP1 (protein phosphatase 1) [52,53]. Hence, inhibition of PP1 can lead to increased phosphorylation of axin followed

by enhanced β -catenin degradation [53]. In this context, the PP1 inhibitor tautomycin has been shown to reduce Wnt/ β -catenin signaling [53]. In addition, there are two poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) that are implicated in this signaling: tankyrase 1 (PARP5a) and tankyrase 2

(PARP5b) [54,55]. Tankyrases have been identified as a promising target for inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. Several research groups have identified small molecules that inhibit tankyrases, and, correspondingly, the Wnt/ β -catenin signaling pathway, by stabilizing the destruction complex [56–61]. Two PARP inhibitors are currently being evaluated in a clinical trial in association with TMZ and radiotherapy (Table 1).

Others inhibitors act on the Wnt receptor. The FDA-approved anthelmintic drug niclosamide has been identified to trigger the internalization of Wnt receptors, while capable of inhibiting Wnt/Frizzled signaling [62–64]. It also downregulates dishevelled-2 (Dvl-2) [65] and induces LRP6 degradation in prostate and breast cancer cells [63]. Interestingly, niclosamide has no reported toxicity against non-cancer cells [65]. Other inhibitors such as filipin can inhibit LRP6/frizzled endocytosis [66]. Finally, inhibition of other transmembrane receptors can reduce Wnt/ β -catenin signaling, as has been demonstrated for the tyrosine kinase inhibitor imatinib [67].

PI3K/Akt signaling pathway

GBM commonly display hyperactivation of the PI3K/Akt pathway [68] (Figure 1). The pathway can be activated in tumors through multiple mechanisms, including activation of upstream growth factors, mutations of the PI3K catalytic subunit, overexpression or amplification of Akt family members, inactivation of the inhibitory effects of PTEN (phosphatase and tensin homolog) tumor suppressor, or by a non-canonical Wnt pathway. Hyperactive Akt signaling promotes tumorigenic cell behaviors by increasing cell survival, proliferation, invasion, and angiogenesis, and has been directly associated with *in vitro* conversion of grade III anaplastic astrocytoma to grade IV GBM [69–72]. Furthermore, it was reported that Akt is implicated in tumorigenesis and aggressiveness [73].

Irradiation activates mTOR signaling in vascular endothelium and in the GBM cell lines U87MG, T98, and A172, but not in GL261 [74–76]. By using the three PTEN-null glioblastoma cells, U87MG, T98 and A172, it was established that rapamycin treatment combined with irradiation inhibited the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family protein survivin through the repression of phospho-Akt. Thus, targeting Akt through mTOR using treatment with rapamycin increases radiation sensitivity [74]. Rapamycin has no effect on the intrinsic radiation sensitivity of cells grown in monolayer culture, whereas this molecule profoundly enhances the efficacy of fractionated radiotherapy in xenografts [76]. Although rapamycin inhibits cell proliferation *in vitro* and *in vivo*, the *in vivo* effects seem to be due only to the direct effect of rapamycin on the cell. Indeed, the *in vivo* effects of rapamycin on tumor proliferation are relatively modest compared with the sensitizing effect of the drug in the xenograft regrowth-delay assay [76]. This suggests that other factors are important for the sensitizing effects of rapamycin. For example, rapamycin induces changes in glucose and nitrogen metabolism that can decrease oxygen consumption in solid tumors and improve overall tumor oxygenation [77]. Any decrease in the proportion of radioresistant hypoxic cells should significantly increase the efficacy of irradiation. Moreover, rapamycin is a

potent inhibitor of endothelial cell proliferation *in vitro*, and systemic administration of rapamycin can inhibit angiogenesis [78]. This finding is supported by findings showing that mTOR inhibition induces apoptosis in HUVEC cells (human umbilical vein endothelial cells) and also sensitizes the vascular endothelium to radiation injury *in vivo* [75]. It has been proposed that these effects are mediated primarily through inhibition of hypoxia-inducible VEGF expression and downstream signaling from the VEGF receptor. Because inhibition of VEGF signaling pathways can sensitize tumors to radiation [79], these observations suggest that the antiangiogenic effect of rapamycin might enhance the efficacy of irradiation [76].

Taken together, those different studies have established that inhibition of the PI3K/Akt pathway through mTOR inhibitor sensitizes tumors to radiation. This effect is not only due to a direct inhibition of mTOR, and inhibition of translation and cell cycle progression, but also to microenvironmental effects of rapamycin concerning primarily the oxygenation of the tumor.

Furthermore, it has been demonstrated in medulloblastoma, the most common brain tumor in children, that cancer stem-like cells residing in the perivascular niche regulated their survival to radiation-induced cell death through activation of the PI3K/Akt pathway [80]. As such, intraperitoneal administration of the Akt inhibitor, perfosine, to tumor-bearing mice is able to cause radiosensitizing effects [80].

Other ‘first-generation’ mTOR-targeted agents, or ‘rapalogs’, have been developed, in particular temsirolimus (CCI-779) and everolimus (RAD-001) (Figure 1). Nevertheless, it is known that mTOR inhibition by the rapamycin–FKBP12 complex indirectly induces Akt activation by negative feedback. Indeed, rapamycin effectively blocks S6 kinase (mTORC1 target) phosphorylation and also induces Akt phosphorylation and activity in an mTORC2-dependent manner [81,82]. Furthermore, p70S6K causes feedback inhibition of insulin-like growth factor 1 (IGF-1)/insulin signaling by phosphorylating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and causing its degradation [83]. In this way, rapamycin relieves this feedback and causes upregulation of IRS protein levels that increase IGF-IR/IRS-1/PI3K signaling to Akt [81]. Furthermore, signaling by the type I receptor (IGF1R) is activated by chemotherapy, radiotherapy, or stress stimulation in several types of cancer. Upregulation of IGF1R signaling has also been found to promote radioresistance in several types of solid tumor. In the bulk of tumor cells, IGF1R-induced activation of PI3K–Akt signaling gives rise to radioresistance by preventing apoptosis and promoting cell survival. It was recently found that irradiation increases the secretion of IGF1 and results in a gradual upregulation of IGF1R in GSCs. Moreover, the study showed that inhibition of IGF1R is an effective way to reverse radioresistance *in vitro* and *in vivo* [84]. Rapalogs have been usually evaluated in combination with other targeted and chemotherapeutic agents. Although inhibition of EGFR [85–88] or mTOR [89] have been investigated separately, recent clinical trials have highlighted the potential interest of their concomitant inhibition, notably by combining gefitinib and everolimus [90,91] (Figure 1, Table 1). An ongoing clinical trial is

Table 1. Clinical trials using targeting therapies directed to elements implicated in radioresistance associated with radiotherapy^a

Target	Drug(s)	Trial design	Study population	Outcome	Refs
EGFR	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase I/II N0177	97 newly diagnosed GBM	Median survival = 15.3 months; no benefit for OS	[85]
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II	65 newly diagnosed GBM/ gliosarcoma	Median survival = 19.3 months vs 14.1 for controls; positive correlation between <i>MGMT</i> methylation and survival; <i>MGMT</i> methylation and <i>PTEN</i> positivity correlated with improved survival	[86]
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II	27 newly diagnosed GBM	OS = 8.6 months; median PFS = 2.8 months	[87]
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II NCT00187486	Newly diagnosed GBM/ gliosarcoma	Ongoing	
	Erlotinib (+RT+TMZ)	Phase II NCT00274833	Newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Cetuximab (+TMZ+RT)	Phase I/II	39 newly diagnosed GBM	12 months OS = 89%; 24 months OS = 42%; 6 months PFS = 76%; 12 months PFS = 45%	[88]
	BIBW2992 (Afatinib) (+RT+TMZ)	Phase I NCT00977431	38 newly diagnosed GBM	Ongoing	
VEGF	Bevacizumab (+RT+TMZ)	Phase III NCT00884741	942 newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Bevacizumab (+RT+TMZ)	Phase III NCT00943826	920 newly diagnosed GBM	Bevacizumab +RT+TMZ did not improve survival in patients with GBM	[79]
VEGFR	Cediranib (TMZ+RT)	Phase II NCT01062425	283 newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Sorafenib (+RT+TMZ)	Phase I/II NCT00734526	51 newly diagnosed GBM/ gliosarcoma	Ongoing	
	Sorafenib (+TMZ+RT)	Phase II NCT00544817	46 newly diagnosed GBM	Ongoing	
	XL184 (cabozantinib) (+RT+TMZ)	Phase I NCT00960492	85 newly diagnosed GBM	Ongoing	
Akt	Nelfinavir (+TMZ+RT)	Phase I/II NCT00694837	Newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Nelfinavir (+TMZ+RT)	Phase I NCT01020292		Ongoing	
mTOR	Temsirolimus (+RT+TMZ)	Phase I NCT00316849	Newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Everolimus (+TMZ+RT)	Phase I/II NCT00553150	108 newly diagnosed GBM	Ongoing	
	Everolimus (+RT+TMZ+bevacizumab)	Phase II NCT00805961	68 newly diagnosed GBM	PFS = 11.3 months; OS = 13.9 months	[89]
mTOR/PI3K	XL765 (+TMZ+RT)	Phase I NCT00704080	Malignant glioma	Ongoing	
Notch	γ -Secretase/Notch signaling pathway inhibitor RO4929097	Phase I NCT01119599	Newly diagnosed malignant glioma	Ongoing	
TGF- β	Antisense oligonucleotide AP-12009	Phase I/II	Recurrent or refractory malignant (high-grade) glioma WHO grade III or IV	Prolonged survival compared with historical control	[117]
	Antisense oligonucleotide AP-12009	Phase IIb	Recurrent or refractory GBM or anaplastic astrocytoma	Tumor control rate superiority of lower dose AP-12009 over standard chemotherapy and comparable survival in GBM, with lower rate of toxicity	[118]
FGF-2	Farnesyltransferase inhibitor tipifarnib	Phase I			[135]
	Tipifarnib + RT	Phase I/II	27 newly diagnosed GBM	Phase II: TTP = 23.1 weeks; OS = 80.3 weeks Phase I/II: TTP = 18.1 weeks; OS = 60.4 weeks	[136]
Integrins α v β 3 and α v β 5	Cilengitide (+TMZ+RT)	Phase I/IIa	52 newly diagnosed GBM	Median survival = 16.1 months; 6 months PFS = 69%	[137]
	Cilengitide (+TMZ+RT)	Phase III NCT00689221	Newly diagnosed glioblastoma and methylated gene promoter status	Ongoing	
	Cilengitide (+TMZ+RT)	Phase II NCT00813943	Newly diagnosed Glioblastoma and methylated gene promoter status	Ongoing	

^aAbbreviations: GBM, glioblastoma multiforme; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; RT, radiotherapy; TMZ, temozolomide; TTP, time to progression.

evaluating the therapeutic potential of temsirolimus associated with TMZ and radiotherapy (Table 1). In parallel, more specific inhibitors as well as dual inhibitors have been developed and evaluated. The dual mTOR/PI3K inhibitor PI103 is the first mTOR inhibitor that possesses simultaneous target inhibition while also inhibiting mTOR in an ATP-competitive manner [92]. Unfortunately, its poor pharmacokinetic properties have compromised its clinical application. Other mTOR and PI3K inhibitors have been developed, including NVP-BEZ235 and XL-765 (Figure 1). NVP-BEZ235 is an mTOR and PI3K inhibitor which has shown efficacy in GBM and is currently in Phase I trials for a variety of solid tumors (NCT 01508104) [93]. Combination therapies with NVP-BEZ235 have also been explored. One strategy consists of associating NVP-BEZ235 with the autophagy inhibitor chloroquine to obtain a synergistic increase in *in vivo* tumor apoptosis [94]. In another study, NVP-BEZ235 was shown to inhibit the DNA repair protein DNA-PKcs and ATM in GBM, which are thought to mediate resistance to ionizing radiation [95], and this treatment may have a synergistic effect with radiotherapy in humans. NVP-BEZ235 has also been shown to sensitize xenograft GBM tumor models to radiation, which depends on its ability to induce autophagy [96]. XL-765 is another PI3K/mTOR inhibitor that is currently undergoing trials in combination with radiotherapy and TMZ for GBM as well as in subjects with recurrent GBM (Table 1). Although capable of exerting a radiosensitizing effect in the perivascular niche in medulloblastoma, perifosin failed to synergize with irradiation in GBM xenograft models [97]. By contrast, nelfinavir, another Akt inhibitor, efficiently radiosensitizes wild type highly-radioresistant PTEN glioma cells [98].

