



HAL
open science

Potentialisation des chimiothérapies dans le traitement du glioblastome : étude des transporteurs ABC et ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

Antonin Dréan Drean

► **To cite this version:**

Antonin Dréan Drean. Potentialisation des chimiothérapies dans le traitement du glioblastome : étude des transporteurs ABC et ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons. Biotechnologies. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS110 . tel-02145219

HAL Id: tel-02145219

<https://theses.hal.science/tel-02145219>

Submitted on 2 Jun 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.

Potentialisation des chimiothérapies dans le traitement du glioblastome : étude des transporteurs ABC et ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582 Cancérologie, biologie, médecine, santé
(CBMS)

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 29/05/18, par

Antonin Dréan

Composition du Jury :

Pr Stéphanie Puget PU-PH, CHU de Paris (UFR de médecine de l'université Paris-V - René Descartes) neurochirurgie, groupe hospitalier Necker-Enfants malades	Présidente du jury
Pr Xavier Declèves PU-PH - UMR_S1144-INSERM - Université Paris Descartes Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Rapporteur
Dr Hélène Castel DR2 - Inserm, U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation. Université de Rouen Faculté des Sciences Université de Rouen	Rapporteur
Dr Jacques Grill PH - Institut Gustave Roussy. Université Paris-sud Gustave Roussy	Examineur
Dr Ahmed Idbaih MCU-PH, Sorbonne Université. Hôpital Pitié-Salpêtrière Pitié-Salpêtrière - Hôpital Pitié-Salpêtrière	Directeur de thèse
Pr Jean-Yves Delattre PU-PH - Sorbonne Université. Hôpital Pitié-Salpêtrière Pitié-Salpêtrière - Hôpital Pitié-Salpêtrière	Invité
Pr Alexandre Carpentier PU-PH - Sorbonne Université. Hôpital Pitié-Salpêtrière Pitié-Salpêtrière - Hôpital Pitié-Salpêtrière	Invité

**Potentialisation des chimiothérapies dans le traitement du
glioblastome : étude des transporteurs ABC et ouverture de la
barrière hémato-encéphalique par ultrasons**

"Savoir écouter, c'est posséder, outre le sien, le savoir des autres"

Léonard De Vinci

Remerciements

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury de ma soutenance de thèse, qui ont accepté la lourde tâche d'évaluer mon travail.

Parce qu'un chercheur n'est rien sans une équipe, ce projet n'a été possible que grâce à l'implication de nombreuses personnes.

Je remercie tout d'abord le personnel des plateformes de l'ICM et du centre d'expérimentation fonctionnelle, qui ont toujours été de bon conseil, et m'ont aidé dans la réalisation de ce projet.

Je tiens également à remercier mes deux équipes de collègues, de CarThera et de l'équipe de neuro-oncologie expérimentale, qui m'ont conseillé et épaulé avec bienveillance et pédagogie tout au long de cette thèse.

J'ai énormément appris auprès de CarThera, autant sur les points de vue biophysiques que réglementaires. Cette expérience m'a appris les rouages complexes de l'exploitation d'une idée de sa conception à sa commercialisation.

Les personnes de l'équipe de neuro-oncologie expérimentale ont été à mes côtés au quotidien pour la réalisation de ce projet. Ils ont toujours été là autant dans les bons moments pour fêter les résultats positifs, que dans les mauvais moments quand rien ne fonctionnait. Ils m'ont permis d'aboutir aux résultats présentés dans ce manuscrit, autant par leurs conseils que par leur contribution aux expériences de ce projet.

Parce qu'un projet se concrétise mieux dans des bonnes conditions, les collègues ont une importance plus large que celle du travail. Je les remercie pour leur bonne humeur, les

moments de divertissements, et les amitiés qui se sont créées lors de nos "Intermèdes" conviviaux.

De façon similaire, je remercie mes amis avec qui j'ai pu décompresser quand il le fallait, et qui m'ont souvent conseillé sur les aspects moins scientifiques de ce travail.

Il est important de noter que je n'aurais pas pu m'impliquer dans ce travail sans l'aide de mes proches. Mes parents et ma sœur m'ont toujours poussé à oser faire ce que je voulais, et m'ont toujours encouragé à rester curieux et intéressé par ce qui m'entoure. Ils m'ont encouragé à aller étudier à Toulouse quand ce choix m'apparaissait pertinent, quitte à se sacrifier pour que j'assouvisse mes ambitions.

Enfin, je remercie Nicolas de m'avoir supporté lors des moments de stress, et pour m'avoir permis de les passer plus sereinement en s'occupant de tous les tracas du quotidien dans ces moments.

Tout comme pour une publication, ce travail est le fruit de l'implication de nombreux auteurs. Ce manuscrit présente mon projet, mais c'est aussi leur projet. Merci à eux pour leur contribution.

Index des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
AQP4	Aquaporine 4
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BHT	Barrière Hémato-Tumorale
GBM	Glioblastome
HBVP	Human Brain Vascular Pericytes : Péricytes vasculaires cérébraux humains
hCMEC/D3	human Cerebral Microvascular Endothelial Cell /D3 : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines /D3
HIFU	Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (High Intensity Focused Ultrasound)
<i>i.a.</i>	Intra-artériel
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
<i>i.v.</i>	Intraveineuse
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
Lipo-dox	Doxorubicine Liposomale
MB	Microbulles
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MMP	Métalloprotéinases
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDCL	Lignée Cellulaire Dérivée de Patient (Patient Derived Cell Line)
Pgp	Glycoprotéine P (ABCB1)
RTK	Récepteur à activité Tyrosine Kinase
RT-qPCR	Réverse Transcription - PCR quantitative
SNC	Système Nerveux Central
TEER	Résistance Electrique Trans-Endothéliale (Trans-Endothelial Electrical Resistance)
TMZ	Témazolomide
US	Ultrasons

Sommaire

I.	Introduction.....	8
A.	Les cancers	9
1.	Des pathologies faisant appel à l'altération de processus biologiques.....	9
2.	Les chimiothérapies dans le traitement des cancers	15
B.	Les gliomes, des tumeurs du système nerveux central	21
1.	Les généralités sur les gliomes	21
2.	La classification des gliomes.....	23
3.	L'épidémiologie et le pronostic des gliomes.....	35
C.	Le glioblastome : le gliome le plus agressif et fréquent.....	38
1.	Les caractéristiques du glioblastome.....	38
2.	Les traitements actuels du glioblastome, un cas particulier complexe.....	46
D.	La résistance aux chimiothérapies dans le glioblastome.....	48
1.	Les mécanismes de résistance moléculaire intrinsèque du glioblastome.....	48
2.	Les transporteurs ABC dans l'efflux des chimiothérapies	56
3.	Les barrières physicochimiques du système nerveux central.....	62
E.	Contourner les résistances physiques : ouvrir la barrière hémato-encéphalique par ultrasons.....	87
1.	L'historique et le principe de la méthode d'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons	87
2.	Le mécanisme de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons ..	89
3.	Les paramètres : balance ouverture vs risques de dommages	96
4.	Les dispositifs utilisables pour l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons	102
5.	Les agents anti-tumoraux utilisés avec une BHE ouverte par ultrasons	109
6.	Le développement clinique de l'ouverture de la BHE par ultrasons	118
II.	Objectifs du projet	122
A.	Chimiothérapies et ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons	123
1.	Étude de la littérature	123
2.	Etablissement d'un modèle de barrière hémato-encéphalique <i>in vitro</i>	124
3.	Validation de l'impact de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons sur le carboplatine et les chimiothérapies candidates.....	124
B.	Etude de l'expression des transporteurs ABC et de l'impact clinique dans le glioblastome.....	126
III.	Matériels et méthodes	127
A.	Conception d'un modèle <i>in vitro</i> de barrière hémato-encéphalique.....	128
1.	Lignées cellulaires	128
2.	Immortalisation des péricytes.....	128
3.	Analyse de l'expression de marqueurs spécifiques des péricytes et cellules endothéliales par RT-qPCR	129

4.	Culture en insert pour le modèle de BHE.....	131
5.	Mesure de l'imperméabilité du modèle.....	131
6.	Tests statistiques.....	132
B.	Ouverture de la barrière hémato-encéphalique aux agents anti-tumoraux pour le traitement du glioblastome	132
C.	Transporteurs ATP binding cassette (ABC) : expression et valeur clinique dans le glioblastome.....	132
IV.	Résultats.....	133
A.	Choisir les molécules thérapeutiques prometteuses pour une utilisation avec ouverture de la barrière hémato-encéphalique adjuvant : analyse de la littérature.....	134
1.	Revue de la littérature.....	134
2.	Discussion et analyse de la revue	188
B.	Conception d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE.....	193
1.	Introduction	193
2.	Résultats	194
3.	Conclusion.....	202
C.	Ouverture de la barrière hémato-encéphalique aux agents anti-tumoraux.....	203
D.	Transporteurs ATP binding cassette (ABC) : expression et valeur clinique dans le glioblastome.....	232
V.	Discussion.....	262
A.	Conception d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE.....	263
B.	Validation de l'efficacité de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons pour potentialiser l'effet des chimiothérapies dans le traitement du glioblastome ..	264
1.	Vers une étude clinique de phase 2	264
2.	Recherche de nouveaux agents anti-tumoraux pour le traitement du glioblastome ..	265
3.	Ouverture au traitement d'autres tumeurs cérébrales	269
4.	Ouverture au traitement d'autres pathologies du système nerveux central	271
C.	Impact de l'expression des transporteurs ABC sur le glioblastome	273
1.	Profil d'expression des quarante-neuf transporteurs ABC	273
2.	Evaluation clinique de l'impact de l'expression des gènes des transporteurs ABC sur le pronostic des patients atteints de glioblastome	276
VI.	Conclusion	278
VII.	Bibliographie	281

I. Introduction

A. Les cancers

1. Des pathologies faisant appel à l'altération de processus biologiques

Les cancers sont des pathologies induites par une immortalisation, une prolifération anarchique des cellules anormales pouvant migrer vers d'autres tissus et organes à distance de leur point d'origine, et dont le développement nuit à l'organisme. Certains cancers peuvent se développer dans un tissu liquide tel que le sang : on parle le plus souvent des hémopathies. D'autres cancers vont former des masses de cellules appelées tumeurs ou cancers solides. Plusieurs mécanismes sont nécessaires au développement d'un cancer. Les caractéristiques principales du cancer incluent l'altération de dix processus majeurs, dont les mécanismes peuvent se recouper (Figure 1).

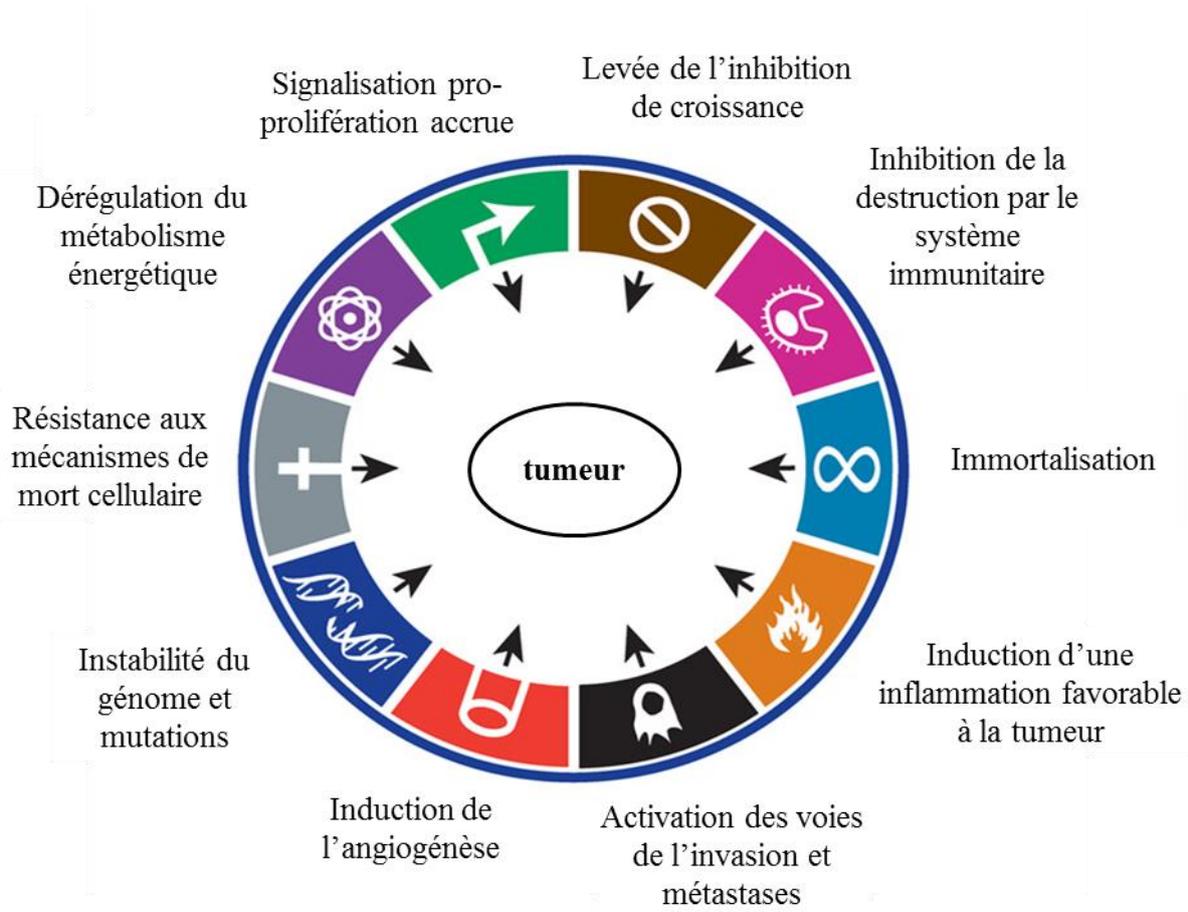


Figure 1 : Les caractéristiques et altérations des cancers.

Dans le processus conduisant une cellule à devenir pathologique et cancéreuse, 10 processus biologiques peuvent être altérés. Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011).

a) L'instabilité du génome

Les cancers se développent des suites d'altérations génétiques et/ou épigénétiques dans des cellules auparavant saines de l'organisme (Croce, 2008). Les causes connues de ces altérations varient de l'infection par un virus oncogène (*e.g.* virus d'Epstein Barr, papillomavirus) (Dogan et al., 2014; Gandhi et al., 2004; Pahud and Ault, 2015) à l'exposition à des xénobiotiques ou des radiations mutagènes (Anand et al., 2008). Ces altérations vont induire des dérégulations géniques perturbant le fonctionnement normal des cellules. Les cancers sont des pathologies résultant principalement de modifications acquises ou somatiques

du génome. Néanmoins, des syndromes de prédisposition héréditaires aux cancers, avec anomalies génétiques germinales ou constitutionnelles sont connus (Roukos, 2009).

b) La prolifération et l'immortalisation des cellules

Dans un tissu sain, afin de contrôler la prolifération des cellules en fonction des besoins du tissu, le cycle cellulaire est strictement régulé et s'active sous l'influence de facteurs présents dans l'environnement. Pour éviter une prolifération inutile, une inhibition de contact s'établit entre les cellules. En cas de dysfonctionnement du mécanisme de prolifération, le cycle cellulaire s'interrompt. Si un grand nombre d'erreurs se produisent lors de la réplication de l'ADN, la cellule peut entrer en mort cellulaire programmée : l'apoptose. Les dysfonctionnements et erreurs survenant lors du cycle cellulaire sont détectés par des protéines constituant les points de contrôle du cycle cellulaire (Figure 2) dont l'activation induit une cascade de signalisation anti-proliférative et/ou pro-apoptotique. Les altérations du génome sont elles aussi détectées par des protéines activant les mêmes processus. L'une de ces voies majeures est la voie du facteur de transcription p53, qui est activée lorsqu'une anomalie est détectée, ce qui conduit à l'arrêt du cycle cellulaire. Une forte activation de cette voie peut conduire à l'apoptose (Surget et al., 2013).

Les extrémités des chromosomes appelées télomères garantissent la stabilité des chromosomes. Ils se raccourcissent à chaque division cellulaire à l'exception de quelques cellules souches exprimant la télomérase, une enzyme capable de rallonger les télomères. Lorsqu'ils deviennent trop courts, la cellule sort du cycle cellulaire et entre en sénescence ou en apoptose (de Jesus and Blasco, 2013).

Lors de la tumorigénèse, une levée des points de blocages du cycle cellulaire va permettre à la cellule cancéreuse de proliférer. La résistance aux processus anti-prolifératifs et l'activation et/ou amplification des voies de signalisation pro-prolifératives permettent à la cellule de se répliquer sans contrôle. Ceci aboutit également à une perte de la capacité des cellules à se différencier. Ainsi, l'établissement d'une résistance aux programmes de mort cellulaire accompagné d'une immortalisation des cellules assure la survie des cellules tumorales et leur donnent leur capacité d'auto-renouvellement (Deshpande et al., 2005; Evan and Littlewood, 1998; Ghebranious and Donehower, 1998; de Jesus and Blasco, 2013; Witsch et al., 2010). A cela s'ajoute le développement d'une instabilité génomique permettant alors aux cellules tumorales d'accumuler plus de mutations et donc d'acquérir de nouveaux phénotypes.

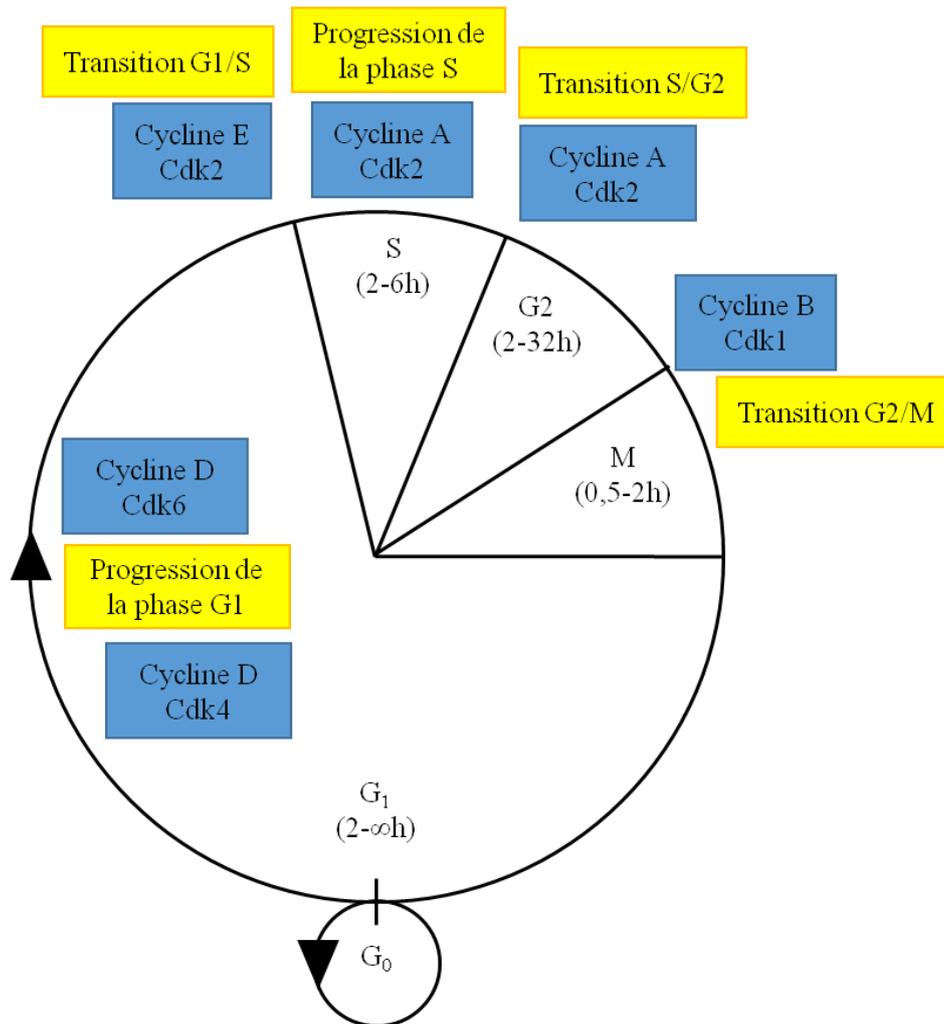


Figure 2: Les phases du cycle cellulaire.

La phase G₁ constitue une phase de préparation de la réplication de l'ADN. C'est la phase d'initiation du processus de division cellulaire, dont l'activation est induite par des signaux pro-prolifération. La phase S (synthèse) est la phase de réplication de l'ADN. La phase G₂ constitue une phase de préparation de la division cellulaire. La phase M (mitose) est la phase au cours de laquelle le matériel génétique est divisé en deux lots identiques, puis répartis dans deux cellules filles identiques suite à une phase de division. La progression dans ce cycle est régulée par des complexes protéiques constitués par les cyclines et les cyclines dépendantes des kinases (CDK). Ces complexes vont réguler et contrôler le bon fonctionnement des étapes du cycle cellulaire, et établir des points de contrôle afin de bloquer le cycle cellulaire en cas de dysfonctionnement. La phase G₀ est une phase de sortie du cycle cellulaire durant laquelle la cellule est quiescente. Un retour au cycle cellulaire est possible, mais la phase G₀ peut aussi être définitive pour une cellule sénescence.

c) L'échappement et le détournement du système immunitaire

Dans un organisme sain, l'apparition spontanée de cellules tumorales est très fréquente en raison du grand nombre de mutagènes auxquels nous sommes exposés quotidiennement. Ces cellules tumorales sont alors détruites par les cellules immunitaires telles que les cellules Natural killers, les macrophages ou les lymphocytes T cytotoxiques. Pour qu'une tumeur puisse se développer à partir d'une cellule tumorale, elle doit échapper au système immunitaire. Elle doit alors devenir indétectable, ou supprimer toute réponse immune. Des points de contrôle immunitaires permettant d'éviter l'activation du système immunitaire contre les cellules saines du « soi » et les réactions auto-immunes peuvent être exploitées par les cellules tumorales afin d'échapper à la détection par ce système. Par exemple, l'interaction de CTLA-4 et PD-1 sur les lymphocytes T avec les molécules de co-stimulation B7-1/2 et PD-L1 respectivement exprimées par les cellules tumorales conduit à l'anergie de ces cellules immunitaires (Fife and Bluestone, 2008; Syn et al., 2017). La levée de la répression de l'immunité par ces points de contrôle immunitaires est particulièrement étudiée en cancérologie (Syn et al., 2017; Wolchok et al., 2017). Paradoxalement, les tumeurs ont des effets pro-inflammatoires. Le recrutement de macrophages et le changement de polarisation de M1 (en faveur de la destruction du tissu) vers M2 (en faveur des processus de réparation du tissu et immunosuppresseur) est favorable aux tumeurs, créant ainsi une immunodépression locale (Mantovani et al., 2002).

d) Un métabolisme accru pour couvrir les besoins

L'activité proliférative intense des cellules tumorales requiert un métabolisme accru (López-Lázaro, 2008; Warburg, 1956) qui conduit à des carences des cellules tumorales en raison des apports énergétiques trop faibles par rapport à leurs besoins augmentés. Ces carences incluent une hypoxie dans la tumeur lorsque celle-ci devient trop grosse. Pour pallier à ces

besoins, le métabolisme énergétique des cellules tumorales change au profit d'un métabolisme anaérobie (López-Lázaro, 2008). De plus, une angiogenèse permet d'accroître les apports à la tumeur et lui permet de survivre. Cette angiogenèse est imparfaite et produit des vaisseaux de mauvaise qualité (Hillen and Griffioen, 2007).

e) Les propriétés invasives des tumeurs

Les tumeurs présentes dans leur organe d'origine sont dites primaires. Cependant, les cellules tumorales peuvent acquérir des propriétés migratoires et invasives lors du développement de la tumeur, permettant à ces cellules d'envahir le tissu d'origine, ou de migrer sur de longues distances via la circulation sanguine et/ou lymphatique et ainsi de coloniser d'autres organes. On parle alors de métastases ou de tumeurs secondaires (Talmadge and Fidler, 2010).

2. Les chimiothérapies dans le traitement des cancers

Le traitement des tumeurs fait majoritairement intervenir des méthodes d'élimination physiques (résection chirurgicale), biophysique (radiothérapie), et chimique (chimiothérapie). Les deux dernières modalités perturbent la division cellulaire en ciblant les cellules prolifératives telles que les cellules tumorales. La radiothérapie et plusieurs chimiothérapies agissent en induisant des dommages à l'ADN pour conduire à un scénario de catastrophe mitotique, tuant les cellules tumorales. D'autres méthodes biologiques sont aussi très développées actuellement (immunothérapies, thérapies moléculaires ciblées). Dans ce projet, je me suis particulièrement intéressé aux chimiothérapies anti-tumorales.

La majorité des chimiothérapies interfère avec le cycle cellulaire dans le but de conduire le plus souvent à une étape de catastrophe mitotique dans laquelle la division cellulaire

induirait trop de dommages pour produire des cellules viables. Les chimiothérapies se répartissent en plusieurs familles selon leur mode d'action (tableau 1). En fonction de leur mode d'action, les chimiothérapies agissent à des phases différentes du cycle cellulaire (Figure 3).

Famille de chimiothérapie	Mode d'action général	Exemples d'agents	Spécificité du mode d'action
Antimétabolites	Interfèrent avec la production des nucléotides : action lors de la synthèse de l'ADN et la phase S du cycle cellulaire	Méthotrexate	Inhibe la dihydrofolate réductase intervenant dans la synthèse des bases puriques
		Thioguanine	S'incorporent à la place des nucléotides normaux lors de la réplication de l'ADN, induisant des erreurs lors de la réplication.
		6-mercaptopurine	
		Hydroxyurée	
		Gemcitabine	
		Cytarabine	
5-fluorouracil (5-FU)			
Agents alkylants	Se lient de manière covalente avec l'ADN conduisant à des erreurs de réplication et réparation pouvant conduire à la fragmentation de l'ADN	Nitrosourées (ACNU, Nimustine ; BCNU, Carmustine ; CCNU, Lomustine ; Fotemustine)	Transfèrent un groupement alkyl sur les bases de l'ADN
		Témozolomide (TMZ)	
		Procarbazine	
		Ifosphamide	
		Agents au platine (Carboplatine, Cisplatine, Oxaliplatine)	S'intercalent dans l'ADN et forment des liens covalents intra- et inter-brins, inhibant la réplication et la transcription de l'ADN
		Chlorambucil	
		Melphalan	

Famille de chimiothérapie	Mode d'action général	Exemples d'agents	Spécificité du mode d'action
Antibiotiques Antinéoplasiques	S'intercalent dans l'ADN et inhibent la réparation et la réplication de l'ADN :	Bléomycine	Inhibe en plus directe de l'ARN polymérase : inhibition de la transcription
Anthracyclines	Inhibent aussi la topoisomérase II Interfèrent avec les histones et les mécanismes de réparation qu'ils régulent	Mitoxantrone	
		Doxorubicine	
		Daunorubicine	
		Epirubicine	
		Idarubicine	
Inhibiteurs de topoisomérase	Inhibent les topoisomérases qui relâchent la tension induite par le débobinage des brins lors de la réplication et la réparation de l'ADN : cassure de l'ADN	Irinotecan (famille des dérivés de la camptothécine)	Inhibent la topoisomérase I
		Topotecan (famille des dérivés de la camptothécine)	
		Etoposide (famille des dérivés de l'épipodophyllotoxine)	Inhibe la topoisomérase II

Famille de chimiothérapie	Mode d'action général	Exemples d'agents	Spécificité du mode d'action
Autres	Inhibe la transcription	Actinomycine-D	Se lie à l'ADN et au complexe d'initiation de la transcription : blocage de l'élongation de l'ARN.
	Inhibent la traduction	L-asparaginase	Déplète en asparagine dont la production par les cellules tumorales est souvent altérée
		Méthioninase	Déplète en méthionine, un acide aminé essentiel
Anti-mitotiques	Interfèrent dans la ségrégation du matériel génétique et la cytodivision lors de la mitose : altération du cytosquelette.	Epothilones	Inhibent la dépolymérisation des microtubules par l'interaction avec la tubuline dans les microtubules
		Taxanes (docétaxel, paclitaxel)	
		Vinca-alcaloïdes (vincristine, vinblastine)	Inhibent la polymérisation des microtubules par l'interaction avec la tubuline libre

Tableau 1: Les familles de chimiothérapies.

Elles se constituent par le regroupement d'agents par leur mode d'action. Certaines incluent des sous-familles de molécules regroupées par leur proximité chimique. En effet, certaines molécules dérivent d'un même agent, ou dérivent l'une de l'autre (e.g. le docétaxel et le paclitaxel dérivent tous deux de taxol). Les chimiothérapies fonctionnent généralement par l'induction d'erreurs dans la réplication de l'ADN, ou lors des phases du cycle cellulaire. Ces erreurs, généralement corrigées dans les cellules saines en prolifération, auront un effet délétère pour les cellules dont la prolifération est anormale, comme les cellules tumorales.

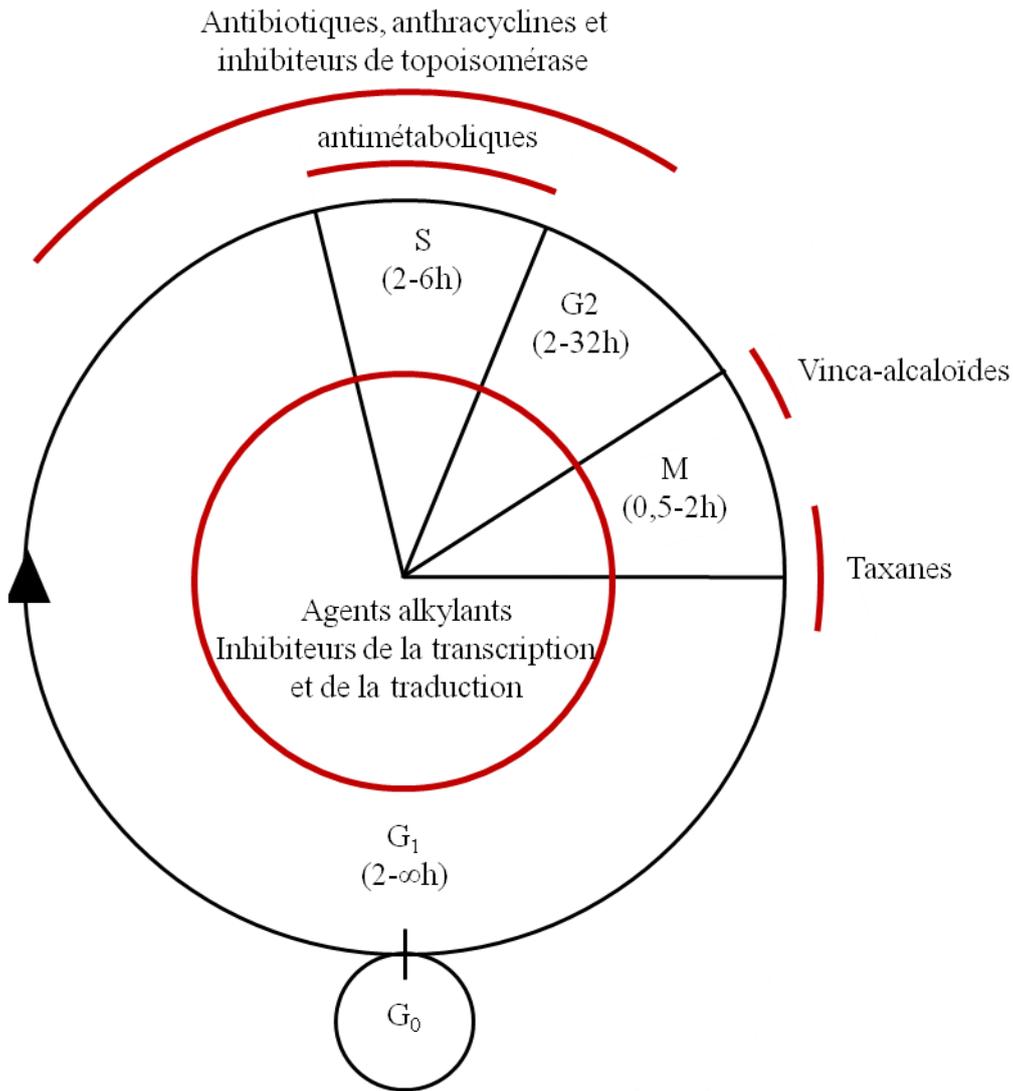


Figure 3 : Les chimiothérapies dans le cycle cellulaire.

Selon leur mode d'action, les chimiothérapies vont agir à des phases différentes du cycle cellulaire. Les phases du cycle cellulaire durant lesquelles chaque famille de chimiothérapie agit sont détaillées dans cette figure.

Les cancers présentent des altérations phénotypiques et génotypiques et des traitements différents selon l'organe dans lequel ils se développent et le type cellulaire dont ils sont originaires. Dans le laboratoire, nous étudions principalement les gliomes qui sont des tumeurs primitives du système nerveux central (SNC).

B. Les gliomes, des tumeurs du système nerveux central

1. Les généralités sur les gliomes

Les gliomes sont des tumeurs primitives du SNC. Ces tumeurs ne disséminent qu'extrêmement rarement hors du SNC. Ils ont cependant des capacités de diffusion au sein du SNC d'où le terme couramment utilisé de gliomes diffus.

Les symptômes induits par les gliomes ont un large spectre et sont variables d'un individu à un autre. Ils dépendent de la taille de la tumeur, de sa localisation, de sa malignité et de sa classification (décrite dans la partie I.B.2 suivante), ainsi que de la présence d'œdème. Ces symptômes incluent des déficits neurologiques progressifs focaux, une faiblesse motrice, des déficits ou des détériorations cognitives progressives, des céphalées, une vision troublée, des altérations du comportement et de la mémoire ainsi que des crises d'épilepsie (Reni et al., 2017). Ces troubles neurologiques peuvent être mesurés en partie par l'indice de Karnofsky, qui définit le degré d'autonomie et de dépendance d'un patient.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'évoquer le diagnostic de tumeur cérébrale. La succession de trois modalités d'imagerie IRM est la procédure standard reconnue pour le diagnostic des lésions tumorales dans le cerveau (Figure 4).

- Une imagerie IRM pondérée en T1 permet de distinguer les premières anomalies. Avec une séquence pondérée en T1, les fluides apparaissent hypo-intenses, avec des modifications en cas d'anomalie du contenu protéique. La relaxation plus rapide des lipides conduit quant à elle à une hyper-intensité du

signal dans le tissu. Cette étape de l'imagerie IRM des tumeurs cérébrales permet de voir la présence de zones nécrotiques et/ou d'altérations du tissu.

- Des acquisitions en imagerie IRM pondérées en T1 avec injection de gadolinium sur trois axes sont ensuite réalisées. Le Gadolinium est un agent de contraste pour imagerie IRM qui apparaîtra hyper-intense dans cette modalité. Cette étape permet de voir le corps de la tumeur en incluant les zones de nécrose et le front prolifératif. Le mécanisme par lequel le Gadolinium permet cette étape est discuté plus en détail dans la suite du manuscrit, dans la section I.D.3.b).
- Une image en IRM pondérée en T2 avec une séquence FLAIR (Fluid Attenuation Inversion Recovery) est ensuite réalisée. Cette méthode permet de voir les anomalies des fluides, qui apparaissent hyper-intenses telles que les zones œdémateuses entourant la tumeur et dans laquelle des cellules tumorales invasives peuvent être présentes (Dréan et al., 2016; Reni et al., 2017).

Pour finir, le prélèvement de biopsies et leur analyse par des anatomo-pathologistes et des biologistes permet d'affirmer le diagnostic en déterminant la classification du gliome.

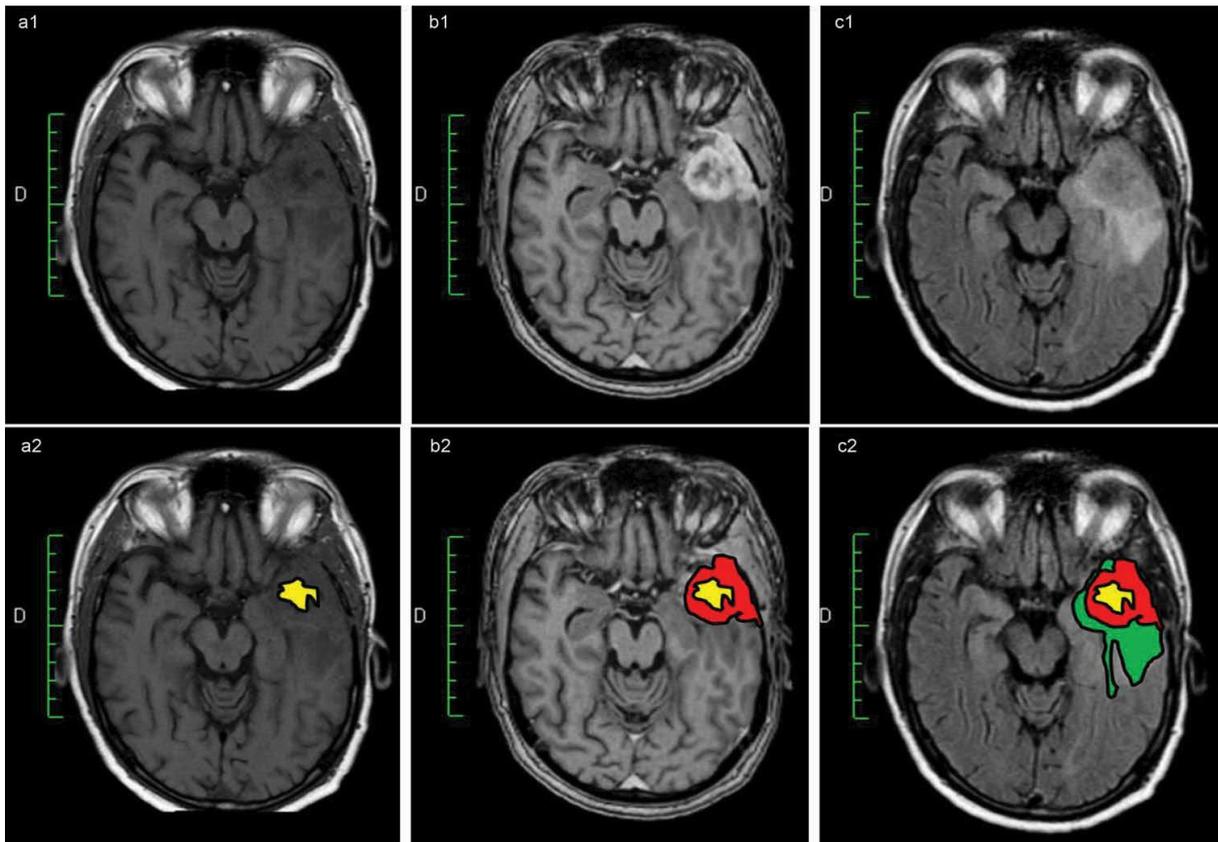


Figure 4: *L'imagerie IRM d'un glioblastome temporal gauche.*

Panel A1 : imagerie IRM pondérée en T1. Panel A2 : la zone nécrotique centrale est colorée en jaune. Panel B1 : imagerie IRM pondérée en T1 avec prise de contraste au gadolinium. Panel B2 : La zone de prise de contraste colorée en rouge correspond à la zone proliférative de la tumeur. Panel C1 : imagerie IRM pondérée en T2 FLAIR. Panel C2 : La zone colorée en vert correspond à une zone d'œdème vasogénique dans laquelle des cellules tumorales sont présentes. (Dréan et al., 2016).

2. La classification des gliomes

Les gliomes ont été classés en différents types et grades d'après des classifications établies en 1926, puis réévaluées par l'OMS en 1979, 1993, 2000, 2007 et 2016. Ces classifications s'appuient majoritairement sur le profil histo-génétique du tissu, et répartissent les tumeurs en différents groupes d'après le type cellulaire auquel elles ressemblent le plus et leur statut estimé de différenciation. En 2016, fort des avancées technologiques en recherche et

médecine, l’OMS a mis à jour cette classification en tenant principalement compte du profil moléculaire génétique des tumeurs (*i.e.* mutations, amplifications, délétions) (Komori, 2017; Louis et al., 2016). La figure 10 décrit la classification selon les caractéristiques morphologiques, le grade et les caractéristiques moléculaires, dont l’implication est détaillée ci-après.

a) La classification morphologique des gliomes

Les gliomes, dérivant de cellules du SNC et se développant dans le même environnement, acquièrent des caractéristiques morphologies similaires aux cellules qui s’y trouvent, majoritairement aux astrocytes et aux oligodendrocytes. Cette classification est permise par l’observation morphologique des tissus de gliomes réalisée par les anatomo-pathologistes. Ces observations sont réalisées sur des coupes de tissu inclus en paraffine et colorée en H&E (hématoxyline et éosine, marquant respectivement les noyaux et les substances acidophiles du cytoplasme et des matrices extracellulaires). Ces observations font alors ressortir trois profils histologiques majeurs :

- Les gliomes à phénotype astrocytaires « infiltrant » incluant les astrocytomes diffus et anaplasiques et les GBM.
- Les gliomes à phénotype oligodendrogial appelés oligodendrogliomes
- Les gliomes qui ont une double composante astrocytaire et oligodendrogiale sont appelés oligoastrocytomes. Ils ont disparu de la classification actuelle révisée en 2016 (Figure 5). La classification de ces tumeurs dépend maintenant de leur classification moléculaire (décrite dans la section I.B.2.c) après), et les classe maintenant soit en astrocytome, soit en oligodendrogliome

D'autres profils minoritaires existent, mais ne seront pas décrits ici.

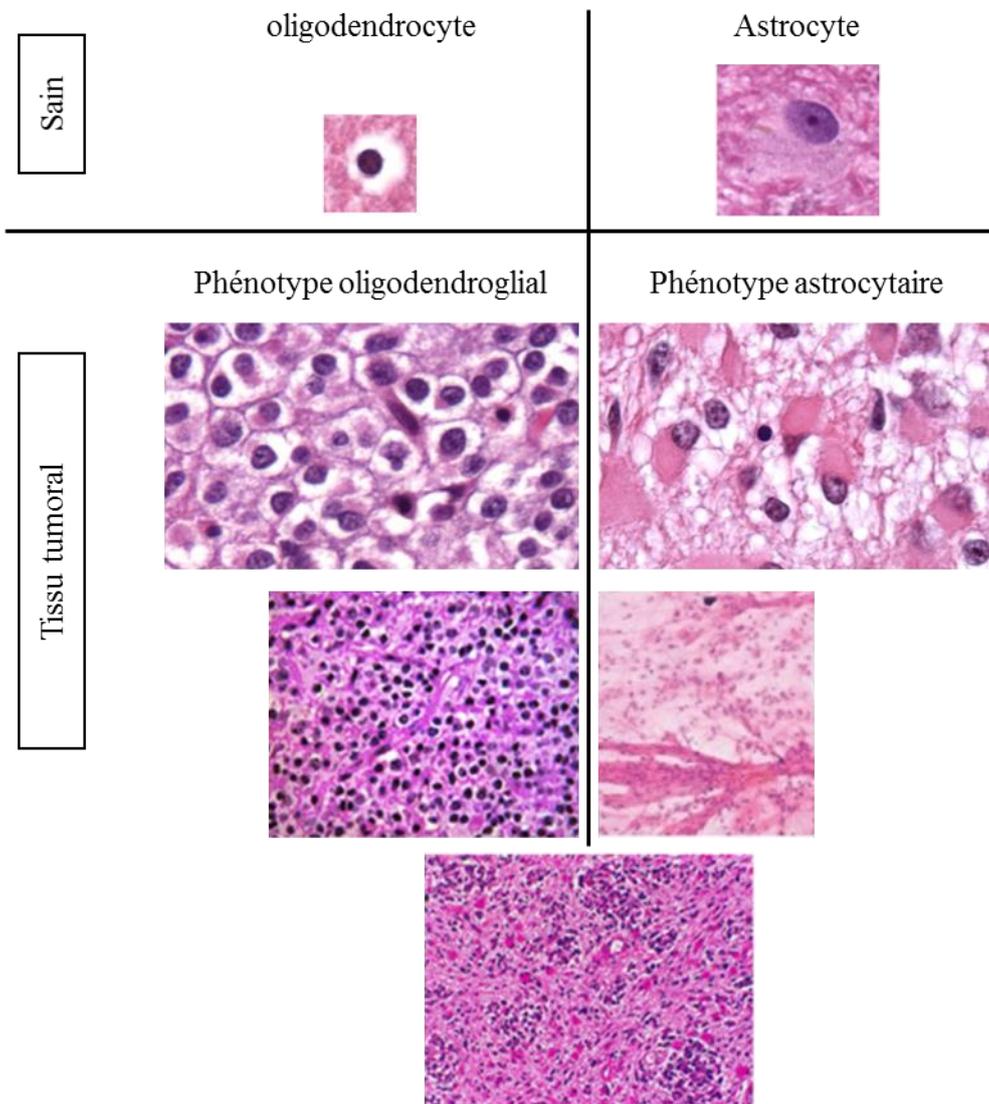


Figure 5 : Les phénotypes oligodendrogial et astrocytaire des gliomes observés en marquage H&E.

Les tumeurs à phénotype oligodendrogial présentent des noyaux ronds, monomorphes avec de petits nucléoles, et un halo clair périnucléaire en « nid d'abeille » (forme ressemblant aux alvéoles des nids d'abeilles). Leur vascularisation est riche, branchée, et endocrinoïde. Des calcifications sont aussi fréquemment observées. Les tumeurs à phénotype astrocytaire ont des noyaux ovoïdes pléomorphiques hyperchromatisés. Leur cytoplasme est gémistocytique (abondant) et fibrillaire. Leurs vaisseaux sanguins sont larges. Certaines tumeurs regroupent les deux phénotypes : les oligo-astrocytomes. Adapté d'un cours du Dr Franck Bielle et de (Figarella-Branger et al., 2008).

b) La classification par grade des gliomes

Un grade relatif à l'état de différenciation des cellules tumorales rend compte de l'agressivité de la tumeur. Les grades 1 et 2 sont dits de bas grade. Les gliomes de grade 1 sont stables ou à croissance lente, et curables par une exérèse chirurgicale complète. Les grades 2 ont aussi une croissance lente, mais présentent un risque de transformation en un grade de malignité supérieur, et un risque de récurrence. Dans ce cas le traitement préconisé est également une exérèse chirurgicale. Les gliomes de haut grade que représentent les grades 3 et 4 ont quant à eux un caractère malin, engagent le pronostic vital des patients, et requièrent des traitements plus lourds. Le grade 4, à croissance rapide et présentant fréquemment une dissémination des cellules cancéreuses est le grade le plus élevé et le plus agressif.

Ces grades sont définis à l'aide de différents marqueurs. Pour les gliomes diffus (*e.g.* oligodendrogliome, astrocytome, GBM), le grade sera défini par plusieurs critères. La prolifération des cellules et l'index mitotique détermineront s'il s'agit d'un grade 2 ou supérieur. Les hauts grades présenteront une hyper-cellularité avec un fort index mitotique, et des atypies cellulaires. La présence de nécrose va aussi contribuer à la classification de la tumeur. Enfin, le dernier marqueur est la prolifération endothélio-capillaire, dans laquelle les vaisseaux sanguins seront constitués des plusieurs couches de cellules endothéliales consécutives à une activation de l'angiogenèse (Figure 6).

Dans le cas des oligodendrogliomes :

- Les oligodendrogliomes de grade 2 ont un indice mitotique faible (moins de 6 mitoses pour 10 champs de lectures en histologie). Ils ne présenteront pas de prolifération endothélio-capillaire ou de nécrose.

- Les oligodendrogliomes anaplasiques de grade 3 peuvent présenter une prolifération endothélio-capillaire ou une nécrose, et ont un indice mitotique plus élevé (plus de 6 mitoses pour 10 champs de lecture).

Pour les astrocytomes infiltrants :

- Les astrocytomes pilocytiques sont définis comme étant des gliomes de grade 1 sur la base de leur activité mitotique faible (marquage Ki67 démontrant une activité proliférative entre 0.5 et 5% des cellules). L'activité mitotique est limitée à un ensemble de cellules immatures sans incidence pronostique.
- Les astrocytomes de grade 2 appelés astrocytomes diffus ont un indice mitotique faible (moins de 2 mitoses pour 10 champs de lecture), une absence de nécrose et de prolifération endothélio-capillaire.
- Les astrocytomes anaplasiques de grade 3 présentent les mêmes caractéristiques avec cependant un indice mitotique plus élevé (plus de 2 mitoses pour 10 champs de lecture).
- Les GBM sont des gliomes astrocytaires de grade 4. Ils montrent un fort index mitotique, ainsi qu'une nécrose et/ou une prolifération endothélio-capillaire. Ces gliomes de grade 4 montrent aussi une forte invasivité du parenchyme cérébral (Figure 6). Les GBM sont les seuls gliomes de grade 4 qui est le grade correspondant aux tumeurs les plus agressives.