Notch signaling pathway

Notch family proteins (Notch 1, 2, 3, 4) are transmembrane receptors proteins mediating cell–cell interactions with a major contribution to proliferation, differentiation, and apoptosis [99] (Figure 1). As such, Notch-1 blockade via a γ -secretase inhibitor (GSI) induces human medulloblastoma stem-like cell apoptosis and differentiation while suppressing tumor xenograft formation in mice [100]. With regard to brain tumor progression, Notch signaling also has an impact on GSC behavior and plays an important role in radioresistance [25]. Expression of Notch target genes, including Hes2 and, to a lesser degree, Hes4 and Hes5, is increased after radiation exposure [25]. By focusing on CD133⁺ GBM cells, it has been established that GSIs moderately impaired clonogenic growth in the absence of irradiation, which was, by contrast, severely affected following radiation exposure at 1, 2, or 3 Gy (Figure 1). GSIs significantly increase caspase activity and the number of annexin V-positive cells after irradiation, supporting their role in sensitizing GSCs to radiation-induced cell death [101]. Similar results demonstrated that GSI at low concentration sensitizes U87MG and U251MG cells to irradiation [102].

Notch can promote cellular survival through different mechanisms such as activation of the PI3K/Akt pathway and upregulation of the pro-survival proteins Bcl-2 and Mcl-1. The PI3K/Akt pathway plays a central role in the

radioprotective functions of Notch because PI3K or Akt inhibitors abolish the radioprotective effect of the Notch intracellular domain-2 (NICD2) involved in the regulation of transcription [101]. Another study reports a non-canonical function of Notch that was independent of transcription, suggesting that membrane-anchored Notch1 is sufficient to activate Akt [103]. Surprisingly, NICD2 upregulates the tumor suppressors PTEN and p53 (Figure 1). It is documented that PTEN and p53 can mediate cell cycle arrest and then promote survival after irradiation of medulloblastoma stem cells [80]. Thus, in glioma stem cells, Notch-induced PTEN and p53 can indirectly contribute to reducing cell death after irradiation by promoting cell cycle arrest.

In addition to γ -secretase inhibitors, arsenic trioxide (ATO) has demonstrated an inhibitory effect on GSCs (Figure 1). ATO inhibits the phosphorylation and activation of Akt and STAT3 through blockade of Notch signaling. *In vivo*, this depletes CSCs in GBM and inhibits neurosphere recovery and secondary neurosphere formation [104].

Hedgehog signaling pathway

In GBM, hedgehog/Gli signaling regulates the stemness signature and self-renewal of CD133⁺ cells, as well as the growth and survival of GSCs [105]. This pathway was established as important for GSC proliferation and malignancy, whereas inhibiting the Notch or Wnt signaling pathway has little effect (Figure 1) [106]. Inhibition of the hedgehog signaling pathway with cyclopamine strongly prevents cell proliferation in both cell lines tested compared with the inhibition of Wnt or Notch. Among the potential Gli target factors (Bmi, N-myc, Sox2, and Cdc2), Cdc2 is indispensable for GSC proliferation [106]. The consequences of hedgehog signaling pathway inhibition on GSCs have been evaluated in GBM neurospheres treated with cyclopamine alone and also in combination with 10 Gy of irradiation. The neurospheres showed significantly lower growth rate when 10 μ M cyclopamine was given in addition to 10 Gy of irradiation, as compared with radiotherapy alone. This suggests that hedgehog blockade may target GBM cells not affected by irradiation [107].

TGF β

The microenvironment can contribute to radiation responses. Among crucial components overexpressed in GBM [108] and induced by ionizing radiation [109,110] is the pleiotropic cytokine transforming growth factor- β (TGF- β) (Figure 1). While loss of growth inhibition by TGF- β may contribute to the development and progression of cancer, TGF- β overexpression may also constitute a pro-tumoral inflammatory component. As such, TGF- β has a wide range of effects on the glioma microenvironment, affecting extracellular matrix deposition, angiogenesis, and invasion [111]. Reactive oxygen species are possibly involved in the radiation-induced activation of TGF- β through a conformational change in the latency-associated peptide (LAP)-TGF β complex, allowing the release of active TGF- β 1 [112]. Furthermore, radiation, and especially helium ions, can induce nitric oxide (NO) and TGF- β secretion, playing a key

role as a signaling factor in radiation-induced bystander effects by further inducing free radicals and DNA damage in the non-targeted bystander cells [113]. Because of the dual role of TGF- β in cancer progression, the use of inhibitors of this pathway must be considered with caution.

Inhibiting TGF- β decreases radiation-induced phosphorylation of p53, chk2, H2AX, and rad17, all of which are substrates of ATM. A preclinical study was conducted on the antitumor effects of the TGF- β receptor (TGF β R) I kinase inhibitor LY2109761 in combination with radiotherapy. *In vivo* studies on an orthotopic intracranial model have shown that LY2109761 significantly reduces tumor growth, prolongs survival, and extends the prolongation of survival induced by radiation treatment [114]. The study also evaluated the combination of LY2109761 with RT and TMZ. Addition of a TGF- β R1 kinase inhibitor to the clinical standard (irradiation plus TMZ) might improve the clinical outcome in human GBM, especially in patients with unmethylated *MGMT* promoter status [115]. Increased in TGF- β production by GSCs maintained as neurospheres protected them from radiation-induced killing through the promotion of DNA damage repair and self-renewal via CXCR4 and Notch1 [116]. Inhibition of TGF- β signaling by LY364947 compromises both mechanisms [116]. Phase I/II and IIb studies performed with the TGF- β 2 antisense oligonucleotide AP-12009 have yielded encouraging results [117,118].

STAT-3

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a transcription factor for cytokine signaling that is constitutively activated in numerous cancers including brain tumors. In turn, STAT3 can be activated by phosphorylation of Tyr705 through activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) family of cytokines receptors and a non-receptor transducer: janus kinase (JAK) (Figure 1). STAT3 can also be directly activated by the tyrosine kinase activity of growth factor receptors such as EGFR [119]. The role of STAT3 in tumorigenesis is to mediate the expression of downstream genes that suppress apoptosis, regulate cell cycle progression, invasion, and angiogenesis. As such, the STAT3 inhibitor cucurbitacin-I suppresses the stem cell phenotype of CD133⁺ cells in medulloblastoma while increasing their sensitivity to radiation [120]. Emphasizing these data, STAT3 inhibition with STAT3-shRNA or resveratrol inhibits the stem cell properties and the radioresistance of CD133⁺ GBM cells [121]. Finally, the STAT3 inhibitor STX-0119 reduces the proliferation of GSCs and would be an interesting compound to be tested in combination with TMZ and radiation therapy [50].

Fibroblast growth factor (FGF) and $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ integrins

Insofar as tumor angiogenesis is responsible for hypoxia, which is a key factor in radioresistance, and because the sensitivity of endothelial cells to irradiation affects that of tumor cells, factors that act on common signals of these two cell types are of particular interest. As such, FGF and integrins represent attractive targets.

FGF is a powerful angiogenic factor expressed by endothelial cells in tumor vessels. Nuclear isoforms of FGF-2 display radioprotective properties [122] by increasing the enzymatic activity of the DNA-PKcs enzyme that is activated by irradiation and implicated in radio-induced non-homologous repair of DNA ds breaks [123–126]. This radioresistance phenomenon is notably controlled by RhoB GTPase activity, known to be activated by stress conditions including UV and ionizing radiation, hypoxia [127], and growth factors including epidermal growth factor (EGF) and FGF-2 (Figure 1). In connection with this, farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication [128]. Inhibition of this farnesylated RhoB with the farnesyltransferase inhibitor R115777 significantly enhances radiosensitization in GBM cell lines. *In vivo*, R115777 facilitates oxygenation of the tumor, normalizes tumor vessels, and inhibits matrix metalloproteinase-2 (MMP2) [129–131]. Furthermore, tumor radiosensitivity is controlled by endothelial cells, being dependent on FGF-2 which is a radioprotector [132]. Thus, inhibition of FGF-2 and its cell signaling pathway leads to the radiosensitization of GBM, acting directly on tumor cells and indirectly through modulation of endothelial cell sensitization.

Integrins are heterodimeric transmembrane receptors that interact with extracellular matrix ligands to transmit cell–cell or cell–matrix signals (Figure 1). While controlling angiogenesis they are also involved in cell survival. In GBM, irradiation induces tumor cell migration associated with increased $\alpha v\beta 3$ expression [133]. Activation of this signaling pathway is controlled by the integrin link kinase (ILK) and passes through RhoB–GTP activation [134]. When carried out before irradiation, the pharmacological inhibition of integrins with cilengitide, a cyclized arginine-glycine-aspartic acid-containing pentapeptide (RGD pentapeptide), causes significant radiosensitization of GBM cell lines. These results demonstrate crosstalk via RhoB between FGF-2, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha v\beta 5$, leading to a decrease of tumor radiosensitivity [122].

Thus, several groups have proposed the hypothesis of increased glioma radiosensitization by inhibition of FGF-2, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha v\beta 5$. Notably, Cohen-Jonathan's group has designed a Phase I trial in which 13 patients were enrolled. After resection or biopsy, tipifarnib, the farnesyltransferase inhibitor, was administered 1 week before and then continuously during radiotherapy (60 Gy), followed by adjuvant administration until progression (Table 1). The tipifarnib dose during radiotherapy was escalated in cohorts of three doses starting at 200 mg/day. They concluded that tipifarnib (200 mg/day) concurrent with standard radiotherapy is well tolerated in patients with GBM [135]. Subsequently, Ducassou and coworkers found that the farnesylated form of RhoB in GBM is implicated in radioresistance (Table 1). These authors designed a Phase II trial of 27 GBM patients who were treated with 200 mg tipifarnib given continuously with radiotherapy. The results show promising overall survival (OS), but no increase in time to progression (TTP) compared to historical data [136]. Stupp and coworkers evaluated the therapeutic benefit of cilengitide in a Phase I/IIa trial, in association with TMZ and radiotherapy (Table 1). Fifty-two patients

were treated with cilengitide (500 mg) administered twice-weekly (up to 35 weeks) intravenously in addition to standard radiotherapy with concomitant and adjuvant TMZ. Results show that the combination of cilengitide with TMZ and radiotherapy was well tolerated, with no additional toxicity or pharmacokinetic interactions between TMZ and cilengitide. Thus, compared with historical controls, the addition of concomitant and adjuvant cilengitide to standard chemoradiotherapy demonstrates promising activity in patients with GBM with *MGMT* promoter methylation [137]. More recently, Ader and coworkers demonstrated that treating U87MG xenograft mice orthotopically with SSR128129E, a multi-FGF receptor blocker, before two subsequent local irradiations of 2.5 Gy significantly increases neurological sign-free survival compared to the control groups [138].

Hypoxia, HIF-1 α , and HIF-2 α

Although tumor-mediated endothelial cell recruitment (neovascularization) or differentiation of their precursors (vasculogenesis) to form new blood vessels, solid tumors, including GBM, contain regions of irregular blood flow that experience fluctuating abnormal hypoxic oxygen tension levels ranging from >1 to 5%. Hypoxia-mediated responses are carried out predominantly by hypoxia-inducible factors (HIFs), which are transcription factors that respond to decreases in oxygen in the cellular environment. Under normoxic conditions, the α subunits of HIF are hydroxylated by HIF prolyl-hydroxylases, allowing their ubiquitination by the von Hippel–Lindau (vHL) tumor-suppressor protein followed by proteasomal degradation. Under hypoxia, HIF α prolyl-hydroxylases, which require oxygen, are inhibited. HIF α proteins become stabilized, leading to dimerization with β subunits and subsequent binding to hypoxia-responsive elements (HREs) on the promoters of target genes that are often involved in modulating cell survival, motility, metabolism, and angiogenesis [139,140].

Whereas HIF1 α is widely expressed in various tissues, thus promoting the proliferation and survival of many cancer cells, HIF2 α appears to be more selectively expressed by tumorigenic GSCs, even under modest hypoxic conditions, making it an attractive target [141]. There are no differences in the radiation response of wild type or HIF-1-deficient mouse hepatoma cells *in vitro*, but HIF-1 deficiency promotes radioresponsiveness *in vivo*. Under hypoxic conditions, the presence of HIF-1 β , and thereby intact HIF-1 function, provides a survival signal for cells maintained in hypoxic conditions and may enhance the ability of cells to adapt to a reoxygenation event following hypoxic exposure. Such reoxygenation events would occur following tumor irradiation [142]. In 2006, Bernardi *et al.* proposed a correlation between the PI3K/Akt/mTOR pathway and hypoxia. These authors mainly established that the promyelocytic leukemia tumor-suppressor gene inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR [143].

The emerging role of nanomedicines in therapeutic strategies using radiosensitization

Radiosensitization is the process of enhancing the susceptibility of tumor tissues to injury induced by radiation

exposure. As such, radiosensitizers are therapeutic or otherwise inert agents that enhance the effects of radiation therapy (Table 1). Hence, new radiosensitizing strategies for the treatment of GBM (e.g., metals enhancing dose deposition, drugs enhancing DNA damage) may strongly benefit from the application of new nanomedicines (Table 2, Figure 2). Three generations of nanocarriers can be distinguished. (i) First, non-functionalized nanocarriers, which are rapidly trapped by the reticuloendothelial elimination system (RES). (ii) Second, sterically stabilized PEGylated nanocarriers, which can evade the RES and achieve passive targeting through the enhanced permeability and retention (EPR) effect (Figure 2) [46,144–146]. (iii) Third, nanocarriers functionalized with antibodies, peptides, or affitins can actively target cells and tissues through specific or selective molecular interactions (Figure 2). In the case of brain tumors, the EPR effect is very unlikely to occur due to the dense matrix network impeding diffusion, while the elevated interstitial fluid pressure reduces convective transport [19,147]. As such, the interest of brain local/regional delivery of drug through nanomedicines, reducing systemic toxicity while avoiding the problem of the BBB, is highly reinforced [11].

Nanomedicines and factors influencing dose deposition *Iodine*

The historical approach to improve dose in the tumor involved the use of a contrast agent, as first demonstrated by Santos Mello *et al.* [148]. They performed preclinical studies on tumor-bearing rabbits and observed complete regression of the tumors after direct injection of contrast agent into the tumors followed by irradiation. The efficacy and safety of this approach was then demonstrated in the treatment of spontaneous brain tumors in dogs and later in a clinical trial [149,150]. Recently, Rousseau and coworkers used 5-iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) as a radiosensitizer in a F98 glioma-bearing rat model and in association with synchrotron X-rays. Although treated rats survived longer in comparison with the untreated group, the combination of treatments did not significantly improve survival compared with X-irradiation or chemotherapy alone [151]. Hence, the development of iodine microspheres or nanoparticles may be useful in that context [152] (Table 2).

Gold nanoparticles (GNPs)

Because X-ray radiation has a high probability to interact with an electron within a high-*Z* atom, gold, which has atomic number 79 and is very inert to tissue interactions, appears to be ideal for photosensitization reactions [153]. Incoming radiation imparts its energy to an electron, ejecting it from its orbit and then generating a photoelectric effect. The ejected electrons are replaced by electrons from higher-energy orbits that release energy as Auger electrons or fluorescent photons (Figure 2).

Yi Zheng and colleagues investigated the enhanced radiosensitization effects of GNPs on DNA damage induced by high-energy electrons. Their results suggest that the enhanced effects are due to the production of low-energy electrons from GNPs and that these effects are directly proportional to the number of particles in proximity of the

Table 2. Nanomedicine applications for radiosensitization

Mechanism	Molecule/tool	Encapsulation strategies	Consequences	Association with RT
Enhances dose gradient	Iodine	Iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) and ¹²⁵ IUdR-loaded biodegradable microspheres		Not yet studied [152]
	Gold	Gold nanoparticles	Enhanced DNA damage, delayed tumor growth and improved mice survival	Yes, preclinical assay [155]
	Gold	Gold nanoparticles	Improved survival rate	Yes, preclinical assay [156]
	Gadolinium	Gadolinium nanoparticles	Improved radiosensitization	<i>In vitro</i> study [157]
	Titanium	Titanium dioxide nanotubes	Improved radiosensitization	<i>In vitro</i> study [160]
	Silver	Silver nanoparticles	Improved radiosensitization	<i>In vitro</i> study [165]
	Hafnium	Hafnium oxide nanocrystals	Improved radiosensitization	<i>In vitro</i> study [166]
Pharmacologic synergism	Cisplatin	Cisplatin-loaded PBCA nanoparticles	Enhancement in mean survival time and reduced side effects	Not yet studied with RT, preclinical study [170]
	Carboplatin	Carboplatin and cisplatin-loaded liposomes (lipoplatin)	Lipoplatin showed the best radiosensitizing effect	<i>In vitro</i> study [169]
	Doxorubicin	Doxorubicin-loaded nanospheres formulated with PLGA	Increased cellular uptake of doxorubicin in A172	Not yet studied [174]
		Doxorubicin encapsulation in nanospheres	Contact between doxorubicin-bearing nanospheres and cells is required for circumvention of MDR	Not yet studied [173]
		Doxorubicin and non-pegylated liposomal form +TMZ	No improvement of patient outcome	Yes, clinical trial in newly diagnosed GBM [172]
	Daunorubicin	Daunorubicin-loaded liposome	Low-level systemic exposure	Not yet studied [175]
	Paclitaxel	Paclitaxel-loaded in lipidic nanoparticles	No benefit of radio-chemotherapy with Px-loaded LNC versus radiotherapy alone	Yes, preclinical study [177]
		Paclitaxel in PLGA nanoparticles	Enhanced radiosensitivity	Yes, <i>in vitro</i> study [178]
		Paclitaxel microspheres	Survival benefit	Yes, preclinical study [179]
		Paclitaxel-loaded PEG-PLA nanoparticles decorated with MT1-AF7p peptide	Enhancement of median survival of nude mice with intracranial C6 glioma	Not yet studied [180]
		Paclitaxel-loaded MPEG-PTMC nanoparticles	<i>In vivo</i> anti-tumor effect, with median survival time of NP/PTX-treated mice (27 days) significantly longer than for mice treated with controls	Not yet studied [181]
	5-FU	5-FU-loaded microspheres	Well tolerated with promising results	Yes, clinical trial [184–186]
	Curcumin	Dual drug loaded magnetic nanoparticles combining TMZ and curcumin	High cytotoxic effect on T-98G	Not yet studied [202]
		Polymeric nanoparticle formulation of curcumin	Decreased growth of multiple brain tumor cell cultures through modulation of cell proliferation, survival, and stem cell phenotype	Not yet studied [203]
		Nanoemulsion of curcumin	Improvement of bioavailability and cytotoxicity against malignant glioma cells	Not yet studied [200]
		Dendrosomal curcumin nanoformulation	Suppression of U87MG proliferation and downregulation of pluripotency genes via miR-145 activation	Not yet studied [201]
	Endostatin	Endostatin transfected cells encapsulated in alginate	Rats receiving glioma cells and endostatin-producing capsules survive 84% longer than controls	Not yet studied [199]
NF-κB	PLGA microparticle delivery system for NF-κB decoy oligonucleotide inhibiting NF-κB translocation	Significant reduction of cell number <i>in vitro</i> (U87, A172, D37)	Not yet studied [205]	
TMZ	Binding of TMZ inside the cavity of cucurbit[7]uril nanocontainer	Improvement in drug activity as against primary GBM cell lines	Not yet studied [204]	

DNA [154]. A study performed in an orthotopic GBM mouse model established that GNPs can effectively radiosensitize the U251MG-GBM cell line when irradiated at 4 Gy, leading to enhanced DNA damage, delayed tumor growth, and improved survival. GNPs could also be used to enhance radiation damage to tumor-associated vasculature [155] (Table 2). Separate studies on rat glioma models showed a similar increase in efficacy and improved survival rate

with 15 nm GNPs in combination with low-energy radiation therapy at 15 Gy delivered in a single dose by synchrotron [156] (Table 2).