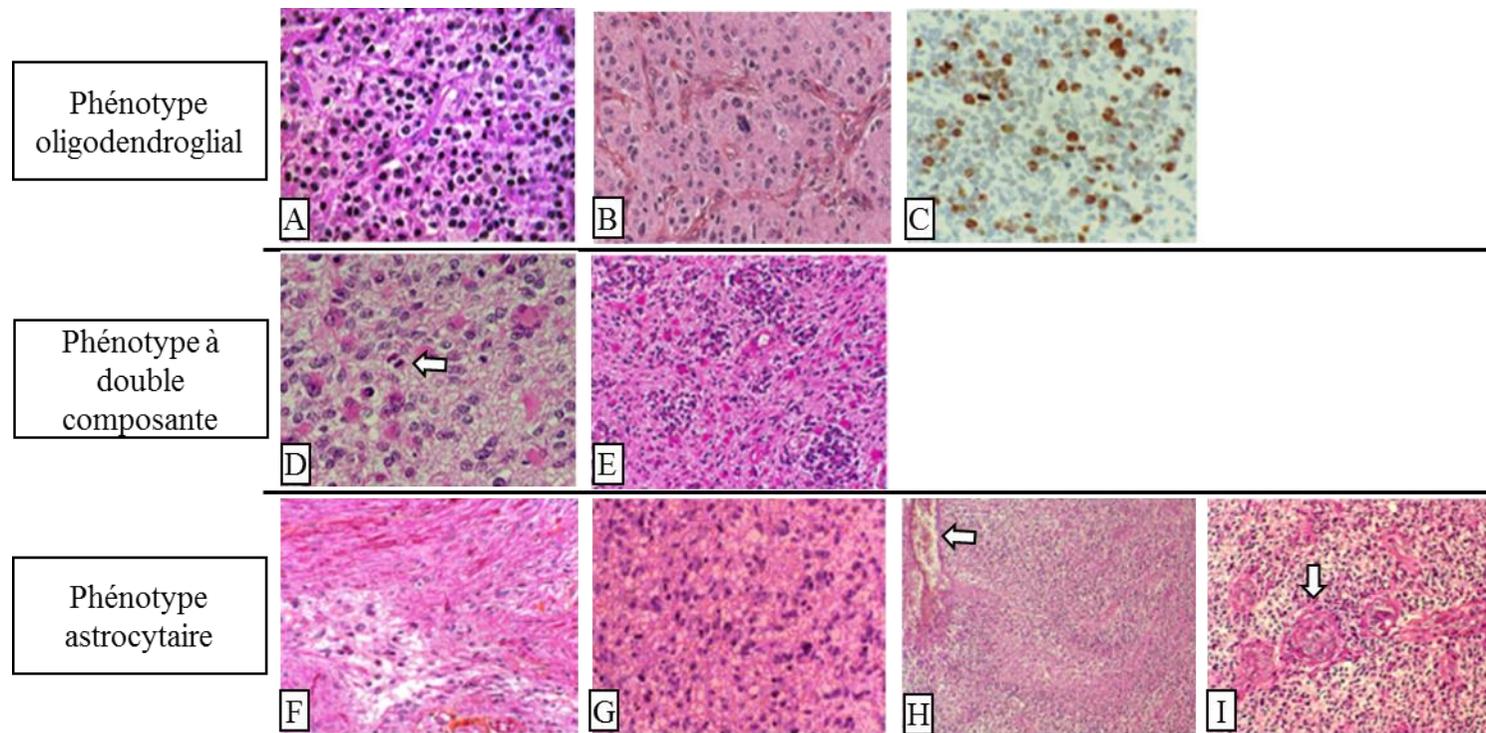


Figure 6 : Les grades des gliomes définis par des différences histologiques (marquage H&E).

Panel A : Oligodendrogliome de grade 2. Panels B et C : Oligodendrogliome anaplasique de grade 3. Le panel C est un immunomarquage du marqueur en DAB de prolifération cellulaire Ki67. Panel D : Tumeur à phénotype oligodendrogial et astocytaire anciennement classée oligoastrocytome de grade 2. (La flèche montre une mitose). Panel E : Tumeur à phénotype oligodendrogial et astocytaire anciennement classée oligo-astrocytome anaplasique de grade 3. Panel F : Astrocytome pilocytique de grade 1. Panel G : Astrocytome anaplasique de grade 3. Panel H et I : GBM (grade 4). Panel H : La flèche montre une zone de nécrose. Panel I : la flèche montre un vaisseaux avec une prolifération endothélio-capillaire. Adapté de (Figarella-Branger et al., 2008).

c) La classification moléculaire des gliomes

Des analyses moléculaires sont utilisées pour compléter les analyses morphologiques et les grades afin d'affiner le diagnostic. Plusieurs altérations sont étudiées et seront détaillées ici.

i. La mutation des gènes *IDH1* et *IDH2*

IDH1 et *IDH2* (Isocitrate déshydrogénases) sont des protéines impliquées dans le métabolisme. Ces oxydoréductases catalysent la conversion de l'isocitrate en α -cetoglutarate, générant du NADPH. La substitution de l'arginine en position 132 (R132H) de la séquence codante du gène *IDH1* induit une nouvelle fonction de cette protéine qui convertira alors l' α -cetoglutarate en D-2-hydroxy-glutarate (Figure 7). Le gène *IDH2* peut lui aussi présenter une mutation sur l'arginine 132.

La mutation R132H de la protéine *IDH1* peut être visualisée en immunohistochimie grâce à un anticorps spécifique de la protéine mutée, et être validé par séquençage. Dans les gliomes, cette mutation est généralement plus fréquente chez les patients jeunes et bénéficie d'un diagnostic plus favorable chez l'adulte (Yan et al., 2009). Paradoxalement, cette mutation n'impacte pas la survie dans le cas des gliomes pédiatriques (De Carli et al., 2009). Le gène d'*IDH2* peut aussi être muté, et sera préférentiellement détecté par le séquençage.

Même si cette mutation est la plus fréquente, d'autres mutations existent, et peuvent être détectées par séquençage. Le mécanisme tumorigénique résultant de ces mutations reste cependant encore peu connu et controversé (Parsons et al., 2008).

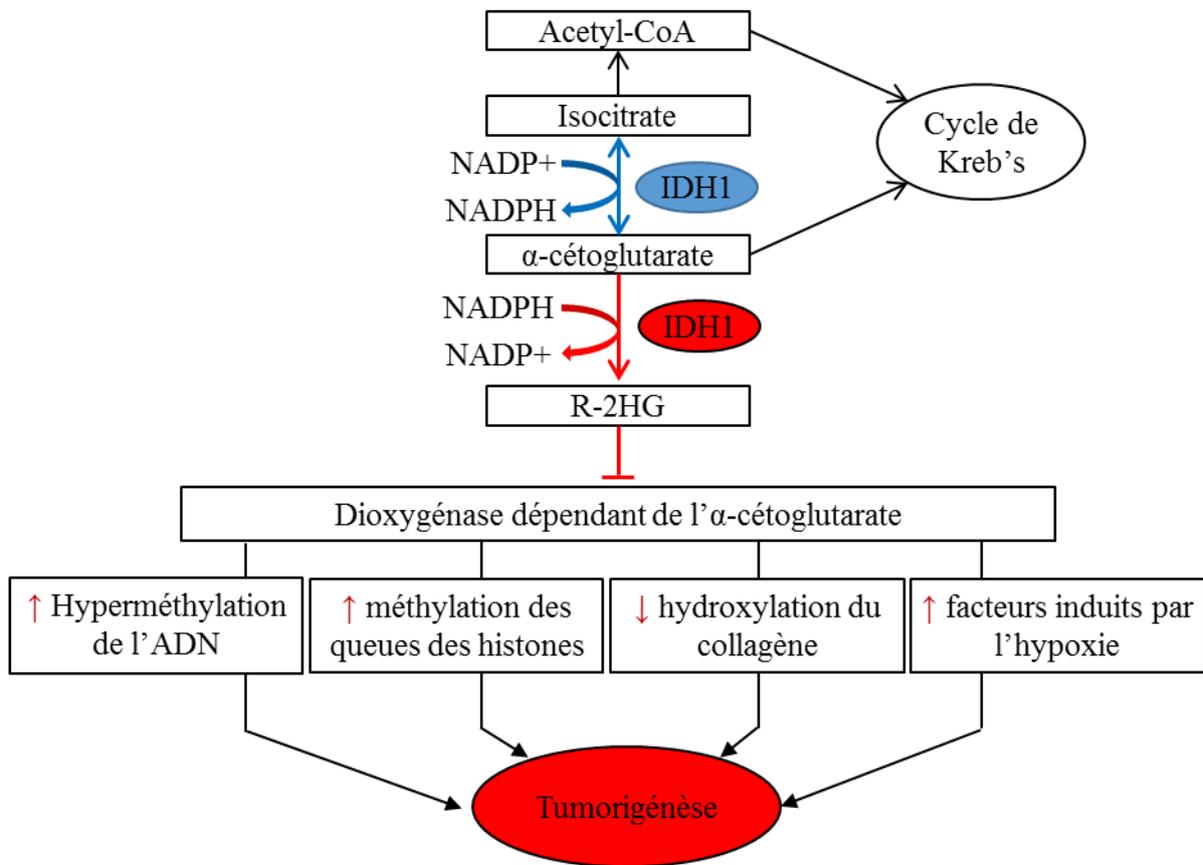


Figure 7 : L'impact de la mutation d'IDH1 dans les cellules de gliome.

IDH1 est une protéine impliquée dans le cycle de Krebs et dans le métabolisme cellulaire. Sa mutation dans les gliomes de bas grade conduit à une altération du métabolisme de la tumeur, mais aussi à des modifications génétiques et épigénétiques des gliomes. Adapté de (Liu et al., 2016a).

ii. Le facteur de transcription ATRX et les variants d'histones H3

ATRX est un régulateur transcriptionnel de la famille SWI2/SNF2 impliqué dans l'insertion du variant d'histone H3.3 dans la chromatine, sur des régions de séquences répétées de l'ADN telles que les télomères. Cela induit une répression de l'expression de ces régions chromosomiques. L'insertion d'histones H3.3 par ATRX aux télomères est impliquée dans l'inhibition du processus d'Elongation Alternatif des Télomères (ALT). La levée de cette

inhibition peut être impliquée dans l'immortalisation des cellules tumorales (Figure 8). Cependant, le mécanisme précis par lequel ATRX induit l'ALT n'est pas encore clairement défini (Voon et al., 2016). Les altérations d'ATRX ont été rapportées dans plusieurs cancers (mutations, délétions). Chez l'adulte, la perte d'expression d'*ATRX* est de bon pronostic pour la survie des patients. Elle peut être visualisée en immunohistochimie (Kannan et al., 2012). L'histone 3 impliquée dans ce mécanisme peut aussi être directement altérée. Les mutations K27M et G34R/V de l'histone 3 sont très fréquentes dans les gliomes pédiatriques, plus précisément dans les gliomes du tronc (Khuong-Quang et al., 2012; Puget et al., 2015; Schwartzenuber et al., 2012; Wu et al., 2012). Elles sont cependant plus rares chez l'adulte. Ces mutations altèrent la fonction de cette histone, impliquée dans l'extinction épigénétique de l'expression de régions chromosomiques (Karsy et al., 2017).

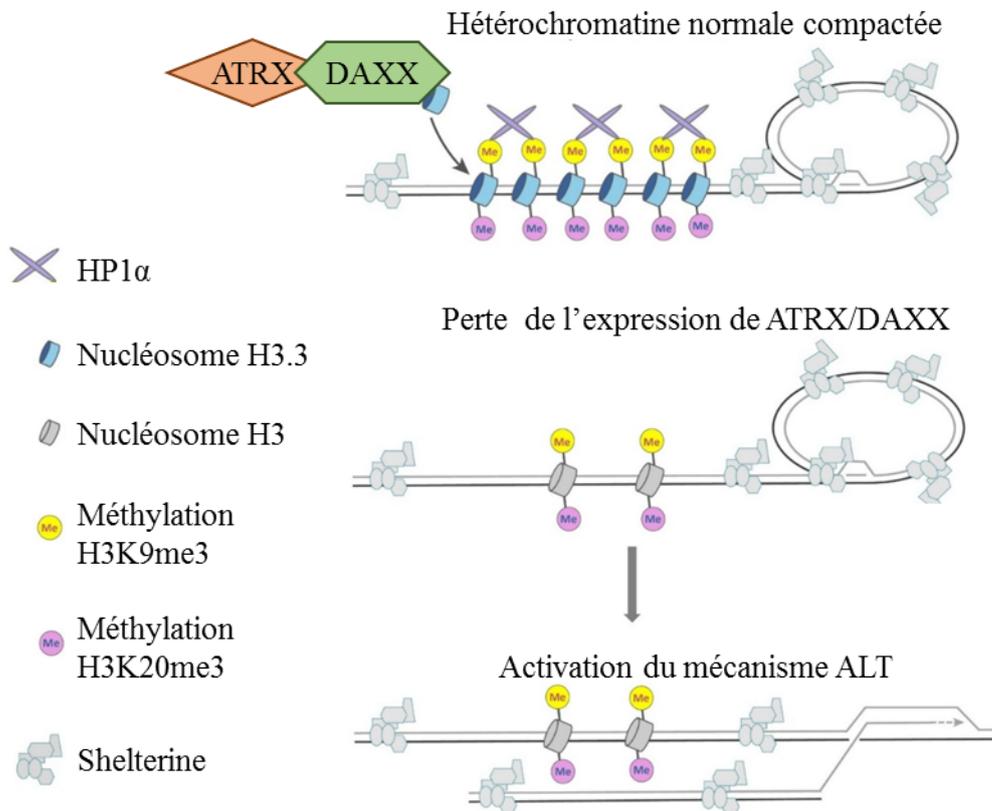


Figure 8 : Le mécanisme de l'élongation des télomères impliquant ATRX et l'histone H3.3.

Cette élongation est inhibée par l'insertion d'histones H3.3 par ATRX dans ces régions chromosomiques. La perte de l'expression d'ATRX permet de lever cette inhibition, et peut être responsable de l'immortalisation des cellules dans les gliomes. Adapté de (Voon et al., 2016).

iii. Les altérations chromosomiques

Des altérations chromosomiques sont aussi impliquées dans le diagnostic des gliomes. Alors que la codélétion des bras chromosomiques 1p et 19q est souvent présente dans les gliomes de phénotype oligodendrogial (Figure 9), la polysomie du chromosome 7 et la monosomie du chromosome 10 sont souvent impliquées dans les gliomes de haut grade (Bigner et al., 1988; Crespo et al., 2011; Jenkins et al., 2006).

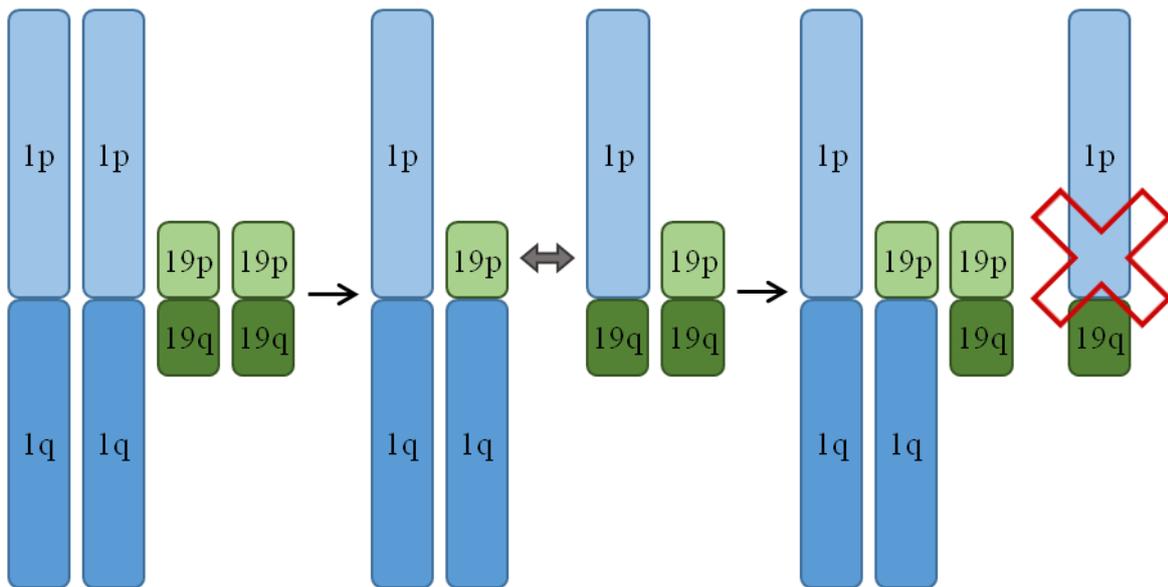


Figure 9 : La codéletion des bras chromosomiques 1p/19q.

Elle consiste en la déletion commune des bras chromosomiques p du chromosome 1 et q du chromosome 19. Cette altération chromosomique est un facteur pronostique utilisé dans la classification des gliomes. Adapté de (Pinkham et al., 2015).

iv. Le récepteur à l'EGF (EGFR)

La sur-activation de la voie de signalisation de ce récepteur à l'hormone EGF (Epidermal Growth Factor) stimule la prolifération des cellules tumorales par l'activation des voies mitotiques. Une amplification du gène codant pour l'EGFR est aussi fréquemment impliquée dans les gliomes de haut grade (Wong et al., 1987).

v. Les autres altérations observées

D'autres altérations existent et varient selon le type de gliome. Certaines mutations sont quant à elles plus particulières. Par exemple, la mutation V600E du gène *BRAF* correspondant à un changement d'une valine (V) en acide glutamique (E) en position 600 dans la séquence d'acides aminés, est retrouvée dans les gliomes pédiatriques ou chez les jeunes adultes, mais très rare dans les gliomes de l'adulte (Basto et al., 2005; Schindler et al., 2011). De la même

manière la mutation du promoteur du gène de *TERT* impliquée dans le processus d'immortalisation des cellules tumorales par l'élongation des télomères, est très fréquente dans les gliomes de haut grade tels que les GBM (Killela et al., 2013). Ces mutations et celles du gène *ATRX* sont mutuellement exclusives.

En associant les trois modes d'analyse par morphologie, grade et profil moléculaire, le gliome est alors classé selon l'arbre de décision en figure 10.

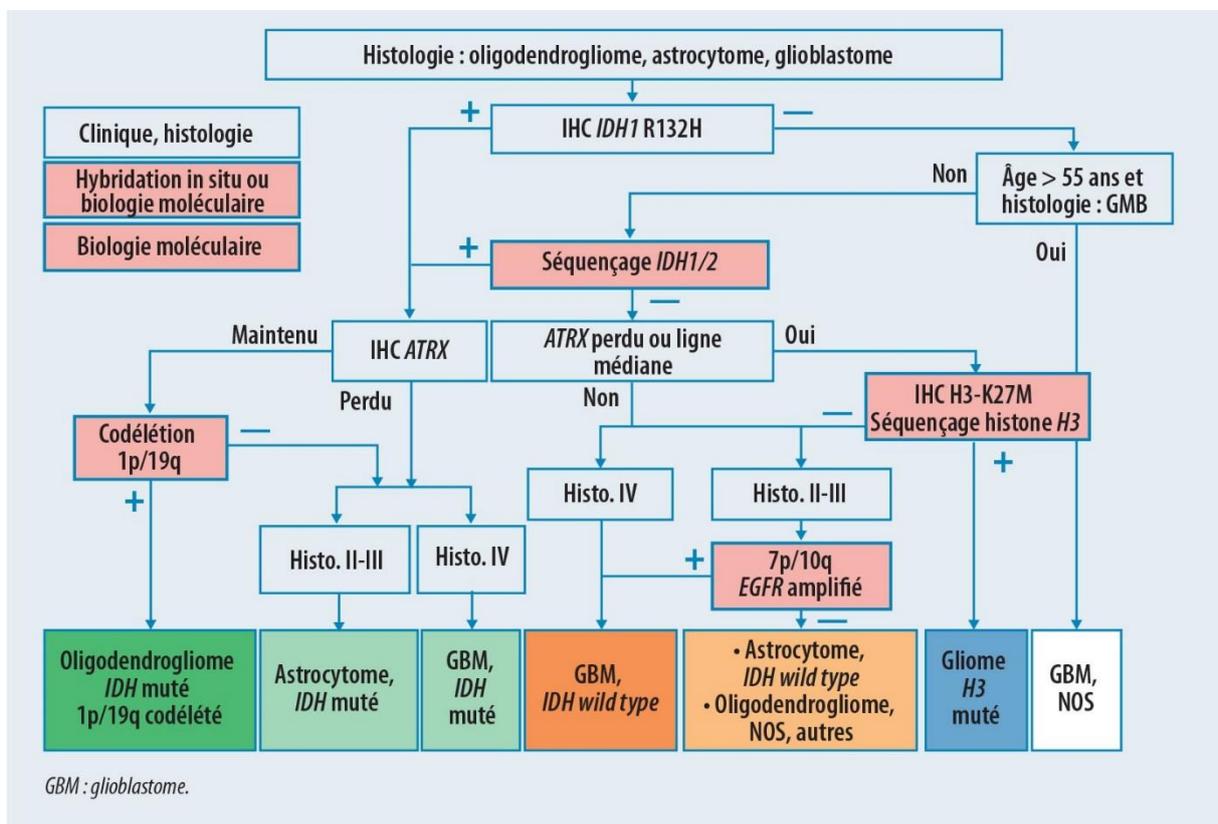


Figure 10 : La classification OMS 2016 des gliomes.

Cette classification cumule les données cliniques, histologiques rapportées par l'analyse anatomo-pathologique des tissus, et l'analyse moléculaire des altérations fréquentes dans les gliomes. Figure réalisée par les Dr Karima Mokhtari et Franck Bielle.

3. L'épidémiologie et le pronostic des gliomes

En Europe, les gliomes astrocytaires représentent 27000 nouveaux diagnostics par an pour la période 2000-2007, rapportant l'incidence à 5 pour 100000, ce qui en fait des tumeurs rares. L'incidence est plus élevée chez les hommes que chez les femmes - 5,4 et 3,6 respectivement -. Ils surviennent généralement chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Au niveau mondial, l'incidence des gliomes est plus importante dans les pays industrialisés. En Europe celle-ci est plus importante dans les pays du nord que dans les pays du sud et de l'est - 5,7 au royaume uni et en Irlande vs 4,5 respectivement- (Ostrom et al., 2014; Reni et al., 2017). En Europe, la survie à 5 ans atteint à peine 31% des patients atteints de gliome, dont 50% survivront plus de 15 ans post-diagnostic. Mais ce taux de survie varie énormément selon la classification du gliome. Quand la survie à 5 ans atteint 14,5% pour les tumeurs astrocytaires, celle des tumeurs oligodendrogiales atteint les 54,5%. Les patients présentant un GBM ont un taux de survie très bas. C'est le gliome le plus agressif, avec une médiane de survie d'environ 15 mois et une survie à 2 ans et 5 ans de 26,5% et 2,7% respectivement avec le traitement actuel établi en 2005 par l'équipe du professeur Roger Stupp (Reni et al., 2017; Stupp et al., 2005). C'est aussi le gliome le plus fréquent, représentant plus de 50% des gliomes, pour une incidence variant entre 0,59 et 3,69 pour 100000 selon la localisation dans le monde (Ostrom et al., 2014; Reni et al., 2017). La médiane de survie des patients par type de gliome diffus est détaillée dans le tableau 2.

Histologie	Gliome diffus					
Mutation ponctuelle récurrente	Mutation des gènes <i>IDH</i>		Pas de mutation des gènes <i>IDH</i>		Mutation du gène de l' <i>histone H3</i>	
					K27M	G34R/V
Variation du nombre de copies	Présence de Codélétion 1p/19q	Absence de Codélétion 1p/19q	80% 7p+/10q- 40% Amplification du gène du gène EGFR	0% 7p+/10q- 0% Amplification du gène du gène EGFR		
Maintien des télomères	100% mutation du promoteur de <i>TERT</i>	>90% mutation des gènes de <i>ATRX</i> et <i>p53</i>	80% mutation du promoteur de <i>TERT</i>	0% mutation du promoteur de <i>TERT</i>		
Diagnostic intégré	Oligodendrogliome muté <i>IDH</i> , codéléte 1p/19q	Astrocytome ou GBM muté <i>IDH</i>	GBM <i>IDH</i> normal	Astrocytome <i>IDH</i> normal	Gliome diffus de la ligne médiane muté <i>H3</i> K27M	Gliome diffus muté <i>H3</i> G34R/V
Médiane de survie	>14 ans	5 ans	1,5 ans	4,5 ans	1 an	2 ans

Tableau 2: La médiane de survie des patients atteints de gliome post-diagnostic selon leur classification.

Les GBM et les gliomes mutés sur le gène de l'histone H3 (qu'on retrouve principalement dans les gliomes pédiatriques) sont les plus agressifs.

Adapté d'un cours du Dr Franck Bielle.

Dans ce projet de thèse, je me suis intéressé plus particulièrement aux GBM, le gliome le plus fréquent et le plus agressif, que je vais vous détailler dans la suite de cette introduction.

C. Le glioblastome : le gliome le plus agressif et fréquent

1. Les caractéristiques du glioblastome

a) Les caractéristiques anatomiques et morphologiques des glioblastomes

Les GBM primaires n'ont pas de localisation anatomique précise (Reni et al., 2017). L'organisation des tumeurs de GBM en 3 zones, observées en imagerie IRM telles que décrite dans la section I.B.1. (Figure 4), est liée à l'agressivité et l'invasivité de la tumeur :

- Une zone de nécrose centrale, dont la formation est induite majoritairement par l'hypoxie et l'appauvrissement nutritif de cette zone tumorale en raison d'une croissance trop rapide de la tumeur.
- Un front prolifératif dans lequel l'angiogenèse est importante.
- Une zone d'œdème vasogénique dans laquelle des cellules tumorales invasives se trouvent.

b) Les caractéristiques moléculaires des glioblastomes

Comme décrit précédemment, les GBM sont caractérisés par une faible fréquence de mutation des gènes *IDH*, une absence de codélétion des bras chromosomiques 1p/19q et de la perte d'expression de la protéine ATRX. Selon cette classification, les GBM sont classés selon 3 sous-types :

- les GBM NOS pour "not otherwise specified" qui regroupent les GBM pour lesquels les données génotypiques n'ont pas pu être acquises. Ils sont très rares.
- les GBM pour lesquels les gènes codant les protéines IDH sont mutés qui représentent environ 10% des GBM.

- les GBM pour lesquels les gènes codant les protéines IDH sont non mutés qui représentent environ 90% des GBM.

Contrairement aux GBM secondaires, qui dérivent de gliomes de bas grade, les GBM primaires, ou *de novo*, sont pour la majorité non mutés pour les gènes *IDH*. Ces derniers, plus fréquents, ont fait l'objet de ce projet de thèse.

Les altérations présentes le plus fréquemment dans les GBM sont pour certaines des marqueurs diagnostiques, ou des altérations classiques des cancers. L'ensemble de ces altérations touche différentes voies de signalisations importantes dans la différenciation, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

i. Les altérations chromosomiques

D'un point de vue génétique, on observe souvent un gain du chromosome 7, et une monosomie du chromosome 10 (Figure 11) (Bigner et al., 1988; Crespo et al., 2011). Ces altérations chromosomiques sont associées à l'amplification des gènes tels que *EGFR* ou à la délétion du gène *PTEN* présents sur ces chromosomes.

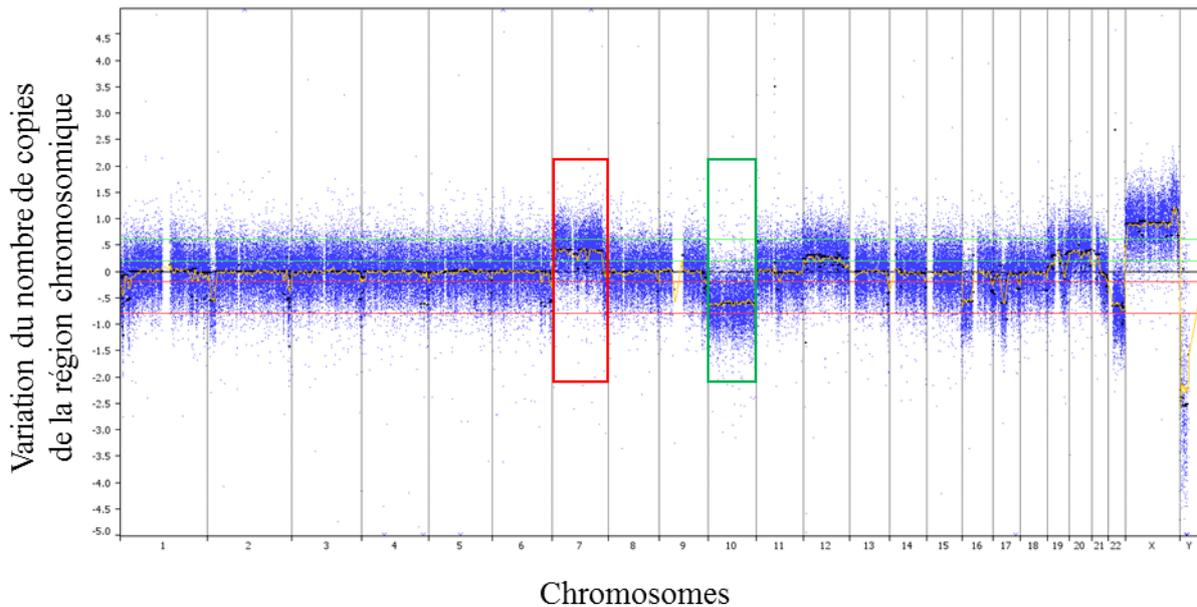


Figure 11 : Le profil chromosomique mesuré par CGH array d'un GBM.

Cette méthode permet de visualiser les amplifications et délétions (modification du nombre de copies des régions chromosomiques) sur l'ensemble du génome. L'amplification du chromosome 7 (encadré rouge) et la délétion d'un chromosome 10 (encadré vert) sont très fréquentes dans le GBM, et sont observables sur ce profil, contribuant à établir ce diagnostic.

ii. Les altérations des voies de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase RTK/RAS/PI-3K

La voie des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK)/RAS/PI-3K est altérée dans 88% des GBM (Figure 12a). En plus d'une amplification et surexpression du gène codant pour l'*EGFR* présente dans 45% des GBM, l'expression du variant EGFRvIII est détectée dans 40% des cas (Knobbe and Reifenberger, 2003; Reni et al., 2017; Wikstrand et al., 1997). Celui-ci est associé à la présence d'ADN double minutes qui sont de petits fragments d'ADN circulaires amplifiés en très grand nombre (Ludwig and Kornblum, 2017). Les amplifications des RTK *PDGFRA* et de *MET*, et la mutation activatrice de *ERBB2* sont aussi des altérations majeures activant cette voie de signalisation (Bello et al., 1994; Fischer et al., 1995; Knobbe and Reifenberger, 2003; Schlegel et al., 1994). Ces RTK activent des effecteurs sous-jacents qui

peuvent également être altérés. Parmi ces derniers, les protéines RAS et PI-3K peuvent présenter des mutations activatrices dans les GBM (Knobbe and Reifemberger, 2003; Knobbe et al., 2004). Ces deux effecteurs sont normalement inhibés respectivement par NF-1 et PTEN, dont la délétion ou la mutation inactivatrice lèvent ce frein dans des GBM. La transduction du signal par cette voie de signalisation induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire et la traduction permettant une production plus efficace de matériel protéique impliqué dans la croissance tumorale.

iii. Les altérations de la voie de signalisation de p53

La voie de signalisation de p53 est aussi altérée dans 87% de GBM (Figure 12b). p53 est une protéine majeure impliquée dans la tumorigénèse. Dans des cellules saines, son activation en réponse à des anomalies dans l'ADN et du cycle cellulaire induit la senescence et/ou l'apoptose. La perte de fonction (i.e. mutation ou la délétion) du gène de *p53* est présente dans 35% des GBM. Les amplifications de *MDM2* et *MDM4*, protéines inhibitrices de p53, sont impliquées dans 14% et 7% des GBM respectivement. La délétion ou la mutation de *CDKN2A*, protéine inhibitrice de MDM2, est quant à elle très fréquente avec une prévalence de 49% dans les GBM (Yin and Van Meir, 2009).

iv. Les altérations de la voie de signalisation RB

La voie de signalisation RB est elle aussi altérée dans 77% des GBM (Figure 12c). L'inhibition de la progression du cycle cellulaire en phase G1/S impliquant cette voie est levée. La protéine RB1, effectrice de cette voie, est délétée ou mutée dans 11% des cas (Bello et al., 1994). Les protéines qui inhibent RB1 sont aussi altérées, avec majoritairement une amplification de CDK4 (Ichimura et al., 1996). Le gène de la cycline D *CCND2*, impliquée dans la régulation du point de contrôle G1/S avec CDK4 est aussi parfois amplifié. La

dérégulation de ces deux partenaires entraîne la levée de ce point de contrôle du cycle cellulaire (Büschges et al., 1999). Ces protéines inhibitrices sont elles aussi inhibées par CDKN2A, CDKN2B et CDKN2C, dont la délétion est fréquente dans les GBM (Ichimura et al., 1996; Ueki et al., 1996).

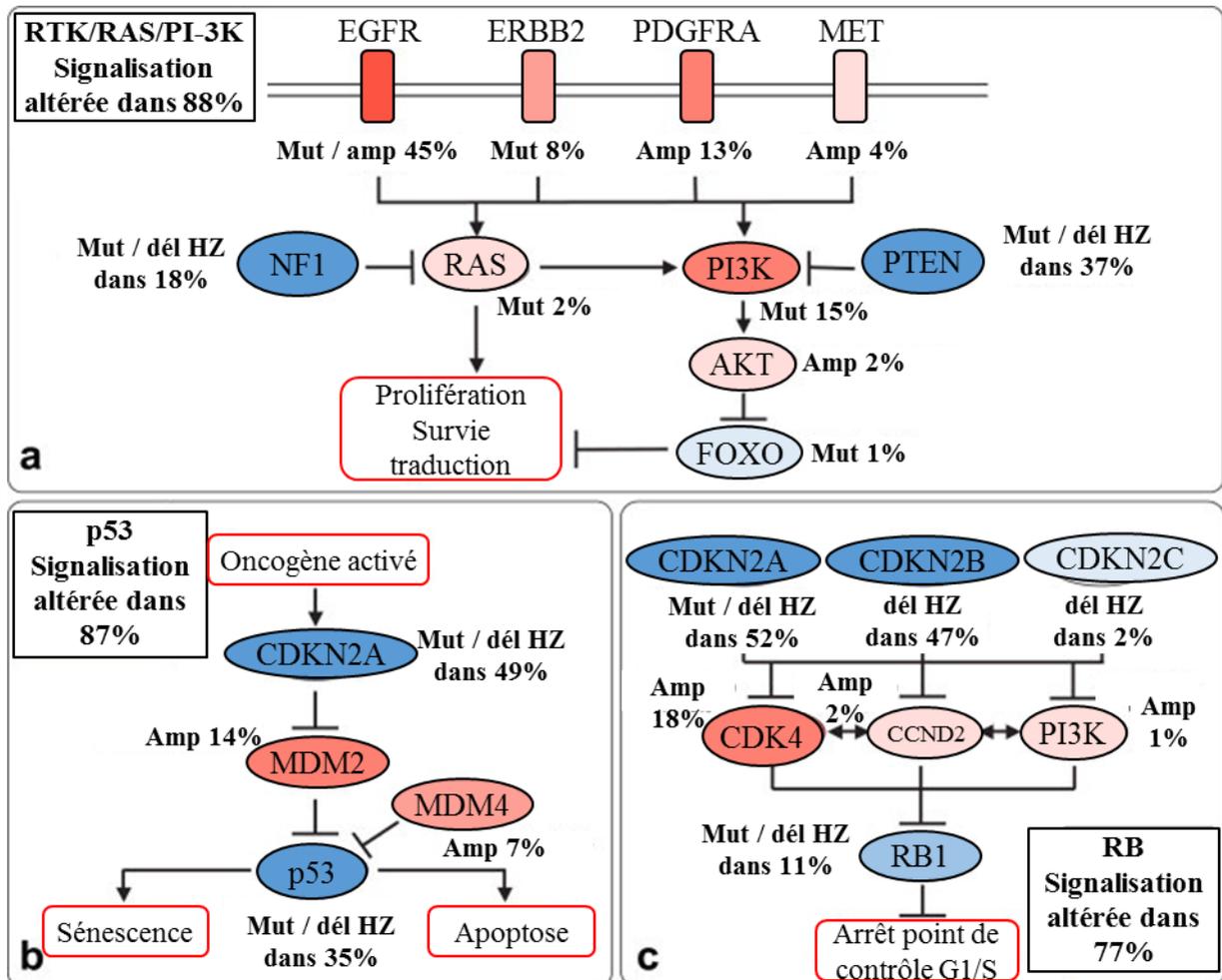


Figure 12 : Les altération majeures du GBM impliquées dans leur tumorigénèse.

Parmi ces altérations majeures dans le GBM, trois voies sont principalement altérées : la voie des récepteurs à tyrosine kinase/RAS/PI-3K, la voie de p53 et la voie RB. Mut : mutation du gène. Amp : amplification du gène. Del : délétion du gène. HZ : hétérozygote. adapté de (Van Meir et al., 2010).

v. Les processus d'immortalisation des cellules par élongation des télomères : implication de *TERT*

Des mutations du promoteur du gène *TERT* sont présentes dans 80% des GBM, permettant l'activation de l'expression cette télomérase. Ces mutations sont mutuellement exclusives avec les mutations du gène *ATRX*. Ce processus permettant d'étendre les télomères participe à l'immortalisation des cellules tumorales (Killela et al., 2013).

c) La sous classification des glioblastomes

Selon les altérations présentes dans une cellule tumorale, celle-ci va acquérir des caractéristiques différentes qui la rapprocheront phénotypiquement et génotypiquement de cellules normales du SNC (Tableau 3). Ainsi, 4 sous-types de GBM se distinguent :

- Le sous-type « classique » inclue les GBM les plus prolifératifs.
- Le sous-type mésenchymateux.
- Le sous-type pro-neural. Ce sous-type est prépondérant chez les jeunes patients.
- Le sous-type neural est moins bien défini. Le profil d'expression de ce sous-type est proche de celui du cerveau normal, avec une expression de marqueur neuronaux suggérant un phénotype différencié des cellules tumorales. Ces tumeurs ont la particularité de montrer une faible infiltration de cellules normales.

L'hypothèse a été émise que ces différents sous-types reflètent le type cellulaire duquel ils sont issus : lignage des astrocytes, neurones, oligodendrocytes et microglie (Van Meir et al., 2010).

Sous-type	Altérations communes
Classique	<p>Amplification du chromosome 7, délétion d'un chromosome 10 et délétion focale du locus 9p21.3 fréquents :</p> <p>Mutation/amplification/surexpression de <i>EGFR</i> (7)</p> <p>Délétion/mutation de <i>PTEN</i> (10)</p> <p>Délétion de <i>CDKN2A</i> (9p21.3)</p> <p>Peu d'altérations de <i>p53</i>, <i>NF1</i> et <i>PDGFRA</i></p> <p>Surexpression des marqueurs des cellules souches neurales et précurseurs neuraux</p> <p>Activation des voies NOTCH et Sonic Hedgehog</p>
Mésenchymateux	<p>Profil d'expression associé au mésenchyme et à l'angiogénèse : Surexpression des gènes <i>CHI3L1/YKL40</i>, <i>MET</i></p> <p>Expression de marqueurs astrocytaires : CD44, MERTK</p> <p>Expression des gènes de la super-famille du TNF associés à la voie de signalisation de NFκB</p> <p>Fréquence élevée d'inactivation de NF1, p53 et PTEN</p>
Neural	<p>Profil d'expression génique proche du cerveau sain, avec l'expression de marqueurs neuraux (phénotype différencié des cellules tumorales) : <i>NEFL</i>, <i>GABRA1</i>, <i>SYT1</i> et <i>SLC12A5</i></p> <p>Amplification et sur-expression du gène <i>EGFR</i></p>

Sous-type	Altérations communes
Proneural	Forte expression des gènes de développement oligodendrocytaire : <i>PDGFRA</i> , <i>OLIG2</i> , <i>TCF3</i> , <i>NKX2-2</i>
GBM secondaire (dérivé de gliomes de bas grade)	<p>Forte expression des gènes du développement proneural : <i>SOX</i>, <i>DCX</i>, <i>DLL3</i>, <i>ASCL1</i>, <i>TCF4</i></p> <p>Amplification fréquente de <i>PDGFRA</i></p> <p>Mutation d'<i>IDH</i> à 30%</p> <p>Mutation fréquente de <i>p53</i> et <i>PIK3CA</i> et <i>PIK3R1</i></p> <p>Amplification du chromosome 7 et délétion d'un chromosome 10 fréquente</p> <p>Activation fréquente des voies de signalisation de <i>PI-3K</i> et <i>HIF</i></p>

Tableau 3 : Les sous-type moléculaires de GBM.

Selon leur profil d'altérations, les GBM vont acquérir des caractéristiques différentes pouvant rappeler le profil moléculaire de différents types cellulaires du SNC. D'après ces altérations, les GBM peuvent alors être classés en différents sous-types. Adapté d'une figure de (Van Meir et al., 2010).

2. Les traitements actuels du glioblastome, un cas particulier complexe

Le traitement standard de première ligne des GBM inclue les trois modalités majeures de traitement des cancers. La résection chirurgicale vise à éliminer au maximum la tumeur. La radiothérapie vise à induire des dommages à l'ADN par des rayonnements afin que les erreurs de réplication et les mutations s'accumulent au point de conduire à un épisode de catastrophe mitotique et donc à la mort de la cellule tumorale qui ne pourra plus réguler son fonctionnement. La chimiothérapie vise à tuer les cellules tumorales par des agents chimiques cytotoxiques ciblant les étapes clés du cycle cellulaire qui est altéré dans les cancers.

Dans le cas du GBM, le protocole standard de première ligne a été développé par l'équipe du Pr Roger Stupp (Stupp et al., 2005), et inclue ces trois modalités :

- La résection chirurgicale maximale est effectuée lorsqu'elle est possible, en fonction de la localisation de la tumeur et des régions fonctionnelles cérébrales qui l'entourent. Cependant, le GBM étant une tumeur très invasive, il généralement est impossible de la réséquer totalement.
- Une radio-chimiothérapie est ensuite utilisée afin de traiter au-delà de la zone de résection et d'atteindre les cellules ayant envahi le cerveau autour de la tumeur. Une radiothérapie aux rayons X fractionnée à 2Gy quotidien est appliquée pendant 5 jours par semaine pendant 6 semaines pour un total de 60Gy. Elle est appliquée dans la zone de prise de contraste en imagerie IRM pondérée en T2 FLAIR (Figure 4). Elle est accompagnée d'une chimiothérapie concomitante au témozolomide (TMZ) à 75 mg par mètre carré de surface corporelle par jour, du début à la fin de la radiothérapie.

- Une chimiothérapie adjuvante au TMZ est ensuite poursuivie avec 6 cycles à 150-200 mg par mètre carré de surface corporelle par jour pour 5 jours / 28 jours par cycle.

Pour le traitement de seconde ligne, la résection est envisagée si elle est possible, et d'autres chimiothérapies peuvent être utilisées et notamment la Lomustine ou la Lomustine + Bevacizumab.

Le choix de la chimiothérapie est, dans le cas des GBM, soumis à des contraintes majeures incluant des limites imposées par l'organisation anatomique des tumeurs, mais aussi par des mécanismes de résistance aux chimiothérapies et de neurotoxicité. L'utilisation du TMZ dans le traitement standard peut être considérée comme un choix par défaut car il répond au mieux à ces contraintes. La nature et l'impact de ces mécanismes de résistance sur les traitements chimiothérapeutiques sont décrits dans la section suivante.

D. La résistance aux chimiothérapies dans le glioblastome

De nombreux mécanismes de résistance aux chimiothérapies existent dans le GBM et sont détaillés ci-dessous. Dans ce projet, je me suis intéressé particulièrement à deux mécanismes : l'expression des transporteurs ABC impliqués dans l'efflux des chimiothérapies et la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui feront l'objet d'une attention particulière au sein de ce chapitre.

1. Les mécanismes de résistance moléculaire intrinsèque du glioblastome

a) L'efflux

Des protéines transmembranaires sont capables de prendre en charge des molécules dans le cytoplasme et de les transporter activement hors de la cellule. L'expression des pompes d'efflux par les cellules tumorales peut réduire la disponibilité intra-cellulaire des chimiothérapies, réduisant ainsi leur action. Le rôle des transporteurs ABC dans ce processus est décrit plus en détail dans la section D.2. dédiée.

b) L'inactivation enzymatique des agents chimiothérapeutiques

Les chimiothérapies peuvent aussi être inactivées par des processus enzymatiques. Certaines chimiothérapies telles que la cytarabine sont des pro-drogues qui, pour devenir actives, ont besoin d'être prises en charge par des voies métaboliques. Des altérations dans ces voies peuvent alors altérer leur efficacité, et les rendre inefficaces.

Il existe d'autres processus pouvant réduire ou inhiber l'activité des chimiothérapies par une conversion de ces dernières en métabolites inactifs. Plusieurs familles enzymatiques sont impliquées, telles que le système cytochrome P450, les superfamilles de la glutathione-S-

transférase et de l'uridine diphospho-glucoronosyltransférase. Ces différents systèmes peuvent être altérés dans les cancers, conduisant à une élimination accrue des chimiothérapies (Iyer and Ratain, 1998). Le système des cytochromes P450 est très impliqué dans la détoxification et la protection du cerveau, en particulier par l'expression de plusieurs protéines de cette famille dans les vaisseaux sanguins cérébraux dont le rôle protecteur particulier majeur est décrit plus loin dans ce manuscrit. Il intervient donc dans la résistance des cellules de GBM.

c) La modification de la cible des chimiothérapies

La modification des cibles des chimiothérapies peut aussi rendre les cellules résistantes. Pour les chimiothérapies qui interagissent avec des protéines - *e.g.* les inhibiteurs de topoisomérase ou les thérapies ciblées – des mutations peuvent altérer le site d'interaction entre la chimiothérapie et sa protéine cible conduisant à la perte de l'interaction et donc de l'efficacité.

Dans le GBM, l'utilisation majoritaire des agents alkylants ne permet pas ce mécanisme, car la cible étant l'ADN, elle ne peut être modifiée.

Cependant, de tels mécanismes peuvent apparaître pour des traitements de seconde ligne. Par exemple, les cellules exposées à l'irinotecan peuvent acquérir une résistance à cette chimiothérapie (Liao et al., 2008). Parmi les mécanismes de résistance décrits pour cette chimiothérapie dans les cancers on retrouve la baisse d'expression de la topoisomérase 1, ou sa mutation limitant son interaction avec l'irinotecan (Xu and Villalona-Calero, 2002). Une forte implication de l'efflux est aussi décrite, mais également des mécanismes de réparation de l'ADN détaillés dans la section suivante (Xu and Villalona-Calero, 2002). Dans le cas du GBM, il a

été montré que la baisse d'expression de la topoisomérase 1 est impliqué dans une résistance acquise à l'irinotecan (Liao et al., 2008).

d) La réparation des dommages à l'ADN causés par les traitements

Beaucoup de chimiothérapies – *e.g.* les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérase - agissent par l'induction de dommages à l'ADN qui en s'accumulant conduiront un événement de catastrophe mitotique et à l'activation de l'apoptose. Des altérations des voies de réparation de l'ADN peuvent alors conduire au développement d'une résistance à ces familles de chimiothérapies.

La O6-méthylguanine DNA methyltransferase (MGMT) est une enzyme de réparation de l'ADN qui répare les O⁶méthylation sur les bases guanines qui sont induits par le mécanisme d'alkylation du TMZ ou d'autres agents alkylants. La déméthylation du promoteur de MGMT conduisant à la hausse d'expression de cette protéine est aujourd'hui reconnue comme marqueur pronostique dans le GBM. Cela est dû au fait que le traitement de première ligne implique l'utilisation de TMZ (Figure 13). La méthylation du promoteur de MGMT peut être le reflet d'un profil de méthylation généralement altéré dans la tumeur, ou liée à une dérégulation des facteurs de transcription (Kim et al., 2016).

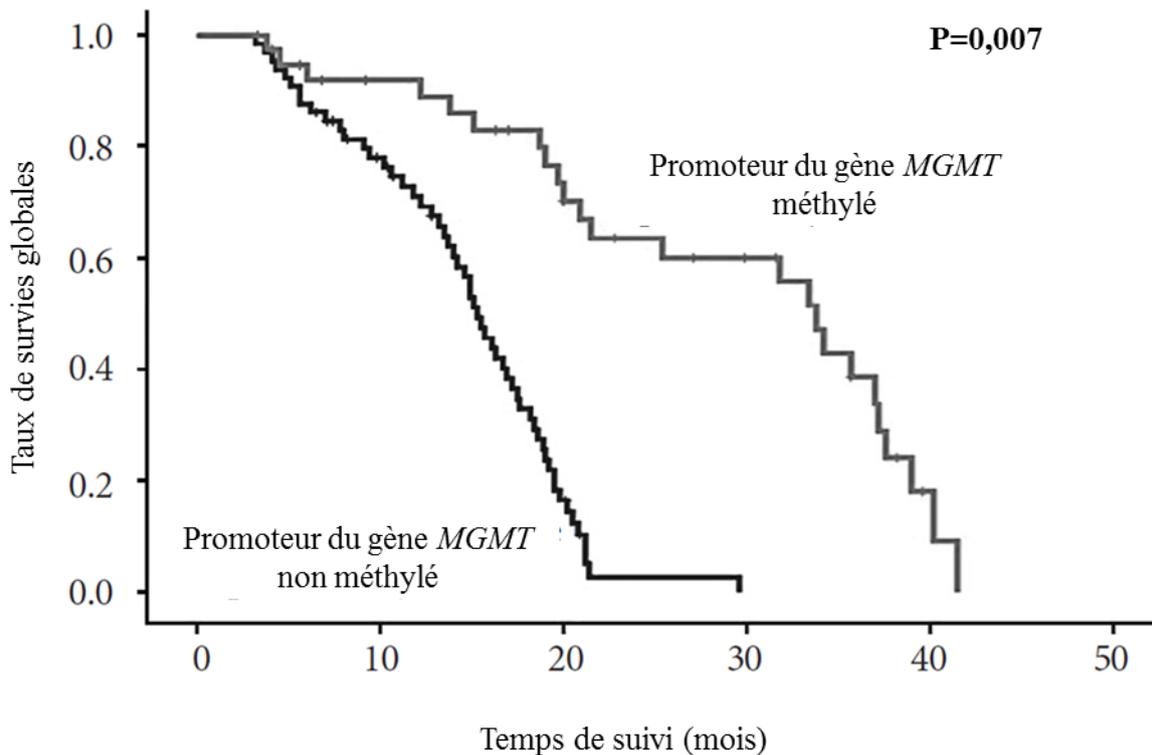


Figure 13 : L'impact de la méthylation du promoteur de MGMT sur la survie des patients atteints de GBM.

L'absence de méthylation du promoteur de MGMT conduit à l'expression de ce gène. L'augmentation d'expression de MGMT va alors conduire à une augmentation de la réparation des alkylations produites par le TMZ sur l'ADN. Ainsi, les patients présentant cette altération du promoteur de MGMT présenteront une résistance au TMZ, et un moins bon pronostic. La méthylation du promoteur a été mesurée par la méthode MSP. Adapté de (Kim et al., 2016).

De façon similaire, d'autres mécanismes intervenant dans la réparation de l'ADN peuvent subir des modifications dans le GBM.

Il a été montré que des mutations inactivatrices de MSH6, qui joue un rôle dans le système de réparation des mésappariements (MMR), étaient impliquées dans la résistance au TMZ (Hunter et al., 2006). Par cette inactivation, les alkylations de l'ADN induites par le TMZ et autres agents alkylants ne sont plus détectées et prises en charge par les mécanismes de réparation. Ainsi, l'inactivation de cette voie de réparation supprime les mécanismes d'arrêt du

cycle cellulaire sous-jacent et contribue à l'accumulation d'erreurs et de mutations (Figure 14) (Hunter et al., 2006).

Le mécanisme de réparation MMR conduit à la coupure simple brin de l'ADN pour exciser la base alkylée. Cette cassure va conduire à l'activation de complexes de réparation qui remplaceront alors le nucléotide excisé. La voie du complexe de l'anémie de Fanconi est impliquée dans ce processus. Son activation contribue à augmenter la réparation de l'ADN alkylé et limite donc son impact (Chen et al., 2007). Le mécanisme MMR peut aussi conduire à la formation de cassures doubles brins. Celles-ci peuvent être réparées par deux voies : la voie de recombinaison homologue et la voie de la jonction d'extrémités non homologues. la première de ces voies fait intervenir la protéine RAD51, dont l'expression élevée contribue à augmenter la réparation de l'ADN et réduit la sensibilité au TMZ (Figure 14) (Zhang et al., 2012). Paradoxalement, sa forte expression est un bon pronostic pour les patients en rechute (Welsh et al., 2009).

Certaines alkylations peuvent aussi être détectées et réparées par la voie de réparation par excision de base. Il a été montré que l'expression de *MPG* (N-méthylpurine-DNA glycosylase), responsable de l'activation de cette voie, était augmentée dans le GBM, contribuant à réparer ces alkylations et à en limiter l'impact (Figure 14) (Kim et al., 2003).

D'un point de vue physique, les rayonnements utilisés par la radiothérapie conduisent à la formation de cassures de l'ADN. Les cassures simple brin sont détectées par la protéine PARP, qui pourra alors activer la voie de réparation de l'ADN par excision de base. Les cassures double brin induites par ces rayonnements ont plus d'impact sur l'efficacité de la radiothérapie. Le système de réparation par excision intervient aussi pour réparer les dommages à l'ADN

induits par le TMZ dans le traitement du GBM. Des activations excessives de ces voies sont également impliquées dans le développement de phénotypes résistants dans le GBM. La voie de réparation des cassures double brin par la jonction d'extrémités non homologues se divise elle-même en deux mécanismes : la voie canonique faisant intervenir les protéines KU70 et KU80, et la voie alternative faisant intervenir les protéines PARP (Figure 14). Il a été démontré qu'une baisse d'expression de KU70 induit une radio-sensibilisation de lignées de GBM en culture (Li et al., 2011). Cependant, la stratégie privilégiée pour augmenter la sensibilité des cellules tumorales et lever ces mécanismes de réparation est d'utiliser des inhibiteurs de PARP (Karpel-Massler et al., 2014; Lesueur et al., 2018).

Les kinases ATM et ATR ont un rôle de senseur des dommages à l'ADN, étant respectivement activées par les cassures doubles brins et simple brin de l'ADN. Lorsqu'elles sont activées, ATM et ATR vont activer des facteurs effecteurs sous-jacents. Les mutations inactivatrices et les délétions de ces deux protéines augmentent la sensibilité des cellules au TMZ (Eich et al., 2013). Via l'activation de p53, CHK1 et CHK2, ATM est normalement impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire aux points de contrôle G1/S et intra-S. Quant à ATR, il intervient dans les points de contrôle intra-S et G2/M via l'activation de CHK1. L'activation d'ATM et ATR peut aussi intervenir lors des processus de réparation d'altérations induites par le TMZ (Eich et al., 2013; Weber and Ryan, 2015).

L'activation des points de contrôle du cycle cellulaire induite par la détection de dommages à l'ADN ou d'erreurs dans la séquence conduit à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'apoptose, mais aussi de la réparation de l'ADN. Dans le cas d'une levée des voies pro-apoptotiques ou d'arrêt du cycle cellulaire telles que discutées dans le paragraphe suivant, les voies de réparations permettent de rendre les cellules résistantes aux dommages à l'ADN.

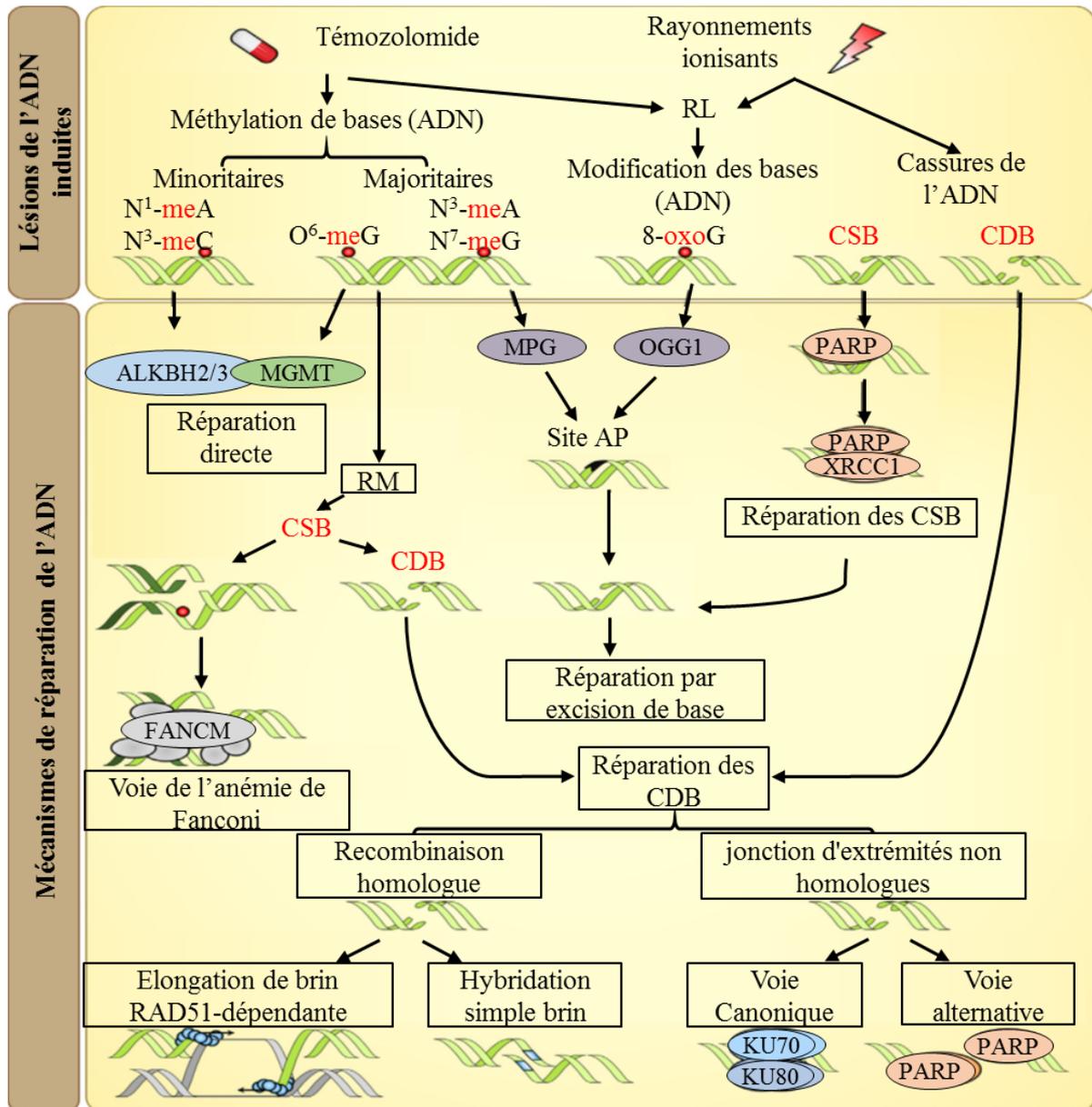


Figure 14 : Les mécanismes de réparation de l'ADN impliqués dans des mécanismes de résistance aux chimiothérapies et à la radiothérapie.

Le TMZ agit par l'ajout de groupements alkyles sur l'ADN. Ces alkylations peuvent être prises en charge par des voies de réparation de l'ADN. Cette réparation peut impliquer l'excision du nucléotide dont la base est alkylée conduisant à la formation de cassures dans l'ADN. Ces cassures pourront alors être réparées. La radiothérapie conduit elle aussi à la formation de cassures de l'ADN, qui pourront elle aussi être prises en charge dans des processus de réparation. L'ensemble de ces processus de détection des erreurs et de réparation peuvent être altérés dans le GBM, conduisant à des résistances aux agents alkylants (dont le TMZ) et à la radiothérapie. (Erasmus et al., 2016).

e) L'inhibition des voies pro-apoptotiques et d'arrêt du cycle cellulaire

L'inhibition des voies de mort cellulaire comme l'apoptose ou celles impliquant l'autophagie fait partie des processus oncogéniques possibles pour induire la transformation oncogénique d'une cellule. Au-delà de ce rôle oncogénique, ces altérations peuvent contribuer à la résistance des cellules tumorales aux chimiothérapies. Il a été démontré que la levée de l'inhibition de ces voies permettait de restaurer la sensibilité aux chimiothérapies des cellules tumorales résistantes.

Il a été montré que la voie ATM/CHK2/p53 jouait un rôle majeur de suppresseur de tumeur dans le cerveau (Weber and Ryan, 2015). De façon générale, les altérations de la voie p53 sont très fréquentes dans les GBM. De même, la voie de RB1 est régulièrement altérée dans le GBM (Figure 12). L'altération de ces voies pro-apoptotiques réduit alors la sensibilité aux traitements radiothérapeutiques et chimiothérapeutiques par la perte de cette réponse aux dommages à l'ADN causés par ces traitements. La réactivation de ces voies va alors induire un scénario de catastrophe mitotique face à l'accumulation de dommages à l'ADN induite par les traitements, conduisant à l'activation des voies apoptotiques.

f) L'hétérogénéité tumorale

L'hétérogénéité tumorale est l'un des grands enjeux actuels dans le traitement des cancers. Au cours de la biogénèse des tumeurs, un grand nombre de mutations apparaissent et s'accumulent. Apparaissent alors plusieurs lignages de cellules selon leurs mutations. Certaines mutations vont apparaître très tôt dans la biogénèse de la tumeur (mutations « driver »), d'autres vont apparaître plus tardivement, mais dans différentes cellules. Ainsi, sur la tumeur, les mutations « driver » seront présentes dans toutes les cellules, mais les mutations tardives varieront d'une cellule à l'autre. Une « phylogénie » va alors apparaître dans la tumeur similaire

à un processus évolutif Darwinien. Ces profils mutationnels variables d'une cellule à l'autre vont conduire à une hétérogénéité des cellules tumorales, mais aussi des profils de sensibilité aux chimiothérapies. Ainsi, lors d'un traitement chimiothérapeutique, l'élimination d'un sous-type de cellules verra émerger un autre sous-type minoritaire qui pourra alors conduire à une rechute. Ce principe est d'autant plus important dans les thérapies ciblées, dont le choix du traitement dépend des mutations détectées chez les patients. L'identification des mutations « driver » est alors requise pour éliminer la tumeur au maximum sans risquer de voir émerger une population résistante (Sottoriva et al., 2013).

g) La différenciation des cellules tumorales

Une modification du phénotype des cellules tumorales peut conduire au développement de résistances. Au cours du développement d'une tumeur, certaines cellules vont suivre des processus modifiant leur comportement. Au sein des tumeurs, des cellules présentent un profil de cellules « souches ». Ces cellules dites « souches tumorales » sont capables d'auto-renouveaulement et ont un impact fort sur la récurrence tumorale. Cette population de cellules, identifiée dans plusieurs cancers dont le GBM présente une forte résistance aux chimiothérapies en partie due à une expression accrue de pompes d'efflux. De plus, le profil souche des cellules s'apparentant à une dédifférenciation, ces dernières réduisent leur sensibilité aux chimiothérapies qui agissent plus efficacement sur les cellules tumorales plus différenciées dont la prolifération excessive est la cible (Beier et al., 2011; Eramo et al., 2006).

2. Les transporteurs ABC dans l'efflux des chimiothérapies

La famille protéique des transporteurs ATP Binding Cassette (ABC) regroupe les gènes de 49 protéines transmembranaires ayant la capacité de prendre en charge de nombreuses

molécules présentes dans un compartiment cellulaire, et les transporteurs activement dans un autre grâce à l'hydrolyse d'ATP (Figure 15).

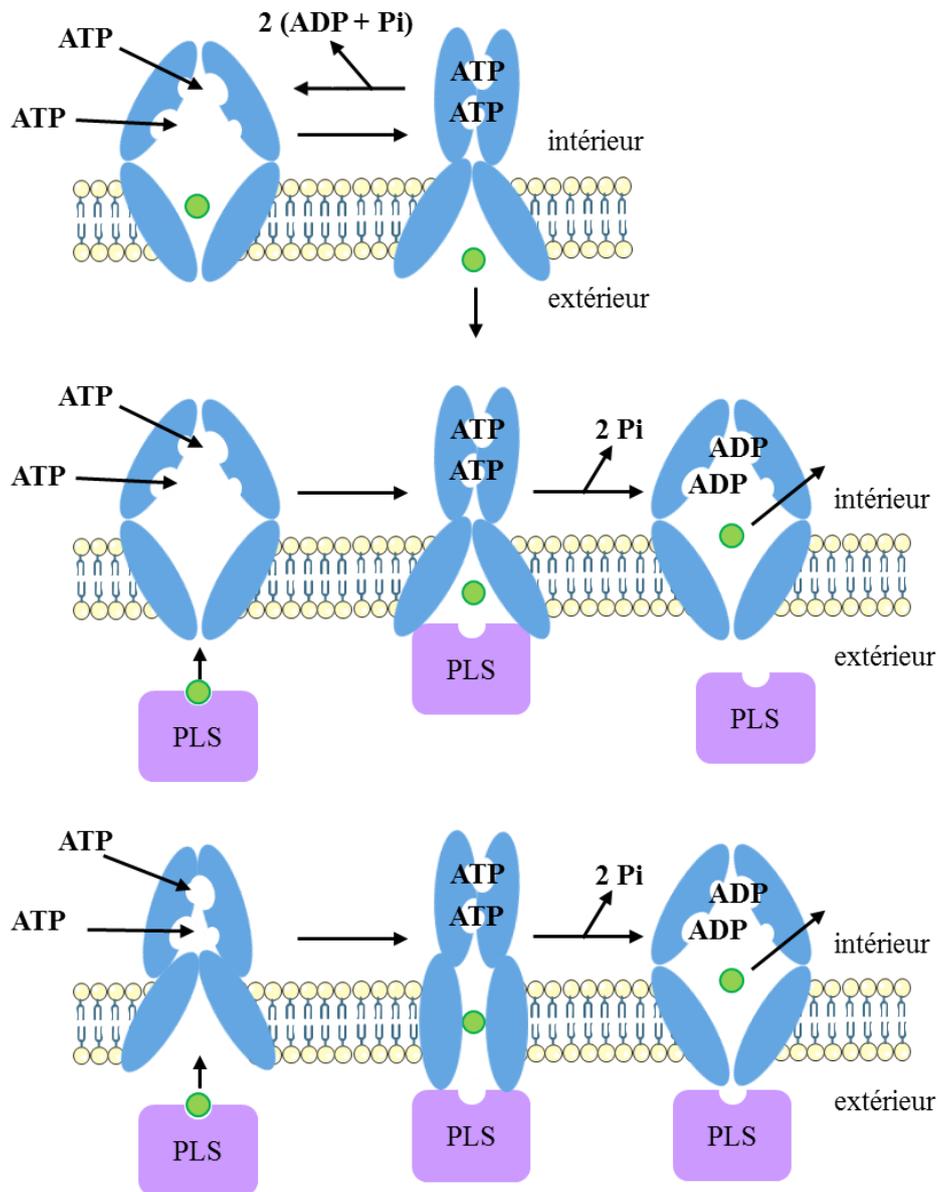


Figure 15 : La structure et le fonctionnement des transporteurs ABC.

Les transporteurs ABC sont des protéines transmembranaires capables de prendre en charge un substrat dans un compartiment cellulaire, puis de le transporter activement dans un autre compartiment cellulaire, ou hors de la cellule. Cette prise en charge peut nécessiter la liaison au préalable du substrat à une protéine de liaison au substrat (PLS). Ce transport actif requiert l'hydrolyse d'ATP pour apporter l'énergie nécessaire à ce transport. trois mécanismes existent, en fonction de l'utilisation de PLS et de la structure du transporteur. Adapté de (Wilkins, 2015).

Plusieurs transporteurs ABC sont impliqués dans l'efflux de chimiothérapies hors des cellules. ABCB1 aussi connu sous le nom de glycoprotéine P (P-gp), et ABCG2 aussi connu sous le nom de BCRP (Breast Cancer Resistance protein) sont les pompes d'efflux les plus étudiées. Les protéines MRP (multidrug resistance protein) dans le sous-groupe C des transporteurs ABC ont aussi un rôle très important dans l'efflux de chimiothérapies (Vasiliou et al., 2009). Chacune de ces protéines a un spectre large de substrats permettant un efflux des cellules d'un nombre important de molécules dont beaucoup de chimiothérapies (Figure 16, Tableau 4). L'expression de ces transporteurs est normale dans certains organes comme les intestins, le foie, les reins ou le cerveau pour permettre de protéger le corps des molécules extérieures toxiques. Cela se fait en les empêchant d'entrer dans le corps ou l'organe protégé, ou en permettant leur élimination (Hartz and Bauer, 2011; Hilgendorf et al., 2007; Leslie et al., 2005). Les tumeurs qui se développent dans ces tissus peuvent alors garder ces propriétés de résistance. L'expression de ces transporteurs peut aussi augmenter dans des cellules tumorales, parfois induite par l'exposition à une chimiothérapie. Cela peut même arriver dans des tissus qui les expriment peu (*e.g.* ABCB1 dans des cancers du poumon), montrant que cette forme de résistance peut être acquise (Abolhoda et al., 1999). La Pgp (ABCB1), BCRP (ABCG2) et MRP1 (ABCC1) sont les plus impliqués dans le développement de ces phénotypes résistants dans de nombreux cancers (Vander Borgh et al., 2008; Yang et al., 2010; Yoh et al., 2004). Il est important de noter que certains transporteurs ABC ont un impact sur la survie des patients dans différents cancers, sans pour autant être impliqués dans l'efflux de chimiothérapies. Par exemple, le transport des lipides tels que le cholestérol, qui est crucial dans le développement des tumeurs, implique des transports actifs faisant beaucoup intervenir des transporteurs de la famille ABCA (Davis et al., 2004; Lee et al., 2013; Sato et al., 2007; Smith and Land, 2012; Vasiliou et al., 2009). Des molécules de signalisation lipidiques tels que la sphingosine-1-

phosphate, les prostaglandines et les leucotriènes qui modulent le système immunitaire, induisent l'angiogenèse et dérèglent les mécanismes de l'apoptose et de l'inhibition de la prolifération sont aussi activement transportés par des transporteurs de la famille ABCC et ABCA (Harris et al., 2002; Ihara et al., 2007; Kimura et al., 2000; Lee et al., 1999; Mezhybovska et al., 2006; Sato et al., 2007; Vasiliou et al., 2009; Yu et al., 2015). ABCB1, ABCC1, ABCC4 et ABCG2 ont montré un rôle dans les systèmes de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose indépendamment d'efflux de chimiothérapies (Bhattacharya et al., 2007; Ihara et al., 2007; Kuss et al., 2002; Pallis and Russell, 2000; Peaston et al., 2001; Robinson et al., 1997; Sassi et al., 2008; Sato et al., 2007). La migration, l'invasion et le processus métastatique sont aussi influencés par des transporteurs ABC tels qu'ABCB1, ABCC1 et ABC4 (Colone et al., 2008; Yu et al., 2015; Zöchbauer-Müller et al., 2001).

Dans le SNC, l'expression de ces transporteurs ABC par de nombreux types cellulaires contribue à la protection des neurones et au maintien de l'homéostasie du cerveau (Hartz and Bauer, 2011). Le profil d'expression de cette large famille protéique des transporteurs ABC est cependant peu documenté dans le GBM, mais est en faveur d'un efflux important de par l'expression important de ces transporteurs dans le cerveau (Housman et al., 2014).

Concernant le TMZ, utilisé pour le traitement du GBM, il n'est jamais décrit comme étant substrat de pompes d'efflux (Kunjachan et al., 2013). En réalité, quelques études tendent à montrer qu'il est un substrat des pompes ABCB1 et ABCG2 (Goldwirt et al., 2014). La surexpression de ces transporteurs, ainsi que leur polymorphisme (*e.g.* substitution C1236T de ABCB1 de bon pronostic) vont modifier la réponse des patients atteints de GBM au TMZ (Schaich et al., 2009).

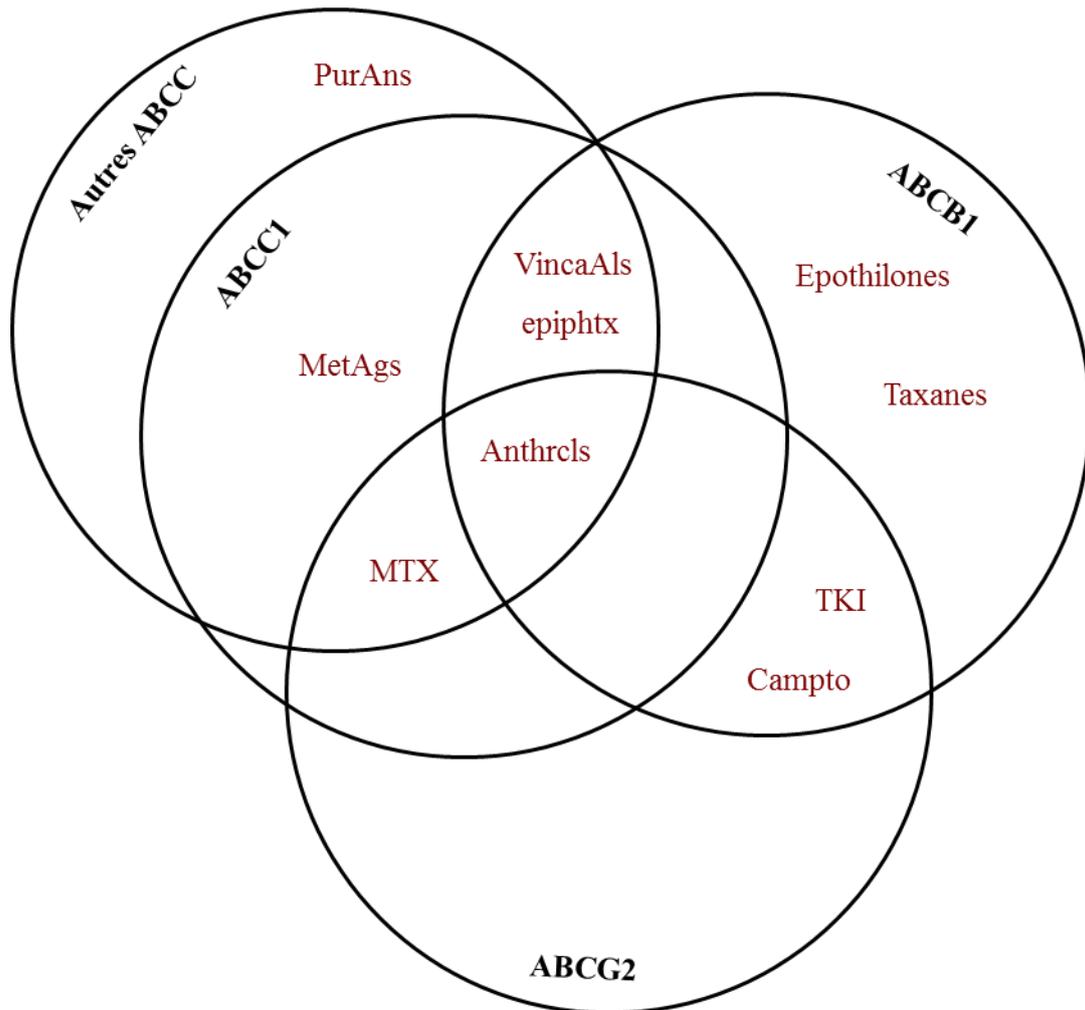


Figure 16 : Les chimiothérapies substrates des pompes d'efflux majeures.

Les transporteurs ABC peuvent prendre en charge et effluer hors des cellules de nombreuses chimiothérapies. Chaque transporteur ABC peut prendre en charge plusieurs chimiothérapies, et une chimiothérapie peut être prise en charge par plusieurs transporteurs ABC. Anthrcls: anthracyclines, Campto: camptothécine, EpiphTx: épipodophyllotoxines, MetAgs: agents méthylants, MTX: méthotrexate, PurAns: analogues aux purines, TKIs: inhibiteurs de tyrosine kinase, VincaAls: vinca alcaloïdes. Adapté de (Kunjachan et al., 2013).

	Antimétabolites	Agents alkylants	Antibiotiques antinéoplasiques	Anthracyclines	Inhibiteurs de topoisomérase	Autres	Anti-mitotiques		Inhibiteurs de tyrosine kinase
							Taxanes et epothilones	Vinca-alcaloïdes	
ABCB1			Mitoxantrone	Plusieurs molécules	Plusieurs molécules	Actinomycine-D	Plusieurs molécules	Plusieurs molécules	Plusieurs molécules
ABCC1	Méthotrexate	Agents méthylants (chlorambucil, melphalan)		Plusieurs molécules	Etoposide			Vincristine	
ABCC2	Méthotrexate				SN-38 (métabolite actif de l'irinotecan)			Vinblastine	
ABCC3	Méthotrexate				Etoposide				
ABCC4	Nucléosides monophosphates								
ABCC5	Nucléosides monophosphates								
ABCG2	Méthotrexate		Mitoxantrone	Plusieurs molécules	Plusieurs molécules				Plusieurs molécules

Tableau 4 : Les chimiothérapies substrates des pompes d'efflux majeures.

Les transporteurs ABC peuvent prendre en charge et effluer hors des cellules de nombreuses chimiothérapies. Chaque transporteur ABC peut prendre en charge plusieurs chimiothérapies, et réciproquement. « Plusieurs molécules » indique que plusieurs membres de la famille de chimiothérapie sont substrats. D'après les informations décrites par (Kunjachan et al., 2013; Sparreboom et al., 2003).

3. Les barrières physicochimiques du système nerveux central

a) Les barrières saines entre le sang, le parenchyme cérébral, les méninges et le liquide céphalorachidien

Les neurones ont un rôle majeur pour les fonctions du corps humain. Associée à leur extrêmement faible renouvellement, leur protection est primordiale. Leur dépendance au glucose requiert aussi un contrôle efficace de l'homéostasie du cerveau. Ces fonctions sont assurées par plusieurs barrières cérébrales. La BHE est une spécificité des vaisseaux sanguins du SNC qui isole le cerveau du sang afin de protéger le cerveau de toute molécule potentiellement toxique, tout en assurant l'apport de nutriments pour préserver l'homéostasie du cerveau. A l'exception des organes circumventriculaires, la BHE protège le cerveau des molécules non nécessaires présentes dans le sang. Au niveau des méninges, des plexus choroïdes et des ventricules, des barrières sang-liquide céphalorachidien (LCR) et cerveau-LCR complètent cette protection. Ces différentes barrières constituent donc un frein à l'efficacité des chimiothérapies dans le traitement des tumeurs cérébrales, car pour la plupart, elles ne passent pas au travers.

Le fonctionnement de ces barrières, leur spécificité, les mécanismes de passage physiologiques en particulier de la BHE, l'impact de ces barrières sur la pénétration cérébrale des chimiothérapies ainsi que les données de passage pour plusieurs chimiothérapies sont détaillés dans la revue "Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma" publiée en 2016 dans Expert Review of Neurotherapeutics (Dréan et al., 2016), et intégrée dans la section IV.A.1.

b) La barrière hémato-encéphalique dans le glioblastome : la barrière hémato-tumorale

La prise de contraste du corps de la tumeur et non du cerveau sain en IRM pondérée en T1 avec injection de gadolinium est liée au passage de cet agent de contraste du sang vers la tumeur alors que celui-ci ne passe pas la BHE saine. Ce constat suggère l'existence d'une altération de la BHE dans la tumeur, qui prend alors des caractéristiques particulières de barrière hémato-tumorale (BHT). Il est important de noter que même si la BHE est altérée dans le corps de la tumeur, elle n'est pas complètement ouverte. La pénétration des chimiothérapies est donc augmentée, mais pas autant qu'en absence totale de BHE. De plus, les cellules tumorales présentes hors de la zone d'altération de la BHE sont toujours protégées. Elles sont donc source de récurrence, et doivent être atteintes par les traitements (Dubois et al., 2014a; Sarkaria et al., 2017). C'est pour cette raison que le traitement par radiothérapie est étendu jusqu'à la zone de prise de contraste en IRM pondéré en T2 avec séquence FLAIR, et que l'utilisation de chimiothérapies capables de passer la BHE est nécessaire pour éliminer au maximum les cellules tumorales (Figure 4).

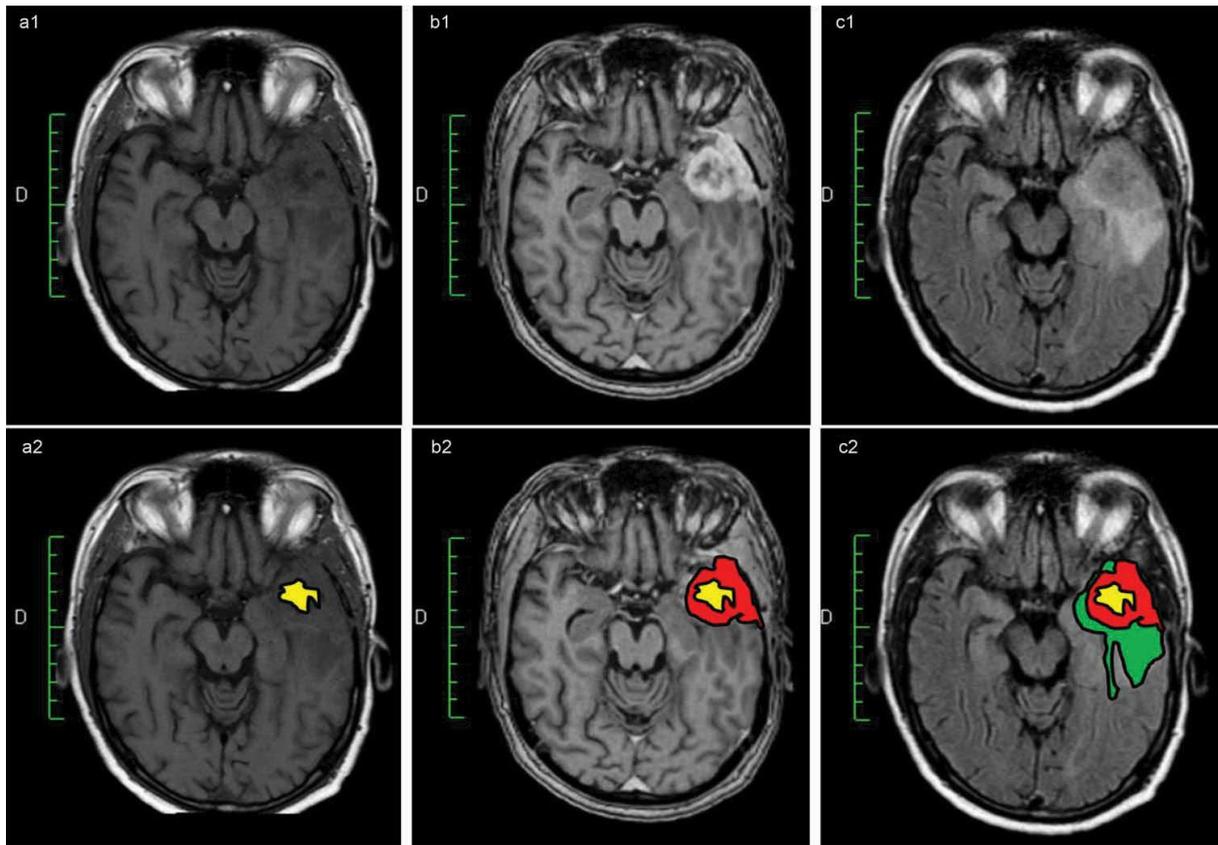


Figure 4 : L'imagerie IRM d'un GBM temporal gauche.

Panel A1 : imagerie IRM pondérée en T1. Panel A2 : la zone nécrotique centrale est colorée en jaune. Panel B1 : imagerie IRM pondérée en T1 avec prise de contraste au gadolinium. Panel B2 : la zone de prise de contraste colorée en rouge correspond à la zone proliférative de la tumeur, ou la BHE est altérée. Panel C1 : imagerie IRM pondérée en T2 FLAIR. Panel C2 : la zone colorée en vert correspond à une zone d'œdème vasogénique dans laquelle des cellules tumorales sont présentes, mais où la BHE est intacte. (Dréan et al., 2016).

Plusieurs acteurs interviennent dans l'évolution de la BHE en BHT : (i) les cellules de GBM, (ii) la matrice extracellulaire (MEC), (iii) les cellules non tumorales - *i.e.* astrocytes, péricytes, oligodendrocytes, cellules endothéliales, neurones -, (iv) la mort cellulaire et la nécrose (v) les cellules immunitaires inflammatoires -*i.e.* microglie, macrophages, monocytes, neutrophiles, éosinophiles - (Figure 17).

(i) Les cellules de GBM sécrètent un grand nombre de facteurs solubles (*e.g.* SDF-1, IL-6, VEGF, bFGF, SDF1, HGF:SF, PDGF, HDGF, GM-CSF, CXCL12, CXCL8, TNF α) ayant différents rôles : un rôle pro-angiogénique pour répondre aux besoins de la tumeur malgré l'hypoxie ou un rôle de modulation de l'inflammation pour échapper au système immunitaire et le détourner à son avantage (Curran and Bertics, 2012; Reynés et al., 2011; Schneider et al., 2004; Thirant et al., 2013). Dans la BHT, les vaisseaux sanguins ont une organisation anarchique, désorganisée, sinueuse. Ils sont de formes et dimensions irrégulières, et fenestrés - avec des cellules endothéliales non jointives - présentant donc une perméabilité augmentée par rapport à la BHE (Dubois et al., 2014a; Hillen and Griffioen, 2007). Ces imperfections sont provoquées par l'influence de la tumeur par la désorganisation des partenaires et signaux de la BHE, l'induction d'une angiogenèse imparfaite et l'activation des processus inflammatoires. L'angiogenèse, afin de répondre aux besoins des cellules en nutriments et oxygène, va conduire les cellules endothéliales à une dédifférenciation pour permettre leur prolifération. De plus, des cellules tumorales avec un profil souche peuvent fusionner avec des cellules endothéliales ou les mimer, voir même se trans-différencier en cellules remplissant les fonctions des cellules endothéliales ou des péricytes. Ces cellules contribuent à former des vaisseaux de mauvaise qualité, augmentant ainsi la perméabilité des vaisseaux de la BHT (Cheng et al., 2013; Dong et al., 2011; El Hallani et al., 2014; Hillen and Griffioen, 2007; Ricci-Vitiani et al., 2010). Les cellules de GBM sécrètent aussi de l'urotensine II, et expriment son récepteur UT. La stimulation autocrine qui en résulte est en faveur de l'invasion du parenchyme cérébral par la stimulation des voies de l'adhérence et la migration des cellules tumorales. L'urotensine a aussi un effet vasoconstricteur sur les vaisseaux sanguins (Lecointre et al., 2015).

(ii) La dérégulation de la BHT passe beaucoup par des altérations de la MEC (Figure 17) (Dubois et al., 2014a). La MEC contribue à l'intégrité des vaisseaux mais aussi aux interactions entre les différents types cellulaires de la BHE. La MEC est régulée par la balance entre l'expression des métalloprotéinases (MMP-1-3, MMP-9, et la famille ADAM/ADAMTS) qui peuvent la dégrader et celle de leurs inhibiteurs (TIMP-1-4). Cette balance est régulée en partie par les facteurs tPA et uPA impliqués dans la fibrinolyse. L'expression de ces facteurs est augmentée dans le GBM. Il en résulte un déséquilibre de la balance MMP/TIMP en faveur des MMP. Les MMP vont alors dégrader les protéines de la MEC (*e.g.* collagène, élastine, laminine, fibronectine, perlecan, agrine), les protéines impliquées dans d'adhérence cellulaire (*e.g.* dystroglycan, cadhérines, intégrines), et les protéines des jonctions serrées (*e.g.* claudine-5, occludines). Cette dégradation va entraîner un flux incontrôlé d'eau du sang vers le parenchyme cérébral formant un œdème vasogénique. Enfin, la dégradation de la MEC conduit à la libération des facteurs solubles bloqués dans la MEC après leur sécrétion, et qui pourront alors agir sur la BHT (Candelario-Jalil et al., 2009; Cuadrado et al., 2008; Goh et al., 2005; Lee et al., 2007; Noell et al., 2012; Pullen et al., 2012; Rocks et al., 2008; Rosenberg and Yang, 2007).

(iii) Le remodelage du parenchyme cérébral induit par la présence des cellules tumorales va désorganiser la population de cellules normales de l'unité neuro-vasculaire, et contribuer à altérer la BHE (Figure 17).

Par un encombrement stérique du parenchyme cérébral causé par la présence en grand nombre de cellules tumorales, la diminution du nombre de cellules saines de l'unité neuro-

vasculaire va induire une réduction des signaux pro-imperméabilité pour la BHE (Lee et al., 2009).

Par leur rôle dans la différenciation des cellules endothéliales de la BHE, les astrocytes inhibent l'angiogenèse. Il a été montré que le PDGF sécrété par les progéniteurs d'oligodendrocytes, mais aussi par les cellules tumorales, induit une levée de cette inhibition (Huang et al., 2014). Des protéines présentes dans la MEC contribuent à la polarisation des astrocytes autour des vaisseaux de la BHE en interagissant avec des protéines transmembranaires exprimés sur les pieds astrocytaires. L'agrine, le dystroglycan et la laminine interviennent dans la polarisation des astrocytes, en particulier en localisant le transporteur aquaporine 4 (AQP4) et le transporteur du potassium Kir4.1 dans des structures appelées « orthogonal arrays of particles » situés dans les pieds astrocytaires en contact avec la MEC des vaisseaux. Ces transporteurs régulent le flux d'eau dans le cerveau. La dégradation de l'agrine, du dystroglycan et de la laminine par les MMP va alors désorganiser le flux hydro-électrolytique régulé par les astrocytes. AQP4 peut aussi être surexprimée par les astrocytes dans le GBM. Ces modifications vont conduire au développement d'œdème cytotoxique dans les astrocytes. L'ensemble de ces facteurs va alors conduire à la perte de l'influence pro-imperméabilité des astrocytes sur la BHE (Noell et al., 2012; Warth et al., 2004; Wolburg et al., 2012).

La sécrétion de PDGF- β par les cellules de GBM va induire un recrutement de péricytes au niveau des vaisseaux de la tumeur. Ce recrutement va permettre de stabiliser les vaisseaux, mais aussi de moduler les apports à la tumeur, augmentant ainsi l'influence de la tumeur sur son environnement et les vaisseaux sanguins. Cependant, le gradient de PDGF- β autour des vaisseaux étant altéré, et la MEC partiellement dégradée, l'attachement des péricytes

aux vaisseaux sanguins est plus lâche, réduisant l'impact des péricytes sur les cellules endothéliales. La sécrétion de VEGF par les cellules de GBM contribue à cette désorganisation des interactions péricyte-cellule endothéliale (Abramsson et al., 2003; Caspani et al., 2014; Chatterjee and Naik, 2012; Erber et al., 2004). Il a été démontré que le taux de couverture des vaisseaux par les péricytes est inversement proportionnel à la survie des patients après chimiothérapie. En effet la stabilisation des vaisseaux par les péricytes a montré un impact sur la résistance aux chimiothérapies en réduisant leur passage dans le cerveau des patients et dans leur tumeur (Dubois et al., 2014a; Zhou et al., 2017).

Cette désorganisation de l'unité neuro-vasculaire qui réduit les signaux de différenciation spécifique à la BHE, et la balance des signaux pro-angiogéniques et modulateurs de l'inflammation, induisant une altération des cellules endothéliales (Wolburg et al., 2012). Ces dernières vont alors acquérir un phénotype plus proche des vaisseaux périphériques avec une perte ou une diminution d'expression des protéines de jonction, d'adhérence et d'attachement entre les cellules endothéliales et leur matrice, mais aussi avec une augmentation de la formation de vésicules et donc de la transcytose au travers de la paroi du vaisseau (Hirano et al., 1994). Il a aussi été montré que l'expression des pompes d'efflux par les cellules endothéliales était altérée dans le GBM. Alors qu'une surexpression d'ABCG2 était rapportée, une diminution de l'expression d'ABCC1 était observée (Aronica et al., 2005; Zhang et al., 2003). Ces altérations vont alors moduler l'entrée des chimiothérapies dans le cerveau. L'expression de tPA par les cellules endothéliales est elle aussi augmentée, contribuant à l'activation des MMP décrite précédemment. Enfin, la dégradation du domaine RGD de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ des cellules endothéliales par les MMP va conduire à l'activation d'une voie de signalisation de propagation (Wolburg et al., 2012).

(iv) La mort des neurones dans la tumeur va libérer de la MMP3 qui va contribuer à la dégradation de la MEC, et va aussi activer la microglie, initiant alors une réponse inflammatoire (Kim et al., 2005). De plus, la nécrose au sein de la tumeur va libérer des facteurs de mort cellulaire (DAMP pour Damage Associated Molecular Pattern) qui vont aussi induire l'activation d'une réponse inflammatoire via l'activation du récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) (Curran and Bertics, 2012).

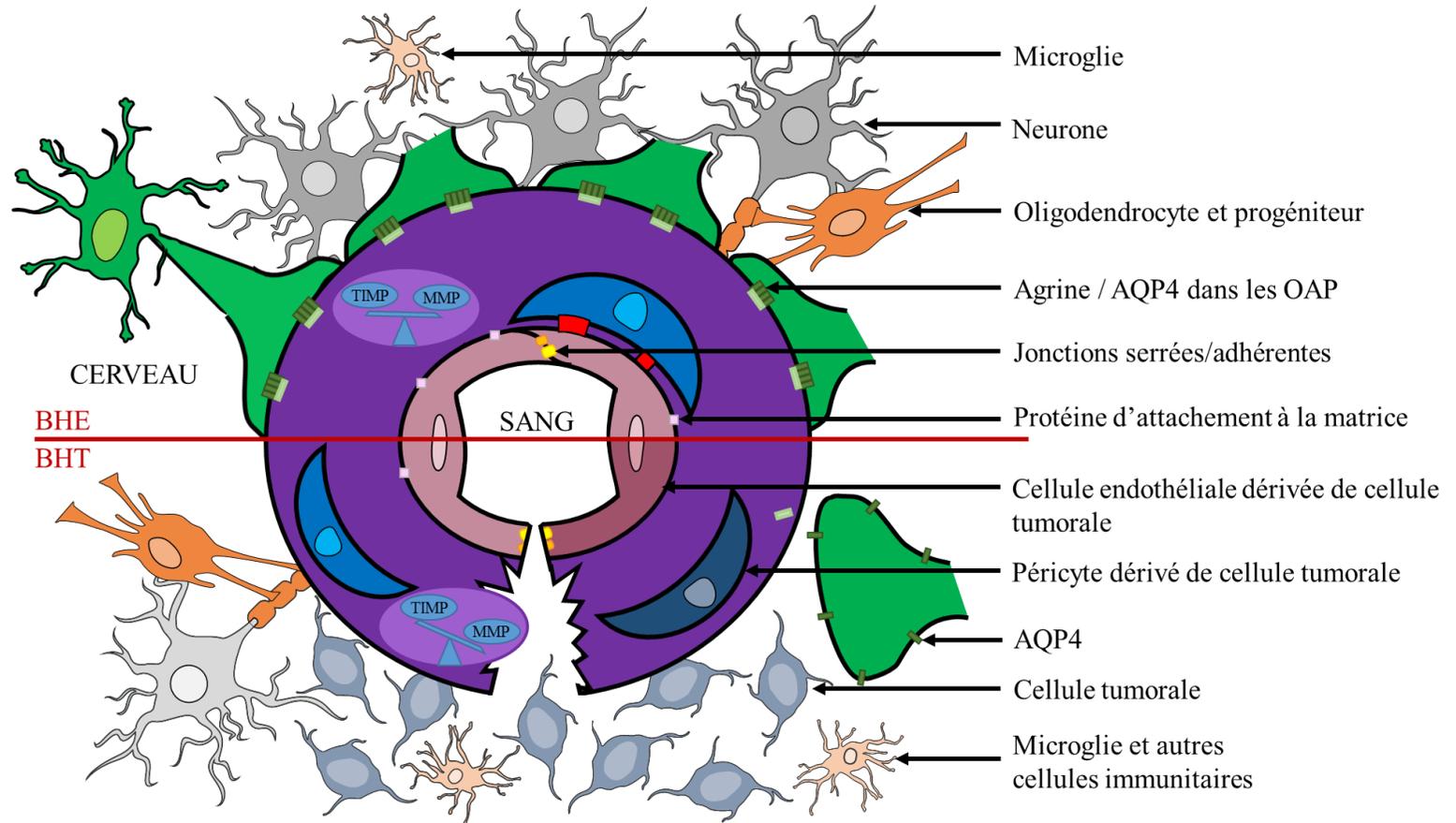
(v) L'activation des cellules inflammatoires par des facteurs sécrétés par les cellules tumorales et par la nécrose va conduire à l'activation de voies pro-inflammatoires. Une sécrétion de MMP-3 et MMP-9 contribue à la dégradation de la MEC, permettant l'ouverture de la BHT et l'influx de cellules immunitaires dans le cerveau par le processus de diapédèse (Curran and Bertics, 2012; Reijerkerk et al., 2006). La sécrétion de facteurs tels que l'amphiréguline, le TGF- α , le VEGF, le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β , l'histamine, les bradykinines et des radicaux libres contribue à l'ouverture de la BHT dans le même objectif d'influx de cellules immunitaires en agissant directement ou indirectement sur les cellules endothéliales et les partenaires de la BHE (Abbott, 2002; Curran and Bertics, 2012; Kore and Abraham, 2014; Reynés et al., 2011; Tafani et al., 2011; Thirant et al., 2013).