Gadolinium nanoparticles

Gadolinium represents another class of radiation sensitizers that are also very practical because they can also be easily viewed *in vivo* through the use of magnetic

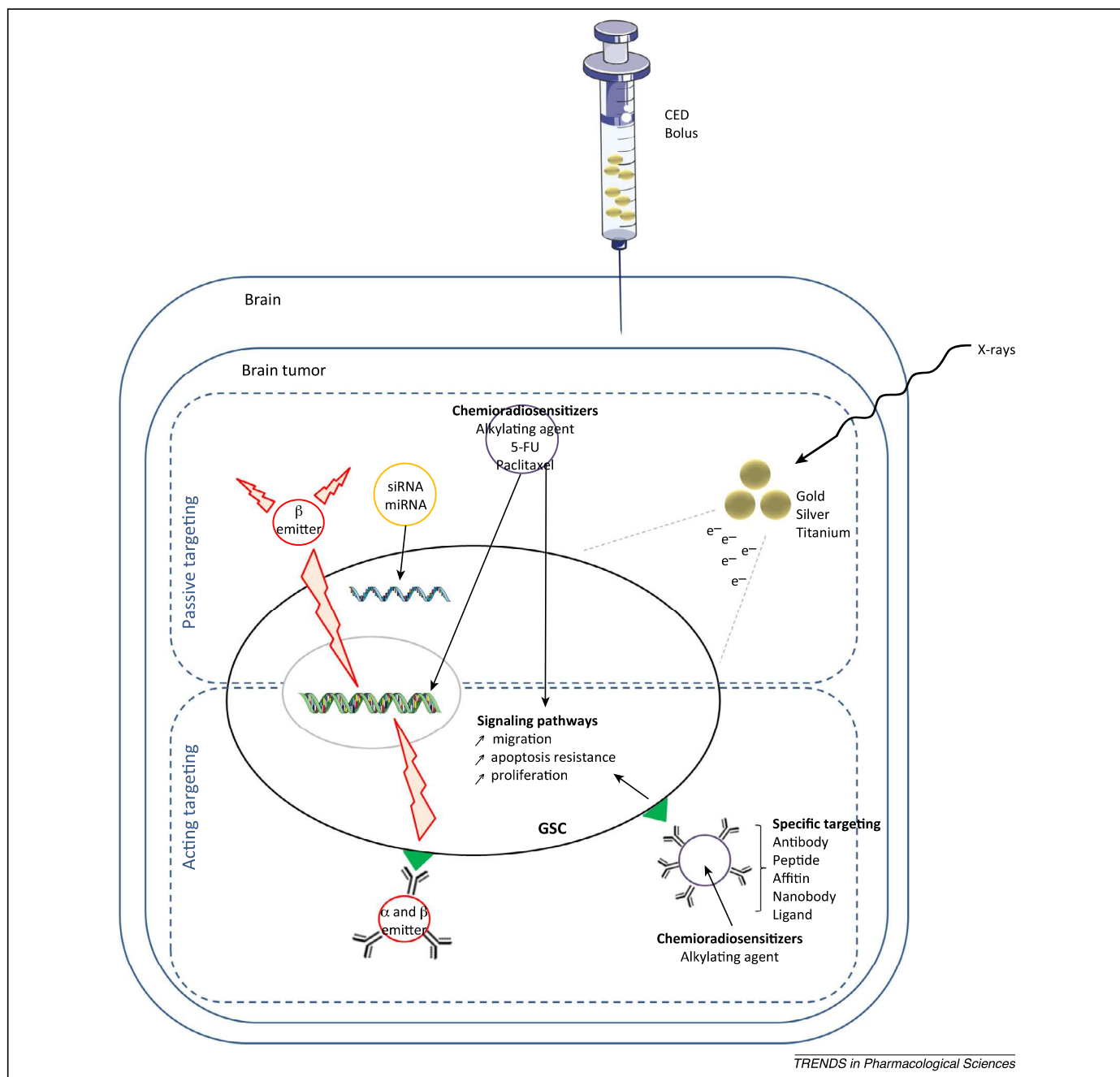


Figure 2. Encapsulated drugs with radiosensitizing properties. Targeting strategies can be divided into two categories: passive targeting and active targeting. Passive strategies contain non-functionalized nanocarriers loaded with chemioradiosensitizer drugs which target DNA or signaling pathways implicated in migration, apoptosis resistance, and proliferation (Table 2). These strategies also include metal nanoparticles which enhance dose deposition and nanovectors loaded with a β -emitter [11,208] or siRNA/miRNA [187]. Active strategies contain nanocarriers functionalized with antibodies, peptides, affitins, nanobodies, or other ligands directed to specific markers such as the CXCR4 chemokine receptor, CD133, RGD, and integrin $\alpha\beta3$, allowing efficient targeting. These nanocarriers can also contain chemioradiosensitizers or α - or β -emitters. These nano-objects are directly introduced into the brain by convection-enhanced delivery (CED) in preclinical trials.

resonance imaging. 5 nm gadolinium-based nanoparticles can efficiently enter the GBM cell line U87MG. These particles consisted of a core of gadolinium oxide with a shell of polysiloxane, and were functionalized by diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA). These formulations were found to possess efficient *in vitro* radiosensitizing properties at an energy of 660 keV [157] (Table 2).

Titanium nanotubes

Titanium dioxide (TiO_2) has also been shown to be useful for killing cancer cells using photocatalytic chemistry.

Because elongated organic nanoparticles internalize into cells more effectively than their spherical counterparts, TiO_2 nanotubes were formulated and tested for their radiosensitization properties [158]. Interestingly, titanate nanotubes (TiONts) contain high amounts of water, oxygen, and hydroxides that may increase the production of free radical radiosensitizers ($\text{OH}\cdot$, $\text{H}\cdot$, and $\text{HO}_2\cdot$) after exposure to radiation [159]. Although 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TiO_2 nanotubes induce radiosensitization on U87MG when irradiated with X-rays, ROS production was unchanged at this concentration [160]. By contrast, at concentrations

higher than 10 $\mu\text{g/ml}$, TiO_2 nanoparticles induced ROS [161,162]. TiONts also induce an increase in the proportion of cells in the G2/M cell cycle phase after 24 h of exposure and at low concentrations, and it was demonstrated that cells in the G2 phase are more sensitive to irradiation [163,164]. Furthermore, TiONts combined with irradiation (at 2 Gy) induce more ds DNA damage than irradiation alone [160] (Table 2).

Silver nanoparticles

Silver nanoparticles (AgNPs) have radiosensitizing properties similar to those seen with other high Z -number atoms. As such, AgNPs of 20 and 50 nm significantly enhanced the radiation sensitivity of U251MG-GBM cells while the effect of 100 nm AgNPs was much weaker [165]. The mechanism of radiosensitization by AgNPs might be related to the release of Ag^+ cation from the silver nanostructures inside cells. The Ag^+ cation has the ability to capture electrons, and thus functions as an oxidative agent which could further reduce the ATP content of the cell and increase ROS production. Indeed, treating cells of an established colony with Ag^+ cation led to rapid cytotoxicity, and further irradiation completely killed the cells within the colony. The radiosensitization effect of AgNPs suggest that intracellular nanostructures may interact with DNA repair system, and has important implications in the design of nanotechnology-based radiosensitizers for improving the outcomes of cancer radiotherapy [165] (Table 2).

Hafnium oxide (HfO_2) nanocrystals

Nanoparticles have been made using rare earth metals and other high- Z elements, as in the case of HfO_2 . The effect of HfO_2 nanocrystals on different cancer cell lines including the GBM cell line 42-MG-BA has been evaluated. Using 100 μM to 400 μM of nanoparticles before X-ray irradiation at 2 Gy enhances radiosensitivity *in vitro* [166] (Table 2).

Nanomedicines and synergistic effects

The properties of nanocarriers allow the encapsulation of drugs which can further be released into cells and tissues [167]. Encapsulation provides physical protection from drug metabolism, as well as from pharmacokinetic and pharmacodynamic modifications, and changes the biodistribution of the drug. Radiation sensitizers are drugs that can enhance the effects of both single and fractionated radiation therapies. The ideal drug would have potent independent cytotoxicity, as well as the ability to sensitize radioresistant tumor cells to the lethal effects of ionizing radiation.

Delivery of alkylating agents: platinum liposomes

Radiosensitization studies have been performed with platinum compounds. The heavy metal compounds exert their anti-neoplastic effect by binding to DNA. Cisplatin combined with external beam radiotherapy results in only marginal benefits in the survival of GBM patients [168]. Adverse effects including renal toxicity, gastrointestinal toxicity, peripheral neuropathy, asthenia, and ototoxicity hinder the use of higher doses to maximize the

antineoplastic effects of cisplatin. To prevent the side effects caused by platinum compounds, a potential approach consists of incorporating the platinum agent into liposomes and combining this with irradiation to obtain a synergistic effect. There is an important increase in cell uptake when drugs are loaded in liposomes [169] (Table 2). It has been proposed that the ability of liposomes to bypass the P-glycoprotein pumps responsible for multidrug resistance can promote a higher uptake of chemotherapeutic agents in resistant cancer cells. Furthermore, among platinum compounds and their liposomal form tested in this study, carboplatin and carboplatin-loaded liposomes yield the best radiosensitizing effects even at low concentrations, showing the best cellular incorporation, and have already been reported to be less neurotoxic than other platinum compounds [169]. Other study showed that cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles enhanced mean survival time and reduced side effects [170] (Table 2).

Delivery of intercalating agent: doxorubicin liposome

In the same way, encapsulation of doxorubicin in liposomal carriers has been shown to reduce toxicities and improve brain tumor exposure to this drug. In a xenograft model, non-pegylated liposomal doxorubicin is markedly less toxic than doxorubicin and appears to act as a radiosensitizer [171]. A clinical trial performed using pegylated liposomal doxorubicin (PEG-Dox) and prolonged TMZ in addition to radiotherapy in newly diagnosed GBM showed that the combination is tolerated and feasible; however, neither the addition of PEG-Dox nor the prolonged administration of TMZ led to a meaningful improvement of patient outcome as compared to previous results [172]. Doxorubicin and daunorubicin nanocarriers have been developed but have not been tested in association with radiotherapy [173–175] (Table 2).

Delivery of spindle poison: paclitaxel (Px) nanoparticles

The tubulin-targeting drug is a potent chemotherapeutic agent that is also known to be a cell cycle-specific radiosensitizer. Indeed, Px arrests cell cycle progression at the G2/M stage in which the cells are most susceptible to radiation-induced damage. Px is poorly soluble in aqueous solution and its action is concentration and time-dependent. It is also a substrate of the MDR-1 efflux pump which typically prevents its cytotoxicity. It was recently demonstrated that loading Px within the lipophilic core of newly developed lipid nanocapsules reverted the multidrug resistance phenomena in GBM cells [176] and strongly improved the activity and subcellular bioavailability of the drug [167,176]. Px-loaded LNC were therefore evaluated for their potential radiosensitizing impact when combined with external beam radiation *in vivo*. In an orthotopic GBM rat model, Vinchon-Petit and coworkers established that 0.375 mg/kg of bodyweight of Px was not sufficient to improve the effect of 18 Gy of X-ray irradiation in three fractions of 6 Gy [177]. In another study performed on hypoxic human tumor cells, encapsulation of Px and etanidazole in PLGA nanoparticles enhanced γ -ray radiation impact [178]. More recently, Gabikian and colleagues demonstrated the safety and efficacy of biodegradable Px

microspheres. These authors showed a significant benefit from the use of combined paclitaxel and X-ray radiotherapy. Moreover, they observed a clinically and statistically significant synergistic survival benefit due to paclitaxel pretreatment before X-ray irradiation in relation to the additive effect observed with the use of X-ray irradiation before paclitaxel [179]. Paclitaxel was also encapsulated in PEG-PLA nanoparticles and MPEG-PTMC nanoparticles [180,181] (Table 2).

Delivery of an anti-metabolic agent: 5-fluorouracil (5-FU) microspheres

Following the pioneering work on the Gliadel® implants, which have been granted marketing authorization in GBM [182,183], anti-metabolic agents including 5FU have also been used as radiosensitizers. A Phase I study demonstrated the feasibility of using 5-FU-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres either after implantation in the resection cavity [184] or on the tumor site in the cases of inoperable GBM [185]. In view of these results, a multi-center randomized Phase IIb (microspheres associated with radiotherapy versus radiotherapy alone) was conducted, showing low toxicity and a survival benefit that has to be further confirmed [186].

Delivery of siRNA/miRNA

Multiple biological pathways become activated in cancer (Box 1), and these make the cancer cells either inherently resistant to radiation therapy or able to acquire resistance upon exposure to radiation.

For example, survivin, which counteracts apoptosis and promotes cell proliferation, is associated with radioresistance and has been implicated in the repair of DNA ds breaks [187]. Various drugs and treatment strategies are being designed to target such specific pathways and render the cancer cells more susceptible to radiation

therapy. These developments involve macromolecular approaches, such as the use of siRNA, which suffer from multiple drug-delivery issues. Hence, a human serum albumin-based nanoparticulate carrier system loaded with a shRNA plasmid directed to survivin has been designed and tested for its efficacy in reversing survivin-mediated radioresistance. Nanoformulations (220 nm) were tested for their effects on inhibition of survivin expression and their overall effects on radiosensitization. The results showed a significant increase in radiation sensitivity on the U87MG cell line [187].

In parallel, inhibition of the EGFR with nanoparticles encapsulating antisense oligonucleotides for EGFR were shown to enhance radiosensitivity in squamous carcinoma cells [188], whereas silencing of miR-21 by locked nucleic acid complexed to lipid nanocapsules was able to sensitize human GBM cells to radiation-induced cell death [189].

Nanomedicines combined with targeting moiety and active recognition

The possibility to modify the surface of nanocarriers permits the improvement of pharmacokinetic parameters and bioavailability while also reducing their toxicity. In addition, nanomedicines offer the opportunity of developing several strategies for active recognition by combining them with targeting moieties such as peptides, antibodies, affins, or well-defined biological ligands. In antineoplastic strategies, two main targets can be considered: the stromal environment, including the tumor vasculature, and the cancer cell themselves, which can be very heterogeneous. In antivascular strategies, targeting of integrins, including $\alpha\beta3$ expressed on the endothelial cells of newly formed vessels, is of particular interest [190]. Because integrins are heterodimeric receptors with an α - and a β -subunit activated by the tripeptide sequence Arg-Gly-Asp (RGD), biomimetic nanocarriers combined to such an RGD

Box 1. Interaction and coordination of signaling pathways

Many clinical trials have been designed to investigate specific inhibitors of well-defined signaling pathways such as the tyrosine receptor kinases or their ligands (see Table 1 in main text). These strategies do not often consider additional effects triggered by the inhibition of a single effector. For example, mTORC1 inhibition by rapamycin paradoxically leads to Akt hyperphosphorylation [82]. So far, despite some promising preliminary clinical trial results, no treatment has demonstrated more efficacy than the conventional treatment: TMZ plus radiotherapy.

To improve these treatments it is important to understand the relationship between signaling pathways. For example, PI3K and MAPK pathways show important cooperation in GBM pathogenesis. Kras activation is insufficient for invasion in the absence of *Pten* deletion, suggesting that Ras-mediated invasion requires concurrent activation of PI3K signaling. By contrast, monoallelic *Pten* deletion is sufficient to induce maximal invasion only in the presence of activated Kras. Biallelic *Pten* deletion has been found to cause maximal invasion in both the presence and the absence of activated Kras [209]. Thus, it appears possible to inhibit Kras-mediated invasion by PI3K inhibition. Nevertheless, inhibition of mTORC1 by RAD001, a rapamycin analog, leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in some cancers, including breast, colon, and melanoma [210].

Furthermore, Gli proteins play an important role in pathway interactions related to GSCs. Gli proteins regulate Insulin receptor substrate 1 (IRS1) protein expression, and insulin-like growth factor

(IGF) induces MAPK activation and consequent RAF1, MEK, and ERK phosphorylation. Gli1 inhibition reduces IGF-1-induced GSC self-renewal, proliferation, and VEGF expression. Gli proteins may not directly transactivate the *VEGF* gene but may regulate its expression through the MAPK pathway via activation of the specific protein-1 (SP-1) transcription factor [37].

Interactions also exist between EGFR-inducible signaling pathways and Wnt/ β -catenin. Intratumoral administration of β -catenin siRNA in subcutaneous gliomas in nude mice transcriptionally downregulates EGFR, STAT3, Akt1, cyclin D1, MMP2, and MMP9. Reciprocally, transcriptional activity of β -catenin has been found to be significantly correlated to Akt1 expression in glioma cells [211].

Thus, detailed knowledge of signaling pathways and their regulation should enable a judicious association of inhibitors to obtain a synergistic effect. For example, co-inhibition of PI3K/Akt and Erk induces the transcription factor FOXO, leading to cell cycle arrest and apoptosis [212]. Inhibitors should also be used with prudence because they can both activate (PI3K and Akt inhibitors) or inhibit (Gli inhibitors) other pathways. Obstacles to targeted therapy are present both at the cellular and tissue levels as a result of heterogeneity within the tumor and within the patient population (e.g., *MGMT* methylation status). Thus, the integration of new technologies, including biobank, epigenetic, and 'omic' characterization, could permit the links between prognosis, diagnosis, and therapeutic treatments to be established, thereby allowing the most effective treatment to be tailored to the individual patient (personalized medicine).

sequence can be useful [191]. As such, polyethylene glycol-coated (PEGylated) RGD peptide-modified carbon nanotubes demonstrated efficient targeting of an integrin-positive tumor in mice, and a high intratumor accumulation was achieved with these nanocarriers [192]. In the same way, it was demonstrated that RGD-targeted nanoparticles can act on endothelial cells and produce an anti-angiogenesis effect [193]. Alternatively, other study demonstrated the feasibility of gold nanoparticle functionalization and resulting biological impact in terms of selective recognition [194,195]. Given the possibility of doping the GNP with radionuclides [196], or to use gold as a means to influence dose deposition [197,198], gold nanoparticle functionalization may represent an opportune tool for GBM targeting and therapy that remains to be evaluated. Other strategies for radiosensitization by use of nanomedicines can include vectorization of endostatin [199], curcumin [200–203], TMZ [204], and action on NF- κ B [205].

Concluding remarks

It is likely that no single drug will solve GBM by itself, and in consequence it appears that a combinatorial approach, even if restricted, will provide a more significant solution. With the failure of molecules with high affinity and high specificity, such as kinase inhibitors or antibodies, the development of multitargeted therapies or polytherapies that would cause several types of damage to radioresistant cancer cells, in parallel with the emergence of new nanomedicines, provide an opportunity not to be missed. The idea is that greater specificity can be achieved not by the interaction between two partners, but through a more subtle combinatorial between factors, multiple but limited in number, for which parallel methodologies and tools are available. To counteract the development of resistant populations it may be desirable not only to target well-defined subpopulations and pathways but also to maintain a degree of broad specificity to enhance the versatility of the therapeutic products/methods, notably in case of GBM where the margins are very large.

Because delivery remains the most significant barrier to the widespread use of radiosensitizing therapeutics in a clinical setting, the synthesis and adaptability of targeted therapeutic nanoparticles composed of polymers, lipids, or conjugates in the specific context of GBM represent major challenges to surmount in future clinical applications. Following in the wake of historical pharmaceutical nanoparticle drug carrier products that have already reached the market (Alveofact[®], DaunoXome[®], AmBisome[®], Doxil[®], Myocet[®], Abraxane[®]), new innovative nanomedicines may well revolutionize our approach to this GBM once their innocuity has been demonstrated by regulatory safety assessments. However, the radiosensitizing effect of an encapsulating drug must be demonstrated clinically and cannot be based solely on *in vitro* and preclinical studies. In addition, the choice and optimization of the nanocarrier system will be important in translating *in vitro* effects to clinical level.

The use of radiosensitizers raises the question of the optimal protocol to be used: should it be a single step or multistep, and how many times before radiotherapy? In lung cancer, Chen *et al.* showed that low-dose paclitaxel was sufficient for radiosensitization, and delayed irradiation

was better than immediate irradiation following drug treatment [206]. In colon cancer cell lines, Ojima and coworkers showed that the cytotoxicity of radiation followed by 5-FU was significantly greater than for 5-FU followed by irradiation [207]. Thus, the optimal clinical schedule should be defined for all radiosensitizers based on preclinical and Phase I clinical trials.

Bearing in mind that delivery of a radiosensitizer or other factor that may influence the efficacy of radiotherapy no longer depends on the intrinsic properties of the sensitizer but instead reflects those of the carrier, nanomedicine-based approaches hold great promise in the development of personalized medicine. Indeed, to date personalized medicine has predominantly relied on drugs targeted to overexpressed cell surface receptors. By contrast, with nanomedicines the drug itself does not need to recognize a receptor at the cell surface because the particle does this job until the drug does its own.

Acknowledgments

This work was supported by “La Ligue Nationale Contre le Cancer” throughout an “Equipe Labellisée 2012” grant, by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” (INSERM), by “La Région Pays-de-la-Loire” throughout the *Nuclear Technology for Health project (NucSan)*, and by the “Axe Vectorisation and Radiothérapies” and the “Réseau Gliome Grand Ouest” (ReGGO) of the “Cancéropôle Grand-Ouest”. Delphine Séhédic was a Ph.D. student from the *NucSan project* and received a fellowship from “La Région Pays-de-la-Loire”.