Le tPA et l'uPA induisent l'expression de plusieurs cytokines et chimiokines par les cellules dans la tumeur (*e.g.* MIP-1, MCP-2, GRO/KC, IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, MIP-3 α , MCP-1, RANTES et fractalkine), qui vont contribuer à l'activation du processus inflammatoire, et amplifier l'impact de l'inflammation sur la BHT (Lee et al., 2007).

L'ensemble de ces facteurs va perturber la BHE qui va donc acquérir des spécificités de la BHT, incluant une hausse de perméabilité, mais n'abrogeant pas les processus réduisant l'entrée des chimiothérapies dans le parenchyme cérébral. Pour le traitement du GBM, la présence de la BHE s'ajoutant aux mécanismes intrinsèques de résistance moléculaire, le traitement chimiothérapeutique de ces tumeurs est compliqué et peu efficace. Afin d'augmenter l'efficacité des chimiothérapies, de nombreuses méthodes ont été développées pour permettre de s'affranchir de l'obstacle que représente la BHE.

**Figure 17 : La BHT :
une BHE altérée.**

La présence de cellules tumorales va remodeler l'unité neuro-vasculaire, levant les signaux pro-imperméabilité de la BHE. La balance des métalloprotéinases et de leurs inhibiteurs (MMP vs TIMP) est déséquilibrée en faveur des MMP, contribuant à dégrader la matrice



extracellulaire, les protéines de jonction, et les protéines structurales. La dégradation des protéines telles que l'agrine contribue à la désorganisation des astrocytes et celle des protéines d'attachement contribue à perturber les cellules endothéliales. Les cellules tumorales sont capables de se différencier en cellules assurant la fonction des cellules endothéliales et des péricytes. Les péricytes sont plus nombreux dans la BHT que dans la BHE, mais sont moins bien ancrés sur les vaisseaux. L'activation de l'immunité contribue aussi à l'ouverture de la BHE.

Une altération de la BHE peut aussi découler du traitement de la tumeur. En effet, les cellules endothéliales sont particulièrement sensibles à la radiothérapie, pouvant conduire à leur mort. Les dommages aux vaisseaux vont alors induire une baisse de leur imperméabilité (Ellingson et al., 2017). La zone de prise de contraste au gadolinium en imagerie IRM pondérée en T1 qui en résulte peut alors mimer une progression tumorale, qualifiée alors de pseudo-progression (de Wit et al., 2004). Ce même phénomène est fréquent dans les gliomes pédiatriques, et a été corrélé à une modification du flux sanguin (Calmon et al., 2017). La pharmacocinétique des chimiothérapies et leur pénétration cérébrale est donc très probablement altérée après un traitement par radiothérapie.

c) **Le système glymphatique : un système de drainage du fluide interstitiel cérébral lié à la barrière hémato-encéphalique**

Le cerveau est dépourvu de vaisseaux lymphatiques pour le drainage du fluide interstitiel et l'élimination des déchets métaboliques et d'éventuelles toxines. Récemment, un système lymphatique glial a été identifié et appelé système Glymphatique.

Le système glymphatique a d'abord été observé par l'injection d'un dextran bleu injecté dans le parenchyme cérébral de rats dont le marquage diffusait de façon directionnelle, laissant supposer qu'il ne s'agissait pas d'une simple diffusion passive selon le gradient de molécules (Cserr and Ostrach, 1974). Ce n'est que bien plus tard que des études ont permis d'identifier les mécanismes de ce système glymphatique. L'injection de dextrans fluorescents dans le LCR de souris et l'observation par microscopie biphotonique a permis d'observer ce flux de façon plus précise. Il a été décrit que ce flux s'orientait des artères vers les veines de gros calibre par lesquelles les déchets métaboliques sont éliminés du cerveau. Dans la même étude, il a été montré que le système glymphatique était lié à un flux de LCR dans la zone périartérielle depuis

la zone sous-arachnoïdienne. Ce flux passe entre les cellules musculaires lisses et la couche formée par les pieds astrocytaires. Le flux de ce compartiment vers le parenchyme est permis par l'aquaporine 4 (AQP4) localisée sur les pieds astrocytaires. Le flux va alors se mettre en place, et la diffusion va se mettre en place vers les veines où les fluides et déchets seront absorbés (Iliff et al., 2012). Il varie selon les paramètres cardiaques et pulmonaires influençant le diamètre des artères (Iliff et al., 2013; Kiviniemi et al., 2016). Il a aussi été montré que ce flux s'intensifie et agit surtout dans les phases de sommeil. Cette régulation n'est pas liée au cycle circadien. En effet, le système glymphatique s'active même lors d'anesthésie chez la souris (Xie et al., 2013).

L'influence du GBM sur ce système glymphatique n'est pas encore documentée. Cependant, le remodelage des cellules du SNC est très probablement destructeur pour ce système. En effet, la diminution de la couverture des vaisseaux par les pieds astrocytaires dans la BHT est très certainement délétère pour ce système dont le flux périvasculaire est dépendant de l'organisation de ces structures de la BHE. De plus, la désorganisation spatiale des AQP4 sur les astrocytes contribue à désorganiser ce flux vers le parenchyme.

d) L'évaluation du passage des chimiothérapies au travers des barrières cérébrales

Le passage des molécules à travers de la BHE dépend de plusieurs paramètres : le poids moléculaire, la liposolubilité, la charge, l'interaction avec les protéines plasmatiques, et l'interaction avec les pompes d'efflux et les transporteurs. Le nombre de ces paramètres et leur complexité requière le développement de modèles afin d'évaluer la capacité de chimiothérapies à passer la BHE. Ces modèles sont cruciaux pour développer des traitements efficaces contre les tumeurs cérébrales et d'autres pathologies de SNC.

i. Les modèles *in silico*

Différents modèles permettent d'évaluer la capacité des chimiothérapies à traverser les barrières cérébrales. De nombreux modèles *in silico* permettent de prédire ce passage, avec un succès très variable et dépendant du type de molécule. Ces méthodes sont discutées dans la revue "Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma" publiée en 2016 dans Expert Review of Neurotherapeutics (Dréan et al., 2016).

ii. Les modèles *in vitro*

Des modèles de BHE *in vitro* permettent aussi d'acquérir des données sur le passage des chimiothérapies du sang vers le parenchyme cérébral. Ces modèles reposent sur l'utilisation d'une membrane séparant deux compartiments, l'un représentant le sang, l'autre le parenchyme cérébral. La molécule dont on veut évaluer le passage est alors déposée dans un des compartiments, puis sa concentration est mesurée dans les deux compartiments à différents temps pour évaluer sa capacité à traverser cette barrière. Le passage de la molécule étudiée au travers de la BHE modélisée peut alors être estimé.

1) Le modèle PAMPA

Le modèle le plus basique est le modèle PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) constitué d'une membrane lipidique séparant deux compartiments (Figure 18) (Kansy et al., 1998). Cette membrane lipidique artificielle est majoritairement constituée de phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine et phosphatidylserine. Ces lipides permettent de se rapprocher du ratio de lipides chargés négativement au sein de la BHE, qui est parmi les plus élevés des membranes biologiques (Di et al., 2003; Mensch et al., 2010). Le choix des solvants et solutions tampons, des températures et des paramètres de l'expérience

ainsi que le maintien de ces paramètres est primordial pour ce modèle (Mensch et al., 2010; Müller et al., 2015). Ce modèle très simple ne permet d'évaluer le passage des molécules au travers de la BHE que sur la seule base de leurs caractéristiques physicochimiques. Les processus biologiques pouvant augmenter ou atténuer le passage des molécules ne sont pas reproduits dans ce modèle dont la composante cellulaire n'est pas utilisée (Dréan et al., 2016).

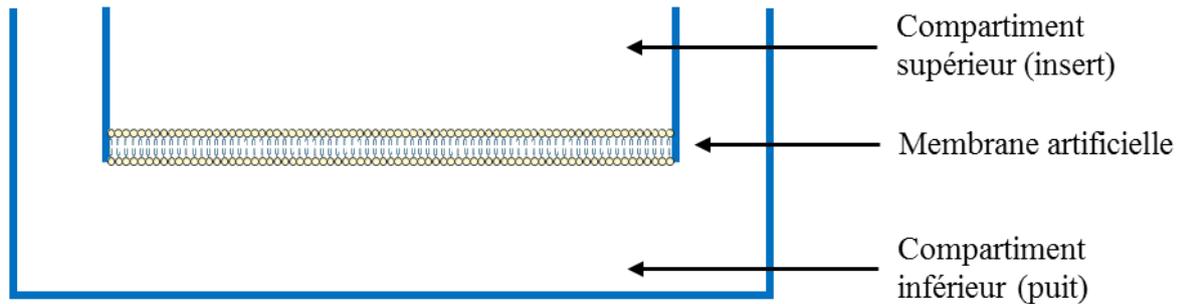


Figure 18 : Un modèle in vitro non cellulaire de BHE: le modèle PAMPA.

Les deux compartiments représentant les compartiments sanguins et cérébraux sont séparés par une membrane lipidique dont la composition est similaire à celle des membranes plasmiques des cellules endothéliales cérébrales. Le passage cérébral de molécules thérapeutiques peut être évalué au travers de ce modèle basique d'après leurs caractéristiques physico-chimiques seules. Les paramètres biologiques impliqués dans le passage de molécules au travers de la BHE ne sont pas pris en compte par ce modèle. Adapté de (Aparicio-Blanco et al., 2016).

2) Les modèles cellulaires

Pour compenser ces lacunes, des modèles cellulaires ont été développés (Figure 19). Ils reposent sur la séparation des deux compartiments par une membrane poreuse sur laquelle des cellules endothéliales sont cultivées. De très nombreux modèles existent, et varient sur plusieurs paramètres. Les cellules endothéliales utilisées peuvent avoir différentes origines : souris, rat, bovines, porcines ou, humaines (Helms et al., 2016). Des différences biologiques existant entre les cellules endothéliales de BHE de ces espèces, les modèles humains sont plus pertinents

(Warren et al., 2009). Ces cellules peuvent être utilisées en culture primaire, ou provenir d'une culture cellulaire de cellules immortalisées (Lyck et al., 2009; Steiner et al., 2011). La lignée hCMEC/D3 (human cerebral microvascular endothelial cell) est une lignée de cellules endothéliales humaines immortalisées (Weksler et al., 2005). Cette lignée humaine est très utilisée car elle a gardé les spécificités moléculaires de la BHE et est facile d'emploi permettant ainsi une bonne reproductibilité des expériences mais aussi une utilisation à plus haut débit que les modèles primaires (Ohtsuki et al., 2013). En fonction du modèle cellulaire choisi, l'application d'une matrice extracellulaire sur le filtre de culture est primordiale à une bonne fixation et polarisation des cellules sur le filtre (Tilling et al., 2002). Pour établir un modèle de BHE plus complet, l'ajout d'autres types cellulaires peut accroître l'efficacité du modèle. L'ajout d'astrocytes, péricytes ou neurones sur la face inférieure du filtre ou au fond des puits permet d'améliorer le modèle (Lippmann et al., 2014; Nakagawa et al., 2009). Ce type de modèle va aussi être influencé par les conditions de culture (choix du milieu de culture, température et, temps de culture). Il a été montré que l'agitation permettait d'accroître l'efficacité du modèle. En effet des récepteurs sensibles aux stress mécaniques vont stimuler la différenciation des cellules endothéliales dans ces modèles (Cucullo et al., 2011; Santaguida et al., 2006). Le choix de la composition de la membrane sur laquelle repose la culture des cellules aura aussi son influence sur les capacités d'ancrage des cellules. La porosité de cette membrane doit être choisie en fonction du type de particule que l'on veut étudier. Une porosité élevée permettra l'étude du passage de virus ou de cellules, tandis qu'une porosité fine sera privilégiée pour étudier le passage de molécules chimiothérapeutiques (Wuest et al., 2013).

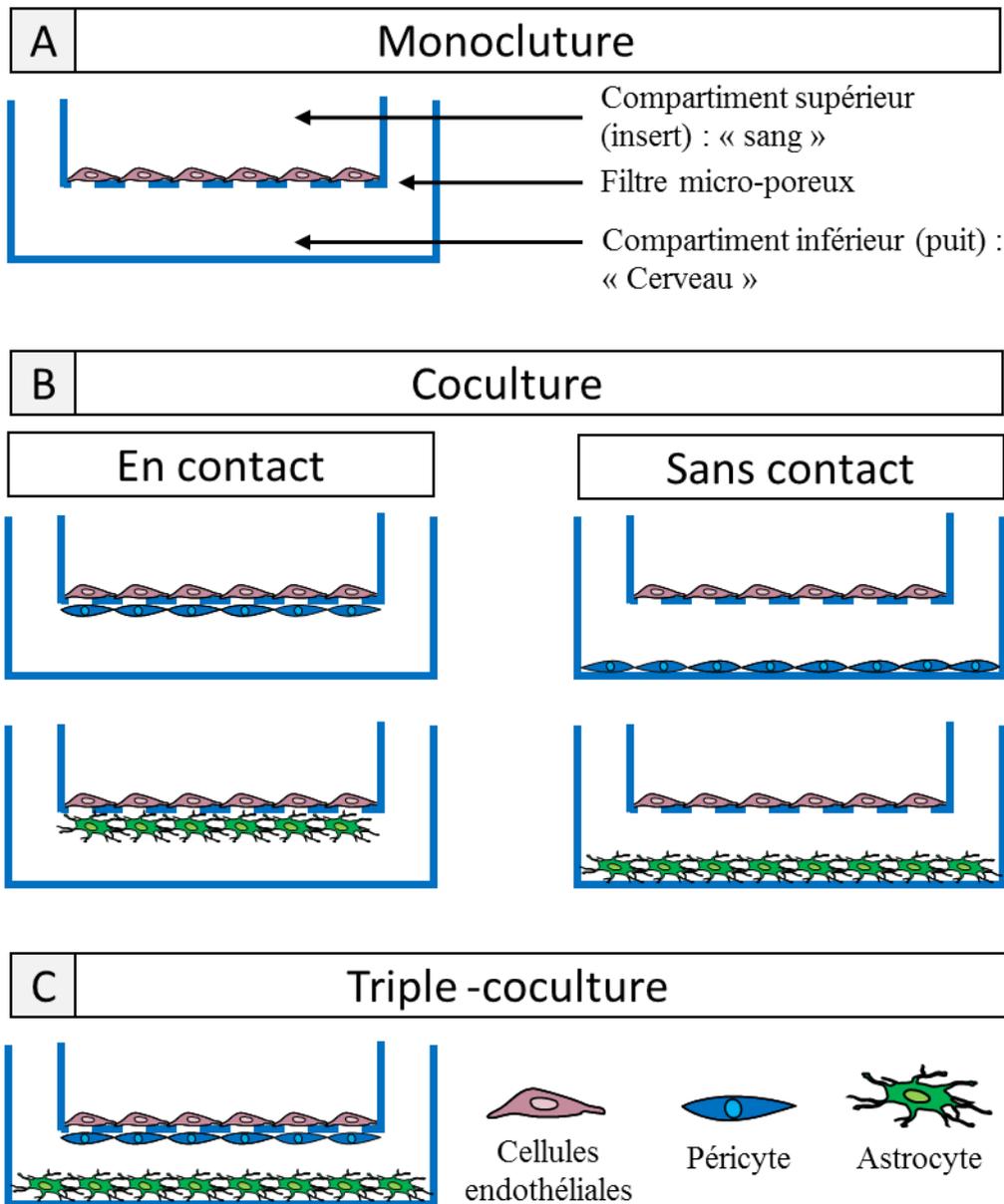
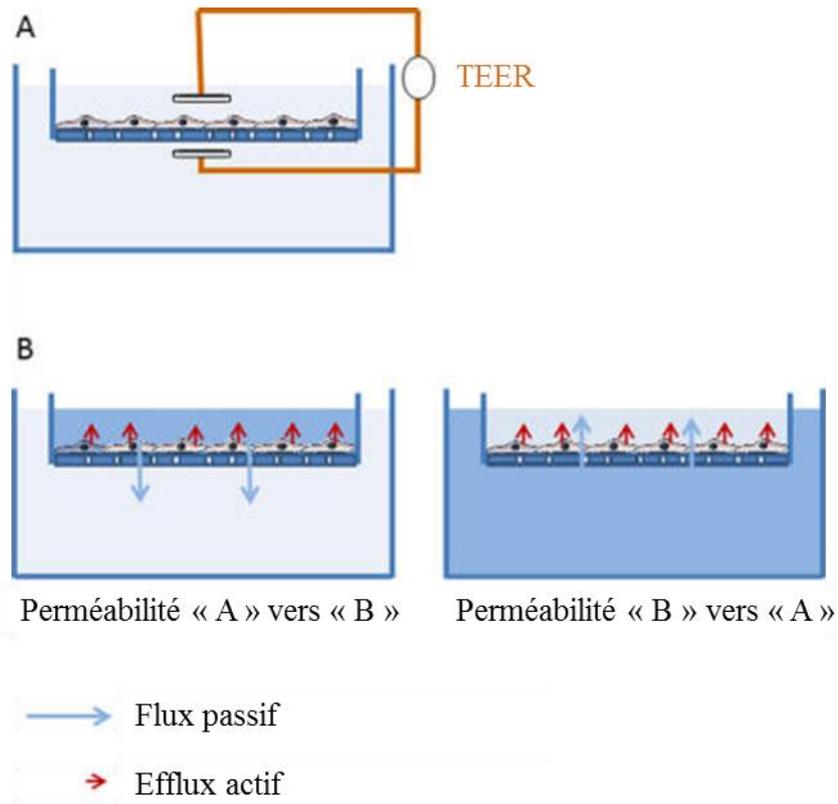


Figure 19 : Les modèles in vitro statiques cellulaires de BHE.

Les deux compartiments représentant les compartiments sanguins et cérébraux sont séparés par un filtre microporeux sur lequel des cellules endothéliales cérébrales sont mises en culture. Le modèle de base est constitué d'une monoculture de cellules endothéliales (panel A). D'autres cellules de la BHE peuvent être associées (panels B et C). Le passage cérébral de molécules thérapeutiques peut être évalué au travers de ce modèle d'après leurs caractéristiques physicochimiques et biologiques. Adapté de (Aparicio-Blanco et al., 2016).

L'évaluation de l'efficacité de ces modèles s'effectue par plusieurs techniques. La mesure de la résistance électrique de part et d'autre du modèle permet de mesurer la perméabilité de l'endothélium artificiel aux ions. Le TEER (en Ω/cm^2) représente alors cette résistance, et ainsi la perméabilité du modèle (Figure 20). Il est à noter que le TEER mesuré sur la BHE d'une grenouille vivante était en moyenne de $1900\Omega/\text{cm}^2$ (Crone and Olesen, 1982). Chez le rat, le TEER atteint en moyenne $1462\Omega/\text{cm}^2$ sur tous types de vaisseaux, variant entre $1490\Omega/\text{cm}^2$ pour les artères et $918\Omega/\text{cm}^2$ pour les veines. Le TEER varie aussi selon la structure cérébrale visée. Cette même étude menée chez le rat montre aussi qu'après une ouverture de la BHE par choc osmotique, le TEER chute de façon réversible à $100\text{-}300\Omega/\text{cm}^2$ indépendamment du type de vaisseau sanguin (Butt et al., 1990). Une autre méthode consiste à déposer une molécule fluorescente qui ne peut normalement pas traverser la BHE dans un des compartiments, puis à la doser au cours du temps dans les deux compartiments pour évaluer son passage au travers de ce modèle. Si cette molécule est substrat des pompes d'efflux ou de transporteurs actifs, elle peut alors révéler si l'orientation de ce transport actif est dans le bon sens (Figure 20) (Bickel, 2005). Enfin, une observation de marqueurs spécifiques de la BHE tels que les protéines des jonctions serrées (*e.g.* occludine, claudine-5, ZO-1) en immunohistochimie permet d'étudier les aspects moléculaires de l'imperméabilité du modèle (Urich et al., 2012).



$$\text{Ratio de l'efflux} = \frac{\text{perméabilité « B » vers « A »}}{\text{perméabilité « A » vers « B »}}$$

Figure 20 : Les méthodes de mesure de la perméabilité du modèle de BHE.

Panel A: mesure du TEER à l'aide d'électrodes reliées à un volt-ohmmètre : résistance électrique du modèle proportionnelle à la perméabilité du modèle. Panel B : mesure de la diffusion d'un traceur qui peut être dosée dans les 2 compartiments pour évaluer l'imperméabilité du modèle. Adapté de (Wilhelm and Krizbai, 2014).

Les modèles cellulaires les plus efficaces ont d'abord été développés chez l'animal (Figure 21). La coculture de cellules endothéliales, péricytes et astrocytes primaires a montré la meilleure efficacité, avec chez le rat des TEER enregistrés jusqu'à $354 \Omega/\text{cm}^2$ (Nakagawa et al., 2009; Wilhelm and Krizbai, 2014). Dans un contexte humain, l'utilisation de la lignée hCMEC/D3 montre un TEER faible, même en cas de coculture avec des astrocytes et des péricytes (Hatherell et al., 2011). Ce modèle est efficace pour évaluer les processus biologiques

comme l'inflammation et la diapédèse ou le passage de virus, mais est peu efficace pour évaluer le passage de chimiothérapies efficacement. Chez l'animal, les lignées cellulaires immortalisées en général conduisent aux mêmes limites. Il y a une exception avec la lignée hBMEC qui a montré en monoculture un TEER jusqu'à $300 \Omega/\text{cm}^2$ (Wilhelm and Krizbai, 2014). Idéalement, l'utilisation d'un modèle humain est plus appropriée pour des études visant à traiter des pathologies humaines en raison des différences qui existent entre les BHE animales et murines. En particulier, le profil d'expression des transporteurs par les cellules endothéliales varie d'une espèce à l'autre. Il est à noter que l'expression des pompes d'efflux qui influence fortement le passage des chimiothérapies au travers de la BHE varie beaucoup. En effet, alors que chez l'homme l'expression d'ABCG2 est plus de 3 fois supérieure à celle d'ABCB1, chez la souris, ce ratio s'inverse et passe à un facteur 4 (Warren et al., 2009).

Pour les modèles *in vitro* humains, le plus efficace a été obtenu en différenciant des cellules souches embryonnaires humaines en cellules neurales et en cellules endothéliales cérébrales à l'aide de plusieurs facteurs dont l'acide rétinoïque (Figure 21). Les cellules endothéliales isolées ont été cultivées sur filtre, mises en coculture avec des péricytes primaires pendant 24h, puis avec cellules progénitrices neurales différenciées conduisant à la formation d'un mélange de neurones et astrocytes. La co-culture a ici montré un fort impact sur le modèle. La présence d'acide rétinoïque dans le milieu a fortement impacté le TEER du modèle. Le TEER de ce modèle a été mesuré à $3500 \Omega/\text{cm}^2$. Il est monté jusqu'à $5350 \Omega/\text{cm}^2$ lorsque le bFGF était supprimé du milieu de culture (Lippmann et al., 2014). Ce modèle est parmi les plus efficaces pour évaluer le passage de chimiothérapies. Néanmoins, ce modèle n'est pas adapté à une évaluation de passage de molécules à haut débit en raison de la complexité de sa mise en œuvre.

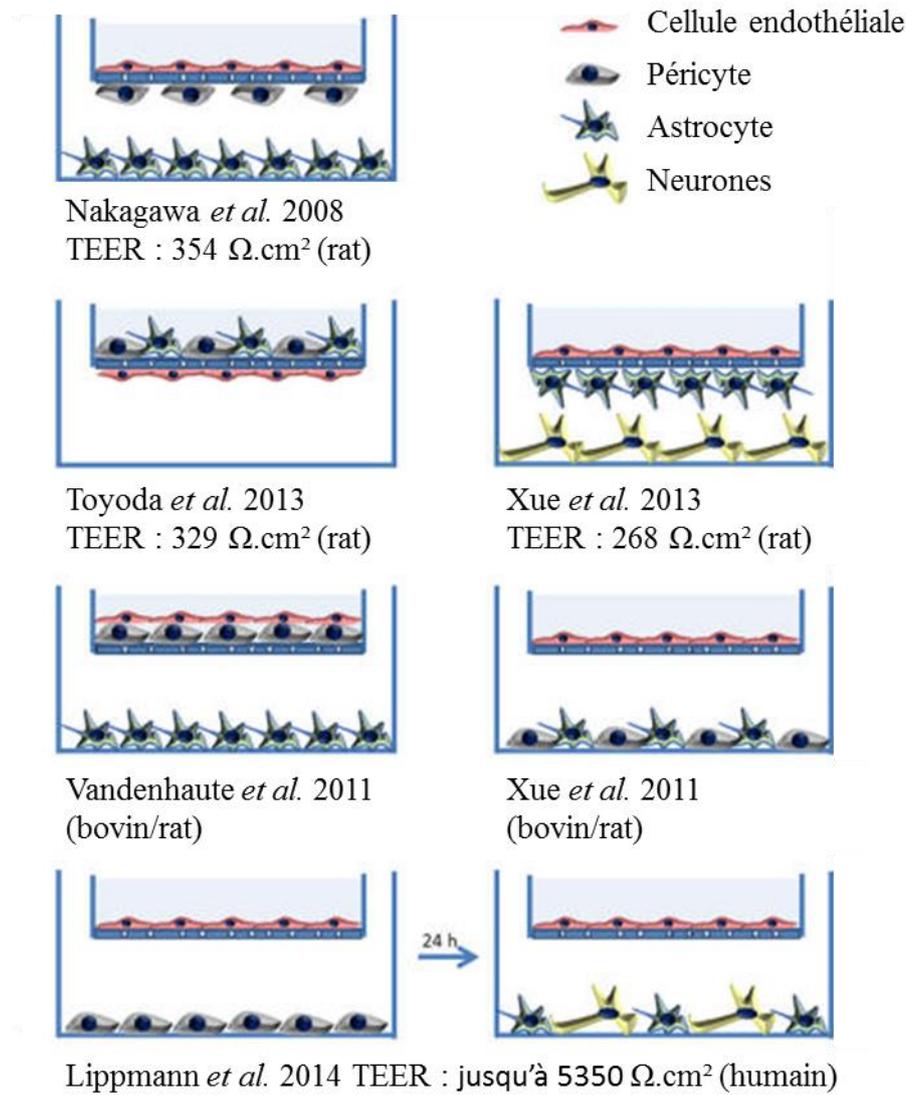


Figure 21 : La composition des modèles animaux et humains les plus efficaces.

Ces modèles associent plusieurs types cellulaires aux cellules endothéliales : des astrocytes, des péricytes ou des neurones. Le modèle animal le plus efficace a été développé à l'aide de cellules endothéliales, d'astrocytes et de péricytes primaires de rats. Le modèle humain le plus efficace a été développé grâce à la différenciation de cellules souches, et est décrit dans le texte (Lippmann *et al.*, 2014). Adapté de (Wilhelm and Krizbai, 2014).

Ces modèles statiques ont cependant des limites. Dans la BHE, les cellules endothéliales sont polarisées avec un côté luminal dirigé vers le sang et un côté abluminal dirigé vers le parenchyme cérébral. La matrice cellulaire va contribuer à mettre en place cette polarisation, mais l'orientation des cellules dans ces modèles n'est pas toujours parfaite. Ainsi,

les transports actifs tels que l'efflux peuvent être mal orientés pour une fraction des cellules. De plus, les cellules endothéliales dans la BHE vont adopter une forme très étalée, qui n'est pas retrouvée dans ces modèles. L'application d'un stress mécanique sur les cellules va permettre de retrouver un phénotype plus proche de la BHE, et contribuer à améliorer les modèles. Les molécules évaluées dans ces modèles sont déposées dans un compartiment, et peuvent y rester un temps bien supérieur au temps imposé par leur pharmacocinétique dans un système vasculaire fonctionnel. Ainsi, un système de flux va aussi permettre de mimer les paramètres pharmacocinétiques des molécules. Dans ces objectifs, des modèles dynamiques de BHE sont développés et des systèmes de microfluidique permettent de mimer un système vasculaire. Le filtre sur lequel les cellules endothéliales sont mises en culture est de forme tubulaire dans lequel un flux est appliqué pour mimer le compartiment sanguin. Les systèmes de co-culture sont aussi applicables sur ces systèmes dynamiques (Bonakdar et al., 2017; van der Helm et al., 2016, 2017; Wang et al., 2016).

Les différents modèles cellulaires existants (Figure 22) présentent des avantages et des inconvénients détaillés dans le tableau 5.

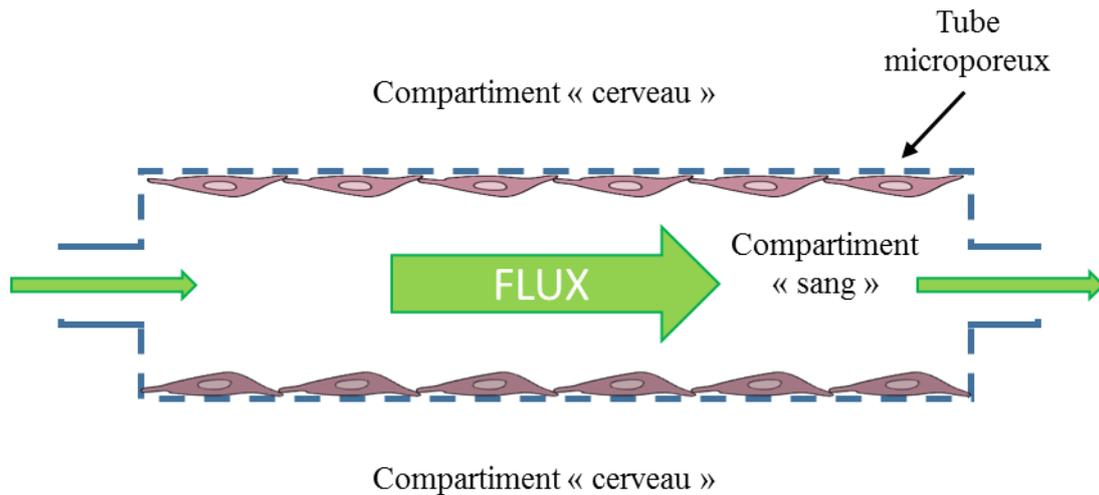


Figure 22 : Le modèle microfluidique dynamique de BHE in vitro.

Il est obtenu par la mise en culture de cellules endothéliales dans un tube microporeux. Un flux mimant le sang peut alors être appliqué. D'autres types cellulaires (e.g. astrocytes, péricytes) peuvent être ajoutés au modèle. Adapté de (Aparicio-Blanco et al., 2016).

	Transwell monoculture	Transwell coculture	Modèle dynamique
TEER	Faible	Modéré	Haut
Temps pour que le modèle soit exploitable (d'après le TEER)	3-4 jours	3-4 jours	> 7 jours
Quantité de cellules requises	Faible	Modérée	Haute
Ressemblance avec l'unité neuro-vasculaire	Modérée	Haute	Haute
Stresse de cisaillement	Non	Non	Oui
Utilisable en haut débit	Haut	Modéré	Faible

Tableau 5 : Comparaison des différents modèles de BHE in vitro.

Chaque type de modèle présente des avantages et des inconvénients inhérents à leur mise en place et utilisation. Adapté de (Aparicio-Blanco et al., 2016).

iii. Les modèles *in vivo*

Le passage peut aussi être mesuré *in vivo*. La concentration de la chimiothérapie évaluée est mesurée dans un échantillon cérébral ainsi que dans le sang. C'est alors le ratio de

la concentration cérébrale sur la concentration plasmatique qui permettra de quantifier le passage de la chimiothérapie au travers de la BHE. Idéalement, plusieurs mesures doivent être faites à différents temps pour tenir compte des variations de concentration dues à la pharmacocinétique de la chimiothérapie. Ce sont les aires sous les courbes des concentrations cérébrales et plasmatiques qui sont comparées pour obtenir le ratio cerveau/plasma (Alavijeh et al., 2005). La BHE présentant quelques différences entre l'homme et les animaux, en particulier pour l'expression des pompes d'efflux telles que décrites dans la section précédente, les modèles animaux ne représentent pas parfaitement la pénétration chez l'homme (Warren et al., 2009). Les mesures chez l'homme sont donc nécessaires pour connaître la vraie pénétration des chimiothérapies dans le cerveau humain, mais les modèles précliniques animaux permettent d'effectuer des mesures à plus haut débit, et de façon plus précise, permettant une analyse statistique plus approfondie. Il est aussi difficilement envisageable d'effectuer des mesures sur un humain sain qui ne nécessite pas de traitement chimiothérapeutique ou d'intervention chirurgicale. Les mesures chez l'homme se feront alors sur des patients touchés par une pathologie. Dans le cas d'une étude de chimiothérapie, le patient atteint du GBM présente une altération de la BHE qui va alors donner des informations de passage dans un contexte d'une BHE altéré. En effet il est éthiquement plus difficile d'effectuer des mesures dans une zone saine que dans une zone pathologique chez l'homme. Les modèles animaux vont quant à eux permettre d'effectuer des mesures sur le cerveau sain ou non, de multiples façons, et permettre d'obtenir plus de données sur la pharmacocinétique des chimiothérapies étudiées.

L'échantillon cérébral peut être obtenu de différentes façons. Lorsque la mesure est effectuée chez un animal pour des expérimentations dédiées, le cerveau peut être prélevé. Chez l'homme, si le patient doit subir une résection chirurgicale ou une biopsie, la chimiothérapie peut être injectée avant l'intervention et des échantillons cérébraux peuvent être prélevés pour

effectuer les mesures. Cette méthode de prélèvement en phase 0 est la plus relevante. Il paraît cependant très compliqué d'effectuer des mesures à différents temps par cette méthode, ou même dans le cerveau sain. La méthode de micro-dialyse permet de prélever du liquide extracellulaire du parenchyme cérébral, de façon répétée, et est plus faiblement invasive que le prélèvement d'un échantillon cérébral. Une canule est alors insérée dans le cerveau, et un petit volume du liquide extracellulaire cérébral pourra être prélevé à plusieurs temps (de Lange et al., 1997). Cette méthode reste tout de même invasive pour le cerveau. De plus, la concentration dans le liquide extracellulaire cérébral ne représente pas parfaitement la concentration intracellulaire cérébrale de la chimiothérapie, qui est la concentration active. Cette méthode est applicable autant chez l'homme que chez l'animal (Burgio et al., 1996; Chiang et al., 2015; Jacobs et al., 2010; Lin et al., 2018). Enfin, le LCR est souvent utilisé pour estimer la concentration cérébrale chez l'homme et l'animal. Cependant, il ne faut pas considérer que la concentration cérébrale sera identique à celle du LCR, mais seulement qu'elle peut en être très proche. En effet, les barrières entre le sang et le LCR au niveau des méninges et plexus choroïdes ne sont pas similaires à la BHE. Des différences moléculaires peuvent impacter la pénétration des molécules. De plus, la diffusion entre le LCR et le cerveau est très limitée (Dréan et al., 2016; Lin, 2008). Enfin, d'un point de vue pharmacocinétique, le renouvellement rapide du LCR va rendre la clairance entre le LCR et les parenchymes cérébraux différents. Ainsi les différences entre le LCR et le parenchyme cérébral vont pouvoir varier dans le temps (Dréan et al., 2016).

Dans le cas du GBM, l'un des mécanismes de résistance le plus impactant sur l'efficacité des traitements et la survie des patients est la BHE. Altérant le passage des chimiothérapies dans le parenchyme cérébral, elle est un frein majeur à cette modalité thérapeutique qu'il est essentiel de dépasser. Malgré une efficacité cytotoxique faible

mesurée *in vitro* sur des lignées de GBM, le TMZ reste le plus efficace *in vivo*. Il a en effet une forte capacité à passer la BHE mesurable sur les différents modèles décrits précédemment (Dréan et al., 2016). Le traitement du GBM par le TMZ reste peu efficace, bien que sa pénétration cérébrale soit bonne. Il est évident que la restriction imposée dans le choix des chimiothérapies est un frein qu'il faut lever afin de pouvoir utiliser des chimiothérapies efficaces. Des méthodes de traitements alternatives sont développées afin de surpasser ces limites.

E. Contourner les résistances physiques : ouvrir la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

De nombreuses méthodes existent pour permettre à des chimiothérapies de dépasser la BHE, et sont détaillés dans la revue "Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma" publiée en 2016 dans Expert Review of Neurotherapeutics, intégrée dans la section IV.A.1. (Dréan et al., 2016). Aujourd'hui, plusieurs de ces méthodes ont échoué à améliorer le pronostic des patients pour diverses raisons : faible efficacité, forte toxicité, effets secondaires délétères pour le patient, forte invasivité et/ou, coût élevé. Les investigations se poursuivent pour développer de nouveaux traitements innovants, dont certains sont prometteurs.

Dans ce projet, l'ouverture de la BHE par ultrasons (US) et microbulles (MB) est évaluée afin d'accroître le passage de chimiothérapies du sang vers le parenchyme cérébral.

1. L'historique et le principe de la méthode d'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

La découverte de l'impact des US sur la BHE date des années 50 lorsqu'une ouverture a été rapportée à la périphérie de lésions induites par des US de haute intensité focalisés (HIFU) (Bakay et al., 1956). L'impact de l'effet thermique des US de haute intensité a d'abord été mis en avant, et la faisabilité d'ouvrir la BHE par HIFU sans effets secondaires a été conjecturée du fait de zones perméabilisées présentes en dehors des bordures des lésions (Patrick et al., 1990). Une ouverture de la BHE par HIFU sans lésion s'est toutefois avérée difficile lors d'une étude préclinique où la dose thermique déposée par US était finement contrôlée par thermométrie IRM (McDannold et al., 2004). Outre l'effet thermique, l'implication de la cavitation acoustique générée par les HIFU dans l'ouverture de la BHE a aussi été démontrée, notamment

par la détection d'émissions acoustiques sous-harmoniques (Vykhodtseva et al., 1995). Le terme cavitation acoustique décrit un phénomène dans lequel des cavités (bulles) se forment, s'étendent et se contractent sous l'action d'une onde de pression. Ce phénomène de cavitation est décrit plus en détail dans la section sur le mécanisme d'ouverture. Dans le cas des premières observations d'ouverture de la BHE par US, les bulles de cavitation étaient formées à de fortes pressions acoustiques à partir de germes de cavitation (élément de développement de cavitation) endogènes. Dans l'objectif de traiter des tumeurs cérébrales par ablation thermique (HIFU) et d'ouvrir la BHE en vue d'une chimiothérapie adjuvante comme traitement complémentaire, l'induction de dommages lors des traitements ultrasonores est acceptable. En revanche, pour rendre plus efficaces des chimiothérapies administrées de façons répétées, ou pour traiter d'autres pathologies cérébrales, l'induction de ces dommages doit être évitée. Dans ce but, des chercheurs ont tenté d'optimiser l'ouverture de la BHE par le mécanisme de cavitation, qui n'induit pas nécessairement de dommage thermique. Ce processus s'est avéré difficile à contrôler, et a montré des difficultés à ouvrir la BHE de façon sûre. Cette difficulté était avant tout liée aux pressions acoustiques très élevées nécessaires à obtenir de la cavitation à partir de germes endogènes, et à la nature stochastique et difficile à contrôler de ce régime.

C'est en 2001 que l'équipe du Dr Hynynen a mis au point une méthode d'ouverture de la BHE par US qui soit contrôlable et sûre, sans lésions tissulaires. L'injection préalable de MB, initialement développées comme agents de contraste d'imagerie ultrasonore, permet d'exploiter efficacement le mécanisme de cavitation. Dans ce mécanisme, la cavitation des bulles est possible à des intensités ultrasonores de puissance 100 fois réduite, sous le seuil conduisant aux dommages thermiques du tissu. L'injection systémique d'une quantité de MB contrôlée avec des propriétés reproductibles permet aussi de s'affranchir de l'aspect stochastique de la cavitation produite à partir de germes endogènes qui n'est possible qu'à des pressions plus

élevées. La durée des impulsions et l'intensité des US est aussi assez faible pour éviter l'échauffement des tissus cérébraux ciblés, et réduire les effets thermiques sur le crâne dans le cas d'un traitement trans-crânial. L'ouverture par ce mécanisme est liée à l'oscillation des MB présentes dans le sang induit par le faisceau ultrasonore. Ainsi, seuls les vaisseaux sont impactés car les MB (typiquement dans la gamme 1-10 μm) ne passent pas la barrière, même une fois ouverte. Avec un bon contrôle des paramètres ultrasonores, il est possible d'éviter d'endommager les vaisseaux sanguins et de provoquer des hémorragies. Dans ce contexte où les vaisseaux ne sont pas endommagés, l'ouverture de la BHE est transitoire, et persiste moins de 24h (O'Reilly and Hynynen, 2012a).

2. Le mécanisme de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

a) Les mécanismes physiques liés aux microbulles

Les mécanismes conduisant l'oscillation des MB à ouvrir la BHE sous l'effet du champ ultrasonore sont multiples et complexes, et ne sont pas encore tous clairement identifiés. Néanmoins, les principaux phénomènes probablement impliqués ont été décrits (Figure 23).

Des forces de radiations acoustiques peuvent pousser les bulles contre l'endothélium et induire une pression sur les cellules endothéliales (Bing et al., 2009). Sous l'effet des sous- et sur-pressions des ondes sonores, les bulles subissent des phases de gonflement et rétrécissement : la cavitation (Caskey et al., 2007). Ces oscillations des bulles peuvent induire par plusieurs biais des forces sur l'endothélium. Les bulles peuvent osciller non linéairement et/ou asymétriquement dans un régime dit de cavitation stable, qui peut conduire à la formation des micro-flux dans le flux sanguin induisant des contraintes de cisaillement sur les cellules endothéliales. Dans le cas de fortes pressions acoustiques les bulles peuvent imploser, dans un

régime dit de cavitation inertielle, pouvant générer des ondes de choc et des micro-jets (Sboros, 2008). Enfin, selon des simulations, une augmentation locale de la température apparaîtrait autour des bulles, conduisant à une ouverture thermique de la BHE (Klotz et al., 2010).

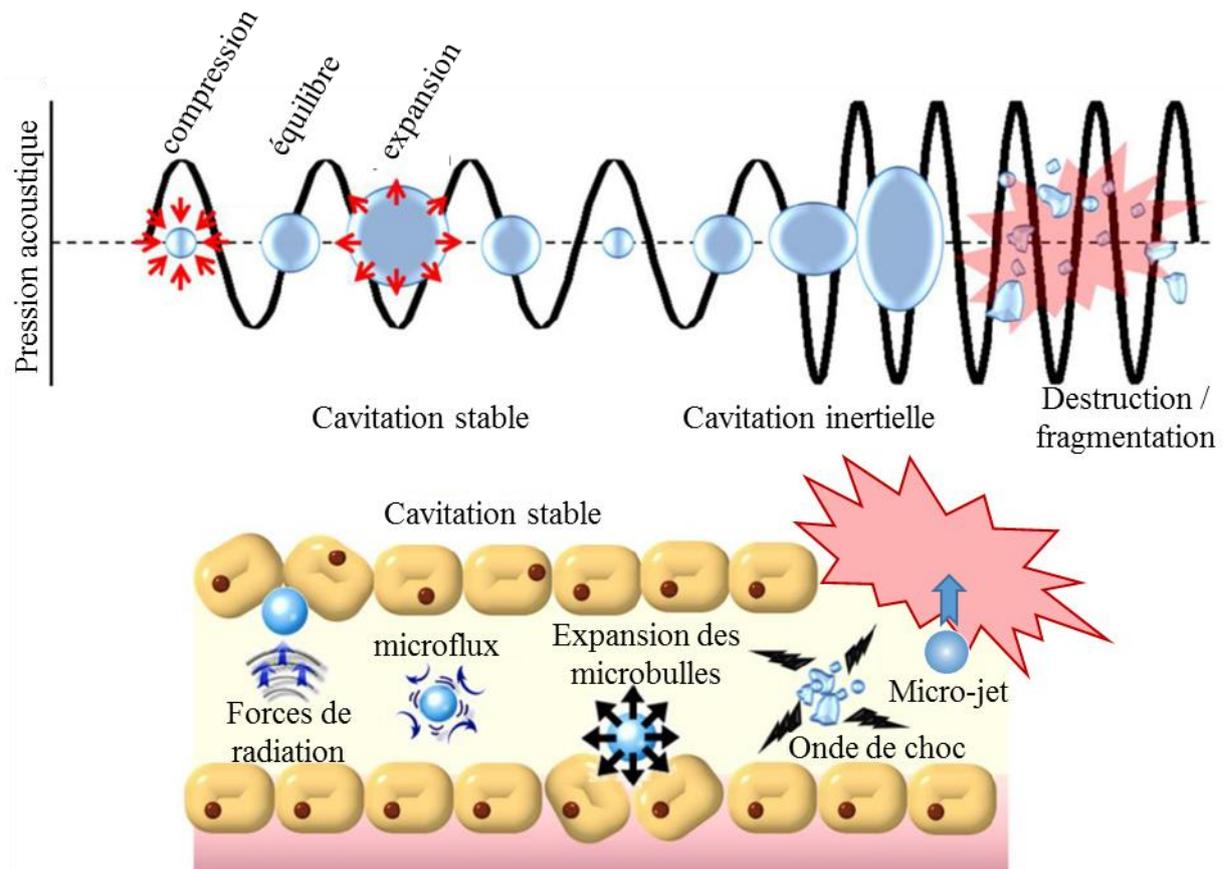


Figure 23 : Le comportement des bulles dans le faisceau acoustique responsable de l'ouverture de la BHE par US.

Même si les mécanismes potentiellement impliqués dans l'ouverture de la BHE induite par les bulles dans le champ acoustique sont peu connus, plusieurs mécanismes sont potentiellement impliqués. Adapté de (Liu et al., 2014).

b) Les mécanismes biologiques induits par les microbulles dans le champ acoustique

i. L'impact morphologique de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons sur l'endothélium

D'un point de vue biologique, l'ouverture se fait tout le long des vaisseaux dans le champ acoustique, mais aussi à des points focaux, correspondant à une augmentation du passage par les voies transcellulaires et paracellulaires respectivement tels que décrit après (Raymond et al., 2007). La rupture des jonctions serrées intervient lors de l'application du champ ultrasonore, mais se referme rapidement après la fin du traitement (Sheikov et al., 2008). Cette voie d'ouverture paracellulaire permet un influx important de molécules dans le parenchyme cérébral, et permet le passage de molécules de taille importante. A la suite de la procédure d'ouverture, une augmentation du nombre de vésicules contribue à l'augmentation du passage par la voie transcellulaire par le mécanisme de transcytose (Sheikov et al., 2004). Une sur-expression des protéines caveoline-1 et -2 contribue à cette augmentation de la formation de vésicules (Deng et al., 2012; Xia et al., 2009). Des canaux cytoplasmiques traversant les cellules endothéliales ont aussi été décrits, résultant potentiellement de la fusion de nombreuses vésicules (Sheikov et al., 2004, 2006). Ces mécanismes dépendants des vésicules ont montré une plus forte importance dans les artérioles et capillaires que dans les veinules (Sheikov et al., 2006). Des études menées à deux fréquences ultrasonores ont montré une formation de vésicules plus importante aux fréquences les plus faibles, tandis que qu'une extravasation d'hématies été décrite aux fréquences la plus élevées, rendant compte d'une ouverture paracellulaire plus importante (McDannold et al., 2008a; Sheikov et al., 2006). Il est à noter que l'un des plus gros risques lors d'une ouverture de la BHE par US est l'hémorragie cérébrale. L'extravasation de quelques hématies étant la première forme de cet effet secondaire, un contrôle important de ce paramètre apparait primordial. Après l'ouverture, une

vasoconstriction a été décrite, conduisant à des ischémies locales qui induisent à leur tour une ouverture de la BHE pour rétablir l'homéostasie cérébrale (Cho et al., 2011; Lo et al., 1994).

ii. **L'impact moléculaire de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons sur l'endothélium**

Enfin, l'ouverture de la BHE conduit à l'activation de mécanismes de régulation dans les cellules endothéliales. Il a été montré que le stress de cisaillement induit par les bulles dans le champ ultrasonore conduit à la phosphorylation d'AKT. L'activation de cette voie de signalisation dans les cellules endothéliales de la BHE conduit à une baisse de l'imperméabilité de la BHE, en partie par la régulation de l'expression de protéines des jonctions serrées telles que la claudine-5 (Jalali et al., 2010). L'étude transcriptomique de vaisseaux soumis à une ouverture de la BHE par US a montré un impact sur plusieurs voies ontologiques (McMahon et al., 2017). De façon surprenante, l'expression des protéines de jonction serrées et des protéines liées à l'endocytose n'est pas altérée de façon significative, mais est légèrement diminuée (McMahon et al., 2017). Une hausse d'expression précoce et durable est observée pour de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation (McMahon et al., 2017). Ces données transcriptomiques sont rejointes par l'observation d'une inflammation stérile après ouverture de la BHE, montrant une infiltration de macrophages dans le cerveau des rats traités (Kovacs et al., 2017; McMahon and Hynynen, 2017). Comme décrit dans la section I.D.3.b). sur l'impact des tumeurs de GBM sur la BHE, l'inflammation contribue à ouvrir la BHE. Dans le cas de l'ouverture de la BHE par US, elle va contribuer à augmenter la durée de l'ouverture et de l'impact du traitement sur la BHE. Les voies pro-angiogéniques sont quant-à elles activées par l'ouverture de la BHE par US même 24h après le traitement (McMahon et al., 2017). Entre autre, une hausse précoce d'expression du gène de MMP-9, dont l'impact est décrit dans la section I.D.3.b). sur l'impact des tumeurs de GBM sur la BHE, contribue probablement à la

réduction de la perméabilité de la BHE. Le processus d'angiogenèse implique une hausse de la prolifération des cellules endothéliales, et donc une diminution de leur différenciation. La hausse d'expression du gène d'*EGR3* (Early Growth Response 3) contribue à cette hausse de prolifération. Quant à la diminution de la différenciation spécifique à la BHE des cellules endothéliales, elle est visible sur une baisse globale de l'expression des transporteurs transmembranaires des familles ABC et SLC (solute Carrier) incluant la *Pgp*, la pompe d'efflux majeure de la BHE murine (McMahon et al., 2017). Cet impact sur l'expression de la *Pgp* est détaillé dans le paragraphe suivant.