References

- Kleihues, P. *et al.* (1993) The new WHO classification of brain-tumors. *Brain Pathol.* 3, 255–268
- Stupp, R. *et al.* (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996
- Somosi, Z. (2000) Radiation response of cell organelles. *Micron* 31, 165–181
- Le Caër, S. (2011) Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H₂ production under ionizing radiation. *Water* 3, 235–253
- Goodhead, D.T. (1994) Initial events in the cellular effects of ionizing-radiations – clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 7–17
- Lim, Y.C. *et al.* (2012) A role for homologous recombination and abnormal cell-cycle progression in radioresistance of glioma-initiating cells. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1863–1872
- Bao, S.D. *et al.* (2006) Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760
- Bao, S. *et al.* (2008) Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res.* 68, 6043–6048
- Andrews, D.W. *et al.* (2006) A review of 3 current radiosurgery systems. *Surg. Neurol.* 66, 559–564
- Jerezek-Fossa, B.A. *et al.* (2006) Particle beam radiotherapy for head and neck tumors: Radiobiological basis and clinical experience. *Head Neck* 28, 750–760
- Vanpouille-Box, C. *et al.* (2011) Tumor eradication in rat glioma and bypass of immunosuppressive barriers using internal radiation with ¹⁸⁸Re-lipid nanocapsules. *Biomaterials* 32, 6781–6790
- Schwarz, S.B. *et al.* (2012) Iodine-125 brachytherapy for brain tumours – a review. *Radiat. Oncol.* 7, 30
- Etcheverry, A. *et al.* (2014) DGKI methylation status modulates the prognostic value of MGMT in glioblastoma patients treated with combined radio-chemotherapy with temozolomide. *PLoS ONE* 9, e104455
- Karayan-Tapon, L. *et al.* (2008) Predictive value of MGMT in glioblastoma: a multicenter study. *J. Clin. Oncol.* 26 (Suppl. 15S), 22065
- Eoli, M. *et al.* (2007) Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase and loss of heterozygosity on 19q and/or 17p are overlapping features of secondary glioblastomas with prolonged survival. *Clin. Cancer Res.* 13, 2606–2613

- 16 Hegi, M.E. *et al.* (2005) MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 997–1003
- 17 Weller, M. *et al.* (2010) MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat. Rev. Neurol.* 6, 39–51
- 18 Rivera, A.L. *et al.* (2010) MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol.* 12, 116–121
- 19 Chang, J. *et al.* (2011) Transferrin adsorption onto PLGA nanoparticles governs their interaction with biological systems from blood circulation to brain cancer cells. *Pharm. Res.* 29, 1495–1505
- 20 Singh, S.K. *et al.* (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63, 5821–5828
- 21 Singh, S.K. *et al.* (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401
- 22 Cheng, L. *et al.* (2010) Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem. Pharmacol.* 80, 654–665
- 23 Lee, J. *et al.* (2006) Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9, 391–403
- 24 Adams, J.M. and Strasser, A. (2008) Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res.* 68, 4018–4021
- 25 Wang, J. *et al.* (2009) Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 28, 17–28
- 26 Walters, M.J. *et al.* (2014) Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats. *Br. J. Cancer* 110, 1179–1188
- 27 Wei, Y. *et al.* (2013) Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 6829–6834
- 28 Bourseau-Guilmain, E. *et al.* (2011) The importance of the stem cell marker prominin-1/CD133 in the uptake of transferrin and in iron metabolism in human colon cancer Caco-2 cells. *PLoS ONE* 6, e25515
- 29 Lathia, J.D. *et al.* (2010) Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421–432
- 30 Lathia, J.D. *et al.* (2014) High-throughput flow cytometry screening reveals a role for junctional adhesion molecule a as a cancer stem cell maintenance factor. *Cell Rep.* 6, 117–129
- 31 Schulte, A. *et al.* (2011) A distinct subset of glioma cell lines with stem cell-like properties reflects the transcriptional phenotype of glioblastomas and overexpresses CXCR4 as therapeutic target. *Glia* 59, 590–602
- 32 Ogden, A.T. *et al.* (2008) Identification of A2B5⁺CD133⁻ tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* 62, 505–514
- 33 Tchoghandjian, A. *et al.* (2010) A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. *Brain Pathol.* 20, 211–221
- 34 Verhaak, R.G.W. *et al.* (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110
- 35 Morrison, R. *et al.* (2011) Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J. Oncol.* 2011, 941876
- 36 Yan, K. *et al.* (2013) The evolving landscape of glioblastoma stem cells. *Curr. Opin. Neurol.* 26, 701–707
- 37 Santoni, M. *et al.* (2013) Essential role of Gli proteins in glioblastoma multiforme. *Curr. Protein Pept. Sci.* 14, 133–140
- 38 Duda, D.G. *et al.* (2011) CXCL12 (SDF1 alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies? *Clin. Cancer Res.* 17, 2074–2080
- 39 Reardon, D.A. *et al.* (2008) Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* 26, 5610–5617
- 40 Gutin, P.H. *et al.* (2009) Safety and efficacy of bevacizumab with hypofractionated stereotactic irradiation recurrent malignant gliomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75, 156–163
- 41 Bobo, R.H. *et al.* (1994) Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2076–2080
- 42 Petit, S. *et al.* (2008) Local chemotherapy of malignant glioma: from syringe injections to nanotechnology. *Revue Neurol. (Paris)* 164, 547–553
- 43 Jain, A. *et al.* (2014) Guiding intracortical brain tumour cells to an extracortical cytotoxic hydrogel using aligned polymeric nanofibres. *Nat. Mater.* 13, 309–316
- 44 Zalutsky, M.R. *et al.* (2008) Clinical experience with alpha-particle-emitting At-211: Treatment of recurrent brain tumor patients with At-211-labeled chimeric antitenascin monoclonal antibody 81C6. *J. Nucl. Med.* 49, 30–38
- 45 Nel, A.E. *et al.* (2009) Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8, 543–557
- 46 Peer, D. *et al.* (2007) Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2, 751–760
- 47 Thompson, M.C. *et al.* (2006) Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J. Clin. Oncol.* 24, 1924–1931
- 48 Chiba, T. *et al.* (2007) Enhanced self-renewal capability in hepatic stem/progenitor cells drives cancer initiation. *Gastroenterology* 133, 937–950
- 49 Kim, Y. *et al.* (2012) Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Lab. Invest.* 92, 466–473
- 50 Ashizawa, T. *et al.* (2013) Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *Int. J. Oncol.* 43, 219–227
- 51 Thornton, T.M. *et al.* (2008) Phosphorylation by p38 MAPK as an alternative pathway for GSK3 beta inactivation. *Science* 320, 667–670
- 52 Strovel, E.T. *et al.* (2000) Protein phosphatase 2C alpha dephosphorylates axin and activates LEF-1-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 2399–2403
- 53 Luo, W. *et al.* (2007) Protein phosphatase 1 regulates assembly and function of the beta-catenin degradation complex. *EMBO J.* 26, 1511–1521
- 54 Smith, S. *et al.* (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484–1487
- 55 Hsiao, S.J. and Smith, S. (2008) Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond. *Biochimie* 90, 83–92
- 56 Chen, B.Z. *et al.* (2009) Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* 5, 100–107
- 57 Waaler, J. *et al.* (2011) Novel synthetic antagonists of canonical wnt signaling inhibit colorectal cancer cell growth. *Cancer Res.* 71, 197–205
- 58 Waaler, J. *et al.* (2012) A novel tankyrase inhibitor decreases canonical wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res.* 72, 2822–2832
- 59 Huang, S.M.A. *et al.* (2009) Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* 461, 614–620
- 60 Karlberg, T. *et al.* (2010) Structural basis for the interaction between tankyrase-2 and a potent Wnt-signaling inhibitor. *J. Med. Chem.* 53, 5352–5355
- 61 Wahlberg, E. *et al.* (2012) Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors. *Nat. Biotechnol.* 30, 283–288
- 62 Chen, M.Y. *et al.* (2009) The anti-helminthic niclosamide inhibits Wnt/ Frizzled1 signaling. *Biochemistry* 48, 10267–10274
- 63 Lu, W.Y. *et al.* (2011) Niclosamide suppresses cancer cell growth by inducing Wnt co-receptor LRP6 degradation and inhibiting the Wnt/beta-catenin pathway. *PLoS ONE* 6, e29290
- 64 Pan, J.X. *et al.* (2012) Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells. *Chin. J. Cancer* 31, 178–184
- 65 Osada, T. *et al.* (2011) Antihelminth compound niclosamide downregulates Wnt signaling and elicits antitumor responses in tumors with activating APC Mutations. *Cancer Res.* 71, 4172–4182
- 66 Li, Y.H. *et al.* (2010) Dkk1 stabilizes Wnt co-receptor LRP6: implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *PLoS ONE* 5, e11014
- 67 Zhou, L. *et al.* (2003) Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec down-regulates the beta-catenin signaling activity. *Cancer Lett.* 193, 161–170
- 68 Heimberger, A.B. *et al.* (2005) Mechanisms of action of rapamycin in gliomas. *Neuro Oncol.* 7, 1–11
- 69 Castellino, R.C. and Durden, D.L. (2007) Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PEN signaling node – an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3, 682–693

- 70 Jiang, B.H. and Liu, L.Z. (2009) PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 102) Woude, G.F.V. and Klein, G., eds In pp. 19–65, Academic Press
- 71 Knobbe, C.B. *et al.* (2005) Genetic alteration and expression of the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway genes PIK3CA and PIKE in human glioblastomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 31, 486–490
- 72 Sonoda, Y. *et al.* (2001) Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res.* 61, 6674–6678
- 73 Chautard, E. *et al.* (2014) Role of Akt in human malignant glioma: from oncogenesis to tumor aggressiveness. *J. Neurooncol.* 117, 205–215
- 74 Anandharaj, A. *et al.* (2011) Rapamycin-mediated mTOR inhibition attenuates survivin and sensitizes glioblastoma cells to radiation therapy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 43, 292–300
- 75 Shinohara, E.T. *et al.* (2005) Enhanced radiation damage of tumor vasculature by mTOR inhibitors. *Oncogene* 24, 5414–5422
- 76 Eshleman, J.S. *et al.* (2002) Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 Xenografts to fractionated radiation therapy. *Cancer Res.* 62, 7291–7297
- 77 Hardwick, J.S. *et al.* (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14866–14870
- 78 Guba, M. *et al.* (2002) Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med.* 8, 128–135
- 79 Chinot, O.L. *et al.* (2014) Bevacizumab plus radiotherapy–temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722
- 80 Hambardzumyan, D. *et al.* (2008) PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* 22, 436–448
- 81 O'Reilly, K.E. *et al.* (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* 66, 1500–1508
- 82 Sarbassov, D.D. *et al.* (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor–mTOR complex. *Science* 307, 1098–1101
- 83 Tremblay, F. *et al.* (2007) Identification of IRS-1 Ser-1101 as a target of S6K1 in nutrient- and obesity-induced insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 14056–14061
- 84 Osuka, S. *et al.* (2013) IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 31, 627–640
- 85 Brown, P.D. *et al.* (2008) Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177. *J. Clin. Oncol.* 26, 5603–5609
- 86 Prados, M.D. *et al.* (2009) Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 579–584
- 87 Peereboom, D.M. *et al.* (2010) Phase II trial of erlotinib with temozolomide and radiation in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J. Neuro Oncol.* 98, 93–99
- 88 Combs, S.E. *et al.* (2009) Influence of EGFR-amplification, EGFR, EGFRvIII- and PTEN-expression as well as MGMT-promoter methylation status on outcome in patients with primary glioblastoma treated with radiation, temozolomide and EGFR-inhibition with Cetuximab: interim analysis from the GERT-protocol. *Strahlenther. Und Onkol.* 185, 16
- 89 Hainsworth, J. *et al.* (2012) Phase II study of concurrent radiation therapy, temozolomide, and bevacizumab followed by bevacizumab/everolimus as first-line treatment for patients with glioblastoma. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 10, 240–246
- 90 Reardon, D.A. *et al.* (2010) Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma. *J. Neuro Oncol.* 96, 219–230
- 91 Kreisl, T.N. *et al.* (2009) A pilot study of everolimus and gefitinib in the treatment of recurrent glioblastoma (GBM). *J. Neuro Oncol.* 92, 99–105
- 92 Hayakawa, M. *et al.* (2007) Synthesis and biological evaluation of pyrido 3',2': 4,5 furo 3,2-d pyrimidine derivatives as novel PI3 kinase p110 alpha inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 2438–2442
- 93 Maira, S-M. *et al.* (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1851–1863
- 94 Fan, Q.W. *et al.* (2010) Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma. *Sci. Signal.* 3, ra81
- 95 Mukherjee, B. *et al.* (2012) The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 is a potent inhibitor of ATM- and DNA-PKCs-mediated DNA damage responses. *Neoplasia* 14, 34–43
- 96 Cerniglia, G.J. *et al.* (2012) Inhibition of autophagy as a strategy to augment radiosensitization by the dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235. *Mol. Pharmacol.* 82, 1230–1240
- 97 Becher, O.J. *et al.* (2010) Preclinical evaluation of radiation and perifosine in a genetically and histologically accurate model of brainstem glioma. *Cancer Res.* 70, 2548–2557
- 98 Chautard, E. *et al.* (2010) Akt signaling pathway: a target for radiosensitizing human malignant glioma. *Neuro Oncol.* 12, 434–443
- 99 Puro, B.W. *et al.* (2005) Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.* 65, 2353–2363
- 100 Fan, X. *et al.* (2006) Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors. *Cancer Res.* 66, 7445–7452
- 101 Wang, J.L. *et al.* (2010) Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 28, 17–28
- 102 Lin, J. *et al.* (2010) Gamma-secretase inhibitor-I enhances radiosensitivity of glioblastoma cell lines by depleting CD133⁺ tumor cells. *Arch. Med. Res.* 41, 519–529
- 103 Perumalsamy, L.R. *et al.* (2009) A hierarchical cascade activated by non-canonical Notch signaling and the mTOR–Rictor complex regulates neglect-induced death in mammalian cells. *Cell Death Differ.* 16, 879–889
- 104 Wu, J. *et al.* (2013) Arsenic trioxide depletes cancer stem-like cells and inhibits repopulation of neurosphere derived from glioblastoma by downregulation of Notch pathway. *Toxicol. Lett.* 220, 61–69
- 105 Clement, V. *et al.* (2007) HEDGEHOG–GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr. Biol.* 17, 165–172
- 106 Takezaki, T. *et al.* (2011) Essential role of the Hedgehog signaling pathway in human glioma-initiating cells. *Cancer Sci.* 102, 1306–1312
- 107 Bar, E.E. *et al.* (2007) Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells* 25, 2524–2533
- 108 Hau, P. *et al.* (2011) TGF-beta 2 signaling in high-grade gliomas. *Curr. Pharmaceutical Biotechnol.* 12, 2150–2157
- 109 Satoh, E. *et al.* (1997) Effect of irradiation on transforming growth factor-beta secretion by malignant glioma cells. *J. Neuro Oncol.* 33, 195–200
- 110 Wang, J.R. *et al.* (1998) Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy. *Am. J. Pathol.* 153, 1531–1540
- 111 Barcellos-Hoff, M.H. *et al.* (2009) Therapeutic targets in malignant glioblastoma microenvironment. *Semin. Radiat. Oncol.* 19, 163–170
- 112 Jobling, M.E. *et al.* (2006) Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species. *Radiat. Res.* 166, 839–848
- 113 Shao, C. *et al.* (2008) Role of TGF-beta 1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells. *Oncogene* 27, 434–440
- 114 Zhang, M. *et al.* (2011) Blockade of TGF-beta signaling by the TGF beta R-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res.* 71, 7155–7167
- 115 Zhang, M.X. *et al.* (2011) Trimodal glioblastoma treatment consisting of concurrent radiotherapy, temozolomide, and the novel TGF-beta receptor I kinase Inhibitor LY2109761. *Neoplasia* 13, 537–549
- 116 Hardee, M.E. *et al.* (2012) Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor-beta. *Cancer Res.* 72, 4119–4129
- 117 Hau, P. *et al.* (2007) Inhibition of TGF-beta 2 with AP 12009 in oligorecurrent malignant gliomas: from preclinical to phase I/II studies. *Oligonucleotides* 17, 201–212

Feature Review

- 118 Bogdahn, U. *et al.* (2011) Targeted therapy for high-grade glioma with the TGF-beta 2 inhibitor trabedersen: results of a randomized and controlled phase IIb study. *Neuro Oncol.* 13, 132–142
- 119 de la Iglesia, N. *et al.* (2009) STAT3 regulation of glioblastoma pathogenesis. *Curr. Mol. Med.* 9, 580–590
- 120 Chang, C.J. *et al.* (2012) Inhibition of phosphorylated STAT3 by cucurbitacin I enhances chemoradiosensitivity in medulloblastoma-derived cancer stem cells. *Childs Nerv. Syst.* 28, 363–373
- 121 Yang, Y.P. *et al.* (2012) Resveratrol suppresses tumorigenicity and enhances radiosensitivity in primary glioblastoma tumor initiating cells by inhibiting the STAT3 axis. *J. Cell. Physiol.* 227, 976–993
- 122 Cohen-Jonathan Moyal, E. (2012) From bench to bedside: experience of the glioblastoma model for the optimization of radiosensitization. *Cancer Radiother.* 16, 25–28
- 123 Cohen-Jonathan, E. *et al.* (1997) Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and a hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa cells. *Cancer Res.* 57, 1364–1370
- 124 Ader, I. *et al.* (2002) The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit. *Oncogene* 21, 6471–6479
- 125 Ader, I. *et al.* (2002) RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* 21, 5998–6006
- 126 Dittmann, K. *et al.* (2005) Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 31182–31189
- 127 Skuli, N. *et al.* (2006) Activation of RhoB by hypoxia controls hypoxia-inducible factor-1 alpha stabilization through glycogen synthase kinase-3 in U87 glioblastoma cells. *Cancer Res.* 66, 482–489
- 128 Milia, J. *et al.* (2005) Farnesylated RhoB inhibits radiation-induced mitotic cell death and controls radiation-induced centrosome overduplication. *Cell Death Differ.* 12, 492–501
- 129 Delmas, C. *et al.* (2002) Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int. J. Cancer* 100, 43–48
- 130 Delmas, C. *et al.* (2003) The farnesyltransferase inhibitor R115777 reduces hypoxia and matrix metalloproteinase 2 expression in human glioma xenograft. *Clin. Cancer Res.* 9, 6062–6068
- 131 Ader, I. *et al.* (2003) Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* 22, 8861–8869
- 132 Haimovitzfriedman, A. *et al.* (1994) Protein-kinase-C mediates basic fibroblast growth-factor protection of endothelial-cells against radiation-induced apoptosis. *Cancer Res.* 54, 2591–2597
- 133 Wild-Bode, C. *et al.* (2001) Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: Implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Res.* 61, 2744–2750
- 134 Monferran, S. *et al.* (2008) Alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins control glioma cell response to ionising radiation through ILK and RhoB. *Int. J. Cancer* 123, 357–364
- 135 Moyal, E.C.J. *et al.* (2007) Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 68, 1396–1401
- 136 Ducassou, A. *et al.* (2013) Alpha v beta 3 Integrin and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): prognostic factors in a phase I-II clinical trial associating continuous administration of tipifarnib with radiotherapy for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Eur. J. Cancer* 49, 2161–2169
- 137 Stupp, R. *et al.* (2010) Phase IIIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* 28, 2712–2718
- 138 Ader, I. *et al.* (2014) Preclinical evidence that SSR 128129E – a novel small-molecule multi-fibroblast growth factor receptor blocker – radiosensitises human glioblastoma. *Eur. J. Cancer* 50, 2351–2359
- 139 Harris, A.L. (2002) Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47
- 140 Keith, B. and Simon, M.C. (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129, 465–472
- 141 Li, Z. *et al.* (2009) Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15, 501–513
- 142 Williams, K.J. *et al.* (2005) Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiother. Oncol.* 75, 89–98
- 143 Bernardi, R. *et al.* (2006) PML inhibits HIF-1 alpha translation and neoangiogenesis through repression of mTOR. *Nature* 442, 779–785
- 144 Papahadjopoulos, D. *et al.* (1991) Sterically stabilized liposomes – improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 11460–11464
- 145 Lasic, D.D. (1996) Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature* 380, 561–562
- 146 Bertrand, N. *et al.* (2014) Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66, 2–25
- 147 Jain, R.K. and Stylianopoulos, T. (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 653–664
- 148 Mello, R.S. *et al.* (1983) Radiation-dose enhancement in tumors with iodine. *Med. Phys.* 10, 75–78
- 149 Norman, A. *et al.* (1997) X-ray phototherapy for canine brain masses. *Radiat. Oncol. Investig.* 5, 8–14
- 150 Rose, J.H. *et al.* (1999) First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 45, 1127–1132
- 151 Rousseau, J. *et al.* (2009) Intracerebral delivery of 5-iodo-2'-deoxyuridine in combination with synchrotron stereotactic radiation for the therapy of the F98 glioma. *J. Synchrotron Radiat.* 16, 573–581
- 152 Reza, M.S. and Whateley, T.L. (1998) Iodo-2'-deoxyuridine (IUdR) and ¹²⁵IUdR loaded biodegradable microspheres for controlled delivery to the brain. *J. Microencapsul.* 15, 789–801
- 153 Kwatra, D. *et al.* (2013) Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer. *Transl. Cancer Res.* 2, 330–342
- 154 Zheng, Y. *et al.* (2008) Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons. *Radiat. Res.* 169, 19–27
- 155 Joh, D.Y. *et al.* (2013) Selective targeting of brain tumors with gold nanoparticle-induced radiosensitization. *PLoS ONE* 8, e62425
- 156 Bobyk, L. *et al.* (2013) Photoactivation of gold nanoparticles for glioma treatment. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 9, 1089–1097
- 157 Mowat, P. *et al.* (2011) In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 7833–7839
- 158 Gratton, S.E.A. *et al.* (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 11613–11618
- 159 Papa, A.L. *et al.* (2009) Effect of reaction parameters on composition and morphology of titanate nanomaterials. *J. Phys. Chem. C* 113, 12682–12689
- 160 Mirjolet, C. *et al.* (2013) The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: a proof-of-concept. *Radiother. Oncol.* 108, 136–142
- 161 Park, E.J. *et al.* (2008) Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.* 180, 222–229
- 162 Saquib, Q. *et al.* (2012) Titanium dioxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in human amnion epithelial (WISH) cells. *Toxicol. Vitro* 26, 351–361
- 163 Ramkumar, K.M. *et al.* (2012) Oxidative stress-mediated cytotoxicity and apoptosis induction by TiO₂ nanofibers in HeLa cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 81, 324–333
- 164 Krueger, S.A. *et al.* (2010) The effects of G2-phase enrichment and checkpoint abrogation on low-dose hyper-radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 77, 1509–1517
- 165 Xu, R. *et al.* (2009) Ag nanoparticles sensitize IR-induced killing of cancer cells. *Cell Res.* 19, 1031–1034
- 166 Marill, J. *et al.* (2014) Hafnium oxide nanoparticles: toward an in vitro predictive biological effect? *Radiat. Oncol. Investig.* 9, 150
- 167 Paillard, A. *et al.* (2010) The importance of endo-lysosomal escape with lipid nanocapsules for drug subcellular bioavailability. *Biomaterials* 31, 7542–7554
- 168 Glass, J. *et al.* (1997) Fractionated stereotactic radiotherapy with cis-platinum radiosensitization in the treatment of recurrent, progressive, or persistent malignant astrocytoma. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* 20, 226–229