Si la molécule thérapeutique que l'on fait entrer au travers de la BHE ouverte est substrat des pompes d'efflux, il y a un risque que ces pompes d'efflux la retournent dans le sang avant qu'elle ne puisse agir. Alors que juste après l'ouverture l'expression de la *Pgp* dans la BHE n'a pas montré de variation dans plusieurs études, une baisse de son expression est observée au-delà de 24h post-ouverture. Pour ces études faites sur le rat, alors que l'expression de la *Pgp* était réduite à 1h, 24h et 48h, elle était restaurée à 72h lorsque la pression acoustique du traitement était fixée à 0.55MPa. Cependant, lorsque la pression acoustique était fixée à 0.81MPa, la baisse d'expression apparaissait plus tardivement à 48h mais était prolongée jusqu'à 72h post-traitement, démontrant un impact de la pression acoustique sur cette extinction de l'expression de la *Pgp* (Figure 24). Cette extinction de la *Pgp* peut être localisée, et apparait même sans dommages apparents aux vaisseaux (Aryal et al., 2017; Baghirov et al., 2018; Cho et al., 2016).

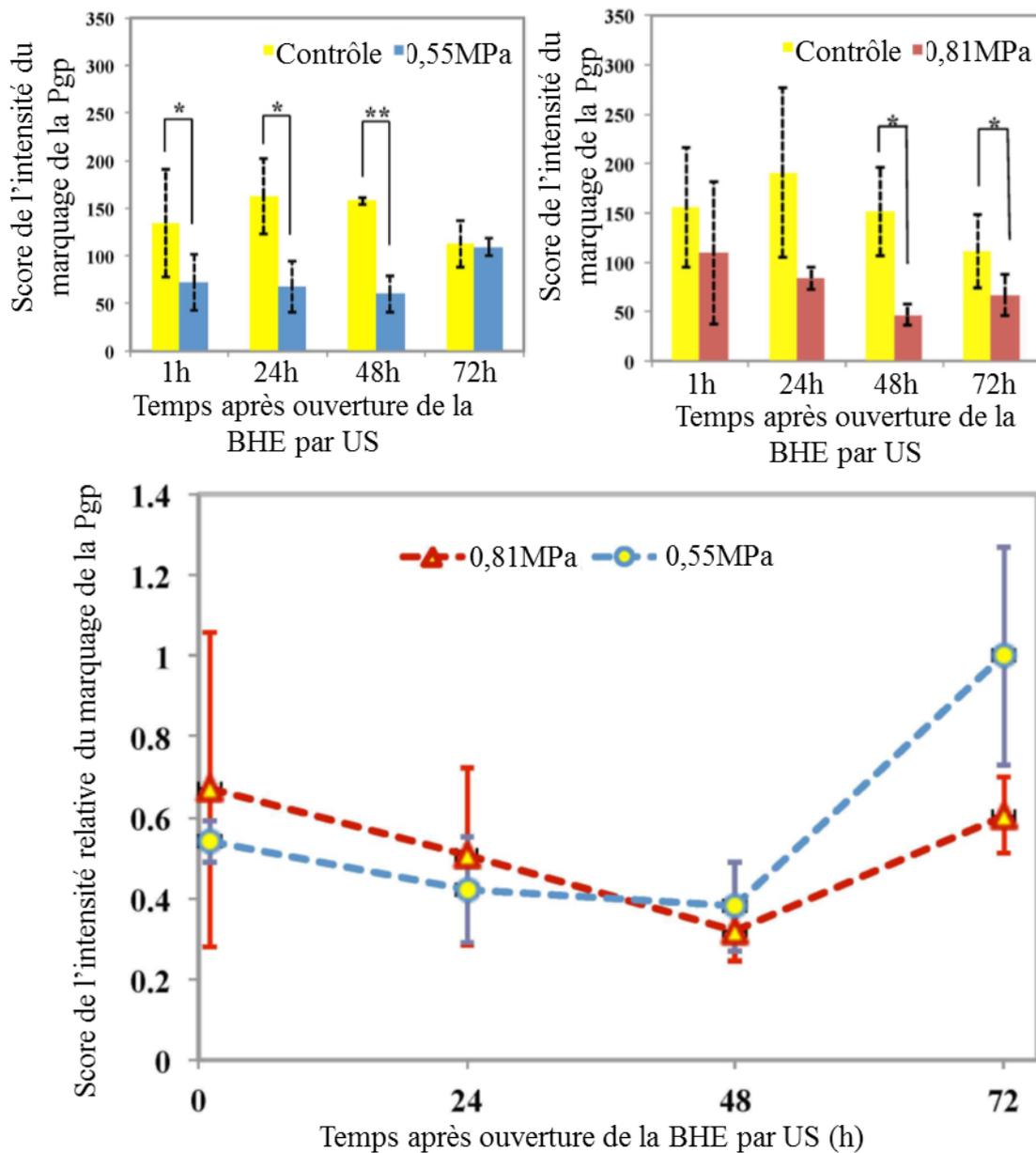


Figure 24 : L'impact de l'ouverture de la BHE par US sur l'expression de la Pgp sur le rat. Les panels A et B montrent l'expression de la Pgp mesurée 1h, 24h, 48h et 72h après le traitement pour des souris non traitées vs traitées à des pressions acoustiques de 0.81MPa ou 0.55MPa. Le panel C montre les différences d'expression de la Pgp entre les souris traitées aux deux pressions acoustiques. L'ouverture de la BHE par US induit une baisse d'expression de la Pgp dont l'apparition et la durée varie selon les paramètres ultrasonores utilisés. Adapté de (Aryal et al., 2017).

c) La fermeture de la barrière hémato-encéphalique après son ouverture par ultrasons

La fermeture de la BHE après les US est graduelle. Alors que pour des cellules (hématies), des gros complexes (liposomes) ou des grosses molécules (anticorps, albumine), l'ouverture est limitée à la phase de rupture totale des jonctions serrées, presque limitée à la période d'exposition aux US. Pour des molécules de plus petite taille, la voie de passage transcellulaire est efficace sur une durée plus longue. Selon la taille de la molécule que l'on souhaite faire passer, le temps d'ouverture va varier. Alors que le Dotarem[®] sera capable de passer la BHE dans les 5h suivant la procédure d'ouverture, d'autres chélates du gadolinium de taille plus importante (P846 et P792) pourront entrer sur une période plus courte suivant la procédure d'ouverture (Figure 25) (Marty et al., 2012). Cette durée de fermeture ne dépend pas du volume de cerveau ayant subi cette ouverture de la BHE par US (O'Reilly et al., 2017).

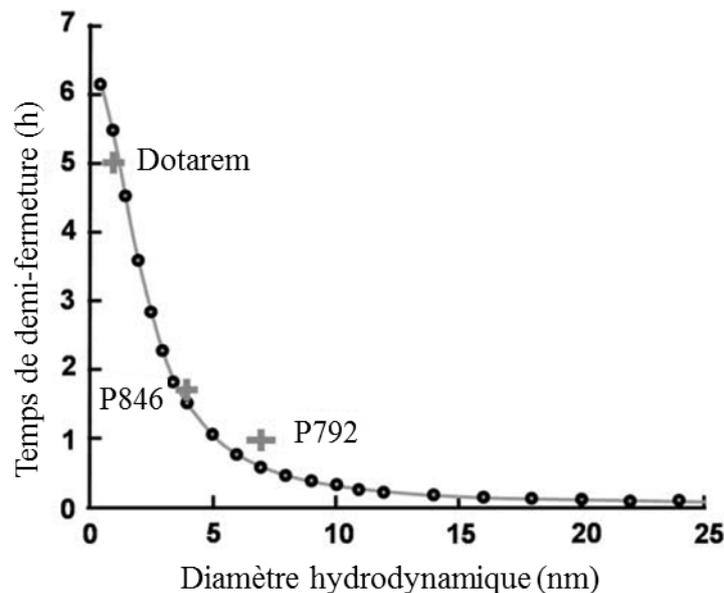


Figure 25 : La fermeture graduelle de la BHE après son ouverture par US.

Le temps de fermeture de la BHE après une ouverture par US est graduelle, et exclura à des temps différents des molécules de tailles différentes : Dotarem (558.64Da), P846 (3,5KDa) et P792 (6,5KDa). Adapté de (Marty et al., 2012).

3. Les paramètres : balance ouverture vs risques de dommages

Après la mise au point de cette méthode, de nombreuses études ont été menées afin d'optimiser les paramètres ultrasonores : la fréquence, la fréquence de répétition des impulsions, la durée des impulsions, l'amplitude, le temps d'exposition total, les bulles utilisées et leur dose (Figure 26, Tableau 6). Ces paramètres vont définir l'efficacité de l'ouverture, mais aussi le risque de survenue de dommages. Ces dommages incluent des œdèmes vasogéniques, mais aussi des pétéchies et extravasation d'hématies pouvant aller jusqu'à des hémorragies fatales ou des dommages du tissu sain dans la zone ciblée (Figure 27) (O'Reilly and Hynynen, 2012a; Shin et al., 2018).

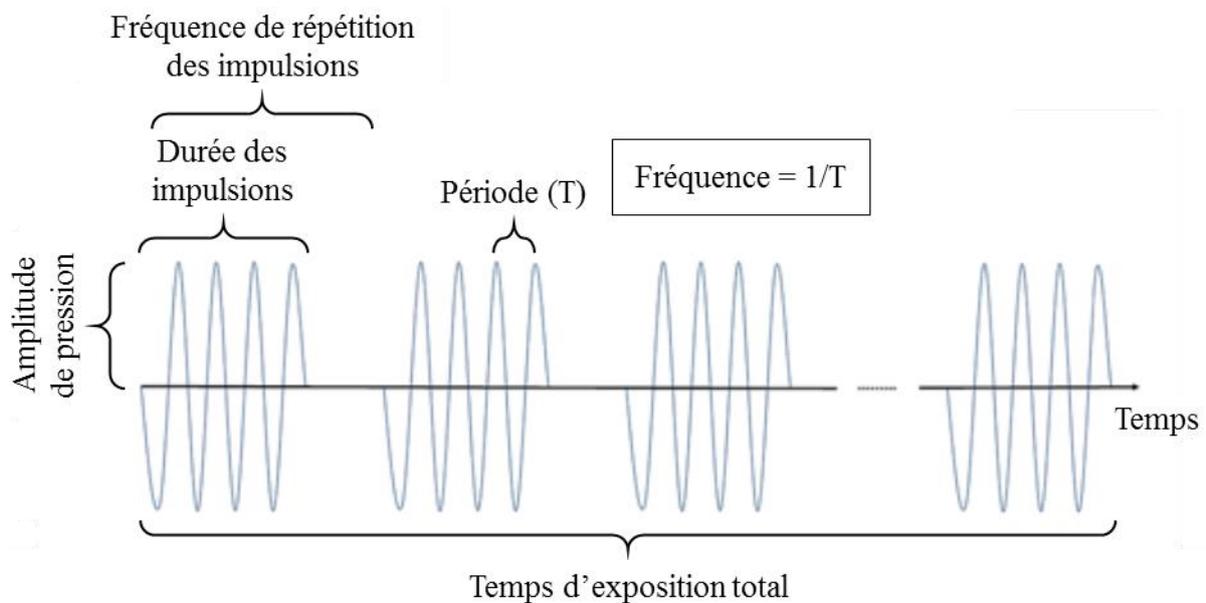


Figure 26 : Les paramètres des US.

Chacun de ces paramètres peut être modifié, influençant l'efficacité de l'ouverture de la BHE, mais aussi le risque de survenue de complications. Adapté de (Shin et al., 2018).

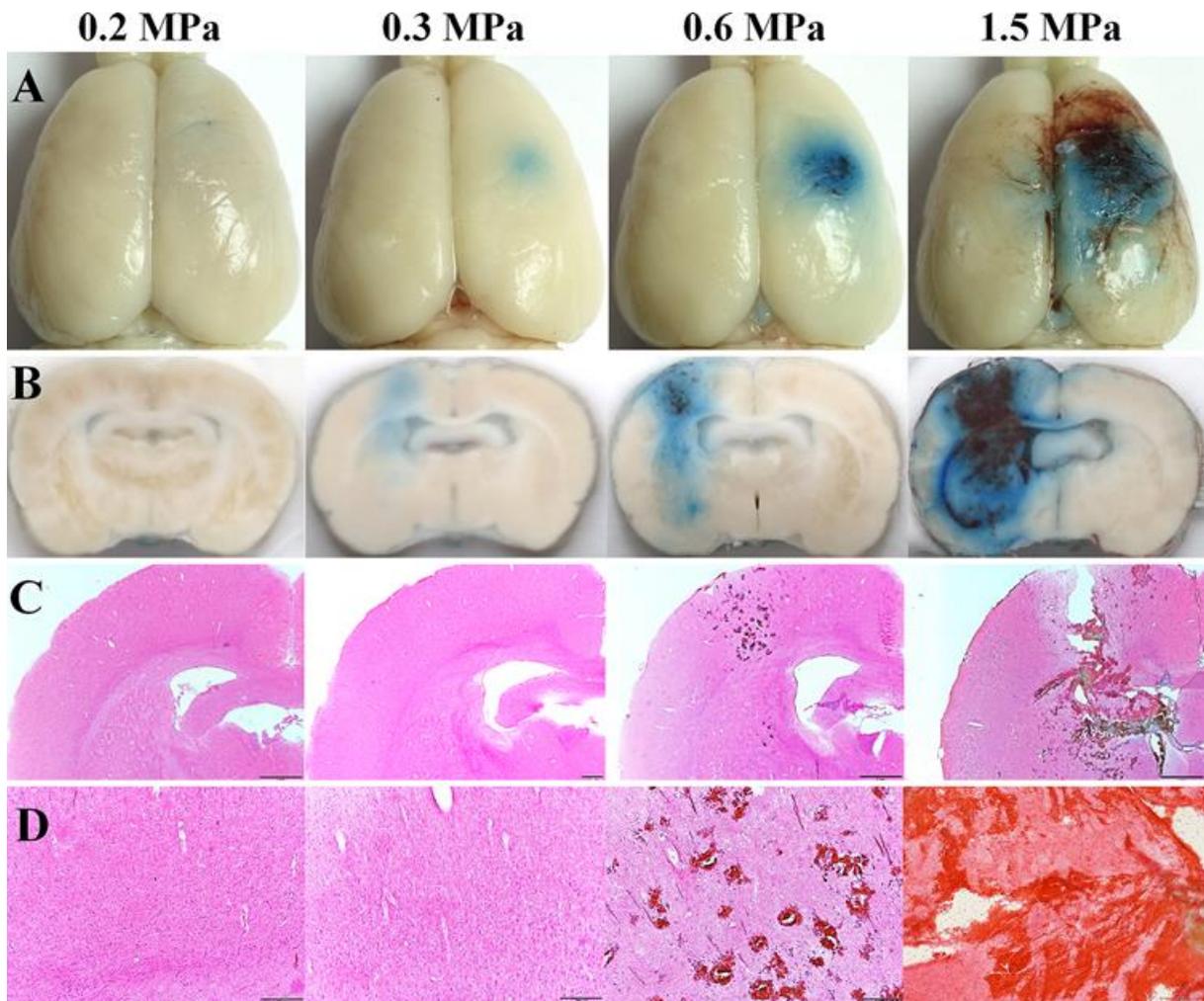


Figure 27 : Exemple de balance ouverture/dommages : impact de la pression acoustique sur des rats traités.

L'ouverture est visible par l'entrée de bleu Evans dans le parenchyme cérébral sur les cerveaux entiers (Panel A), et sur des coupes coronales (Panel B). Des coloration H&E de coupes des cerveaux permettent d'identifier les dommages tissulaires (Panel C à 2X, Panel D à 10X). Alors que des pétéchies apparaissent à 0,6MPa, des hémorragies et dommages du tissu sont visibles à la pression plus élevée. (Shin et al., 2018).

Une ouverture de la BHE peut être obtenue avec des impulsions ultrasonores dont la durée varie de l'ordre de quelques microsecondes à quelques secondes. La tendance générale, infirmée pour quelques conditions particulières, est une efficacité de l'ouverture de la BHE et un risque d'effets secondaires augmentant avec la durée des impulsions (Beccaria et al., 2013; Choi et al., 2011; O'Reilly and Hynynen, 2012a; Shin et al., 2018).

Une ouverture a pu être obtenue pour des fréquences variant entre 28kHz et 10MHz (Fan et al., 2015; Liu et al., 2010a). Le seuil du niveau acoustique pour une ouverture efficace et sûre de la BHE est lié à la fréquence des US. En effet la probabilité et l'amplitude des phénomènes de cavitation dépendent fortement de la fréquence ultrasonore. Notamment, l'effet obtenu sur la BHE est plus particulièrement corrélé à l'index mécanique qui tient compte de cette dépendance: $\text{index mécanique} = \text{pic de pression réfractée} / \text{fréquence}^{1/2}$ (Chu et al., 2016; McDannold et al., 2008b). Aux très basses fréquences (par exemple 28kHz), l'index mécanique pour obtenir une ouverture de BHE est très élevé, augmentant le risque de cavitation spontanée et peu contrôlable lié aux germes de bulles endogènes. Des fréquences plus hautes sont donc en général préférées. Les fréquences habituellement utilisées se situent entre 0.2 et 1,5MHz. La limite haute de cette gamme de fréquence est surtout liée au fait que la majeure partie des équipes utilise des approches transcrâniennes. À des fréquences plus élevées, le crâne réduit la pénétration des US, et empêche les traitements transcrâniens efficaces. Dans le cas d'une application focalisée transcrânienne, un compromis est à trouver entre transmission des US à travers l'os (fréquences basses) et précision de la focalisation (fréquences élevées) (O'Reilly and Hynynen, 2012a; Shin et al., 2018).

La durée du traitement influence aussi les effets des US sur la BHE. Il est à noter que l'effet de l'ouverture augmente avec la durée du traitement jusqu'à une certaine mesure, mais que le risque d'induire des dommages aussi (O'Reilly and Hynynen, 2012a; Shin et al., 2018). L'efficacité est ensuite limitée par la durée de vie des MB dans la circulation (quelques minutes).

Il existe plusieurs formulations de MB typiquement utilisées avec les US pour l'ouverture de la BHE (tableau 6). Trois formulations de MB disponibles sur le marché sont le

plus fréquemment utilisées et ont été initialement développées et approuvées en tant qu'agents de contraste ultrasonore. Les bulles Definity® et Optison™ sont les plus utilisées aux Etats-Unis. En Europe, SonoVue® est la plus utilisée. D'autres types de MB optimisées pour l'ouverture ont aussi été proposées et évaluées sur des modèles animaux (Choi et al., 2010; Fan et al., 2015; Song et al., 2017; Vlachos et al., 2011). Le type de bulle va conditionner les paramètres des US à utiliser. En particulier, la taille des bulles a démontré une importance dans le processus d'ouverture. Les bulles de plus grande taille (4-5 et 6-8 μm de diamètre) produisent une ouverture plus importante que les bulles de taille plus faible (1-2 μm de diamètre) pour une même pression acoustique et une même fréquence (Choi et al., 2010; Samiotaki et al., 2012; Vlachos et al., 2011). Une corrélation entre la fréquence des US et la taille des bulles va aussi influencer l'ouverture. En effet la taille des bulles va conditionner la fréquence de résonance de celles-ci, et donc leur interaction avec le champ ultrasonore. Ces corrélations vont ainsi influencer l'ouverture de la BHE, mais aussi le risque de dommages (O'Reilly and Hynynen, 2012a; Shin et al., 2018).

	SonoVue®	Définity®	Optison®
Fabricant	Bracco Diagnostics	Bristol-Myers Squibb Medical Imaging	GE Healthcare
Gaz encapsulé	Sulfure hexafluoride (SF ₆)	Octafluoropropane (C ₃ F ₈)	Octafluoropropane (C ₃ F ₈)
Capsule	Phospholipides	Phospholipides	Albumine
Diamètre moyen des bulles (mm)	2,5	1,1 - 3,3	2 - 4,5
Concentration en bulles (bulle/ml)	1 - 5 x 10 ⁸	1,2 x 10 ¹⁰	5 - 8 x 10 ⁸
Demi-vie (min)	2	1,9	1,3

Tableau 6 : Les trois MB les plus fréquemment utilisées pour l'ouverture de la BHE par US. Chaque type de bulles diffère par sa composition (capsule et gaz), sa taille, sa demi-vie, mais aussi la concentration sous laquelle ils sont vendus.

Une étude publiée très récemment montre l'impact de plusieurs paramètres sur l'efficacité de l'ouverture, mais aussi sur la survenue de dommages (Figure 28) (Shin et al., 2018). L'ouverture de la BHE résultant de la combinaison de plusieurs paramètres, une analyse de chaque paramètre indépendamment ne permet cependant qu'une analyse partielle de leur impact. Cette étude, bien que non exhaustive et dans un modèle murin assez éloigné de l'homme, illustre bien l'existence de jeux de paramètres permettant un très bon compromis efficacité-sécurité. En revanche, afin de parvenir à ce compromis, les paramètres adéquats doivent être d'abord identifiés, puis appliqués de manière reproductible et précise, car la fenêtre efficacité-sécurité est limitée.

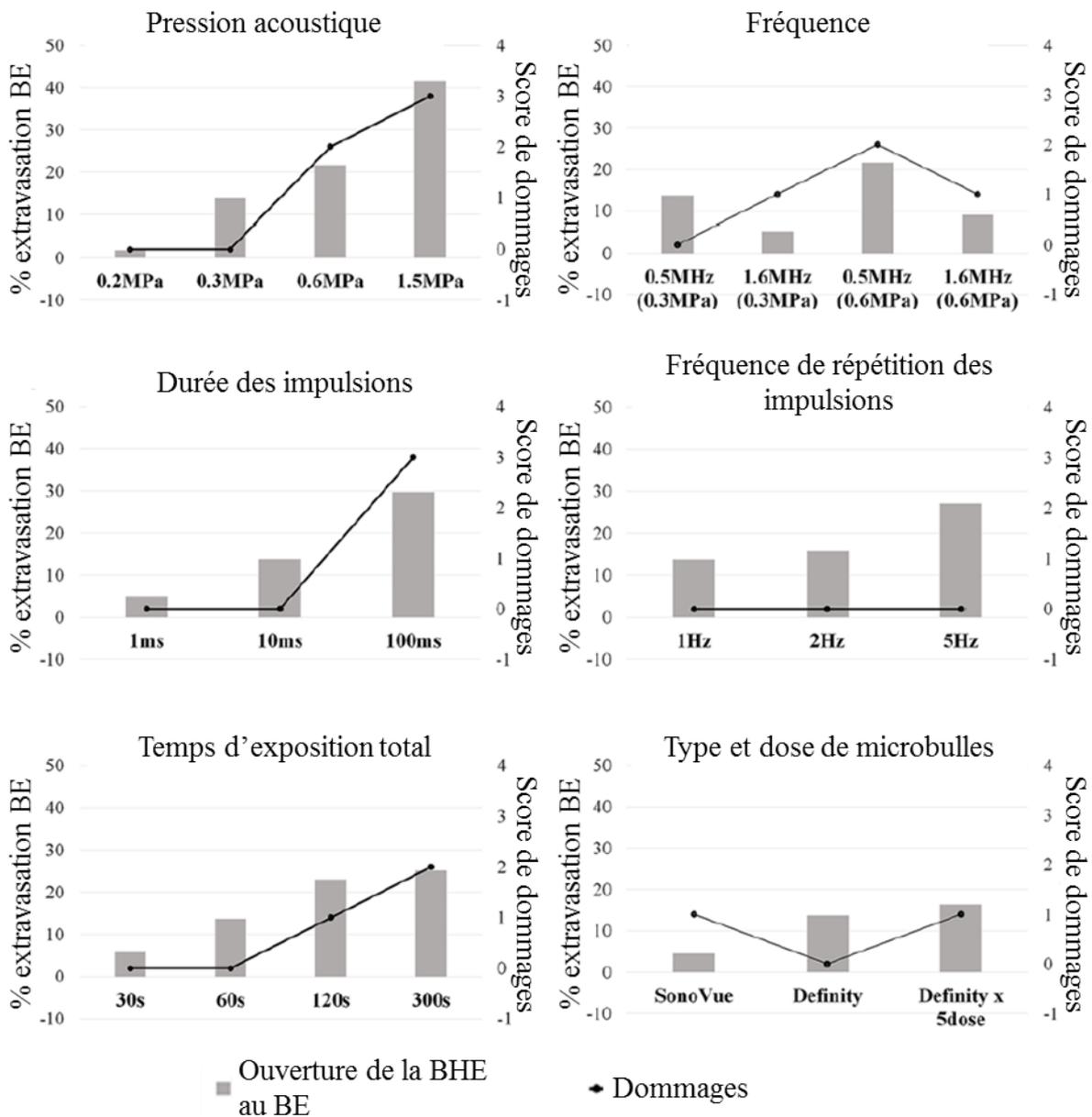


Figure 28 : L'impact des paramètres ultrasonores sur l'ouverture de la BHE au Bleu Evans (BE) et la survenue de dommages.

Cette étude a étudié l'impact de chaque paramètre indépendamment. L'ouverture de la BHE a été mesurée par le passage de BE, et les dommages tissulaires ont été classés par grade de gravité. Ces résultats sont cependant biaisés par le fait que l'efficacité de l'ouverture et la sécurité du procédé ne peut être imputé à la variation d'un seul paramètre, mais à la variation de plusieurs paramètres en même temps. Adapté de (Shin et al., 2018).

4. Les dispositifs utilisables pour l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

Les petits animaux (*i.e.* souris, rat, lapin), ont des crânes assez fins pour être traversés par les US avec une distorsion et une atténuation acceptable et reproductible. Les US peuvent alors être directement appliqués en transcrânien. Les dispositifs consistent en un transducteur ultrasonore relié à un générateur. Chez les petits rongeurs, l'animal est placé la tête en face du transducteur, avec de l'eau ou du gel de couplage échographique pour établir le contact entre le transducteur et le scalp de l'animal et assurer la transmission des ondes. Aucune bulle ne doit interférer avec les US. Ainsi, de l'eau dégazée est utilisée. Deux modèles principaux existent. Dans le premier, le système positionne la souris au-dessus du transducteur. Le transducteur est immergé dans de l'eau dégazée, et la tête de la souris est positionnée au-dessus du transducteur, avec le scalp dans l'eau (Figure 29). Dans le second système, le transducteur est positionné au-dessus de la tête de la souris. Le transducteur peut être situé dans un réservoir d'eau dégazée. L'onde acoustique va alors traverser l'eau, puis une membrane perméable aux US, puis du gel à échographie faisant le lien avec le scalp. Il est aussi possible d'établir directement le contact entre le transducteur et l'animal avec du gel à échographie (Figure 30 et 31). Ce système est mieux adapté pour une utilisation sur une souris dans un cadre de stéréotaxie, et permet un ciblage plus précis.

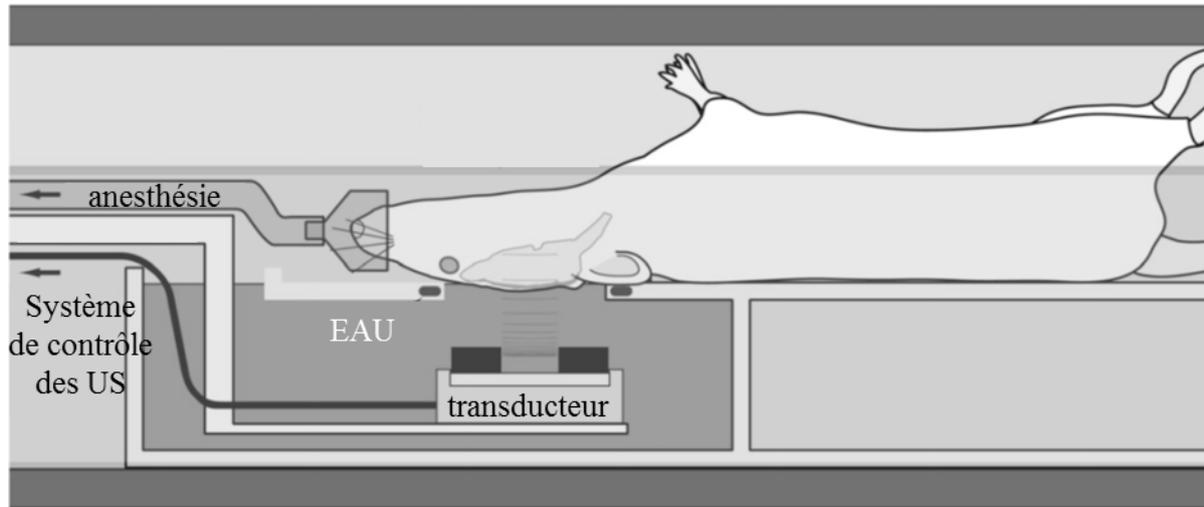


Figure 29 : Un dispositif d'ouverture de la BHE par US : système immergé sous l'animal.
Le transducteur ultrasonore est positionné au fond d'une cuve remplie d'eau dégasée. L'animal est positionné avec la tête au dessus, le scalp dans l'eau. L'eau établira le contact entre les transducteur et l'animal pour permettre aux US d'atteindre le cerveau. Adapté de (McDannold et al., 2011)

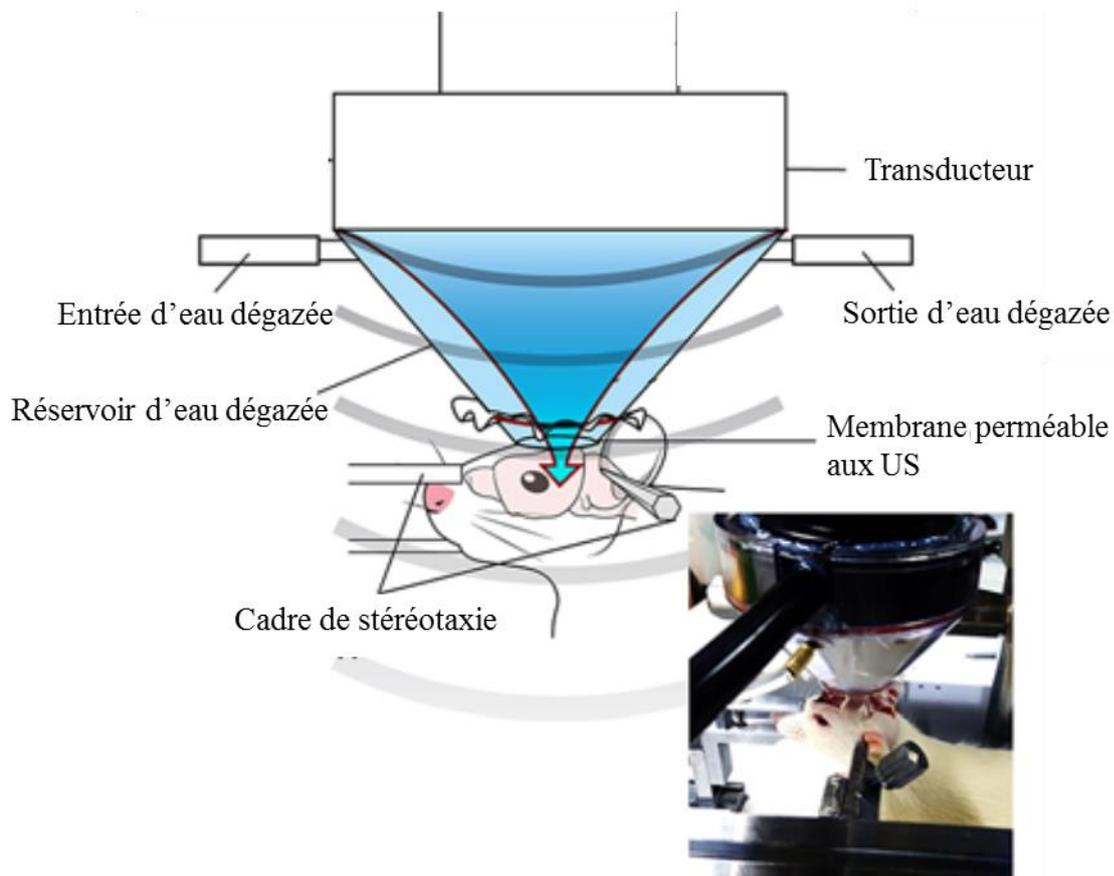


Figure 30 : Un dispositif d'ouverture de la BHE par US : système en réservoir d'eau au-dessus de l'animal.

Le transducteur est positionné au dessus de l'animal. Le transducteur est dans une cuve d'eau dont une partie du fond est constitué d'une membrane perméable aux US. Le contact entre cette membrane et l'animale est alors permis par du gel utilisé généralement en imagerie échographique. Ce dispositif est compatible avec le positionnement de la souris dans un cadre de stéréotaxie. Adapté de (Shin et al., 2018)

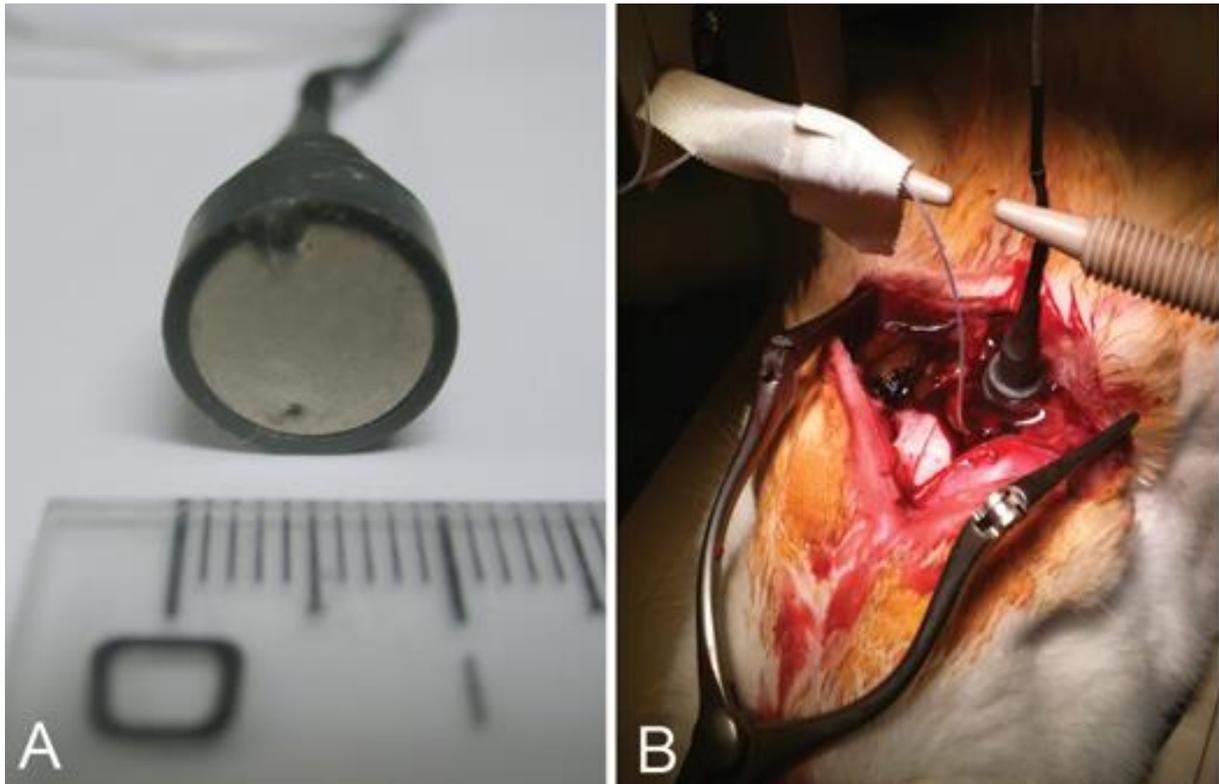


Figure 31 : Un dispositif d'ouverture de la BHE par US : système en contact direct par gel à échographie.

Ce système utilise un transducteur mobile, qu'il est possible de placer sur l'animal en établissant le contact par du gel à échographie. Ce dispositif est plus adapté aux gros modèles tels que le lapin. Il est aussi utilisable sur des animaux positionnés dans un cadre de stéréotaxie. (Beccaria et al., 2013)

Chez les animaux de plus grandes tailles tels que les primates, incluant l'homme, le crâne plus épais va provoquer une distorsion et une atténuation des US qui le traverseront. Aujourd'hui, deux types de systèmes existent.

Le premier type de système utilise des champs ultrasonores focalisés. La surface émettrice est alors une portion de sphère apposée à la tête du patient, le point focal concentrant l'énergie ultrasonore se situe donc au centre de la sphère, dans le cerveau. L'onde traversant les zones intermédiaires entre le transducteur et le point focal, y compris l'os du crâne, est suffisamment faible pour ne pas induire d'effets. Le grand contraste d'amplitude de pression

entre le point focal et le reste des tissus (gain focal) limite la zone traitée à un très petit volume, ce qui permet un traitement potentiellement précis spatialement, mais long s'il faut balayer une zone large avec cette petite zone focale. La surface émettrice peut être découpée en un grand nombre d'éléments indépendants permettant d'appliquer des déphasages (retards) de l'onde émise par chacun d'eux afin de déplacer électroniquement le point focal avec précision et sans nécessiter de mouvement mécanique (Figure 32). Ces dispositifs sont généralement couplés à des appareils IRM afin de contrôler la qualité de focalisation de l'onde sur la zone ciblée et éventuellement de la corriger. Il est possible d'exploiter les images IRM ou des images TDM (TomoDensitoMétrie) acquises au préalable pour ajuster la focalisation et l'amplitude des US et de compenser et corriger les distorsions du signal induites par le crâne. Un système de coussin d'eau permet d'établir la jonction entre les transducteurs et le scalpe du patient. Ce type de système focalisé initialement développé pour l'ablation thermique par HIFU, est à ce jour le plus utilisé pour des essais sur l'ouverture de la BHE *in vivo*. Des systèmes d'US focalisés transcrâniens sont utilisés par l'équipe du Dr Hynynen, mais aussi par l'équipe des Dr McDannold et Konofagou dont les travaux ont permis de développer ce procédé et ces dispositifs. Ces recherches ont permis à la société Insightec de développer des dispositifs utilisables pour traiter des humains (essais cliniques phase 1 NCT02343991, NCT02986932 en cours). La société NaviFUS développe un système similaire en essayant de s'affranchir de la nécessité d'une imagerie IRM simultanée.

Malgré son caractère extracorporel et minimalement invasif, l'approche focalisée transcrânienne a de fortes limitations. En effet, la transmission des US à travers le crâne est peu efficace et surtout très variable. Or, comme discuté plus haut, la plage de pression acoustique nécessaire pour obtenir une ouverture de BHE sûre et efficace est étroite et ne peut pas s'accommoder de cette variabilité. Ainsi, pour compenser partiellement cette variabilité, des

mécanismes complexes de monitoring et de rétrocontrôle sont nécessaires. De plus, le couplage acoustique entre le transducteur focalisé extracorporel et la tête du patient nécessite un rasage complet des cheveux, et un mécanisme de refroidissement complexe pour évacuer la chaleur générée par l'onde atténuée par le scalp et par le crâne. L'alignement entre le point focal du transducteur et la zone à traiter nécessite un système de positionnement compliqué soit sous contrôle IRM soit avec une approche stéréotaxique. Il est difficile d'atteindre avec un système extracorporel focalisé les zones proches de l'os du crâne, ce qui limite les traitements à des zones relativement profondes. Enfin, ouvrir la BHE sur un grand volume nécessite de balayer le point focal et peut donner des temps de traitements prohibitifs avec plusieurs injections de MB. Au final, malgré un caractère extracorporel et minimalement invasif a priori très attractif, les US transcrâniens focalisés sont limités à des indications nécessitant uniquement une ouverture sur des zones relativement profondes et peu volumineuses, et les traitements peuvent être lourds surtout dans le cas de cures répétées : longue immobilisation du patient dans un IRM (plusieurs heures), rasage des cheveux, et système ultrasonore complexe et onéreux (O'Reilly and Hynynen, 2012b).

Pour pallier à ces limitations, sous l'idée du Pr Alexandre Carpentier, la société CarThera a développé un transducteur implantable dans l'épaisseur de l'os : le SonoCloud®. Il peut être implanté dans un trou de trépan lors d'une chirurgie pour exérèse, ou lors d'une courte intervention sous anesthésie locale. Le scalp est alors remis par-dessus. L'implant SonoCloud® est aussi IRM compatible en raison de ses matériaux, afin de permettre l'imagerie de suivi des patients, et le contrôle de l'ouverture de la BHE. Le SonoCloud® est activé grâce à une aiguille transdermique de connexion électrique reliant le générateur au transducteur, et permettant son activation. Les US émis ne sont pas focalisés, et permettront alors une ouverture de la BHE dans une large zone cylindrique dont le diamètre est environ celui de l'implant (1 cm). De plus,

la barrière osseuse étant supprimée, une pression acoustique très précise et reproductible peut être générée dans la zone ciblée en utilisant une calibration préalable de l'implant, sans nécessiter de système de monitoring ou de rétrocontrôle (Figure 33).

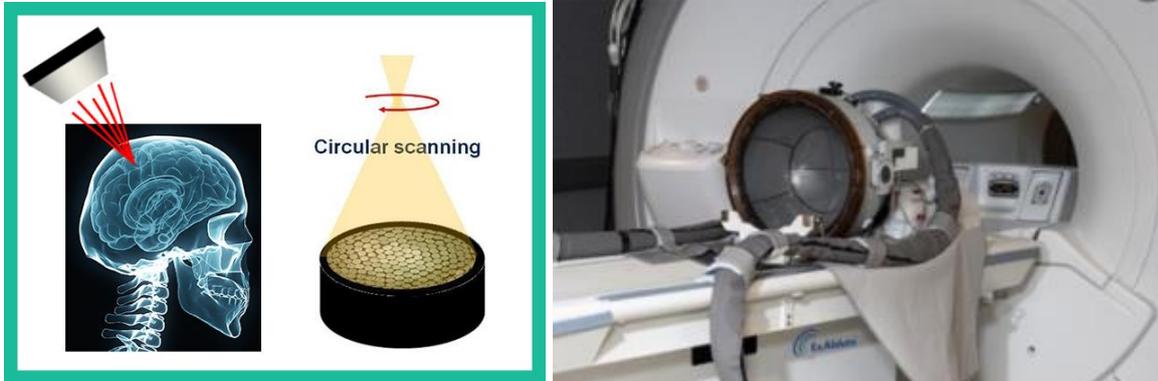


Figure 32 : Les dispositifs pour l'envoi d'US focalisés dans ce cerveau de patients humains. Deux sociétés travaillent au développement de ces appareils: NaviFus (gauche) et insightec (droite).

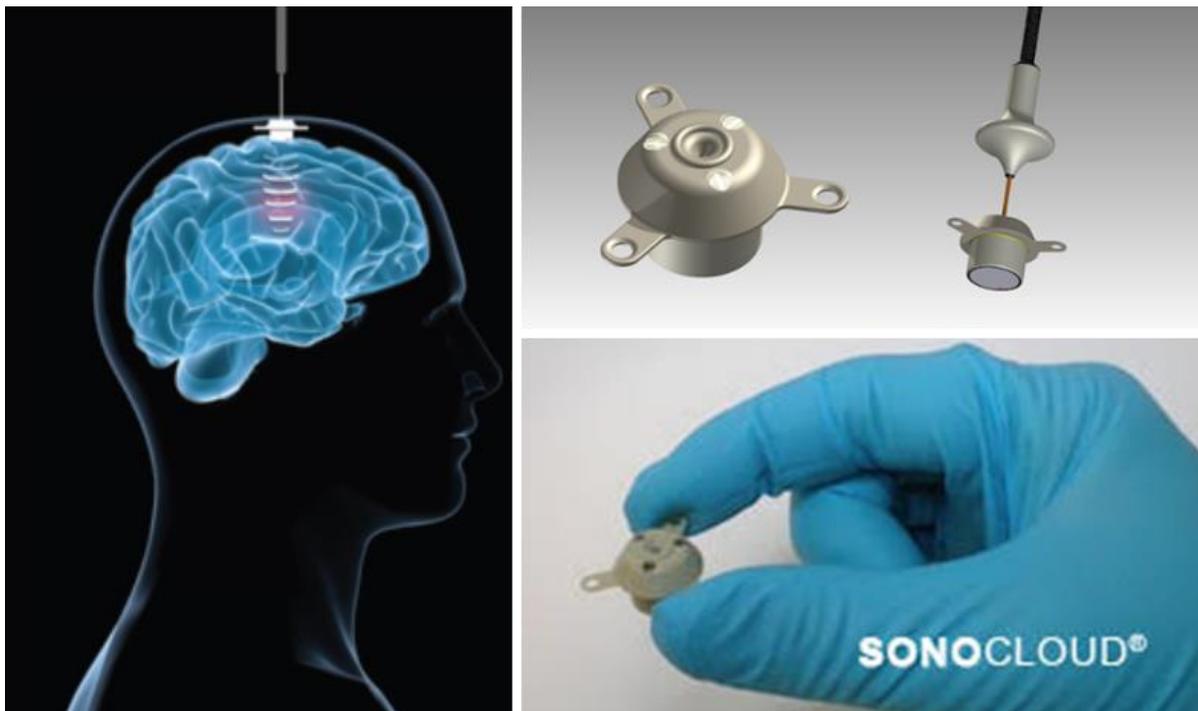


Figure 33 : Le dispositif développé par CarThera : le SonoCloud®.

Ce dispositif implantable dans l'épaisseur du crâne dans un trou de trépan permet d'envoyer des US dans le cerveau des patients. Son activation est permis par un système d'aiguille établissant le contact avec le générateur.

5. Les agents anti-tumoraux utilisés avec une BHE ouverte par ultrasons

L'impact de l'ouverture de la BHE par US sur le passage et l'efficacité des traitements a été évalué pour plusieurs molécules. De nombreuses chimiothérapies et anticorps ont été testées (Tableaux 7 et 8) et des études récentes s'intéressent au passage d'acides nucléiques (Tableau 9). Plusieurs formulations en nanoparticules incluant des formes liposomales ont fait l'objet d'études en association à une ouverture de la BHE par US. Cette encapsulation de la molécule thérapeutique permet de la protéger et donc d'accroître sa demi-vie plasmatique et dans le tissu. Les nanoparticules vont aussi contribuer à masquer la molécule thérapeutique des systèmes d'efflux. Le déchargement lent des nanoparticules va aussi permettre une diffusion plus longue de la molécule thérapeutique, permettant une exposition des cellules tumorales plus durable. Il a aussi été décrit que le phénomène de force de radiation acoustique pousse les nanoparticules vers le parenchyme cérébral au travers de la BHE alors ouverte dans le champ ultrasonore (Baghirov et al., 2018). Les anticorps, les liposomes et les nanoparticules étant parmi les plus grosses molécules/particules qui soient utilisées en médecine, le bénéfice de les associer à une ouverture de la BHE par US démontre l'efficacité de cette ouverture, et permet de potentialiser leurs effets thérapeutiques dans le traitement des pathologies du SNC.

Chimiothérapie	Modèle	Résultats	Référence
Doxorubicine	Rat (sain)	Augmentation de passage	(Treat et al., 2007)
	Rat (sain)	Augmentation de passage	(Park et al., 2012b)
	Rat (modèle de gliome C6)	MB conjuguées à des nanoparticules (SPIO) chargées en doxorubicine. Augmentation de l'accumulation de doxorubicine	(Fan et al., 2013a, 2016)
	Souris SCID (modèle de gliome humain GBM8401)	Augmentation de passage mesuré par microdialyse	(Lin et al., 2018)
Doxorubicine liposomale	Rat (modèle de gliome C6)	Doxorubicine encapsulée dans des liposomes cationiques (DOX-CLs) Suppression de la progression tumorale et rallongement de la survie des rats.	(Lin et al., 2015)
	Rat (modèle de gliome C6)	Augmentation de passage Forte suppression tumorale	(Zhao et al., 2015)
	Rat (modèle de gliome 9L)	Contrôle de la progression tumorale et augmentation de la survie.	(Treat et al., 2009, 2012)
	Souris (modèle de gliome)	Retard dans la progression tumorale.	(Yang and Horng, 2013a)

Chimiothérapie	Modèle	Résultats	Référence
Doxorubicine liposomale (suite)	Souris (modèle de gliome GBM-8401)	Augmentation de passage Inhibition significative de la croissance tumorale comparée au groupe avec chimiothérapie seule.	(Yang et al., 2012a, 2012b, 2012c)
	Rat (modèle de gliome 9L)	Suppression tumorale complète et survie augmentée de 100%.	(Aryal et al., 2013)
	Rat (modèle de gliome 9L)	Augmentation de passage	(Aryal et al., 2013)
	Rat (modèle de gliome 9L à différents stades)	Augmentation de passage	(Aryal et al., 2015)
	Deux modèles de GBM de souris syngéniques (GL261 et SMA-560)	Augmentation de passage Augmentation significative de la survie et progression plus lente.	(Kovacs et al., 2014)

Chimiothérapie	Modèle	Résultats	Référence
Doxorubicine liposomale (suite)	Souris (modèle de gliome)	Doxorubicine encapsulée dans des liposomes de polymères conjugués à des groupements folates (FPD). Association des FPD + GMBL / US conduisant aux meilleurs effets anti-gliome avec augmentation significative de la survie globale. (GMBL : cf ligne sur les inhibiteurs de TGFβ1)	(Chen et al., 2015)
Epirubicine	Rat (modèle de gliome C6)	Conjugaison sur des nanoparticules magnétiques. Augmentation de passage Meilleur contrôle de la progression tumorale.	(Liu et al., 2010b)
Irinotecan	Lapin (sain)	Augmentation de passage	(Beccaria et al., 2015)
Témozolomide	Rat (modèle de gliome)	Augmentation de passage Meilleur contrôle de la progression tumorale. Augmentation de survie.	(Wei et al., 2013)
	Lapin (sain)	Augmentation de passage	(Beccaria et al., 2015)

Chimiothérapie	Modèle	Résultats	Référence
BCNU	Rat (modèle de gliome C6)	Augmentation de passage Augmentation de survie. Meilleur contrôle de la progression tumorale.	(Liu et al., 2010c)
	Rat (modèle de gliome C6)	Conjugaison ou non sur des nanoparticules magnétiques. Augmentation de passage	(Chen et al., 2010)
	Rat (modèle de gliome C6)	MB chargées en BCNU : augmentation de la demi-vie du BCNU. Suppression de la progression tumorale. Augmentation de la survie.	(Ting et al., 2012)
	Rat (modèle de gliome C6)	Développement d'un ciblage par des MB conjuguées au VEGF-R2 chargées en BCNU. Augmentation de passage local par le couplage au VEGF-R2 et par l'ouverture de la BHE par US. Ralentissement de la progression tumorale. Augmentation de survie.	(Fan et al., 2013b)
Carboplatine	Primates non humains (sain)	Augmentation de passage	(Goldwirt et al., 2015)
Cisplatine liposomal	Souris (modèles de gliome)	Ralentissement de la progression tumorale.	(Yang and Horng, 2013b)

Chimiothérapie	Modèle	Résultats	Référence
Nanoparticules chargées en cisplatine	Rat (modèle de gliome 9L)	Augmentation de la demi-vie du cisplatine par la formulation en nanoparticules. Augmentation de passage Ralentissement de la croissance tumorale.	(Timbie et al., 2017)
Méthotrexate liposomal	Rat (sain)	Liposomes chargés en méthotrexate couplés aux MB. Augmentation de passage	(Wang et al., 2014)
Méthotrexate	Lapin (sain)	Augmentation de passage	(Mei et al., 2009)
Inhibiteurs de TGF β 1	Souris (modèles de gliome)	MB conjuguées à des groupements des-octanoyl ghreline (GMB) chargées en inhibiteur de TGF β 1 (LY364947) (GMBL) Augmentation de passage	(Chen et al., 2015)
Cytarabine	Rat (sain)	Augmentation de passage	(Zeng et al., 2012)
Paclitaxel liposomal	Souris NUDE (xénogreffe de U87 : lignée de GBM humain)	Augmentation de passage Ralentissement de la progression tumorale Augmentation de la survie.	(Shen et al., 2017)

Tableau 7: Les chimiothérapies ayant été utilisées avec une ouverture de la BHE par US sur différents modèles animaux.

Les modèles utilisés et les effets observés sont détaillés dans ce tableau.

Anticorps	Modèle	Résultats	Référence
Bevacizumab (avastin)	Souris (modèle de glioma U87)	Augmentation de passage Ralentissement significatifs de la progression tumorale. Augmentation significative de la médiane de survie.	(Liu et al., 2016b)
Anticorps anti-VEGF-R2	Rat (modèle de gliome C6)	Développement d'un ciblage par des MB conjuguées au VEGF-R2 chargées en BCNU. Augmentation de passage local par le couplage au VEGF-R2 et par l'ouverture de la BHE par US.	(Fan et al., 2013b)
Trastuzumab	Rat (modèle de métastase cérébrale de cancer du sein)	Augmentation de la survie	(Park et al., 2012a)
	Rats (modèle de métastases cérébrales de cancer du sein) (cellules HER2-positives dérivées d'une métastase cérébrale d'un cancer du sein humain : MDA-MB-361).	Trastuzumab + pertuzumab Inhibiteur de la croissance tumorale	(Kobus et al., 2016)

Anticorps	Modèle	Résultats	Référence
Pertuzumab	Rats (modèle de métastase cérébrale de cancer du sein) (cellules HER2-positives dérivées d'une métastase cérébrale d'un cancer du sein humain : MDA-MB-361).	Trastuzumab + pertuzumab Inhibition de la croissance tumorale	(Kobus et al., 2016)
Herceptin	Souris (saines)	Augmentation de passage	(Kinoshita et al., 2006a)

Tableau 8 : Les anticorps ayant été utilisés avec une ouverture de la BHE par US sur différents modèles animaux.

Les modèles utilisés et les effets observés sont détaillés dans ce tableau.

Acides nucléiques	Modèle	Résultats	Référence
shARN anti-birc5 encapsulés dans des liposomes décorés de peptides Asn-Gly-Arg (NGR) qui ciblent les gliomes qui surexpriment CD13 (shBirc5-lipo-NGR) eux même liés aux MB	Rat (modèle de gliome C6)	Hausse de passage des shBirc5-lipo-NGR par la procédure ultrasonore Extinction de la cible.	(Zhao et al., 2018)

Tableau 9 : Les acides nucléiques ayant été utilisées avec une ouverture de la BHE par US sur différents modèles animaux.

Les modèles utilisés et les effets observés sont détaillés dans ce tableau.

6. Le développement clinique de l'ouverture de la BHE par ultrasons

Les dispositifs utilisables chez l'homme ont déjà montré une bonne tolérance du procédé chez des primates non humains (Horodyckid et al., 2015; McDannold et al., 2012). Chez l'homme, l'utilisation des US focalisés pour ouvrir la BHE fait l'objet de trois essais cliniques enregistrés sur clinicaltrials.gov au centre Sunnybrook Health Sciences Centre de Toronto pour le traitement de patients atteints de tumeurs cérébrales (NCT02343991), de la maladie d'Alzheimer (NCT02986932) ou de la sclérose amyotrophique latérale (NCT03321487).

Pour l'ouverture de la BHE par US non focalisés, une étude clinique de phase 1 utilisant le carboplatine avec une ouverture de la BHE par le SonoCloud[®] a déjà montré une bonne tolérance et une efficacité à ouvrir la BHE de manière répétée (Figure 34) chez les patients traités pour leur GBM (NCT02253212) (Carpentier et al., 2016). Cette étude menée à l'hôpital de la pitié Salpêtrière, à Paris, a permis d'identifier les pressions acoustiques optimales produisant une ouverture de la BHE chez l'homme, visible par la prise de contraste au gadolinium mesurée en imagerie IRM pondérée en T1 (Figure 35). Dans cette étude en cours (25 patients traités à ce jour), la procédure était bien tolérée, même pour des patients ayant reçu 10 traitements, et des ouvertures de la BHE large et reproductible étaient observées pour les traitements aux paramètres optimaux. Cette étude est à ce jour la plus avancée dans le domaine de l'ouverture de la BHE par US. En effet, les autres dispositifs tels que celui développé par Insightec ont peu de données publiées, et sont actuellement principalement utilisés en traitement unique, ne permettant pas d'évaluer l'impact des traitements répétés nécessaires aux applications chimiothérapeutiques.

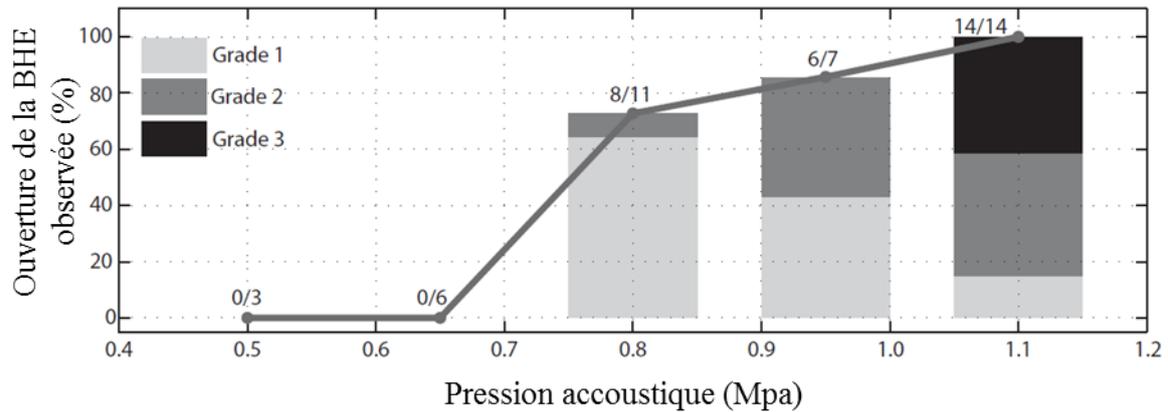


Figure 34 : L'ouverture de la BHE par le SonoCloud® visualisée par la prise de contraste au gadolinium en imagerie IRM pondérée en T1.

Un grade a été attribué à chaque ouverture de la BHE d'après le passage observé de gadolinium dans la zone cérébrale soumise à l'ouverture de la BHE par US. L'ouverture est visible pour des pressions acoustiques supérieures à 0,8MPa. Les ouvertures sont classées selon un grade, le grade 1 représentant une ouverture faible alors qu'un grade 3 représente une ouverture importante. (Carpentier et al., 2016).

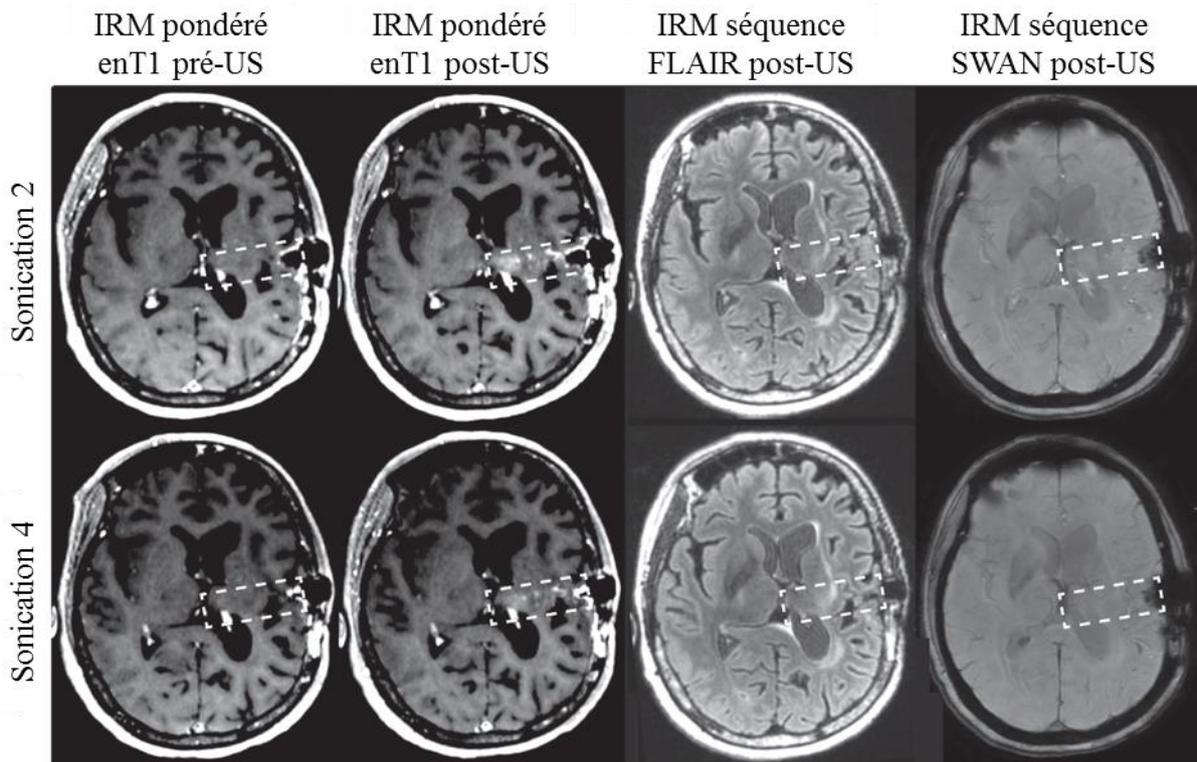


Figure 35 : L'ouverture de la BHE par le SonoCloud®.

L'encadré en pointillé représente la zone exposée aux US émis par le SonoCloud®. L'imagerie IRM pondérée en T1 montre le canal d'ouverture de la BHE visible par la prise de contraste au gadolinium après l'activation du SonoCloud®. L'imagerie IRM pondérée en T2 FLAIR ne montre pas d'apparition d'un œdème vasogénique après l'ouverture de la BHE. L'imagerie IRM avec une séquence SWAN ne montre pas d'hémorragie. Chez ce patient, les imageries après 2 traitements espacées de 2 mois ne montrent pas d'évolution de la tumeur. Adapté de (Carpentier et al., 2016).

De façon notable, un patient chez qui l'ouverture de la BHE a été très efficace, et ayant reçu du carboplatine lors des traitements, a montré une absence de progression de sa tumeur en imagerie IRM pondérée en T1 et une réduction du signal mesuré en imagerie IRM pondérée en T2 FLAIR (Figure 35). Ces résultats vont dans le sens de l'efficacité du procédé pour traiter les GBM, et doivent être confirmés dans une étude clinique de phase 2 (Carpentier et al., 2016).

Une étude clinique d'ouverture de la BHE par le SonoCloud® sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est aussi en cours (NCT03119961), et devrait, elle aussi, conforter les données prouver la bonne tolérance de l'ouverture de la BHE par le SonoCloud®.

L'ouverture de la BHE par US permet d'accroître le passage cérébral et l'efficacité des chimiothérapies dans différents modèles animaux. Chez l'homme, les nouvelles technologies permettent de traiter les patients avec un contrôle des paramètres permettant à la procédure d'être sûre. Ces derniers résultats encouragent donc à évaluer des chimiothérapies associées à une ouverture de la BHE concomitante pour traiter des patients atteints de GBM.

II. Objectifs du projet

Le projet s'organise en 2 axes:

- Le premier axe vise à identifier des chimiothérapies qui pourraient bénéficier de l'ouverture de la BHE par US dans le traitement du GBM, et d'en confirmer l'impact sur des modèles murins de GBM orthotopiques.
- Le second axe vise à établir le profil d'expression des transporteurs ABC et leur valeur clinique dans le GBM.

A. Chimiothérapies et ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

1. Étude de la littérature

La première étape de l'identification des chimiothérapies pouvant bénéficier de l'ouverture de la BHE par US a été conduite sur les données disponibles dans la littérature. Une revue exhaustive des caractéristiques pouvant avoir un impact dans le traitement du GBM pour plusieurs chimiothérapies a été effectuée et publiée. Le choix de critères éclairés associés à cette analyse vise à présélectionner des chimiothérapies afin de les évaluer dans les modèles décrits par la suite.

Finalement, cette analyse a suffi à elle seule à identifier des chimiothérapies prometteuses pour le traitement du GBM après ouverture de la BHE par US. En particulier, cette analyse a confirmé que le carboplatine, utilisé dans l'étude clinique de phase 1 du SonoCloud[®], est un bon candidat pour bénéficier de l'ouverture de la BHE par US.

2. Etablissement d'un modèle de barrière hémato-encéphalique *in vitro*

Le second objectif était d'établir un modèle de BHE *in vitro* afin d'évaluer à moyen débit, le passage cérébral de chimiothérapies. En effet, la disponibilité dans la littérature des données concernant la biodisponibilité des molécules dans le parenchyme cérébral est peu documentée, et parfois manquante pour certains agents thérapeutiques.

Un modèle *in vitro* de BHE humain constitué de cellules immortalisées facile de mise en place et d'emploi a donc été créé à partir des données de la littérature, et évalué. Après validation du modèle avec l'analyse du passage de chimiothérapies dont la pénétration cérébral est connue (Dréan et al., 2016), ce modèle devait servir à évaluer le passage d'autres chimiothérapies ou molécules thérapeutiques innovantes. Ces nouvelles données auraient complété les données de la littérature et permis d'optimiser la sélection des chimiothérapies candidates pour l'étape de validation et confirmation sur le modèle *in vivo*.

Cet objectif a été initié, mais n'a pas été conduit à sa fin à défaut d'une efficacité du modèle évalué.

3. Validation de l'impact de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons sur le carboplatine et les chimiothérapies candidates

a) Evaluation de l'efficacité thérapeutique du carboplatine adjuvant à la procédure d'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

L'évaluation du gain thérapeutique induit par l'utilisation du carboplatine adjuvant à l'ouverture de la BHE par US vise à apporter des données pour favoriser la mise en place de l'évaluation clinique d'efficacité de phase 2 de cette procédure déjà évaluée en étude clinique de phase 1. Elle servira également de référence pour l'évaluation d'autres agents candidats pour des essais cliniques futurs.

La cytotoxicité du carboplatine a d'abord été évaluée *in vitro* sur 6 lignées dérivées de patients (PDCL) et 2 lignées commerciales de GBM (U87-MG et U251). La lignée commerciale U87-MG a ensuite été choisie pour réaliser les premières étapes d'optimisation *in vivo* en raison d'une croissance plus rapide qu'avec des modèles primaires. L'efficacité du traitement au carboplatine des GBM a d'abord été validé *in vivo* sans impact de la BHE sur un modèle de souris immuno-déficientes greffées en position hétérotopique sous-cutanée avec la lignée U87-MG.

Cette même lignée a ensuite été greffée en position orthotopique sur des souris immuno-déficientes. Ces dernières ont alors été traitées par les différentes modalités : non traité, US seuls, carboplatine seul, carboplatine + US. Ce modèle et cette procédure ont permis l'évaluation de l'impact de cette procédure thérapeutique impliquant le carboplatine et l'ouverture de la BHE par US.

b) Evaluation de la procédure avec d'autres chimiothérapies

Les autres chimiothérapies candidates ont été évaluées sur le même modèle murin afin de confirmer l'impact thérapeutique supposé de ces chimiothérapies avec une ouverture de la BHE par US. Cette partie de l'étude permet de proposer aux centres souhaitant traiter leurs patients avec le SonoCloud[®] une alternative au carboplatine.

Enfin, cette procédure a été répétée sur un modèle murin immuno-déficient greffé en position orthotopique avec la PDCL 6240 pour valider l'impact de la combinaison de la chimiothérapie la plus efficace avec une ouverture de la BHE par US.

B. Etude de l'expression des transporteurs ABC et de l'impact clinique dans le glioblastome

Les transporteurs ABC regroupent plusieurs pompes d'efflux dont l'expression par les cellules tumorales peut contribuer au développement de mécanismes de résistance aux chimiothérapies. Une vue globale du profil d'expression de ces transporteurs dans le GBM n'est pas disponible dans la littérature. Dans ce second axe du projet de thèse, nous avons donc établi ce profil d'expression des transporteurs ABC dans le GBM en analysant leur expression dans neuf couples de PDCL et les tumeurs parentales dont elles dérivent. Nous avons par la suite recherché l'impact clinique de leur expression sur la survie des patients atteints de GBM. Pour cela, nous avons utilisé sur les données du TCGA (The Cancer Genome Atlas) concernant les quarante-neuf transporteurs ABC comme panel de référence, puis nous avons validé les résultats significatifs grâce à une cohorte de patients de la Pitié Salpêtrière.

III. Matériels et méthodes

Pour les études pour lesquelles les publications sont intégrées, la partie « Matériels et Méthodes » ne sera pas détaillée ici. Il ne sera donc détaillé ici que les informations relatives aux données non publiées.

A. Conception d'un modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique

1. Lignées cellulaires

La lignée hCMEC/D3 (SCC066, Merck Millipore) a été cultivée dans le milieu EndoGRO MV complet (SCME004, Merck Millipore) sur une couche de collagène de queue de rats de faible viscosité à 10 μ g/cm² (#3443-100-01, R&D systems, Trevigen). La lignée d'astrocytes immortalisés (T0281, ABM) a été cultivée dans le milieu Prigrow IV (TM004, ABM) sur une couche de collagène de type 1 (G422, ABM). La lignée de péricytes primaires Human Brain Vascular Pericytes HBVP (1200-sc, clinisciences) a été cultivée dans le milieu adapté « pericyte medium » (1201-sc, clinisciences) sur une couche de poly-L-Lysine à 2 μ g/cm².

2. Immortalisation des péricytes

Afin d'immortaliser la lignée HBVP, les virus lentivirus Lenti-SV40 codant le grand antigène T de SV40 (#G203, gentaur) et Lenti-hTERT codant le gène humain de TERT (#G200, gentaur) ont été utilisés à deux titres : 5 et 10 UI/cellules. Six conditions ont été testées : Lenti-hTERT seul aux deux titres (hTERT.1 et hTERT.2), Lenti-SV40 seul aux deux titres (SV40.1 et SV40.2), et les deux lentivirus aux 2 titres (SV40/hTERT.1 et SV40/hTERT.2). Les cellules

ont été maintenues en culture en parallèle des HBVP natifs jusqu'au passage maximum auquel les cellules primaires ont pu se maintenir.

3. Analyse de l'expression de marqueurs spécifiques des péricytes et cellules endothéliales par RT-qPCR

Pour chaque analyse, 1×10^4 cellules dissociées ont été mises en culture dans des flasques de 75cm². Pour les HBVP primaires et immortalisés, le milieu de culture était changé au jour 1 puis les cellules étaient dissociées et récoltées au jour 2. Pour les hCMEC/D3, le milieu de culture était changé au jour 3, puis les cellules étaient dissociées et récoltées au jour 4. Les cellules étaient conservées en culot sec à -80°C jusqu'à utilisation. L'extraction d'ARN a été réalisée sur les culots secs de cellules avec le kit NucleoSpin[®] RNA (#740955, Macherey-Nagel) d'après les recommandations du fabricant. La réverse transcription a été effectuée avec le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoScientific, K1442) d'après les recommandations du fabricant à partir de 750ng d'ARN. Les ADNc ont été stockés à -20°C. La qPCR a été réalisée avec le système des sondes UPL (#04483433001, Roche) et le réactif LightCycler Probe Master mix 2X (#04887301001, Roche). Les amorces et sondes utilisées sont listées dans le tableau 10. La mesure a été faite sur le Light Cycler 96 (Roche). Chaque qPCR a été faite en duplicata à chaque expérience et moyennées. Pour chaque marqueur, les moyennes de trois expériences différentes faites à partir des cellules à trois passages différents ont été analysées. PPIA (peptidylproplyl isomérase A) a été utilisé comme gène de ménage pour la normalisation.

Marqueur	Primer L	Primer R	Sonde UPL
SV40T	tttctcattaaaggcattcca	agattccaacctatggaactgatg	32
A-SMA	cctatccccgggactaagac	aggcagtgtgtctcttct	78
SM22-a	ttccagactgttgacctcttg	caaagccatcagggtctc	74
NG2	gagaggcagctgagatcagaa	tgagaatac gatgtctgcaggt	78
PDGFR- β	catctgcaaaaccaccattg	gagacgttgatggatgacacc	10
ostéopontine	gagggttggtgtcagc	caattctcatgtagtgagtttcc	18
Kir6.1	cgctaccggagtctgag	cagcttagccacctcctct	34
Claudine-5	gtgtacaccagtggtgtg	ccagttcaggtgacaccactt	48
Occludine	ggactctacgtggatcagtattg	aataatcatgaacccagtacaatg	79
LSR	gtggccaaggctcctatgta	gtagccactgcggacagag	56
PECAM-1	gcaacacagtccagatagtcgt	gacctcaaactgggcatcat	14
VE-Cadhérine	gcagtccaacggaacagaa	catgagcctctgcacttcc	30
JAM-A	tcaaggtcaagctcatcgtg	ggcagaggaggggatgta	58
ZO-1	tgatcattccaggcactcg	ctcttcatcttactccggagact	66
β -caténine	gctttcagttgagctgacca	caagtccaagatcagcagctctc	21
MSFD2A	ggactgcaggtgctaggaag	cacagtgagcacagcaagtg	10
PLVAP	gcatcaatgccagcttcc	tctgcattgcttctactcaa	46
Récepteur à la transférine	tgtccagacaatctccagagc	tgttttccagtcagagggaca	12
GLUT-1	tgcttcatctctaaagacagctca	gcagatgaagtgtcttggaa	63
ABCB1	gaaatttagaagatctgatgtcaaca	actgtaataataggcatacctggca	65
ABCG2	tggttagactcaagcacagc	tcgtcctgcttagacatcc	56
PPIA	cctaaagcatacgggtctctg	tttcacttgccaaacacca	48

Tableau 10 : Les amorces et sondes UPL utilisées pour les qPCR.

4. Culture en insert pour le modèle de BHE

Des inserts de la membrane en PET transparent de porosité 0.4µm pour plaque 12 puits ont été utilisées (ThinCerts 665641, Greiner bio-one).

Les cellules hCMEC/D3 étaient cultivées sur la membrane recouvertes de collagène comme décrit précédemment à 50.000 cellules/cm². Les péricytes étaient cultivées sous la membrane recouvertes de poly-L-lysine comme décrit précédemment à 17.000 cellules/cm². Les astrocytes étaient cultivés au fond des puits recouverts de collagène comme décrit précédemment, à 17000 cellules/cm². Le milieu de culture utilisé pour le modèle est le milieu utilisé pour la culture des cellules hCMEC/D3, supplémenté en chlorure de lithium (#438002, Merck millipore) à 10mM et resveratrol à 10µM (R5010, Sigma-aldrich).

5. Mesure de l'imperméabilité du modèle

La résistance électrique au travers du modèle était mesurée à l'aide d'électrodes STX2 (WPI) reliées à un volt-ohmmètre transépithélial (EVOM2, WPI). Le TEER était calculé par la relation $(\text{Résistance}_{\text{insert avec cellules}} - \text{Résistance}_{\text{insert vide}}) \times \text{Surface}_{\text{filtre}}$.

Pour le test de perméabilité au Lucifer yellow (L0259, Sigma-aldrich), la perméabilité a été mesurée dans le sens insert vers puit avec une solution initiale dans l'insert à 25µM de Lucifer yellow. L'absorbance du Lucifer yellow a été mesuré dans les deux compartiments à 0, 15, 30, 45 et 60 minutes à 428nm. La perméabilité a été calculée comme décrit dans la littérature (Siflinger-Birnboim et al., 1987).

6. Tests statistiques

Les données ont été analysées par two-way ANOVA avec comparaison multiple sur GraphPad PRISM 6.

B. Ouverture de la barrière hémato-encéphalique aux agents anti-tumoraux pour le traitement du glioblastome

Les procédures ont été décrites dans le manuscrit qui sera soumis pour publication. Celui-ci a été intégré dans la section IV.C.

C. Transporteurs ATP binding cassette (ABC) : expression et valeur clinique dans le glioblastome

Les procédures ont été décrites dans le manuscrit qui sera soumis pour publication. Celui-ci a été intégré dans la section IV.D.

IV. Résultats

A. Choisir les molécules thérapeutiques prometteuses pour une utilisation avec ouverture de la barrière hémato-encéphalique adjuvant : analyse de la littérature

1. Revue de la littérature

Une revue de la littérature a été effectuée, et publiée dans le journal « Expert Review in Neurotherapeutics » (Dréan et al., 2016). Outre la description des barrières cérébrales, et des méthodes permettant le passage de molécules référencées dans l'introduction de ce manuscrit, cette revue recense également les caractéristiques pharmacologiques de plusieurs chimiothérapies. Ces données sont essentielles à la sélection raisonnée des chimiothérapies candidates à l'évaluation de leur utilisation adjuvante à l'ouverture de la BHE par US. Cette publication est intégrée au manuscrit ci-après, et analysée pour les besoins de ce projet dans le paragraphe suivant.

Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma

Dréan Antonin^{1,2}, Goldwirt Lauriane³, Verreault Maïté¹, Canney Michael², Schmitt Charlotte¹, Guehenec Jeremy¹, Delattre Jean-Yves^{1,4}, Carpentier Alexandre^{2,5} and Idbah Ahmed^{1,4}.

¹Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France.

²Carthera SAS, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France.

³AP-HP, Hôpital Universitaire Saint Louis, Service de Pharmacologie, F-75013, Paris, France.

⁴AP-HP, Hôpital Universitaire La Pitié Salpêtrière, Service de Neurologie 2-Mazarin, F-75013, Paris, France.

⁵AP-HP, Hôpital Universitaire La Pitié Salpêtrière, Service de Neurochirurgie, F-75013, Paris, France.

Corresponding author

Ahmed Idbah. Service de Neurologie 2-Mazarin, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière. 47-83, Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: 01-42-16-03-85. Fax: 01-42-16-04-18. Email: ahmed.idbah@gmail.com or ahmed.idbah@aphp.fr

Acknowledgments

The research leading to these results has received funding from the program "Investissements d'avenir" ANR-10-IAIHU-06. Institut Universitaire de Cancérologie (IUC). Antonin Dréan is funded by Carthera SAS. This work is part of GlioTex (*i.e.* Glioblastoma and Experimental Therapeutics) project funded by La Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer

Abstract

Introduction:

Glioblastomas (GBM) are the most common and aggressive primary malignant brain tumors in adults. The blood brain barrier (BBB) is a major limitation reducing efficacy of anti-cancer drugs in the treatment of GBM patients.

Areas covered:

Virtually all GBM recur after the first-line treatment, at least partly, due to invasive tumor cells protected from chemotherapeutic agents by the intact BBB in the brain adjacent to tumor. The passage through the BBB, taken by antitumor drugs, is poorly and heterogeneously documented in the literature. In this review, we have focused our attention on: (i) the BBB, (ii) the passage of chemotherapeutic agents across the BBB and (iii) the strategies investigated to overcome this barrier.

Expert commentary:

A better preclinical knowledge of the crossing of the BBB by antitumor drugs will allow optimizing their clinical development, alone or combined with BBB bypassing strategies, towards an increased success rate of clinical trials.

Keywords: glioblastoma, blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapy, pharmacokinetics, delivery.

1. Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent primary brain cancer in adults. Indeed, GBM has an annual incidence from 0.6 to 3.7/100,000 individuals, with the highest incidences in European countries, United States, and Australia [1]. The median overall survival of newly diagnosed GBM patients is 12 to 18 months despite very intensive therapeutic regimens. The standard of care in newly diagnosed GBM patients, under 70 years old and in good clinical conditions, is maximal safe resection surgery followed by concurrent radiochemotherapy and adjuvant treatment with temozolomide (TMZ), an alkylating agent [2].

Virtually all GBM patients experience tumor recurrence. Several issues are known to limit the immediate and long-term efficacies of anticancer drugs in GBM: (i) the blood–brain barrier (BBB) limiting penetration of drugs within the tumor and the brain adjacent to tumor (BAT), (ii) primary or intrinsic molecular resistance, and (iii) secondary or acquired resistance after drug exposure.

In this review, we will focus on the BBB in the setting of primary brain cancers. Indeed, the BBB is a physical and biological barrier limiting drug penetration within the brain, and therefore within GBM cells. Although the BBB is disrupted in the tumor core, allowing a partial penetration of antitumor drugs, the BBB is widely intact around the BAT where invasive/escaping GBM cells can be found [3]. Reaching efficiently and safely these invasive/escaping GBM cells is one of the main challenges in GBM treatment, and developing strategies to overcome this limit will undoubtedly open new therapeutic perspectives using well-known cytotoxic drugs or innovative drugs.

In this review, we have focused our attention on: (i) the BBB, (ii) our knowledge of the passage of chemotherapeutic agents across the BBB, and (iii) the strategies investigated to overcome this physico-biochemical barrier. The topic of the BBB in the settings of

neurotherapeutics is very broad, and our general review refers to several comprehensive articles for more specific points.

2. Methods

Our review of public data was performed using: (i) Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), (ii) Google (<https://www.google.fr/>), (iii) Google Scholar (<https://scholar.google.fr/>), and (iv) University library.

Data related to the ability of the drugs to cross the BBB were searched using the following formula (e.g. for CCNU (lomustine)): (CCNU OR belustine OR lomustine) AND ('brain/blood' OR 'brain/plasma' OR 'CSF/blood' OR 'CSF/plasma' OR 'brain:blood' OR 'brain:plasma' OR 'CSF:blood' OR 'CSF:plasma') ratio.

Data related to the physicochemical characteristics of drugs were collected using public databases chEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) and drugbank (<http://www.drugbank.ca/>) In silico data prediction was performed using <http://www.cbligand.org/BBB/index.php>.

Data related to the cytotoxicity of anticancer drugs were collected from chEMBL database (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>).

The figures were made using the Servier Medical Art (<http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>).

3. Brain barriers

3.1. The normal BBB

The BBB is a physical and biological barrier: (i) protecting the brain from pathogens and toxic molecules circulating in the blood flow, and (ii) regulating hydrometabolic exchanges between the brain and blood to maintain brain homeostasis.

The BBB includes several cellular and molecular actors: (i) endothelial cells, (ii) pericytes, (iii) astrocytes, and (iv) extracellular matrix (Figure 1(b)). The barrier function of the BBB is mainly endorsed by the endothelial cells of blood vessels. The BBB functioning is also influenced by neurons, oligodendrocytes, and microglial cells that belong to the neurovascular unit [4].

There are five main mechanisms or pathways driving molecular penetration through the BBB: (i) passive paracellular pathway, (ii) transcellular lipophilic pathway, (iii) transcytosis pathway, (iv) transport protein pathway, and (v) efflux pump pathway (Figure 2).

Passive paracellular diffusion of molecules between endothelial cells is hampered by the tight junctions (TJs) and adherens junctions (AJs). Only a few small, highly liposoluble molecules can cross the BBB by passive paracellular diffusion [4].

Some small gaseous or lipophilic molecules are also able to cross the BBB by passive transcellular diffusion across the endothelial cells [4].

The transcytosis pathway refers to successive endocytosis from one side and exocytosis from the other side of endothelial cells. The three main transcytosis types are: (i) constitutive and nonspecific, i.e. fluid-phase endocytosis: micropinocytosis, macropinocytosis; (ii) ligand charge-mediated and nonspecific, i.e. adsorptive endocytosis; and (iii) specific receptor-mediated. The nonspecific transcytosis mechanisms are less represented in the BBB than in the peripheral blood vessels [4,7].

The transport protein pathway is an active and specific transport mechanism of molecules across the BBB. This transport pathway is predominant in the BBB. A large variety of transporters are expressed by endothelial cells, including transporters from the solute carrier (SLC) family. SLC2A1 (Glucose transporter 1, GLUT-1), involved in the crossing of glucose, is one of the most abundant transporters of the SLC family [4,8,9].

The last mechanism is the efflux pump pathway, a crucial mechanism for detoxification. Mainly ABCB1 (ATP Binding Cassette B1, P-glycoprotein, P-gp), ABCG2 (ATP Binding Cassette G2, Breast Cancer Resistance Protein, BCRP), and MRP (Multidrug resistance-associated protein) 1 to 5 reject potential harmful xenobiotics from the endothelial cells to the blood (Figure 2) [4,10].

The BBB is disrupted in restricted zones of the brain close to the third and the fourth ventricles: the circumventricular organs. These organs are isolated from CSF by tightly attached ependymal cells (tanycytes) and from the brain by a dense layer of astrocytes, tanycytes, and extracellular matrix [11–13] (Figure 1(e)).

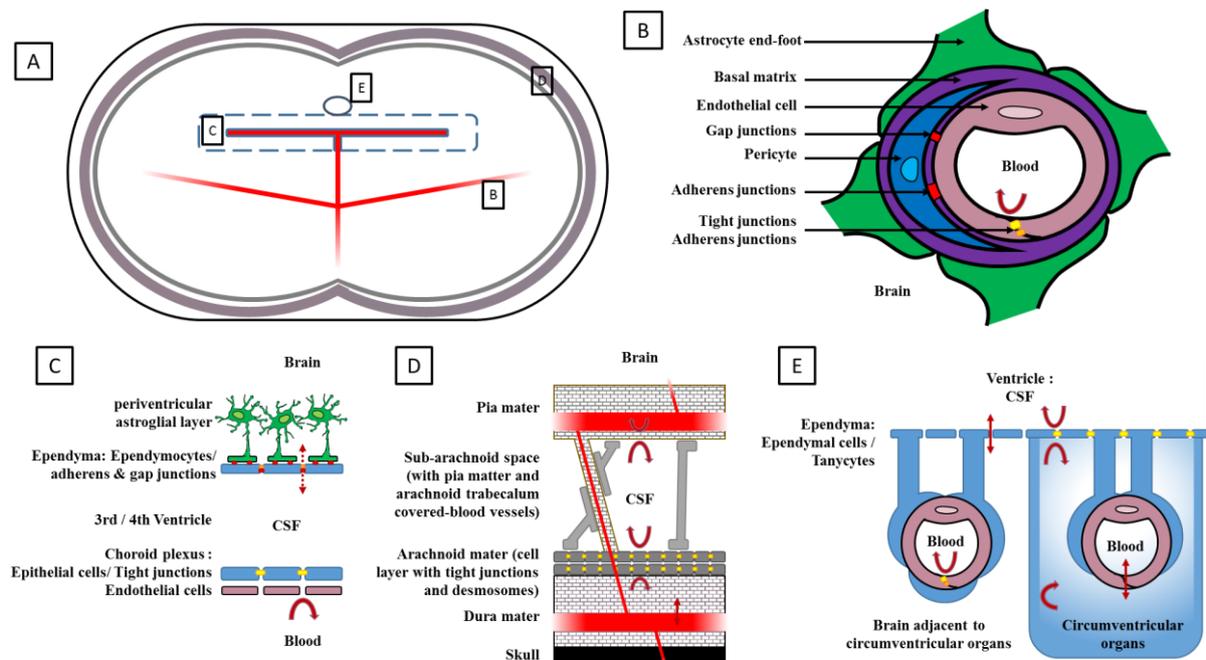


Figure 1. Structure of the brain barriers. Overview in Panel A. Adapted from Saunders et al. 2013 [5] and Langlet et al. 2014 [6]. Panel B: The actors of the Blood Brain Barrier. Endothelial cells are the main actors of the BBB. Pericytes are closely attached to the endothelial cells via gap and adherens junctions. Astrocyte end-feet strongly surround the basal matrix. Panel C. The choroid plexus and ependyma. The choroid plexus is at the interface between blood and CSF in the 3rd and 4th ventricles. The fenestrated endothelium is covered by tightly attached choroid plexus epithelial cells. The ependyma surrounding the 3rd and 4th ventricle is constituted of a loosely attached ependymocytes contacted by astrocytes. Panel D. The meningeal barriers. CSF in the subarachnoid space is protected by the arachnoid barrier cell layer and is isolated from brain by the pia matter. Pia matter and the arachnoid barrier also covers blood vessels. Panel E. The circumventricular organs. Due to their particular role, circumventricular organs require a direct contact to the blood. Therefore, the BBB does not exist or is altered in these organs. However, they are isolated from the brain by a dense matrix and astrocytes/tanycytes layer. These organs are close to the 3rd and 4th ventricle, but a particular ependyma in these organs with tightly attached tanycytes prevent diffusion to the CSF. Tanycytes also contact the blood vessels in and out of these organs, and replace astrocytes endfeet.

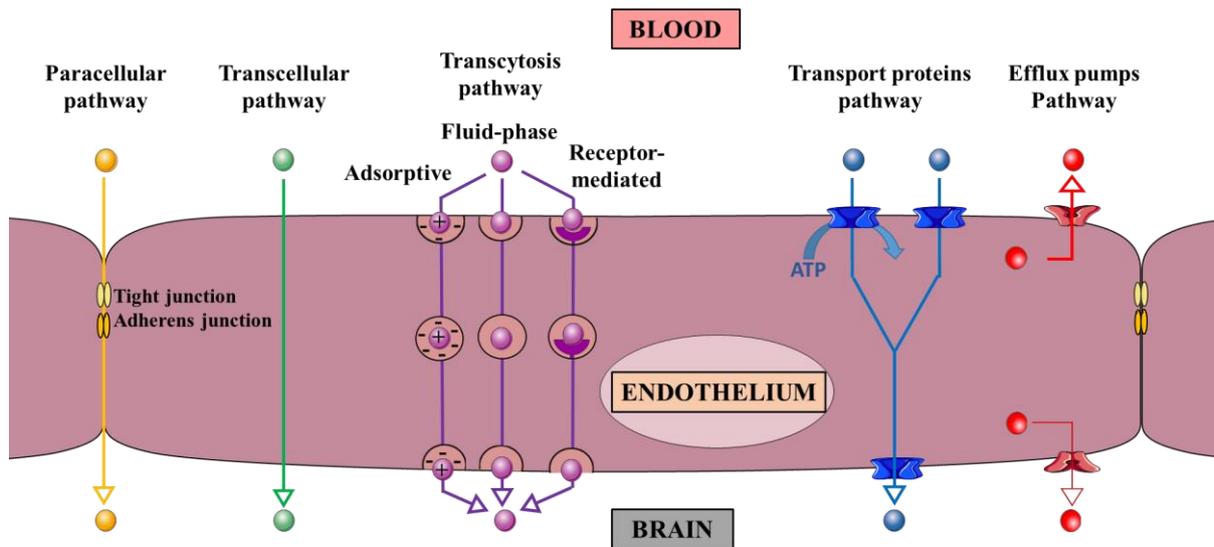


Figure 2. Transport mechanisms through the blood brain barrier. Five pathways are distinguished: (i) paracellular pathway, (ii) transcellular pathway, (iii) transcytosis pathway, (iv) transport protein pathway and (v) efflux pumps pathway. Adapted from Wong et al., 2013 [4] and Abbott et al., 2004 [228].

3.2. The blood-tumor barrier

In GBM, the tumor bulk is schematically organized in three major parts: (i) the necrotic central area, (ii) the proliferative/angiogenic forehead, and (iii) the BAT, including invasive/escaping tumor cells (Figure 3).

The blood–tumor barrier (BTB) refers to a histologically and/or biologically altered BBB with increased permeability. In the BTB, the blood vessels are anarchic, disorganized, sinuous, irregularly shaped, large, and leaky, mainly due to an imperfect angiogenesis and inflammation [14,15].

These modifications are due to both: (i) pro-angiogenic and immune-modulating factors secreted by GBM cells, and (ii) tumor-induced microenvironmental changes [16–18].

3.3. CSF-related barriers

As discussed by Saunders et al., CSF is isolated from both the blood and the brain. In the ventricular system, CSF is isolated from the blood in the choroid plexus by epithelial cells, which play a barrier role similar to the endothelial cells in the BBB (Figure 1(c)). Even if the mechanisms are similar, specific transporters and efflux pumps are different from the ones

expressed in the BBB [5,19]. Ependymal cells lining the ventricle are not tightly attached in adults. The ependyma is therefore not thought to hamper the diffusion from the CSF to the brain (Figure 1(c)). However, transport systems and CSF flow limit diffusion to 1–2 mm [19,20]. CSF is also isolated from the brain and blood by the arachnoid and pia matters, which present tightly packed cell layers that prevent diffusion from both the blood to CSF and from CSF to the brain [21] (Figure 1(d)).

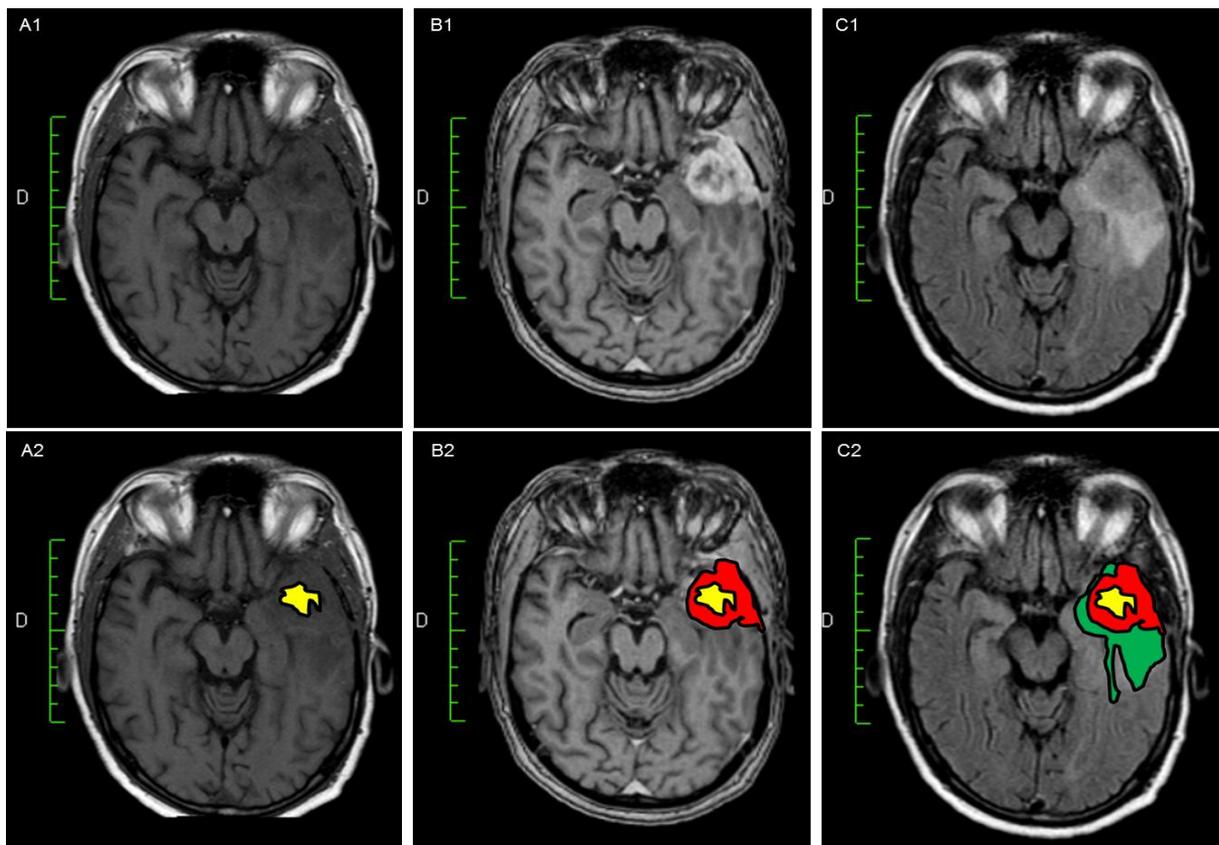


Figure 3. Left temporal glioblastoma. Panel A1, MRI T1SE weighted images; Panel A2, same panel as A1 with central necrotic area indicated in yellow; Panel B1, MRI T1SE weighted images with gadolinium infusion showing contrast enhancement; Panel B2, same panel as B1 with the tumor proliferative forehead indicated in red; Panel C1, MRI T2 FLAIR weighted images; Panel C2, same panel as C1 with the brain adjacent the tumor indicated in green.