- 169 Charest, G. *et al.* (2010) Concomitant treatment of F98 glioma cells with new liposomal platinum compounds and ionizing radiation. *J. Neuro Oncol.* 97, 187–193
- 170 Shahmabadi, H.E. *et al.* (2014) Efficacy of cisplatin-loaded polybutyl cyanoacrylate nanoparticles on the glioblastoma. *Tumor Biol.* 35, 4799–4806
- 171 Chastagner, P.B. *et al.* (2005) Comparison of doxorubicin and its non-pegylated liposomal form as radiosensitizer in high grade glioma xenografts. *J. Clin. Oncol.* 23 (Suppl. 16S), 1524
- 172 Beier, C.P. *et al.* (2009) RNOP-09: pegylated liposomal doxorubicin and prolonged temozolomide in addition to radiotherapy in newly diagnosed glioblastoma – a phase II study. *BMC Cancer* 9, 308
- 173 Hu, Y.P. *et al.* (1996) On the mechanism of action of doxorubicin encapsulation in nanospheres for the reversal of multidrug resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 37, 556–560
- 174 Tahara, K. *et al.* (2011) Intracellular drug delivery using polysorbate 80-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres to glioblastoma cells. *J. Microencapsul.* 28, 29–36
- 175 Zucchetti, M. *et al.* (1999) Distribution of daunorubicin and daunorubicinol in human glioma tumors after administration of liposomal daunorubicin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44, 173–176
- 176 Garcion, E. *et al.* (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1710–1722
- 177 Vinchon-Petit, S. *et al.* (2010) In vivo evaluation of intracellular drug-nanocarriers infused into intracranial tumours by convection-enhanced delivery: distribution and radiosensitisation efficacy. *J. Neuro Oncol.* 97, 195–205
- 178 Jin, C. *et al.* (2007) Radiosensitization of paclitaxel, etanidazole and paclitaxel plus etanidazole nanoparticles on hypoxic human tumor cells in vitro. *Biomaterials* 28, 3724–3730
- 179 Gabikian, P. *et al.* (2014) Radiosensitization of malignant gliomas following intracranial delivery of paclitaxel biodegradable polymer microspheres. *J. Neurosurg.* 120, 1078–1085
- 180 Gu, G.Z. *et al.* (2013) The influence of the penetrating peptide iRGD on the effect of paclitaxel-loaded MT1-AF7p-conjugated nanoparticles on glioma cells. *Biomaterials* 34, 5138–5148
- 181 Jiang, X.Y. *et al.* (2011) PEGylated poly(trimethylene carbonate) nanoparticles loaded with paclitaxel for the treatment of advanced glioma: in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 420, 385–394
- 182 Brem, H. *et al.* (1995) Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. *Lancet* 345, 1008–1012
- 183 Westphal, M. *et al.* (2003) A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 5, 79–88
- 184 Menei, P. *et al.* (1999) Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of glioblastoma – a pilot study. *Cancer* 86, 325–330
- 185 Menei, P. *et al.* (2004) Stereotaxic implantation of 5-fluorouracil-releasing microspheres in malignant glioma – a phase I study. *Cancer* 100, 405–410
- 186 Menei, P. *et al.* (2005) Local and sustained delivery of 5-fluorouracil from biodegradable microspheres for the radiosensitization of malignant glioma: a randomized phase II trial. *Neurosurgery* 56, 242–247
- 187 Gaca, S. *et al.* (2013) Targeting by cmHsp70.1-antibody coated and survivin miRNA plasmid loaded nanoparticles to radiosensitize glioblastoma cells. *J. Control. Release* 172, 201–206
- 188 Ping, Y. *et al.* (2010) Inhibition of the EGFR with nanoparticles encapsulating antisense oligonucleotides of the EGFR enhances radiosensitivity in SCCVII cells. *Med. Oncol.* 27, 715–721
- 189 Griveau, A. *et al.* (2013) Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *Int. J. Pharm.* 454, 765–774
- 190 Ruoslahti, E. (2002) Specialization of tumour vasculature. *Nat. Rev. Cancer* 2, 83–90
- 191 Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D. (1986) Arg-Gly-Asp – a versatile cell recognition signal. *Cell* 44, 517–518
- 192 Liu, Z. *et al.* (2007) In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat. Nanotechnol.* 2, 47–52
- 193 Zhang, C.F. *et al.* (2007) Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* 67, 1555–1562
- 194 Qian, X.M. *et al.* (2008) In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nat. Biotechnol.* 26, 83–90
- 195 Yang, S. *et al.* (2013) Biomimetic, synthetic HDL nanostructures for lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 2511–2516
- 196 Marega, R. *et al.* (2012) Antibody-functionalized polymer-coated gold nanoparticles targeting cancer cells: an in vitro and in vivo study. *J. Mater. Chem.* 22, 21305–21312
- 197 Karmani, L. *et al.* (2014) Zr-89-labeled anti-endoglin antibody-targeted gold nanoparticles for imaging cancer: implications for future cancer therapy. *Nanomedicine* 9, 1923–1937
- 198 Karmani, L. *et al.* (2013) Antibody-functionalized nanoparticles for imaging cancer: influence of conjugation to gold nanoparticles on the biodistribution of ⁸⁹Zr-labeled cetuximab in mice. *Contrast Media Mol. Imaging* 8, 402–408
- 199 Read, T.A. *et al.* (2001) Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 29–34
- 200 Kumar, A. *et al.* (2014) Curcumin-loaded lipid nanocarrier for improving bioavailability, stability and cytotoxicity against malignant glioma cells. *Drug Deliv.* Published online May 14, 2014. <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2014.909906>
- 201 Mirgani, M.T. *et al.* (2014) Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. *Int. J. Nanomed.* 9, 403–417
- 202 Dilnawaz, F. and Sahoo, S.K. (2013) Enhanced accumulation of curcumin and temozolomide loaded magnetic nanoparticles executes profound cytotoxic effect in glioblastoma spheroid model. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 452–462
- 203 Lim, K.J. *et al.* (2011) A polymeric nanoparticle formulation of curcumin inhibits growth, clonogenicity and stem-like fraction in malignant brain tumors. *Cancer Biol. Ther.* 11, 464–473
- 204 Appel, E.A. *et al.* (2012) Enhanced stability and activity of temozolomide in primary glioblastoma multiforme cells with cucurbit[n]uril. *Chem. Commun. (Camb.)* 48, 9843–9845
- 205 Gill, J.S. *et al.* (2002) Effects of NF kappa B decoy oligonucleotides released from biodegradable polymer microparticles on a glioblastoma cell line. *Biomaterials* 23, 2773–2781
- 206 Chen, Y. *et al.* (2001) Schedule-dependent pulsed paclitaxel radiosensitization for thoracic malignancy. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* 24, 432–437
- 207 Ojima, E. *et al.* (2006) The optimal schedule for 5-fluorouracil radiosensitization in colon cancer cell lines. *Oncol. Rep.* 16, 1085–1091
- 208 Sofou, S. (2008) Radionuclide carriers for targeting of cancer. *Int. J. Nanomed.* 3, 181–199
- 209 Vitucci, M. *et al.* (2013) Cooperativity between MAPK and PI3K signaling activation is required for glioblastoma pathogenesis. *Neuro Oncol.* 15, 1317–1329
- 210 Carracedo, A. *et al.* (2008) Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J. Clin. Invest.* 118, 3065–3074
- 211 Paul, I. *et al.* (2013) Current understanding on EGFR and Wnt/ β -catenin signaling in glioma and their possible crosstalk. *Genes Cancer* 4, 427–446
- 212 Roy, S.K. *et al.* (2010) Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *J. Mol. Signal.* 5, 10

Thèse de Doctorat

Annabelle CIKANKOWITZ

Evaluation de la radiothérapie vectorisée à l'aide de nanocapsules lipidiques chargées en rhénium-188 pour le traitement du glioblastome : investigation des modalités d'administrations locales.

Evaluation of nanovectorized radiotherapy using ^{188}Re -lipid nanocapsules for glioblastoma treatment: investigation on local deliveries' modalities.

Résumé

Les glioblastomes sont des tumeurs gliales de haut grade qui restent incurables de nos jours. Le traitement recommandé (résection chirurgicale suivie d'un traitement de radiothérapie externe associé à la chimiothérapie) conduit à une augmentation de la médiane de survie des patients de quelques mois. De nouvelles stratégies notamment dans le champ des nanomédecines véhiculant un radioélément (émetteur β ou α) ont été évaluées en clinique. La première partie, après avoir dressé l'état des lieux des technologies utilisées dans ce domaine, rend compte des critères importants à prendre en compte que sont le choix du radioélément, les modalités d'administration et les vecteurs utilisés. Elle se conclut par une présentation des études précliniques en cours dont l'utilisation de nanovecteurs encapsulant un radioisotope : les LNC ^{188}Re -SSS. La deuxième partie illustre l'application thérapeutique sur un modèle murin de xénogreffe et montre une éradication de la tumeur initiale suite à un protocole personnalisé d'injection fractionnée par convection-enhanced delivery. Elle décrit également la distribution des LNC ainsi que les effets directs des radiations sur les cellules tumorales (cellules géantes atypiques, supposées polyploïdes), accompagnés par un infiltrat inflammatoire (immunité innée). Une évaluation complémentaire sur modèle murin GL261 a été réalisée et constitue la troisième partie de cette thèse. Le transfert de ces résultats à l'application clinique pourrait être facilité par le recours à un modèle canin de gliome spontané homologue à celui de l'homme, dont ce travail prépare l'utilisation, dans le but de valider les procédures d'injection intracérébrales automatisées.

Mots clés

glioblastomes, radiothérapie nanovectorisée, rhénium-188, LNC ^{188}Re -SSS, modèles pré-cliniques, xénogreffe Lab1, GL261, CED.

Abstract

High grade glial brain tumors are defined as glioblastomas. Nowadays, they are incurable. The current therapeutic proposal (surgical resection, external radiotherapy and chemotherapy) doesn't extend the patients median survival time up to a few months. New strategies as nanomedicines loaded with a radionuclide (β or α emitter) have been evaluated in clinical trials. A state of the art of this domain's technologies is described in a first part which analyses the important criteria to take account in vectorized radiotherapy like the radionuclides, the route of administration and the vectors used. Then, it is concluded with a presentation of preclinical ongoing studies as the use of nanovectors loaded with a radioisotope : the LNC ^{188}Re -SSS. The second part illustrates the therapeutical strategy application on a xenograft mice model. The data show an eradication of the tumor mass of treated mice with the personalized convection-enhanced delivery of fractionated radiotherapy. Furthermore, it describes the LNC distribution and the direct radiation effects on tumor cells (atypical giant cells, polyploidy) supported by an inflammatory infiltration (innate immune effectors). An evaluation on the GL261 mice model has been realized and concerns the third part of this thesis. In perspectives, the transfer of these data to clinical trials could be facilitated thanks to the dog spontaneous glioma model. This tumor share characteristics with the human neoplasma. Finally, this work will aim to validate the automated intracranial injection procedures.

Key Words

glioblastomas, nanovectorized radiotherapy, rhenium-188, LNC ^{188}Re -SSS, pre-clinical models, Lab1 xenograft, GL261, CED.