Drug	Tested as monotherapy in clinical trial dedicated to GBM patients	CNS toxicity at high dose or in direct exposure to the CNS	Currently used in neuro-oncology	References
Busulfan	No	Medium	++	[23]
Thiotepa	No	Low-medium	++	[23]
CCNU (lomustine)	Yes	Low	+++	[23-25]
BCNU (carmustine)	No	Low-medium	+++	[23,24,26]
ACNU (nimustine)	Yes	Medium	++	[23,27,28]
Temozolomide	Yes	Low	+++	[23,29-31]
Methotrexate	Yes	Medium	+++	[23,24,32]
Topotecan	Yes	Low	-	[23,33-35]
Cisplatin	No	High	++*	[23,24]
Etoposide	Yes	Low-medium	++	[23,36]
Irinotecan / SN-38	Yes	Low-medium	+	[23,37-39]
Carboplatin	Yes	Medium	++	[23,24,40-42]
Doxorubicin	No (Yes for liposomal form)	Medium-high	-	[23,24,43]
Vinblastine	No	Medium	+	[23,24]
Vincristine	No	Medium-high	++	[23,24,44]
Procarbazine	Yes	Medium-high	++	[23,24,45]
Paclitaxel	Yes	Medium-high	-	[24,33,46-48]
Fotemustine	Yes	Low-medium	+	[49-52]
Ifosfamide / 4-Hydroxyifosfamide / aldoifosfamide	Yes	High	-	[23,24,31]
Bevacizumab**	Yes	No	++	[25,53-56]
5-FluoroUracil	No	Medium-high	-	[23-24]
Bleomycin	Yes	Low	-	[23,57]
Hydroxyurea	Yes	Low	-	[23,24,58]
Docetaxel	Yes	Medium-high	-	[23,59-61]
Cytarabine (cytosine arabinoside, ara-C) / ara-U	No	Low	+	[23]

Tableau 1 Cytotoxic chemotherapeutic agents used in neuro-oncology. - : not commonly used in neuro-oncology; + : poorly used or used in limited or specific situations; ++: commonly used in neuro-oncology; +++: highly used in neurooncology; *: mainly in pediatric neuro-oncology; **: not a cytotoxic agent but a monoclonal antibody targeting VEGF-A used in neuro-oncology. CNS: central nervous system; GBM: Glioblastoma; BCNU: carmustine; CCNU: lomustine; ACNU: nimustine.

4. The BBB limits drug penetration to both normal brain and tumors

Currently, the most frequently used chemotherapeutic agent in GBM is TMZ, a drug that is able to cross the BBB [2]. Table 1 indicates several drugs according to their clinical use and relevance in the treatment of central nervous system (CNS) tumors.

Table 2 shows experimental brain and CSF penetration data for several drugs. Recently, Jacus et al. reviewed the pharmacokinetic properties of several anticancer agents and assessed their penetration in CSF and/or in brain tissue of patients with CNS tumors [22].

Several physicochemical parameters are involved in the ability of the drugs to cross the normal BBB: (i) size, (ii) liposolubility, (iii) charge, (iv) interactions with plasma proteins, and (v) interactions with efflux pumps and transporters. According to these parameters, several groups have suggested a way to predict *in silico* their ability to cross the BBB. The rule of five developed by Lipinski is the theoretical basis of these predictions [132]. According to this rule, 'poor absorption or permeation is more likely when: (i) >5 hydrogen bond donors, (ii) MWt > 500, (iii) logP > 5, (iv) >10 hydrogen bond acceptors, and (v) substrates for biological transporters are exceptions to this rule'. Although this modeling has been significantly improved over time, predictions are not always consistent with the experimental data [133]. Table 3 shows several parameters used for the prediction of BBB crossing by drugs. As an example of the limits of predictive models, irinotecan is predicted not to cross the BBB and cisplatin is predicted to cross the BBB (Table 3), while the *in vivo* data reported in Table 2 shows that irinotecan is more likely to cross the BBB than cisplatin.

Based on our current preclinical models, accurate prediction of the ability of anticancer drugs to cross the BBB and penetrate the patients' brain remains challenging. Combining *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* predicting approaches may help for better prediction.

Drug	Species	Normal Brain/ Plasma ratio	CSF/ Plasma ratio	References
Busulfan	H	NA	95-99%	[62-65]
	P	NA	NA	
	R	74-77%	NA	
Thiotepa	H	NA	101%/95% **	[66,67]
	P	NA	93% (ventricular) ; 113% (lumbar)	
	R	NA	NA	
CCNU (lomustine)	H/P	NA	NA	[68,69]
	R	High ; 20% ****	NA	
BCNU (carmustine)	H/P	NA	NA	[69,70]
	R	High; 30%	NA	
ACNU (nimustine)	H/P/R	NA	NA	
Temozolomide	H	18%* ***	20-40% **	[71,79]
	P	NA	33%	
	R	22-41% (include ****)	20-23% **	
Methotrexate	H	NA	0.5-2.5%	[80,87]
	P	NA	1.5%	
	R	3%* - 21%	0.5%	
Topotecan	H	NA	18-42% **	[88-93]
	P	NA	19-24%	
	R	5.5% ****	NA	
Cisplatin	H	NA	3% **	[94-97]
	P	1-3% *	3-5% (include **)	
	R	10% (include ****)	NA	
Etoposide	H	NA	0.5-5% ; 9%***	[69,98-102]
	P	NA	NA	
	R	Very low; 3-8%; 36%	NA	
Irinotecan/SN38	H	NA	NA	[72-103]
	P	NA	13%/ND	

		R	9-13%/1-6%	NA	
Carboplatin		H/R	NA	NA	[95,96,104]
		P	2/3-4%*	1-5%	
Doxorubicin		H/P	NA	NA	[69,105]
		R	Very low; 0-0.5%	NA	
Vinblastine		H/P	NA	NA	[106,107]
		R	ND**-10%	NA	
Vincristine		H	NA	ND	[69,106-109]
		P	NA	NA	
		R	Very low****-18%	NA	
Procarbazine		H/P	NA	NA	[69]
		R	medium	NA	
Paclitaxel		H	ND****	ND	[113-115]
		P	NA	NA	
		R	ND - ≈19%	NA	
Fotemustine		H	NA	17-30%	[50]
		P/R	NA	NA	
Ifosfamide / Hydroxyifosfamide aldoifosfamide	4-	H	NA	23- 53% / NA / NA	[116-118]
	/	P	NA	NA / 13% / NA	
		R	NA	NA	
Bevacizumab		H	0.2% (general for IgG)	NA	[119,120]
		P	NA	NA	
		R	ND	NA	
5-FluoroUracil		H	NA	ND-low**	[69,121-123]
		P	NA	48% (bolus); 11-20% (infusion, depending upon infusion rate)	
		R	low - 18*	NA	
Bleomycin		H/P	NA	NA	[69]
		R	Very low	NA	
Hydroxyurea		H	NA	33% (HIV patient)	[124-126]
		P	NA	NA	

	R	9-25%	6%	
Docetaxel	H	NA	0-9%**	[115,127-129]
	P	NA	NA	
	R	4.4- ≈8% ; 29-35%	NA	
Cytarabine (cytosine arabinoside, ara-C) / ara-U	H	NA	3-15% / 15-25% (include **)	[110,111,130,131]
	P/R	NA	NA	

Table 2. Blood–brain barrier crossing: experimental data for chemotherapeutic agents used in neuro-oncology. H: human; P: primate; R: rodent – mice or rat-; *: extracellular fluid by microdialysis; **: CNS involvement; ***: Brain adjacent to tumor; ****: Normal brain of animals/patients with brain tumors. ND: not detected. Data above 100% indicate accumulation of the drug, or a faster clearance in the plasma than in the brain or CSF. Many drugs also showed a similar effect with large scales – e.g. methotrexate, paclitaxel, docetaxel. We tried to show penetration with minimum impact of accumulation or differential clearance.

Drug	M. weight	Ex-LogP	Polar SA	P. charges	Rot. bound	HB acceptor	HB donor	Protein binding	P-gp	Rule of 5	<i>In silico prediction*</i>
Busulfan	246	-0.5	87-104	0	7	4	0	32-79%	No	Yes	Yes
Thiotepa/tepa	189/173	0.5/NA	9-51/36	0/0	3/3	3-1/1	0/0	NA/NA	No/NA	Yes/Yes	Yes
CCNU (lomustine)	234	2.8	62	0	4	2	1	50%	No	Yes	Yes
BCNU (carmustine)	214	1.5	62	0	5	2	1	80%	No	Yes	Yes
ACNU (nimustine)	273	NA	114	0	5	NA	NA	NA	NA	Yes	Yes
Temozolomide	194	-2.8	106	0	1	5	1	15%	No	Yes	Yes
Methotrexate	454	-1.9	211	-2	9	12	5	50%	Yes	No	No
Topotecan	421	0.8	103	0	3	6	2	35%	Yes	Yes	No
Cisplatin	298	-2.2	NA	0	1	5	1	90% (Free P)	No	Yes	Yes
Etoposide	589	0.6	161	0	5	12	3	97%	Yes	No	No
Irinotecan / SN-38	587/392	3.2/NA	113/100	1/0	5/2	6/5	1/2	30-68%/NA	Yes/Yes	No/Yes	No/No
Carboplatin	371	NA	NA	0	0	2	0	90% (Free P)	No	Yes	Yes
Doxorubicin	544	1.3	206	1	5	12	6	74-76%	Yes	No	No
Vinblastine	811	3.7	154	2	10	9	3	98-99%	Yes	No	No
Vincristine	825	2.8	171	2	10	9	3	~ 75%	Yes	No	No
Procarbazine	221	0.1	53	0	5	3	3	NA	No	Yes	Yes
Paclitaxel	854	3.0	221	0	14	10	4	89-98%	Yes	No	No

Fotemustine	316	NA	107	0	9	3	1	NA	No	Yes	Yes
Ifosfamide / 4-Hydroxyifosfamide / aldoifosfamide	261 / 277 / 277	0.9 / NA / NA	51 / 71 / 77	0 / 0 / 0	5 / 5 / 10	2 / 3 / 3	1 / 2 / 2	Low / NA / NA	No / NA / NA	Yes / Yes / Yes	Yes / Yes / Yes OR No***
Bevacizumab	149,000	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	No	NA
5-FU**	130	-0.89	58.2	0	0	2	2	8-12%	No	Yes	Yes
Bleomycin	1415	NA	627	2	36	28	20	1%	Yes	Yes****	No
Hydroxyurea	76	-1.8	75	0	0	2	3	NA	No	Yes	Yes
Docetaxel	808	2.4	224	0	13	10	5	97%	Yes	No	No
Cytarabine (cytosine arabinoside, ara-C) / ara-U	243 / 244	-2.8 / NA	129 / 119	0 / 0	2 / 2	7 / 6	4 / 4	13% / NA	No / NA	Yes / Yes	Yes OR No / Yes OR No

Table 3. Parameters used to predict crossing of the blood–brain barrier by chemotherapeutic agents. *M* weight: Molecular weight (g/mol); *Ex-LogP*: experimental LogP; *Polar SA*: polar surface area (Å²); *P* charges: physiological charges; *Rot. Bound*: Rotatable bound count; *HB acceptor*: hydrogen bond acceptor count; *HB donor*: hydrogen bond donor count; *Prot. binding*: Protein binding; *P-gp*: P-glycoprotein substrate; *: <http://www.cbligand.org/BBB/index.php>; *NA*: not available on the used databases; *Free P*: free platinum; **: no information for active forms after hepatic metabolism; ***: depending on the algorithm; ****: found in database, but inconsistent with the size of the molecule. Data obtained from chEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) and drugbank (<http://www.drugbank.ca/>). Wishart DS, Knox C, Guo AC, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D668–D672. 16381955; Bento AP, Gaulton A, Hersey A, et al. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D1083–D1090.

Drug	GI50	IC50	LC50*
Busulfan	234000 nM ^{U251}	NA	NA
Thiotepa / Tepsa	58749 nM ^{U251} / NA	NA / NA	NA / NA
CCNU (lomustine)	31550 nM ^{U251}	NA	328000 nM
BCNU (carmustine)	52119 nM ^{U251}	15000 nM ^{U251}	173000 nM
ACNU (nimustine)	NA	NA	179000 nM
Temozolomide	100000 nM ^{U251}	250000 nM ^{U251} ; 49000 nM ^{U87}	NA
Methotrexate	92 nM ^{U251}	NA	2400 nM
Topotecan	18 nM ^{U251}	60 nM - 3000 ^{U251} ; 160 nM ^{U87}	NA

Cisplatin	1918.67 ; 100000 nM ^{U251}	490 - 16193.6 nM ^{U87} ; 11580.08 nM ^{U251}	3670 nM
Etoposide	NA	500-25000 nM ^{U251/U373} ; 145 - 12400 nM ^{U87} ; 14880 nM (8,76 µg/mL)	NA
Irinotecan / SN-38	3741 nM ^{U251} / 1 nM ^{U251}	NA / NA	NA / NA
Carboplatin	68076.94 nM ^{U251}	NA	80000 nM
Doxorubicin	40 - 125 nM ^{U251}	18 - 790 nM ^{U87} ; 10 - 600 nM ^{U251/U373}	500 nM
Vinblastine	0.7 nM ^{U251}	5,02 - 8.1 nM ^{U251} ; 1 - 29.98 nM ^{U87}	240 nM
Vincristine	132 nM ^{U251}	NA	80 nM
Procarbazine	336512 nM ^{U251}	NA	NA
Paclitaxel	20 nM ^{U87} ; 3 - 3.98 nM ^{U251}	80 - 90000 nM ^{U87} ; 30 - 128 nM ^{U251}	LC90 7.2 nM
Fotemustine	NA	NA	NA
Ifosfamide / 4-Hydroxyifosfamide / aldoifosfamide	310456 nM ^{U251} / NA / NA	NA / NA / NA	NA / NA / NA
Avastin	NA	NA	NA
5-FU	912.01 nM ^{U251}	NA	NA
Bleomycin	NA	4363.14 nM ^{U251} ; 11057.16 nM ^{U87}	NA
Hydroxyurea	580764.42 nM ^{U251}	NA	NA
Docetaxel	10 nM ^{U251}	2.5-25647 nM ^{U251} ; 3.55 nM ^{U87}	NA
Cytarabine (cytosine arabinoside, ara-C) / ara-U	NA / NA	1129.99 nM ^{U251} ; 1742.57 nM ^{U87} / NA	NA / NA

Table 4. In vitro efficacy of chemotherapeutic cytotoxic agent used in neuro-oncology. GI50: drug concentration inducing 50% of growth inhibition; IC50: drug concentration inducing 50% of inhibition; LC50: drug concentration inducing 50% of cell death; *: median LC50 obtained from multiple glioma cell lines [112]. Data obtained from ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Bento AP, Gaulton A, Hersey A, et al. The ChEMBL bioactivity database: an update. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D1083–D1090.

5. Overcoming the BBB for better drug delivery within the tumor core and the BAT

Table 4 indicates the in vitro efficacy of chemotherapeutic cytotoxic agents investigated against GBM cells. Significant interlaboratory variability is observed (e.g. the IC₅₀ for paclitaxel on U87 cells ranges from 80 to 90,000 nM). TMZ, the most commonly used chemotherapeutic agent in GBM, is inconsistently cytotoxic on GBM cell lines, while vincristine, vinblastine, paclitaxel, and doxorubicin are up to 10,000–100,000 times more cytotoxic than TMZ. Integrated therapeutic strategies, including improved brain delivery of the most efficient drugs and molecular biomarkers of response to these drugs (e.g. MGMT for TMZ), will significantly improve the outcome for GBM patients [134]. Several approaches have been developed or are still under development.

5.1. Intra-tumor injection

Direct delivery of chemotherapy within the tumor and the BAT require insertion of a catheter within the tumor site. Imaging prior to drug administration is thus necessary to locate specifically the target site. Any molecule, regardless of its physicochemical characteristics, is deliverable using this method. The main limitations are local injuries: (i) infection, (ii) inflammatory reaction, and (iii) direct neurotoxicity (Table 1) [44,135]. Indeed, neurotoxicity of chemotherapeutic agents is a major issue when increasing local delivery (e.g. vincaalcaloids may induce seizure, encephalopathy, ataxia, and/or movement disorders; taxanes may induce seizure; and platinum derivatives may induce seizure, encephalopathy, stroke, ataxia, and/or myelopathy) [23,136]. The main advantage of catheter-based drug delivery is an increase of local drug concentration without increasing systemic concentration and drug toxicity. The use of this method for nitrosoureas (i.e. BCNU (carmustine) and CCNU) has shown efficacy and few side effects in mice and patients [137,138]. A stabilization of the tumor was observed for 72% of patients treated by DTI-015 (BCNU in 100% ethanol) (NCT00038441) [137]. However,

the invasiveness and the direct exposure of the brain to the drug toxicity limit the use of this method.

5.2. Convection enhanced delivery (CED)

Convection-enhanced delivery (CED) is based on a catheter inserted, during a neurosurgical procedure, within the tumor or the BAT. The catheter is linked to an Ommaya/Rickham reservoir or to an external pump maintaining a positive pressure and flow. It allows a slow drug delivery over a longer period of time to reduce the potential acute neurotoxicity of chemotherapy [139]. CED has been tested for cisplatin, methotrexate, paclitaxel, nimustine, topotecan, and carboplatin [33]. The capacity of a drug to diffuse within the brain parenchyma is heterogeneous and depends on: (i) the drug, (ii) the tumor site, and (iii) the administration parameters [33,140–142]. Cisplatin was reported to diffuse 1 cm around the needle tip in 1982 [143]. A more recent study indicated that the mean volume of distribution is between 12.8 and 22.9 cm³ for paclitaxel [142]. Neurotoxicity was reported in some trials (e.g. paclitaxel). Despite the limitations of this invasive procedure, clinical benefits were observed in brain tumor patients in some trials (e.g. nimustine, topotecan, carboplatin) [33]. Recently, an implantable catheter system was developed and tested with carboplatin in a recurrent GBM patient, and it was shown to induce a 58% tumor shrinkage and a stabilization of the patient's clinical condition (NCT01317212) [144].

5.3. CSF delivery

Drugs can be directly injected within the CSF. This method is mainly used to treat spinal cord tumors, leptomeningeal tumors, and tumor meningitis. As the CSF volume is lower than the blood volume, the intrathecal injection of chemotherapy leads to a higher concentration of chemotherapy, with a minimum risk of systemic toxicity [145]. However, the limited diffusion from CSF to the CNS parenchyma reduces the impact of this strategy in the treatment of intraparenchymal GBM patients [145]. Although some drugs are commonly used through the

CSF route (e.g. methotrexate, cytarabine) with acceptable side effects, other drugs (e.g. vincristine) are contraindicated for direct CSF delivery due to the high risk involved – severe neurotoxicity or death [146,147].

5.4. In situ biodegradable polymer, gels, microships or microcarrier

After surgical resection of the brain tumor, a cytotoxic agent-impregnated biodegradable polymer can be deposited in the tumor resection cavity. Carmustine-impregnated wafers (Gliadel®) continuously deliver the drug directly in the brain parenchyma over 3 weeks [148]. Although the initial results were promising, more recent data suggest a limited survival benefit in GBM patients (NCT00003876) [26,149,150]. Increasing drug concentration within the wafers might increase efficacy with acceptable toxicity, as shown in a phase I clinical trial [151]. Adverse effects such as seizures, convulsions, confusion, brain edema, infection, hemiparesis, aphasia, and visual field defects were reported with this treatment [26,148–150,152,153]. High-dose BCNU was detected 5–6.1 mm around the wafer on day 1, and between 1.1 and 3.6 mm from days 3 to 30. Several drugs were used within this delivery system. They were detected in low concentrations up to 5 cm around the wafer, but their concentration dropped below the LC90 (lethal concentration) within 1 cm around the wafer [152,154,155]. However, tumor recurrence was reported to occur mainly in the 2 cm around the BAT. The use of gels to fill the postsurgical cavity, microchips, and micro-carriers instead of wafers has also been evaluated with quite similar efficacy and limitations mainly in murine models [156–159]. Gels have also been investigated in cancer patients (NCT00479765) [157].

5.5. Transnasal epithelium drug delivery

A drug can also cross the nasal epithelium at least in some regions of the brain [160] and reach CSF and brain. Transnasal drug delivery has been tested in animals for various treatments, including methotrexate or 5-FU (5-fluorouracil) [160–162]. However, it has not been used in humans to treat brain tumors so far.

5.6. High-dose and dose-dense chemotherapy delivered using intravenous (i.v.) peripheral route

As mentioned above, some drugs are very efficient against GBM cells *in vitro*, but exhibit limited effects *in vivo* due to their low ability to cross the BBB (e.g. doxorubicin, vincristine, vinblastine, paclitaxel). High-dose and dose-dense chemotherapy regimens aim, with or without bone marrow transplant, at increasing drug concentrations within the brain tumor using higher dose of chemotherapy delivered in a peripheral vein. The benefits of these procedures, associated with significant toxicity, are debated and heterogeneous across patients (e.g. NCT00304031 and NCT01364064) [163–168].

5.7. Intra-arterial (i.a.) drug delivery

The intra-arterial (i.a.) delivery of drugs via the carotid artery has been shown to improve drug delivery within CNS. I.a. injection of cisplatin and etoposide led to a two- and fourfold increase of drug delivery to the brain compared to i.v. injection, respectively [169,170]. Penetration of methotrexate, aminoisobutyric acid, and dextran 70 within the brain was 2–2.5 times higher with i.a. delivery compared to i.v. delivery to tumor-bearing rats [171]. BCNU i.a. delivery achieved a 50-fold improvement of delivery in glioma patients [172]. ACNU i.a. delivery was not associated with an improvement of survival in glioma patients but showed a lower chemotherapy-related toxicity compared to HeCNU (elmustine) delivered by an i.a. injection. Overall, this route of injection is associated with a high risk of neurological, ophthalmological, and vascular toxicities, thereby limiting its use [27,28,173–177].

5.8. Efflux pumps inhibition

P-gp and BCRP can be inhibited by various drugs (e.g. cyclosporine A, elacridar, valspodar, tariquidar, or zosuquidar trihydrochloride) [178–180]. The association of paclitaxel and valspodar reduced the tumor volume up to 90%, while paclitaxel alone had no effect. A prolonged 1.7-fold increase of brain concentration of paclitaxel was observed when combined

with several of these inhibitors [181–183]. Colchicine and vinblastine uptake was enhanced 8.42- and 9.08-fold, respectively, when they were co-injected with valsopodar in rats [184]. Cyclosporin A treatment also increases the brain delivery of doxorubicin in rats [185]. However, cyclosporin A injection in nonhuman primates did not appear to improve the CSF delivery of doxorubicin [186]. Docetaxel brain concentration was also increased by elacridar, valsopodar, and cyclosporine A in mice [127].

Such inhibitors showed no or poor effect on different non-CNS tumors expressing P-gp in clinical trials enrolling patients (NCT00069160) [179]. However, due to the BBB and due to high expression of efflux pumps in brain normal cells, this approach might be interesting. For example, combination of verapamil with an antiepileptic treatment in patients with pharmaco-resistant seizures doubled the time interval between hospitalizations and improved the overall control of seizures and the quality of life of patients [187]. An improved brain/plasma ratio was also obtained for loperamide when associated with tariquidar and elacridar [188]. Moreover, even if a method allows a molecule to cross the BBB, the therapeutic impact would be decreased by the efflux of the drug to the blood if it is a substrate of efflux pumps [189]. Any method developed to deliver drugs to the brain could benefit by the addition of an adjuvant efflux pump inhibitor.

5.9. BBB opening

Interestingly, besides their direct antitumor effect, some antitumor therapeutic strategies already used in clinics are able to open the BBB (e.g. etoposide, morphine, and radiotherapy) [2,190–192].

The opening of the BBB can also be obtained by i.a. injection of hypotonic solutions or hyperosmotic solutions (i.e. mannitol). These two methods induce a water flow from the endothelial cells to the blood, leading to shrinkage and subsequent opening of TJs [193–195]. Interestingly, complete tumor response was reported for patients receiving carboplatin and

etoposide after i.a. administration of mannitol [196]. Methotrexate, aminoisobutyric acid, and dextran 70 delivery to the brain was improved by 2.5–7.6-fold by mannitol-induced BBB disruption [171]. In the same line, intra-carotid hyperosmolar perfusion in rats allowed 240–500% increase of antibodies [197]. Bradykinin or its agonist (i.e. RMP-7) or histamine also opens the BBB [198–200]. Intra-carotid infusion of RMP-7 improved the delivery of carboplatin by 2.7-fold in rats [201]. For methotrexate, aminoisobutyric acid, and dextran 70, Neuwelt et al. reported an increase of drug delivery to the tumor and the BAT in rats by: (i) 2.2–2.5-fold after i.a. injection compared to i.v. injection, (ii) 2.5–7.6-fold after mannitol-induced BBB disruption compared to saline injection, and (iii) 6.3–16.7-fold after combining both methods (i.a. + mannitol vs. i.v. + saline) [171].

Ultrasounds can also be used to open the BBB [195,202]. Indeed, association of low-frequency ultrasounds with microbubble contrast agents was shown to open the BBB, a technique that was described to be minimally/noninvasive and safe [203–205]. The ultrasound-induced opening of the BBB was reported to improve the TMZ CSF/plasma ratio from 22.7% to 38.6% in tumor-bearing rats [71]. Irinotecan delivery was increased by 206% to 331% in healthy rabbits [206]. In a primate model, the mean platinum brain distribution was 5.2-fold higher in the US field (0–5 mm section) than in the contralateral hemisphere [104]. A phase I clinical trial (NCT02253212) testing non-focused ultrasounds plus carboplatin is currently enrolling recurrent GBM patients. Thermal ablation of GBM on patients has also been performed with transcranial high-frequency focused ultrasound [207]. The use of the same device with different ultrasound parameters could therefore lead to a BBB opening [208].

5.10. Drug design, modification and encapsulation

Biochemical modifications (e.g. addition of ligand to receptor-mediated transcytosis, lipophilic molecules, nanovectors, and/or positively charged molecules) of existing drugs are explored to improve their capacity to cross the BBB and their antitumor efficacy.

Doxil®/Caelix® consists of doxorubicin encapsulated in a PEGylated liposome. A stabilization in malignant glioma patients was obtained with Doxil® [43]. The modification of Doxil® with glutathione groups led to a 4.8-fold increase of the brain-to-blood ratio compared to Doxil®/Caelix® (~0.08% vs. ~0.02%, respectively) in preclinical models [209,210]. Various other methods have been tested, such as the modification of drugs with fatty acids to increase their liposolubility and improve their diffusion through the BBB [211]. The modification of a drug with a molecule that is recognized by specific receptors/proteins on endothelial cells can also promote its passage through receptor-mediated transcytosis (e.g. complexation of drugs with transferrin) [7,212,213].

Interestingly, drug modification can be combined with other strategies to increase drug delivery within the brain, improve its stability, or reduce its elimination [214].

5.11. Magnetic delivery

Magnetic nanoparticles can be included in liposomes, thus forming magnetoliposomes. These magnetoliposomes can be modified with molecules such as transferrin to promote their interaction with the brain endothelium. Drugs can be loaded in these magnetoliposomes. Therefore, the application of a magnetic field around the brain can attract these particles out of the blood vessels, through the BBB, and deliver the drug in the brain parenchyma [215]. The use of paclitaxel-loaded anti-GPNMB antibody-decorated magnetoliposomes improved the brain delivery of paclitaxel by fourfold in rats. Paclitaxel concentration was still high 48 h after treatment with the liposomal form, while it was not detected after 6 h in animals treated with unmodified paclitaxel [216].

5.12. Electric fields and Electromagnetic fields

In 1977, application of low-intensity electric fields to the brain was shown to induce BBB opening and to improve passage of dyes and drugs from the blood to the brain. This passage of

drugs can also implicate multiple putative mechanisms: (i) iontophoresis (charge-mediated displacement of charged molecules), (ii) electro-osmosis, (iii) convection flows, and/or (iv) electroporation [217]. Recently, the use of intracranial irreversible electroporation in rat brain was shown to induce a BBB opening [218].

The Novocure device delivers ‘tumor-treating fields’ (TTFs) to the brain, and was shown to induce tumor cell death in preclinics and increase survival of newly diagnosed GBM patients (NCT00916409) [219]. The mechanism of tumor cell death remains unclear, but it is at least partly due to interaction of TTFs with the cytoskeleton. Indeed, TTFs impede polymerization and functions of tubulin, resulting in abnormal mitoses and cytokinesis. Finally, the electroporation of tumor cells was also observed. Electroporation was proposed to explain the synergic effect of TTF and chemotherapy observed in some patients [220]. Moreover, a BBB opening was observed after nonthermal irreversible electroporation as a tumor ablation method [195].

Interactions between electromagnetic fields and BBB are still unclear and under investigation [221].

6. Discussion

GBM is a lethal disease, and more efficient therapeutic strategies are urgently needed. Despite the fact that multiple efficient cytotoxic chemotherapeutic agents are available, as demonstrated in *in vitro* preclinical models (i.e. GBM cell lines) and in *in vivo* preclinical models without BBB (i.e. GBM subcutaneous xenografts), their efficacy is dramatically reduced in GBM orthotopic xenografts and in GBM patients [222]. Several reasons might explain this reduced efficacy in patients, one of them being the limited penetration of drugs within the tumor and the BAT.

The passage of cytotoxic drugs across the BBB is commonly admitted to be limited in patients and to be well-documented in the literature. However, data are scarce and heterogeneous in the literature, limiting comparisons across studies. Our review of the literature reports, in Table 2, the ability of antitumor drugs to cross the brain barriers (i.e. brain/plasma and CSF/plasma ratio). However, preclinical and clinical studies are heterogeneous in terms of materials and methods: (i) heterogeneity of models and patients – tumor or not, tumor type, CNS involvement or not – and (ii) heterogeneity of methods – i.e. route of administration of the drug, total dose, time between treatments, biological sample management, assays, and cell lines used. These heterogeneities, also raised by Jacus et al., highlight the difficulties in comparing and interpreting the studies in a robust manner [22]. Therefore, major efforts need to be conducted by the community to standardize preclinical evaluation of drug efficacy and preclinical evaluation of drug penetration within the tumor, the BAT, and the CSF.

Indeed, these data are critical to optimize drug delivery of current cytotoxic agents and take advantage of efficient drugs that would otherwise be disregarded due to their incapacity to reach GBM cells. Indeed, one of the major therapeutic advances that have been accomplished over the last years in neuro-oncology came from very old cytotoxic drugs [223,224]. Therefore, ‘old drugs’ might have unexpected efficacy if used in the right indication, in the right therapeutic regimen, at the right moment, and in the right patients.

Assessment of brain distribution is challenging in practice in preclinical and clinical settings. In silico prediction is the most efficient approach to perform a high throughput analysis. However, the limited accuracy of this method hampers the benefits of such evaluations. On a smaller scale, a limited number of molecules can also be analyzed using in vitro models of BBB. Various models exist, and they all rely on the transwell system. Endothelial cells are cultured on a porous membrane delimiting two compartments, each representing the blood and the brain [4,225]. The drug can then be deposited in one

compartment and measured in the two compartments to quantify the passage of the drug. The most commonly used human endothelial cells are the immortalized human brain endothelial cells hCMEC/D3 cells [226]. These cells were shown to retain the normal gene expression pattern of endothelial cells of the BBB, making them one of the easiest to use, the most reproducible, and the most reliable models. More accurate models are available but cannot be used in medium to large-scale studies [106]. The optimal animal model remains the nonhuman primate (e.g. Rhesus monkey). The BBB of rodents (mice, rats) is different from the human BBB. More specifically, the expression of efflux pumps such as ABCB1 (P-gp) and ABCG2 (BCRP) is qualitatively similar, but quantitatively different [227]. The pathway of *in silico*, preclinical *in vitro*, and preclinical *in vivo* analysis allows preselection of the best candidate drugs at each step, and reduces the cost of drug screening [228].

In clinical trials, most often, the passage of drugs is measured in the CSF. However, the drug concentration is not always well correlated between the CSF and the brain. The most robust data are obtained with biopsies of the brain after chemotherapy administration. However, biopsies are mainly used for diagnosis rather than for drug dosage, and are thus performed prior to initiation of treatment. Phase 0 clinical trials may help to better understand CNS pharmacokinetics and pharmacodynamics of anticancer drugs [229].

7. Conclusions

The BBB/BTB is a major obstacle limiting the efficacy of anticancer agents in GBM. Multiple classic cytotoxic agents and innovative drugs showed promising therapeutic activity in GBM cells in the absence of the BBB or BTB (i.e. *in vitro* experiments or subcutaneous xenografts). Their ability to cross the BBB and the BTB has been poorly or heterogeneously documented in the literature. A better comprehensive and standardized evaluation of the ability of drugs to cross the BBB and their antitumor efficacy is needed. In parallel, multiple innovative

physical and chemical strategies are under development to bypass the BBB and the BTB, particularly in the BAT. A better knowledge of the ability of the drugs to cross the BBB and a better ability to open the BBB will undoubtedly improve the treatment of GBM patients.

8. Expert commentary

Treating brain diseases, including GBM, is challenging due, at least partly, to the BBB. It will be virtually impossible to test, in human patients, for each anti-GBM candidate drug and for each drug combination, their ability to cross the BBB, their therapeutic efficacy, and their toxicity. Therefore, robust, reproducible, and consensual models to assess the ability of anti-GBM candidate drugs to cross the BBB in preclinical settings (i.e. *in vitro* and *in vivo*) need to be optimized and validated-admitted across the research teams involved in the field. These models, including the complexity of the human BBB, will undoubtedly better rationalize our selection of anti-GBM candidate drugs to be tested, alone or combined with a BBB-opening procedure, in clinical trials enrolling GBM patients. This strategy will improve our success rate in clinical trials dedicated to GBM patients and will benefit GBM patients.

9. Five-years view

Currently, two major axes of therapeutic research are converging to increase the efficacy of anticancer treatments in the field of primary malignant brain tumors. Innovative smart antitumor drugs have been developed, and some of them have demonstrated dramatic efficacy in systemic cancers, raising hope for the treatment of GBM patients. Some of these promising drugs are large molecules (e.g. monoclonal antibodies) or highly hydrophilic. Obviously, although these anticancer drugs are efficient, they will not be able to reach GBM cells located in the BAT. Significant efforts are ongoing to increase, using chemical or physical approaches,

the bioavailability of these drugs with the GBM bulk and the BAT. Merging these two axes of therapeutic research will undoubtedly improve the treatment of GBM patients.

10. Key issues

- Escaping/invasive GBM cells, located in the BAT which is protected by intact BBB, are often the source of GBM recurrence
- The BBB remains a major obstacle to obtain therapeutic drug bio-availability within the GBM bulk and the BAT
- Systematic, comparable and comprehensive pharmacokinetics and pharmacodynamics data for anti-cancer drugs are lacking.
- Physical strategies to open the BBB in a reproducible, large, transient and safe are under investigations.
- Chemical strategies to increase drug penetration through the BBB are under investigations

11. Declaration of interest

The research leading to these results has received funding from the program 'Investissements d'avenir' ANR-10-IAIHU-06. Institut Universitaire de Cancérologie (IUC). A Dréan is funded by Carthera SAS. This work is part of GlioTex (i.e. GBM and Experimental Therapeutics) project funded by La Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer. A Idbaih discloses funds from Carthera SAS, Gekco, Bristol Myers Squibb, Hoffmann-La Roche. M Canney and A Carpentier disclose funds from Carthera SAS. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

12. References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest

- of considerable interest

1. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.* 2014;16 (7):896–913.

- **This article provides a comprehensive review of epidemiology of gliomas, including GBM.**

2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):987–996.

3. Scherer H. Structural development in gliomas. *Am J Cancer.* 1938;33(3):333–351.

4. Wong AD, Ye M, Levy AF, et al. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng.* 2013;6:7.

- **This review offers a large overview of the structure of the BBB, the functions of the BBB, and the molecular mechanisms involved in its crossing. In addition, it also describes the methods used to evaluate the models of BBB and their functioning.**

5. Saunders NR, Daneman R, Dziegielewska KM, et al. Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Mol Aspects Med.* 2013;34(2–3):742–752.

6. Langlet F. Role of tanycytes within the blood-hypothalamus interface. *Biol Aujourd'hui.* 2014;208(3):225–235.

7. Preston JE, Joan Abbott N, Begley DJ. Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv Pharmacol San Diego Calif.* 2014;71:147–163.

8. Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, et al. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm.* 2011;8(4):1332–1341.

9. Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, et al. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem.* 2011;117(2):333–345.
10. Hartz AMS, Bauer B. ABC transporters in the CNS - an inventory. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12(4):656–673.
11. Horsburgh A, Massoud TF. The circumventricular organs of the brain: conspicuity on clinical 3T MRI and a review of functional anatomy. *Surg Radiol Anat SRA.* 2013;35(4):343–349.
12. Langlet F, Mullier A, Bouret SG, et al. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol.* 2013;521(15):3389–3405.
13. Morita S, Furube E, Mannari T, et al. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 2015;363(2):497–511.
14. Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(3–4):489–502.
15. Dubois LG, Campanati L, Righy C, et al. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:418.
16. Lee J, Lund-Smith C, Borboa A, et al. Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Res.* 2009;1288:125–134.
17. Schneider SW, Ludwig T, Tatenhorst L, et al. Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol (Berl).* 2004;107(3):272–276.
18. Wolburg H, Noell S, Fallier-Becker P, et al. The disturbed blood brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med.* 2012;33(5–6):579–589.
19. De Lange ECM. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56(12):1793–1809.

20. Pardridge WM. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids Barriers CNS*. 2011;8(1):7.
21. Patel N, Kirmi O. Anatomy and imaging of the normal meninges. *Semin Ultrasound CT MR*. 2009;30(6):559–564.
22. Jacus MO, Daryani VM, Harstead KE, et al. Pharmacokinetic properties of anticancer agents for the treatment of central nervous system tumors: update of the literature. *Clin Pharmacokinet*. 2015;55(3):297–311.
23. Newton HB. Neurological complications of chemotherapy to the central nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2012;105:903–916.
24. Cherubini GB, Platt S. Neurological complications of chemotherapy. *Companion Anim*. 2008;13(5):76–82.
25. Taal W, Oosterkamp HM, Walenkamp AME, et al. Single-agent bevacizumab or lomustine versus a combination of bevacizumab plus lomustine in patients with recurrent glioblastoma (BELOBtrial): a randomised controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014; 15(9):943–953.
26. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The polymer-brain tumor treatment group. *Lancet*. 1995;345(8956):1008–1012.
27. Imbesi F, Marchioni E, Benericetti E, et al. A randomized phase III study: comparison between intravenous and intraarterial ACNU administration in newly diagnosed primary glioblastomas. *Anticancer Res*. 2006;26(1B):553–558.
28. Kochii M, Kitamura I, Goto T, et al. Randomized comparison of intra-arterial versus intravenous infusion of ACNU for newly diagnosed patients with glioblastoma. *J Neurooncol*. 2000;49(1):63–70.

29. Brada M, Hoang-Xuan K, Rampling R, et al. Multicenter phase II trial of temozolomide in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2001;12(2):259–266.
30. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2012;13(9):916–926.
31. Paulsen F, Hoffmann W, Becker G, et al. Chemotherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme: ifosfamide versus temozolomide. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1999;125(7):411–418.
32. Luyendijk W, Van Beusekom GT. Chemotherapy of cerebral gliomas with intra-carotid methotrexate-infusion. *Acta Neurochir (Wien)*. 1966;15(3):234–248.
33. Healy AT, Vogelbaum MA. Convection-enhanced drug delivery for gliomas. *Surg Neurol Int*. 2015;6(Suppl 1):S59–67.
34. Bruce JN, Fine RL, Canoll P, et al. Regression of recurrent malignant gliomas with convection-enhanced delivery of topotecan. *Neuro surgery*. 2011;69(6):1272-1279-1280.
35. Macdonald D, Cairncross G, Stewart D, et al. Phase II study of topotecan in patients with recurrent malignant glioma. National Clinical Institute of Canada Clinical Trials Group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 1996;7(2):205–207.
36. Fulton D, Urtasun R, Forsyth P. Phase II study of prolonged oral therapy with etoposide (VP16) for patients with recurrent malignant glioma. *J Neurooncol*. 1996;27(2):149–155.
37. Friedman HS, Petros WP, Friedman AH, et al. Irinotecan therapy in adults with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999;17(5):1516–1525.

38. Prados MD, Lamborn K, Yung WKA, et al. A phase 2 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro Oncol.* 2006;8(2):189–193.
39. Turner CD, Gururangan S, Eastwood J, et al. Phase II study of irinotecan (CPT-11) in children with high-risk malignant brain tumors: the Duke experience. *Neuro Oncol.* 2002;4(2):102–108.
40. Cloughesy TF, Gobin YP, Black KL, et al. Intra-arterial carboplatin chemotherapy for brain tumors: a dose escalation study based on cerebral blood flow. *J Neurooncol.* 1997;35(2):121–131.
41. Prados MD, Warnick RE, Mack EE, et al. Intravenous carboplatin for recurrent gliomas. A dose-escalating phase II trial. *Am J Clin Oncol.* 1996;19(6):609–612.
42. Stewart DJ, Belanger JM, Grahovac Z, et al. Phase I study of intracarotid administration of carboplatin. *Neurosurgery.* 1992;30(4):512-516-517.
43. Fabel K, Dietrich J, Hau P, et al. Long-term stabilization in patients with malignant glioma after treatment with liposomal doxorubicin. *Cancer.* 2001;92(7):1936–1942.
44. Oliver AS, Firth G, McKeran RO. Studies on the intracerebral injection of vincristine free and entrapped within liposomes in the rat. *J Neurol Sci.* 1985;68(1):25–30.
45. Yung WK, Albright RE, Olson J, et al. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer.* 2000;83(5):588–593.
46. Chamberlain MC, Kormanik P. Salvage chemotherapy with paclitaxel for recurrent primary brain tumors. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1995;13(8):2066–2071.
47. Lidar Z, Mardor Y, Jonas T, et al. Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. *J Neurosurg.* 2004;100(3):472–479.

48. Postma TJ, Heimans JJ, Luykx SA, et al. A phase II study of paclitaxel in chemo-naïve patients with recurrent high-grade glioma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2000;11(4):409–413.
49. Fabrini MG, Silvano G, Lolli I, et al. A multi-institutional phase II study on second-line Fotemustine chemotherapy in recurrent glioblastoma. *J Neurooncol*. 2009;92(1):79–86.
50. Khayat D, Giroux B, Berille J, et al. Fotemustine in the treatment of brain primary tumors and metastases. *Cancer Invest*. 1994;12(4):414–420.
51. Pennese E, Vergine C, Matera R, et al. Complete response induced by fotemustine given as single agent in a patient with primary central nervous system non-Hodgkin aggressive lymphoma relapsed after high-dose chemotherapy and autologous stem cell support. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(11):2188–2189.
52. Tranchand B, Lucas C, Biron P, et al. Phase I pharmacokinetics study of high-dose fotemustine and its metabolite 2-chloroethanol in patients with high-grade gliomas. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1993;32(1):46–52.
53. Dirven L, van den Bent MJ, Bottomley A, et al. The impact of bevacizumab on health-related quality of life in patients treated for recurrent glioblastoma: results of the randomised controlled phase 2 BELOB trial. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2015;51(10):1321–1330.
54. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(28):4733–4740.
55. Kreisl TN, Kim L, Moore K, et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(5):740–745.
56. Nagane M, Nishikawa R, Narita Y, et al. Phase II study of single agent bevacizumab in Japanese patients with recurrent malignant glioma. *Jpn J Clin Oncol*. 2012;42(10):887–895.

57. Patchell RA, Regine WF, Ashton P, et al. A phase I trial of continuously infused intratumoral bleomycin for the treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol.* 2002;60(1):37–42.
58. Dresemann G, Weller M, Rosenthal MA, et al. Imatinib in combination with hydroxyurea versus hydroxyurea alone as oral therapy in patients with progressive pretreated glioblastoma resistant to standard dose temozolomide. *J Neurooncol.* 2010;96(3):393–402.
59. Forsyth P, Cairncross G, Stewart D, et al. Phase II trial of docetaxel in patients with recurrent malignant glioma: a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Invest New Drugs.* 1996;14(2):203–206.
60. Sanson M, Napolitano M, Yaya R, et al. Second line chemotherapy with docetaxel in patients with recurrent malignant glioma: a phase II study. *J Neurooncol.* 2000;50(3):245–249.
61. Zwerdling T, Krailo M, Monteleone P, et al. Phase II investigation of docetaxel in pediatric patients with recurrent solid tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer.* 2006;106(8):1821–1828.
62. Hassan M, Ehrsson H, Wallin I, et al. Pharmacokinetic and metabolic studies of busulfan in rat plasma and brain. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1988;13(4):301–305.
63. Hassan M, Ehrsson H, Smedmyr B, et al. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of busulfan during high-dose therapy. *Bone Marrow Transplant.* 1989;4(1):113–114.
64. Hassan M, Hassan Z, Nilsson C, et al. Pharmacokinetics and distribution of liposomal busulfan in the rat: a new formulation for intravenous administration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998;42(6):471–478.
65. Vassal G, Gouyette A, Hartmann O, et al. Pharmacokinetics of high-dose busulfan in children. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(6):386–390.

66. Heideman RL, Cole DE, Balis F, et al. Phase I and pharmacokinetic evaluation of thiotepa in the cerebrospinal fluid and plasma of pediatric patients: evidence for dose-dependent plasma clearance of thiotepa. *Cancer Res.* 1989;49(3):736–741.
67. Strong JM, Collins JM, Lester C, et al. Pharmacokinetics of intraventricular and intravenous N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (thiotepa) in rhesus monkeys and humans. *Cancer Res.* 1986;46 (12 Pt 1):6101–6104.
68. Castronovo FP, Potsaid MS, Kopiwoda S. Formulation and biological distribution of radiolabeled 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea in an animal tumor model. *Cancer Res.* 1980;40(10):3473–3474.
69. Levin VA. Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem.* 1980;23(6):682–684.
70. Luco JM. Prediction of the brain-blood distribution of a large set of drugs from structurally derived descriptors using partial least-squares (PLS) modeling. *J Chem Inf Comput Sci.* 1999;39(2):396–404.
71. Wei K-C, Chu P-C, Wang H-YJ, et al. Focused ultrasound-induced blood brain barrier opening to enhance temozolomide delivery for glioblastoma treatment: a preclinical study. *PLoS One.* 2013;8(3):e58995.
72. Goldwirt L, Beccaria K, Carpentier A, et al. Irinotecan and temozolomide brain distribution: a focus on ABCB1. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(1):185–193.
73. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, et al. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2004;10(11):3728–3736.
74. Patel M, McCully C, Godwin K, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. *J Neurooncol.* 2003;61(3):203–207.

75. Portnow J, Badie B, Chen M, et al. The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009;15(22):7092–7098.
76. Reyderman L, Statkevich P, Thonoor CM, et al. Disposition and pharmacokinetics of temozolomide in rat. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst.* 2004;34(5):487–500.
77. Zhou Q, Gallo JM. Differential effect of sunitinib on the distribution of temozolomide in an orthotopic glioma model. *Neuro Oncol.* 2009;11(3):301–310.
78. Zhou Q, Guo P, Wang X, et al. Preclinical pharmacokinetic and pharmacodynamics evaluation of metronomic and conventional temozolomide dosing regimens. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321(1):265–275.
79. Zhou Q, Guo P, Kruh GD, et al. Predicting human tumor drug concentrations from a preclinical pharmacokinetic model of temozolomide brain disposition. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2007;13 (14):4271–4279.
80. Ettinger LJ, Chervinsky DS, Freeman AI, et al. Pharmacokinetics of methotrexate following intravenous and intraventricular administration in acute lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer.* 1982;50(9):1676–1682.
81. Evans WE, Hutson PR, Stewart CF, et al. Methotrexate cerebrospinal fluid and serum concentrations after intermediate-dose methotrexate infusion. *Clin Pharmacol Ther.* 1983;33(3):301–307.
82. Heideman RL, Balis FM, Zimm S, et al. The effect of amitriptyline on the central nervous system penetration of methotrexate. *Cancer Drug Deliv.* 1986;3(4):219–222.
83. Lippens RJ, Winograd B. Methotrexate concentration levels in the cerebrospinal fluid during high-dose methotrexate infusions: an unreliable prediction. *Pediatr Hematol Oncol.* 1988;5(2):115–124.

84. Morse M, Savitch J, Balis F, et al. Altered central nervous system pharmacology of methotrexate in childhood leukemia: another sign of meningeal relapse. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1985;3(1):19–24.
85. Slørdal L, Jaeger R, Kjaeve J, et al. Pharmacokinetics of 7-hydroxymethotrexate and methotrexate in the rat. *Pharmacol Toxicol*. 1988;63(2):81–84.
86. Thyss A, Milano G, Deville A, et al. Effect of dose and repeat intravenous 24 hr infusions of methotrexate on cerebrospinal fluid availability in children with hematological malignancies. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23(6):843–847.
87. Westerhout J, Van Den Berg D-J, Hartman R, et al. Prediction of methotrexate CNS distribution in different species - influence of disease conditions. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci*. 2014;57:11–24.
88. Baker SD, Heideman RL, Crom WR, et al. Cerebrospinal fluid pharmacokinetics and penetration of continuous infusion topotecan in children with central nervous system tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1996;37(3):195–202.
89. Blaney SM, Cole DE, Balis FM, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetic study of topotecan in nonhuman primates. *Cancer Res*. 1993;53(4):725–727.
90. Morgan RJ, Synold T, Mamelak A, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of topotecan in a phase I trial of topotecan, tamoxifen, and carboplatin, in the treatment of recurrent or refractory brain or spinal cord tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;66(5):927–933.
91. Straathof CS, van den Bent MJ, Loos WJ, et al. The accumulation of topotecan in 9L glioma and in brain parenchyma with and without dexamethasone administration. *J Neurooncol*. 1999;42(2):117–122.
92. Sung C, Blaney SM, Cole DE, et al. A pharmacokinetic model of topotecan clearance from plasma and cerebrospinal fluid. *Cancer Res*. 1994;54(19):5118–5122.

93. Zamboni WC, Lüftner DI, Egorin MJ, et al. The effect of increasing topotecan infusion from 30 minutes to 4 hours on the duration of exposure in cerebrospinal fluid. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2001;12(1):119–122.
94. DeGregorio MW, King OY, Holleran WM, et al. Ultrafiltrate and total platinum in plasma and cerebrospinal fluid in a patient with neuroblastoma. *Cancer Treat Rep*. 1985;69(12):1441–1442.
95. Jacobs S, McCully CL, Murphy RF, et al. Extracellular fluid concentrations of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in brain, muscle, and blood measured using microdialysis in nonhuman primates. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010;65(5):817–824.
96. Jacobs SS, Fox E, Dennie C, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin in nonhuman primates. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005;11(4):1669–1674.
97. Straathof CS, van den Bent MJ, Ma J, et al. The effect of dexamethasone on the uptake of cisplatin in 9L glioma and the area of brain around tumor. *J Neurooncol*. 1998;37(1):1–8.
98. Burgio DE, Gosland MP, McNamara PJ. Modulation effects of cyclosporine on etoposide pharmacokinetics and CNS distribution in the rat utilizing microdialysis. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(7):987–992.
99. Burgio DE, Gosland MP, McNamara PJ. Effects of P-glycoprotein modulators on etoposide elimination and central nervous system distribution. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998;287(3):911–917.
100. Hande KR, Wedlund PJ, Noone RM, et al. Pharmacokinetics of highdose etoposide (VP-16-213) administered to cancer patients. *Cancer Res*. 1984;44(1):379–382.
101. Relling MV, Mahmoud HH, Pui CH, et al. Etoposide achieves potentially cytotoxic concentrations in CSF of children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1996;14(2):399–404.

102. Zucchetti M, Rossi C, Knerich R, et al. Concentrations of VP16 and VM26 in human brain tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 1991;2(1):63–66.

103. Blaney SM, Takimoto C, Murry DJ, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 9-aminocamptothecin (9-AC), irinotecan (CPT-11), and SN-38 in nonhuman primates. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1998;41(6):464–468.

104. Goldwirt L, Canney M, Horodyckid C, et al. Enhanced brain distribution of carboplatin in a primate model after blood-brain barrier disruption using an implantable ultrasound device. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015;77(1):211–216.

•• The first human-compatible device emitting ultrasounds to open the BBB was evaluated in preclinical setting in this article. It significantly improves carboplatine delivery to the brain. It is currently investigated in a phase 1 clinical trial enrolling GBM patients (NCT02253212).

105. van Asperen J, van Tellingen O, Tijssen F, et al. Increased accumulation of doxorubicin and doxorubicinol in cardiac tissue of mice lacking *mdr1a* P-glycoprotein. *Br J Cancer*. 1999;79(1):108–113.

106. Garberg P, Ball M, Borg N, et al. In vitro models for the blood brain barrier. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 2005;19(3):299–334.

107. Greig NH, Soncrant TT, Shetty HU, et al. Brain uptake and anticancer activities of vincristine and vinblastine are restricted by their low cerebrovascular permeability and binding to plasma constituents in rat. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1990;26(4):263–268.

108. Boyle FM, Eller SL, Grossman SA. Penetration of intra-arterially administered vincristine in experimental brain tumor. *Neuro-Oncol*. 2004;6(4):300–305.

109. Kellie SJ, Barbaric D, Koopmans P, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of vincristine after bolus intravenous dosing: a surrogate marker of brain penetration. *Cancer*. 2002;94(6):1815–1820.

110. Van Prooijen HC, Punt K, Muus P. Cerebrospinal fluid concentrations of cytosine arabinoside during intravenous therapy with intermediate dose: a preliminary report. *Br J Haematol.* 1985;59(1):188–190.
111. Slevin ML, Pfall EM, Aherne GW, et al. The pharmacokinetics of cytosine arabinoside in the plasma and cerebrospinal fluid during conventional and high-dose therapy. *Med Pediatr Oncol.* 1982;10(Suppl 1):157–168.
112. Wolff JE, Trilling T, Mölenkamp G, et al. Chemosensitivity of glioma cells in vitro: a meta analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999;125(8–9):481–486.
113. Eiseman JL, Eddington ND, Leslie J, et al. Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;34(6):465–471.
114. Heimans JJ, Vermorken JB, Wolbers JG, et al. Paclitaxel (Taxol) concentrations in brain tumor tissue. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO.* 1994;5(10):951–953.
115. Hendriks JJMA, Lagas JS, Wagenaar E, et al. Oral co-administration of elacridar and ritonavir enhances plasma levels of oral paclitaxel and docetaxel without affecting relative brain accumulation. *Br J Cancer.* 2014;110(11):2669–2676.
116. Arndt CA, Balis FM, McCully CL, et al. Cerebrospinal fluid penetration of active metabolites of cyclophosphamide and ifosfamide in rhesus monkeys. *Cancer Res.* 1988;48(8):2113–2115.
117. Creaven PJ, Allen LM, Alford DA, et al. Clinical pharmacology of isophosphamide. *Clin Pharmacol Ther.* 1974;16(1):77–86.
118. Ninane J, Baurain R, De Kraker J, et al. Alkylating activity in serum, urine, and CSF following high-dose ifosfamide in children. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1989;24(Suppl 1):S2–6. discussion S7
119. Walker EJ, Su H, Shen F, et al. Bevacizumab attenuates VEGF-induced angiogenesis and vascular malformations in the adult mouse brain. *Stroke J Cereb Circ.* 2012;43(7):1925–1930.

120. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84 (5):548–558.
121. Chiang M-H, Chang L-W, Wang J-W, et al. Herb-drug pharmacokinetic interaction of a traditional chinese medicine jia-wei-xiao-yao-san with 5-Fluorouracil in the blood and brain of rat using microdialysis. *Evid.-Based Complement Altern Med ECAM.* 2015;729679:2015.
122. Hornbeck CL, Floyd RA, Byfield JE, et al. Cerebrospinal fluid versus serum concentrations of 5-FU, allopurinol, and oxypurinol during treatment of metastatic brain cancer with 5-FU infusion, allopurinol, and radiation. *Cancer Treat Rep.* 1982;66(3):571–573.
123. Kerr IG, Zimm S, Collins JM, et al. Effect of intravenous dose and schedule on cerebrospinal fluid pharmacokinetics of 5-fluorouracil in the monkey. *Cancer Res.* 1984;44(11):4929–4932.
124. Dogruel M, Gibbs JE, Thomas SA. Hydroxyurea transport across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers of the guineapig. *J Neurochem.* 2003;87(1):76–84.
125. Gwilt PR, Manouilov KK, McNabb J, et al. Pharmacokinetics of hydroxyurea in plasma and cerebrospinal fluid of HIV-1-infected patients. *J Clin Pharmacol.* 2003;43(9):1003–1007.
126. Navarra P, Del Carmine R, Ciabattini G, et al. Hydroxyurea: relationship between toxicity and centrally-induced adrenal activation. *Pharmacol Toxicol.* 1990;67(3):209–215.
127. Kemper EM, Verheij M, Boogerd W, et al. Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *Eur J Cancer Oxf Engl.* 2004;40(8):1269–1274.
128. Ten Tije AJ, Loos WJ, Zhao M, et al. Limited cerebrospinal fluid penetration of docetaxel. *Anticancer Drugs.* 2004;15(7):715–718.
129. Li C-M, Lu Y, Chen J, et al. Orally bioavailable tubulin antagonists for paclitaxel-refractory cancer. *Pharm Res.* 2012;29(11):3053–3063.

130. Breithaupt H, Pralle H, Eckhardt T, et al. Clinical results and pharmacokinetics of high-dose cytosine arabinoside (HD ARA-C). *Cancer*. 1982;50(7):1248–1257.

131. DeAngelis LM, Kreis W, Chan K, et al. Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1992;29(3):173–177.

132. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46(1–3):3–26.

133. Lanevskij K, Japertas P, Didziapetris R. Improving the prediction of drug disposition in the brain. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(4):473–486.

•• Prediction, in silico, of how a drug crosses the BBB is challenging. Mathematical models are of major interest in the development of new drugs for neurological disorders and are continuously improved to fit with experimental data. Pro and cons of each model are discussed in this review.

134. Van Niftherik KA, Van Den Berg J, Van DerMeideWF, et al. Absence of the MGMT protein as well as methylation of the MGMT promoter predict the sensitivity for temozolomide. *Br J Cancer*. 2010;103(1):29–35.

135. Tomita T. Interstitial chemotherapy for brain tumors: review. *J Neurooncol*. 1991;10(1):57–74.

136. Stone JB, DeAngelis LM. Cancer-treatment-induced neurotoxicity—focus on newer treatments. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016;13(2):92–105.

137. Hassenbusch SJ, Nardone EM, Levin VA, et al. Stereotactic injection of DTI-015 into recurrent malignant gliomas: phase I/II trial. *Neoplasia N Y N*. 2003;5(1):9–16.

138. Tator CH, Day A, Ng R, et al. Chemotherapy of an experimental glioma with nitrosoureas. *Cancer Res*. 1977;37(2):476–481.

139. Ommaya AK. Subcutaneous reservoir and pump for sterile access to ventricular cerebrospinal fluid. *Lancet*. 1963;2(7315):983–984.

140. Kroll RA, Pagel MA, Muldoon LL, et al. Increasing volume of distribution to the brain with interstitial infusion: dose, rather than convection, might be the most important factor. *Neurosurgery*. 1996;38(4):746-752-754.

141. Sampson JH, Brady ML, Petry NA, et al. Intracerebral infusate distribution by convection-enhanced delivery in humans with malignant gliomas: descriptive effects of target anatomy and catheter positioning. *Neurosurgery*. 2007;60(2 Suppl 1):ONS89-98; discussion ONS98-99.

142. Tanner PG, Holtmannspötter M, Tonn J-C, Goldbrunner R. Effects of drug efflux on convection-enhanced paclitaxel delivery to malignant gliomas: technical note. *Neurosurgery*. 2007;61(4):E880–882. discussion E882

143. Kroin JS, Penn RD. Intracerebral chemotherapy: chronic micro-infusion of cisplatin. *Neurosurgery*. 1982;10(3):349–354.

144. Barua NU, Hopkins K, Woolley M, et al. A novel implantable catheter system with transcutaneous port for intermittent convection-enhanced delivery of carboplatin for recurrent glioblastoma. *Drug Deliv*. 2016;23(1):167–173.

• **This article illustrates the potential clinical benefit of increased local chemotherapy, using a medical device, in the treatment of glioblastoma GBM patients**

145. Kerr JZ, Berg S, Blaney SM. Intrathecal chemotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2001;37(3):227–236.

146. Qweider M, Gilsbach JM, Rohde V. Inadvertent intrathecal vincristine administration: a neurosurgical emergency. Case report. *J Neurosurg Spine*. 2007;6(3):280–283.

147. Saiki JH, Thompson S, Smith F, et al. Paraplegia following intrathecal chemotherapy. *Cancer*. 1972;29(2):370–374.

148. Brem H, Mahaley MS, Vick NA, et al. Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas. *J Neurosurg.* 1991;74(3):441–446.
149. Perry J, Chambers A, Spithoff K, et al. Gliadel wafers in the treatment of malignant glioma: a systematic review. *Curr Oncol Tor Ont.* 2007;14(5):189–194.
150. Subach BR, Witham TF, Kondziolka D, et al. Morbidity and survival after 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea wafer implantation for recurrent glioblastoma: a retrospective case-matched cohort series. *Neurosurgery.* 1999;45(1):17-22-23.
151. Olivi A, Grossman SA, Tatter S, et al. Dose escalation of carmustine in surgically implanted polymers in patients with recurrent malignant glioma: a New Approaches to Brain Tumor Therapy CNS Consortium trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003;21(9):1845–1849.
152. Engelhard HH. Tumor bed cyst formation after BCNU wafer implantation: report of two cases. *Surg Neurol.* 2000;53(3):220–224.
153. Weber EL, Goebel EA. Cerebral edema associated with Gliadel wafers: two case studies. *Neuro Oncol.* 2005;7(1):84–89.
154. Fung LK, Shin M, Tyler B, et al. Chemotherapeutic drugs released from polymers: distribution of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in the rat brain. *Pharm Res.* 1996;13(5):671–682.
155. Fung LK, Ewend MG, Sills A, et al. Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain. *Cancer Res.* 1998;58(4):672–684.
156. Akbar U, Jones T, Winestone J, et al. Delivery of temozolomide to the tumor bed via biodegradable gel matrices in a novel model of intracranial glioma with resection. *J Neurooncol.* 2009;94(2):203–212.

157. Elstad NL, Fowers KD. OncoGel (ReGel/paclitaxel)—clinical applications for a novel paclitaxel delivery system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(10):785–794.
158. Kim GY, Tyler BM, Tupper MM, et al. Resorbable polymer microchips releasing BCNU inhibit tumor growth in the rat 9L flank model. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2007;123 (2):172–178.
159. Li KW, Dang W, Tyler BM, et al. Polylactofate microspheres for Paclitaxel delivery to central nervous system malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003;9(9):3441–3447.
160. Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 2000;11(1):1–18.
161. Sakane T, Yamashita S, Yata N, et al. Transnasal delivery of 5-Fluouracil to the brain in the rat. *J Drug Target.* 1999;7(3):233–240.
162. Shingaki T, Inoue D, Furubayashi T, et al. Transnasal delivery of methotrexate to brain tumors in rats: a new strategy for brain tumor chemotherapy. *Mol Pharm.* 2010;7(5):1561–1568.
163. Bay J-O, Jacques-Olivier B, Linassier C, et al. Does high-dose carmustine increase overall survival in supratentorial high-grade malignant glioma? An EBMT retrospective study. *Int J Cancer J Int Cancer.* 2007;120(8):1782–1786.
164. Grill J, Kalifa C, Doz F, et al. A high-dose busulfan-thiotepa combination followed by autologous bone marrow transplantation in childhood recurrent ependymoma. Phase-II Study *Pediatr Neurosurg.* 1996;25(1):7–12.
165. Valteau-Couanet D, Fillipini B, Benhamou E, et al. High-dose busulfan and thiotepa followed by autologous stem cell transplantation (ASCT) in previously irradiated medulloblastoma patients: high toxicity and lack of efficacy. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(11):939–945.

166. Armstrong TS, Wefel JS, Wang M, et al. Net clinical benefit analysis of radiation therapy oncology group 0525: a phase III trial comparing conventional adjuvant temozolomide with dose-intensive temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31(32):4076–4084.
167. Gilbert MR, Wang M, Aldape KD, et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013;31(32):4085–4091.
168. Massimino M, Gandola L, Luksch R, et al. Sequential chemotherapy, high-dose thiotepa, circulating progenitor cell rescue, and radiotherapy for childhood high-grade glioma. *Neuro Oncol*. 2005;7(1):41–48.
169. Nakagawa H, Fujita T, Izumoto S, et al. cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) therapy for brain metastasis of lung cancer. I. Distribution within the central nervous system after intravenous and intracarotid infusion. *J Neurooncol*. 1993;16(1):61–67.
170. Savaraj N, Lu K, Feun LG, et al. Comparison of CNS penetration, tissue distribution, and pharmacology of VP 16-213 by intracarotid and intravenous administration in dogs. *Cancer Invest*. 1987;5 (1):11–16.
171. Neuwelt EA, Barnett PA, McCormick CI, et al. Differential permeability of a human brain tumor xenograft in the nude rat: impact of tumor size and method of administration on optimizing delivery of biologically diverse agents. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1998;4(6):1549–1555.
172. Tyler JL, Yamamoto YL, Diksic M, et al. Pharmacokinetics of superselective intra-arterial and intravenous [11C]BCNU evaluated by PET. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 1986;27(6):775–780.

173. Chauveinc L, Sola-Martinez MT, Martin-Duverneuil M, et al. Intra arterial chemotherapy with ACNU and radiotherapy in inoperable malignant gliomas. *J Neurooncol.* 1996;27(2):141–147.
174. Hirano Y, Mineura K, Mizoi K, et al. Therapeutic results of intraarterial chemotherapy in patients with malignant glioma. *Int J Oncol.* 1998;13(3):537–542.
175. Poisson M, Chiras J, Fauchon F, et al. [Treatment of supratentorial glioma in adults by intra-arterial HECNU. Experience of the Pitié-Salpêtrière group]. *Rev Neurol (Paris).* 1992;148(6–7):441–447.
176. Roosen N, Lins E, Kiwit JC, et al. Intra-arterial chemotherapy with ACNU for the treatment of glioblastoma. Preliminary experience. *Acta Radiol Suppl.* 1986;369:220–222.
177. Vega F, Davila L, Chatellier G, et al. Treatment of malignant gliomas with surgery, intraarterial chemotherapy with ACNU and radiation therapy. *J Neurooncol.* 1992;13(2):131–135.
178. Bankstahl JP, Bankstahl M, Römermann K, et al. Tariquidar and elacridar are dose-dependently transported by P-glycoprotein and Bcrp at the blood-brain barrier: a small-animal positron emission tomography and in vitro study. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem.* 2013;41(4):754–762.
179. Fox E, Bates SE. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2007;7(4):447–459.
180. International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang SM, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(3):215–236.
181. Kemper EM, Cleypool C, Boogerd W, et al. The influence of the P-glycoprotein inhibitor zosuquidar trihydrochloride (LY335979) on the brain penetration of paclitaxel in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;53(2):173–178.

182. Kemper EM, Van Zandbergen AE, Cleypool C, et al. Increased penetration of paclitaxel into the brain by inhibition of P-Glycoprotein. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003;9(7):2849–2855.
183. Fellner S, Bauer B, Miller DS, et al. Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 2002;110(9):1309–1318.
184. Drion N, Lemaire M, Lefauconnier JM, et al. Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J Neurochem.* 1996;67(4):1688–1693.
185. Hughes CS, Vaden SL, Manaugh CA, et al. Modulation of doxorubicin concentration by cyclosporin A in brain and testicular barrier tissues expressing P-glycoprotein in rats. *J Neurooncol.* 1998;37(1):45–54.
186. Warren KE, Patel MC, McCully CM, et al. Effect of P-glycoprotein modulation with cyclosporin A on cerebrospinal fluid penetration of doxorubicin in non-human primates. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;45(3):207–212.
187. Asadi-Pooya AA, Razavizadegan SMA, Abdi-Ardekani A, et al. Adjunctive use of verapamil in patients with refractory temporal lobe epilepsy: a pilot study. *Epilepsy Behav EB.* 2013;29(1):150–154.
188. Choo EF, Kurnik D, Muszkat M, et al. Differential in vivo sensitivity to inhibition of P-glycoprotein located in lymphocytes, testes, and the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;317(3):1012–1018.
189. Mason WP. Blood-brain barrier-associated efflux transporters: a significant but underappreciated obstacle to drug development in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2015;17(9):1181–1182.
190. Hollis PH, Zappulla RA, Spigelman MK, et al. Physiological and electrophysiological consequences of etoposide-induced blood-brain barrier disruption. *Neurosurgery.* 1986;18(5):581–586.

191. Sardi I. Morphine facilitates doxorubicin penetration in the central nervous system: a new prospect for therapy of brain tumors. *J Neurooncol.* 2011;104(2):619–620.
192. Cao Y, Tsien CI, Shen Z, et al. Use of magnetic resonance imaging to assess blood-brain/blood-glioma barrier opening during conformal radiotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2005;23(18):4127–4136.
193. Rapoport SI, Robinson PJ. Tight-junctional modification as the basis of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;481:250–267.
194. Joshi S, Ergin A, Wang M, et al. Inconsistent blood brain barrier disruption by intraarterial mannitol in rabbits: implications for chemotherapy. *J Neurooncol.* 2011;104(1):11–19.
195. Rodriguez A, Tatter SB, Debinski W. Neurosurgical techniques for disruption of the blood-brain barrier for glioblastoma treatment. *Pharmaceutics.* 2015;7(3):175–187.
196. Neuwelt EA, Williams PC, Mickey BE, et al. Therapeutic dilemma of disseminated CNS germinoma and the potential of increased platinum-based chemotherapy delivery with osmotic blood-brain barrier disruption. *Pediatr Neurosurg.* 1994;21(1):16–22.
197. Bullard DE, Bourdon M, Bigner DD. Comparison of various methods for delivering radiolabeled monoclonal antibody to normal rat brain. *J Neurosurg.* 1984;61(5):901–911.
198. Gregor A, Lind M, Newman H, et al. Phase II studies of RMP-7 and carboplatin in the treatment of recurrent high grade glioma. RMP-7 European Study Group. *J Neurooncol.* 1999;44(2):137–145.
199. Prados MD, Schold SC, Fine HA, et al. A randomized, doubleblind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2003;5(2):96–103.
200. Qureshi AI, Suri MF, Khan J, et al. Superselective intra-arterial carboplatin for treatment of intracranial neoplasms: experience in 100 procedures. *J Neurooncol.* 2001;51(2):151–158.

201. Matsukado K, Inamura T, Nakano S, et al. Enhanced tumor uptake of carboplatin and survival in glioma-bearing rats by intracarotid infusion of bradykinin analog, RMP-7. *Neurosurgery*. 1996;39(1):125-133-134.
202. Vykhodtseva NI, Hynynen K, Damianou C. Histologic effects of high intensity pulsed ultrasound exposure with subharmonic emission in rabbit brain in vivo. *Ultrasound Med Biol*. 1995;21(7):969–979.
203. Horodyckid C, Canney M, Vignot A, et al. Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device : a multiparametric study in primates. *J Neurosurg*. 2015;10:1–11.
204. McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, et al. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol*. 2005;31 (11):1527–1537.
205. Hynynen K, McDannold N, Sheikov NA, et al. Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *NeuroImage*. 2005;24(1):12–20.
206. Beccaria K, Canney M, Goldwirt L, et al. Ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier to enhance temozolomide and irinotecan delivery: an experimental study in rabbits. *J Neurosurg*. 2015;124(6):1602–1610.
207. McDannold N, Clement GT, Black P, et al. Transcranial magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound surgery of brain tumors: initial findings in 3 patients. *Neurosurgery*. 2010;66(2):323–332. discussion 332
208. McDannold N, Arvanitis CD, Vykhodtseva N, et al. Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Res*. 2012;72(14):3652–3663.

209. Birngruber T, Raml R, Gladdines W, et al. Enhanced doxorubicin delivery to the brain administered through glutathione PEGylated liposomal doxorubicin (2B3-101) as compared with generic Caelyx,(®)/Doxil(®)—a cerebral open flow microperfusion pilot study. *J Pharm Sci.* 2014;103(7):1945–1948.

210. Gaillard PJ, Appeldoorn CCM, Dorland R, et al. Pharmacokinetics, brain delivery, and efficacy in brain tumor-bearing mice of glutathione pegylated liposomal doxorubicin (2B3-101). *PloS One.*2014;9(1):e82331.

211. Bradley MO, Webb NL, Anthony FH, et al. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2001;7(10):3229–3238.

212. Lajoie JM, Shusta EV. Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:613–631.

213. Zhang F, Xu C-L, Liu C-M. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:2089–2100.

214. Fan C-H, Ting C-Y, Lin H-J, et al. SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery. *Biomaterials.* 2013;34(14):3706–3715.

•• This article illustrates combination of strategies to improve brain delivery.

215. Thomsen LB, Thomsen MS, Moos T. Targeted drug delivery to the brain using magnetic nanoparticles. *Ther Deliv.* 2015;6:1145–1155.

• Magnetic nanoparticles is a promising strategy to overcome the BBB.

216. Dilnawaz F, Singh A, Mewar S, et al. The transport of non-surfactant based paclitaxel loaded magnetic nanoparticles across the blood brain barrier in a rat model. *Biomaterials.* 2012;33(10):2936–2951.

217. Mitragotri S. Devices for overcoming biological barriers: the use of physical forces to disrupt the barriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65 (1):100–103.
218. Garcia PA, Rossmeisl JH, Robertson JL, et al. 7.0-T magnetic resonance imaging characterization of acute blood-brain-barrier disruption achieved with intracranial irreversible electroporation. *PloS One.* 2012;7(11):e50482.
219. Stupp R, Taillibert S, Kanner AA, et al. Maintenance therapy with tumor-treating fields plus temozolomide vs temozolomide alone for glioblastoma: A randomized clinical trial. *JAMA.* 2015;314(23):2535–2543.
220. Rehman AA, Elmore KB, Mattei TA. The effects of alternating electric fields in glioblastoma: current evidence on therapeutic mechanisms and clinical outcomes. *Neurosurg Focus.* 2015;38(3):E14.
221. Stam R. Electromagnetic fields and the blood-brain barrier. *Brain Res Rev.* 2010;65(1):80–97.
222. Pokorny JL, Calligaris D, Gupta SK, et al. The efficacy of the weel inhibitor MK-1775 combined with temozolomide is limited by heterogeneous distribution across the blood–brain barrier in glioblastoma. *Clin Cancer Res.* 2015;21(8):1916–1924.
223. van den Bent MJ, Brandes AA, Taphoorn MJB, et al. Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013;31(3):344–350.
224. Cairncross G, Wang M, Shaw E, et al. Phase III trial of chemoradiotherapy for anaplastic oligodendroglioma: long-term results of RTOG 9402. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2013;31(3):337–343.
225. Naik P, Cucullo L. In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci.* 2012;101(4):1337–1354.

226. Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, et al. Blood-brain barrierspecific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2005;19(13):1872–1874.
227. Warren MS, Zerangue N, Woodford K, et al. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 2009;59(6):404–413.
228. Abbott NJ. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):407–416.
229. Sigmond J, Honeywell RJ, Postma TJ, et al. Gemcitabine uptake in glioblastoma multiforme: potential as a radiosensitizer. *Ann Oncol.* 2009;20(1):182–187.

2. Discussion et analyse de la revue

Afin d'évaluer l'impact de l'ouverture de la BHE par US sur l'efficacité des chimiothérapies, nous avons établi certains critères de sélection :

- Faible passage de la BHE saine
- Faible neurotoxicité
- Efficacité sur des lignées de GBM *in vitro*
- Faible substrat des pompes d'efflux

Ce dernier critère n'est inclus qu'avec un impact réduit par rapport aux trois autres critères. Il vise à éviter que la chimiothérapie une fois entrée au travers de la BHE ouverte ne soit éliminée. Mais aussi important que puissent être les transporteurs ABC dans la pénétration des médicaments au travers de la BHE, être substrat de pompes d'efflux n'empêche pas certaines molécules de pénétrer dans le cerveau (Chaves et al., 2014; Declèves et al., 2006; Taccola et al., 2018). De plus, le développement d'inhibiteurs des pompes d'efflux maintenant injectables comme l'Elacridar pourrait éventuellement palier à cet obstacle (Goutal et al., 2018).

Afin d'évaluer ces paramètres d'après les données de la littérature, nous avons rédigé une revue de la littérature les étudiant. (Dréan et al., 2016).

De façon générale, d'après les données décrites dans la revue et dans ce manuscrit, certaines familles de chimiothérapies sont plus susceptibles que d'autres à être de bons candidats.

Concernant les antimétabolites, leur passage au travers de la BHE est limité. De plus, s'ils sont utilisés en *i.v.* à haute dose, le risque de neurotoxicité peut être élevé. Les antimétabolites ont cependant l'avantage d'être substrats de peu de pompes d'efflux, à l'exception du méthotrexate qui est substrat des pompes majeures de la famille ABCC. La neurotoxicité générale des antimétabolites en fait de mauvais candidats.

A l'exception des agents au platine, les agents alkylants ont une bonne pénétration cérébrale. Ils sont en général peu neurotoxiques, hormis le cisplatine qui présente un vrai risque de neurotoxicité. L'efflux de ces agents par les pompes d'efflux est très faible. Hormis le carboplatine qui correspond à tous les critères choisis, les agents alkylants bénéficieraient peu de l'ouverture de la BHE en raison de leur passage déjà élevé au travers de la BHE.

Les antibiotiques antinéoplasiques et les anthracyclines ont une pénétration cérébrale presque nulle en raison de leur taille importante. Leur toxicité est variable, puisque la bléomycine ne présente pas de neurotoxicité, alors que la doxorubicine peut être létale si elle est injectée en intrathécale (dans le LCR). La neurotoxicité et l'efflux variables des agents de cette famille en excluent plusieurs membres. La bléomycine est cependant intéressante, mais de taille très élevée.

Les inhibiteurs de topoisomérase présentent une faible pénétration cérébrale, en partie due à leur prise en charge par plusieurs pompes d'efflux. Leur neurotoxicité est cependant modérée. Ces derniers sont des candidats dont l'intérêt n'est relativisé que par leur efflux.

L'actinomycine D est substrat d'ABCB1, qui réduit sans pour autant empêcher sa pénétration cérébrale. Sa neurotoxicité est peu documentée. Quant aux enzymes de déplétion, leur taille élevée empêche leur pénétration cérébrale, n'empêchant pas une neurotoxicité

notable pour la L-asparaginase. L'efflux de cet agent, et le flou sur sa neurotoxicité réelle en fait un mauvais candidat selon nos critères.

Enfin, la grande taille des inhibiteurs des microtubules empêche leur pénétration cérébrale au travers de la BHE. Les vinca-alcaloïdes présentent de plus une forte neurotoxicité, potentiellement létale en cas d'injection intrathécale comme rapporté pour la vincristine. Les taxanes présentent aussi une neurotoxicité, mais sont cependant mieux tolérés que les vinca-alcaloïdes. En particulier, le docétaxel présente une neurotoxicité moins importante que le paclitaxel. Les microtubules sont essentiels aux neurones pour le maintien des axones et le transport vésiculaire le long de ces derniers pour faire parvenir les neurotransmetteurs et récepteurs jusqu'aux synapses. La neurotoxicité des inhibiteurs de microtubules n'est pas surprenante. Ces caractéristiques en font des agents peu intéressants pour notre étude.

D'après la revue de la littérature, le carboplatine remplit le mieux les critères définis. Le choix du carboplatine pour l'étude clinique de phase 1 pour le SonoCloud® est donc cohérent. L'irinotecan, le topotecan et la bléomycine semblent aussi correspondre aux critères, avec une légère entorse au critère de l'efflux pour l'irinotecan et le topotecan. L'irinotecan et le topotecan sont des molécules analogues, mais l'irinotecan a été utilisé en neuro-oncologie, avec des résultats mitigés probablement dus à sa faible pénétration cérébrale. L'irinotecan est alors apparu comme un bon candidat à évaluer. Avec la taille importante de la bléomycine (1415 Da), l'ouverture de la BHE ne sera effective pour cette chimiothérapie que sur un temps très court. L'étude de l'irinotecan apparaît donc plus intéressante que l'étude de la bléomycine.

D'après les recherches décrites dans la section I.E.5. de l'introduction de ce manuscrit sur les « Agents anti-tumoraux utilisés avec une BHE ouverte par US », la doxorubicine liposomale a beaucoup été évaluée et présente une bonne efficacité lorsque la BHE est ouverte par US. La doxorubicine est un substrat des pompes d'efflux ABCB1 et ABCC1 qui sont des pompes d'efflux majeures au sein de la BHE. Si elle est injectée en *i.v.* avec une BHE fermée, elle n'est pas neurotoxique. Cependant, dans le cas d'une injection *i.a.* pour le traitement de tumeurs cérébrales, elle peut être responsable d'effets secondaires sur le système vasculaire pouvant causer des hémorragies. Lorsqu'elle est injectée en intrathécal, elle cause des myélopathies et encéphalopathies pouvant être fatales (Newton, 2012). Sa neurotoxicité est donc élevée lorsqu'elle passe la BHE. Néanmoins, l'encapsulation en liposome compense ces risques. En effet, l'encapsulation en liposome va protéger la doxorubicine de la prise en charge rapide par les pompes d'efflux. Elle sera libérée progressivement par le liposome, permettant un apport plus lent de doxorubicine au tissu, permettant de traiter les cellules tumorales en limitant le risque de neurotoxicité. Enfin, la liposolubilité élevée du liposome est favorable à sa pénétration par la voie paracellulaire dans la BHE ouverte. La doxorubicine liposomale est donc un bon candidat à évaluer en comparaison aux autres candidats.

Un autre critère peut être associé à la neuro-toxicité : la modification des fonctions cognitives du patient. En effet, des chimiothérapies anti-cancéreuses ont été associées à des modifications du comportement des patients inclus sous le terme « chemobrain ». Par exemple, une altération des cycles de sommeil et des habitudes alimentaires ont été associées à l'utilisation de l'everolimus (Dubois et al., 2014b). Cet effet de "toxicité comportementale" n'a pas été pris en compte dans cette étude. Il peut cependant avoir un fort impact sur l'efficacité du traitement. Le choix des agents thérapeutiques à associer à l'ouverture de la BHE par US

doit alors aussi tenir compte de ce phénomène si des régions fonctionnelles importantes sont touchées par l'ouverture de la BHE pour préserver la qualité de vie des patients.

Cette étude de la littérature a révélé un intérêt pour le carboplatine, l'irinotecan et la doxorubicine liposomale dans le traitement de GBM après ouverture de la BHE par US. C'est donc sur ces agents que les études décrites après ont été menées.

B. Conception d'un modèle *in vitro* de BHE

1. Introduction

L'évaluation du passage des chimiothérapies au travers de la BHE saine est essentielle pour prédire si elles pourront bénéficier d'une ouverture de la BHE par US. Comme discuté dans l'introduction, les modèles actuels forcent à un choix entre haut débit et efficacité. Le développement d'un modèle rapide à mettre en place et suffisamment efficace pour évaluer le passage de chimiothérapies est donc un enjeu pour permettre des études à haut débit.

Le modèle de BHE *in vitro* humain le plus efficace dans la littérature a été obtenu par la différenciation de cellules souches en cellules endothéliales cérébrales pour l'acide rétinolique. Dans ce modèle décrit dans l'introduction de ce manuscrit, la suppression du bFGF du milieu de culture a permis d'accroître l'imperméabilité du modèle (Lippmann et al., 2014). Cependant, la lourdeur des procédures pour mettre en place ce modèle le rendent inutilisable pour une évaluation haut-débit du passage de chimiothérapies.

L'utilisation de lignées cellulaires est quant à elle plus favorable aux pratiques à haut-débit, mais souffre d'une faible efficacité. La lignée hCMEC/D3 est une lignée de cellules endothéliales humaines immortalisées. Il a été montré que cette lignée est capable de répondre à une stimulation par l'acide rétinolique (Mizee et al., 2013). Son utilisation pour des modèles de BHE *in vitro* avec des astrocytes et des péricytes n'a jusque-là montré qu'une efficacité très faible (Hatherell et al., 2011).

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle de BHE *in vitro* utilisable à haut débit, obtenu par des cellules hCMEC/D3, des astrocytes et des péricytes humains immortalisés ; et d'en accroître l'efficacité par l'ajout d'acide rétinolique et la déprivation en

bFGF dans le milieu de culture. Le modèle ainsi constitué sera utilisé pour mesurer le passage de chimiothérapies dont le passage est connu pour valider son efficacité, puis servira à l'évaluation de nouvelles chimiothérapies dont le passage est faiblement documenté.

2. Résultats

a) Immortalisation de péricytes humains

Aucune lignée immortalisée de péricytes cérébraux humains n'est disponible à l'achat. Nous avons donc établi cette lignée. La lignée HBVP est une lignée primaire de péricytes humains commercialement disponible. Nous avons testé six conditions pour immortalisation, et généré six lignées désignées par les lentivirus utilisés : hTERT.1, hTERT.2, SV40.1, SV40.2, SV40/hTERT.1 et SV40/hTERT.2.

D'un point de vue morphologique, les lignées HBVP immortalisées générées étaient proches de la lignée HBVP d'origine.

Les HBVP ayant reçu le vecteur hTERT seul n'ont pas généré de lignée immortalisée. En qPCR, hTERT n'a jamais été détecté, même sur la lignée double transduite, montrant une très probable inefficacité du vecteur sur les HBVP. Ainsi, les quatre modèles restants ont été générés seulement par l'expression du grand antigène T de SV40 à deux titres différents. Nous avons cependant maintenu les appellations des doubles transduits SV40/hTERT pour garder la différence entre les modèles.

Pour valider la pertinence des modèles cellulaires générés, nous avons mesuré l'expression de marqueurs spécifiques de péricytes par RT-qPCR (Figure 36). La forte expression du grand antigène T de SV40 confirme l'efficacité du vecteur pour ce transgène

pour les 4 lignées l'ayant reçu. L'expression de NG2 et de l'ostéopontine restent stables après l'immortalisation. Une augmentation non significative de Kir6.1 est observée pour tous les modèles. Alors qu'une diminution très faible non significative de l'expression du gène de l' α SMA était obtenue pour un des modèles, son expression était stable pour les modèles. Une diminution significative d'expression de SM22-a était quant à elle observée pour tous les modèles. Cependant, les péricytes en culture ont une expression de ce marqueur plus importante qu'*in vivo*, rendant cette diminution d'expression acceptable. Enfin, l'expression de PDGFR- β décroît significativement pour 3 modèles. Le 4^{ème} modèle (SV40/hTERT 2), pour lequel la baisse d'expression de PDGFR- β n'est pas statistiquement significative, a été sélectionnée comme modèle le plus efficace et nommé HBVPi.

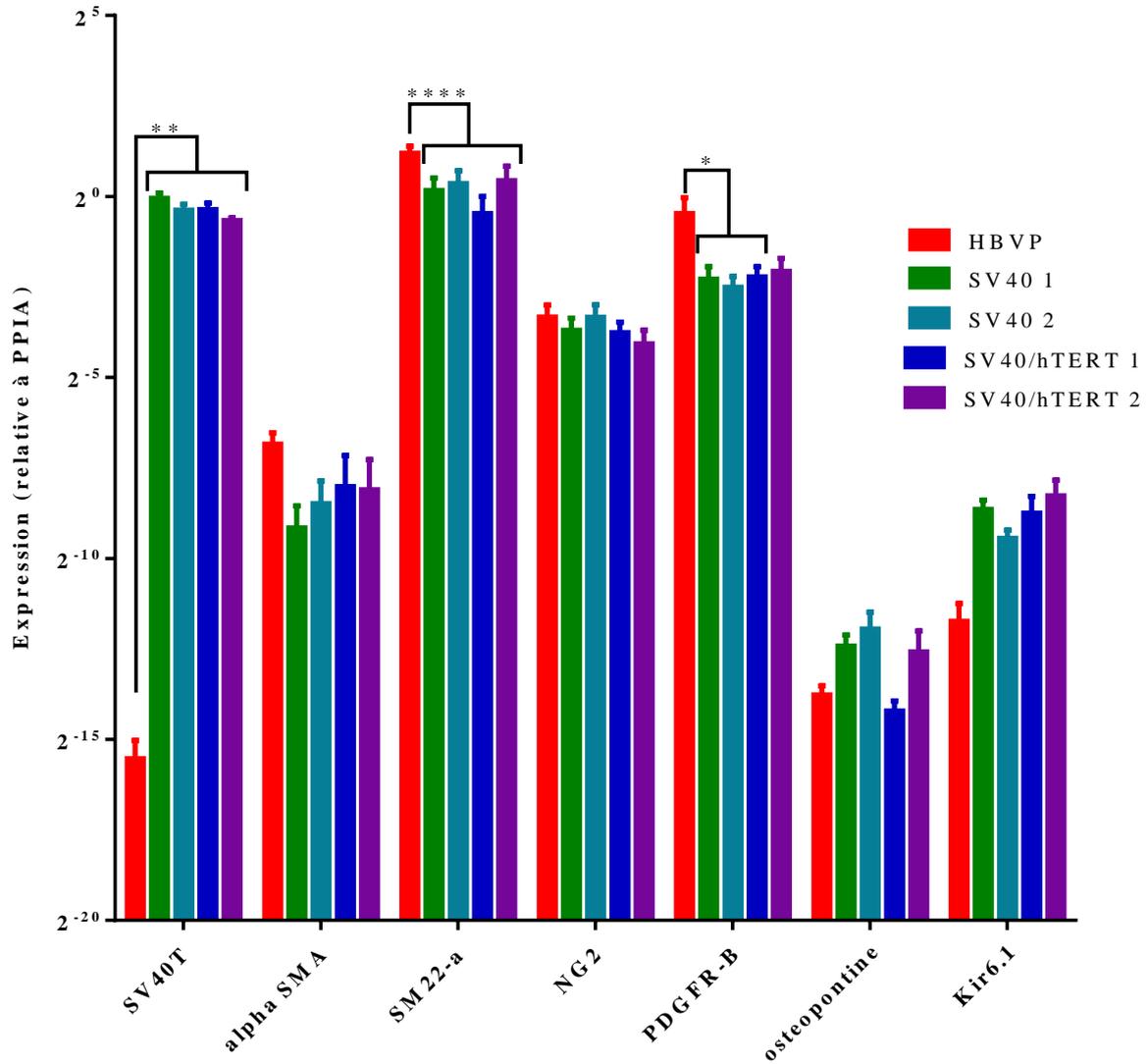


Figure 36 : La comparaison de l'expression des marqueurs de péricytes avant et après immortalisation de la lignée de péricytes humains HBVP.

SV40 désigne l'antigène-grand-T du virus SV40 utilisé pour l'immortalisation des cellules. L' α -SMA, SM22-a, NG2, PDGFR- β , l'ostéopontine et Kir6.1 sont des gènes dont le profil d'expression est un marqueur des péricytes. L'expression est rapportée au gène de ménage PPIA.

* : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; **** : $p < 0.0001$. Les barres d'erreur sont en Déviation Standard.

b) Impact de l'acide rétinoïque et de la déprivation en bFGF sur l'imperméabilité d'une monocouche de cellules hCMEC/D3

D'un point de vue fonctionnel, l'effet de ces modifications de milieu de culture a été évalué sur le modèle de BHE constitué seulement de la lignée hCMEC/D3 par la mesure du TEER. Le modèle est optimal au jour 7 post dépôt des cellules sur le filtre de l'insert (Figure 37 panel A). De façon cohérente avec la littérature, le TEER le plus élevé a été obtenu dans la condition avec acide rétinoïque et sans bFGF (Figure 37 Panel B).

Le test de perméabilité au Lucifer yellow n'a cependant montré aucun impact significatif des modifications du milieu de culture sur le passage de cette molécule non perméante à la BHE (Figure 37 Panel C).

Afin de clarifier l'impact de ce milieu de culture, l'expression de marqueurs des cellules endothéliales de la BHE a été mesurée par RT-qPCR sur les cellules hCMEC/D3 cultivées dans ces milieux (Figure 38). Alors que la déprivation en bFGF seule n'a aucun effet sur l'expression des marqueurs des hCMEC/D3, l'ajout d'acide rétinoïque montre un impact sur plusieurs marqueurs. L'expression de PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) est réduite dans les deux conditions avec l'acide rétinoïque. L'expression de la β -caténine est réduite seulement pour la condition avec acide rétinoïque et sans bFGF. L'expression du récepteur à la transférine et de ABCB1 est quant à elle augmentée dans les deux conditions avec acide rétinoïque.

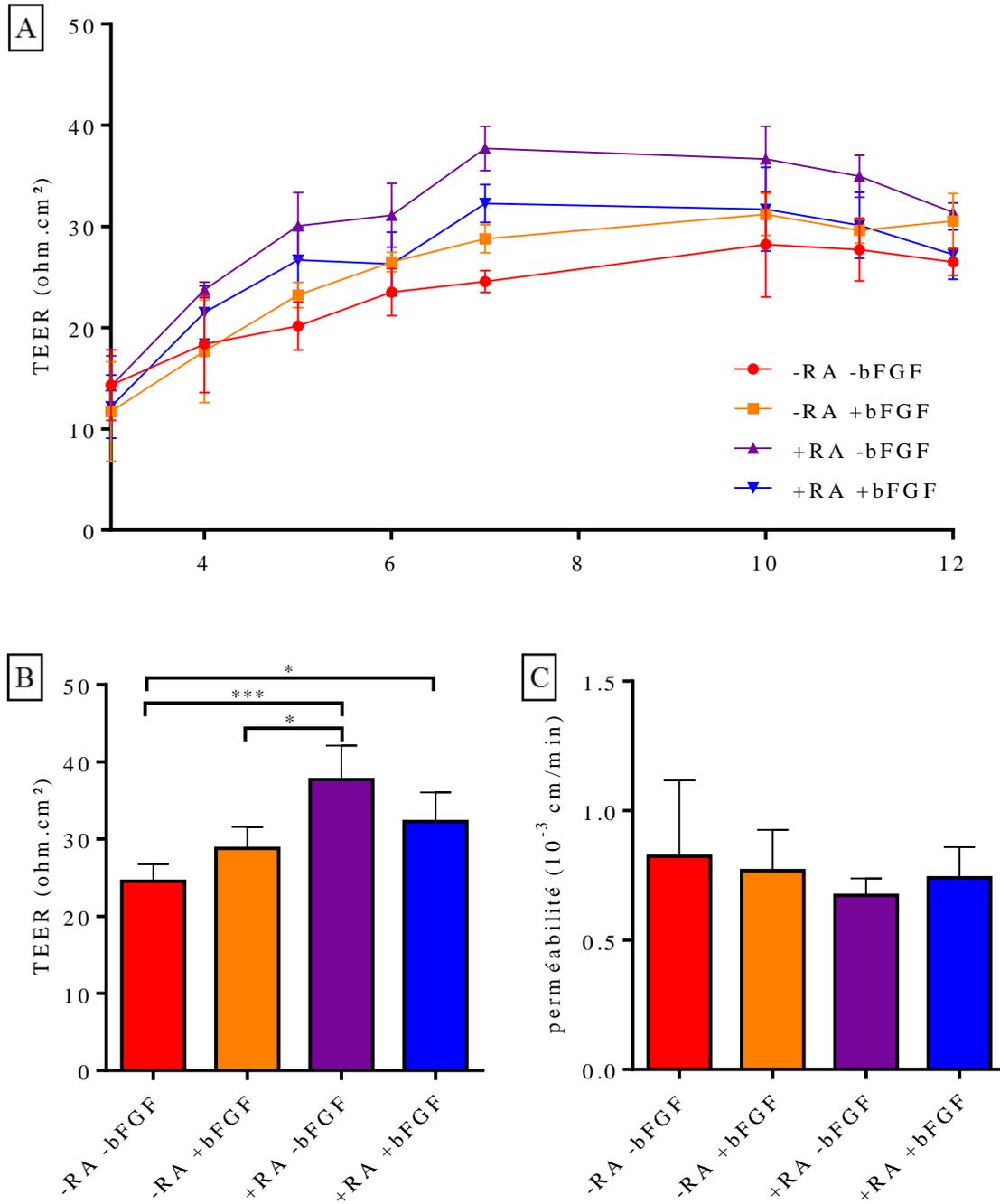


Figure 37: L'influence de l'acide rétinoïque et de la déprivation en bFGF sur la perméabilité du modèle *in vitro* de BHE constitué d'une monocouche de hCMEC/D3.

Panel A : mesure du TEER (résistance électrique) au cours du temps. Panel B : analyse du TEER des différents modèles au jour 7. * : $p < 0.05$; *** : $p < 0.001$. Panel C : mesure de la perméabilité au lucifer yellow. Non significatif. Les barres d'erreur sont en déviation standard.

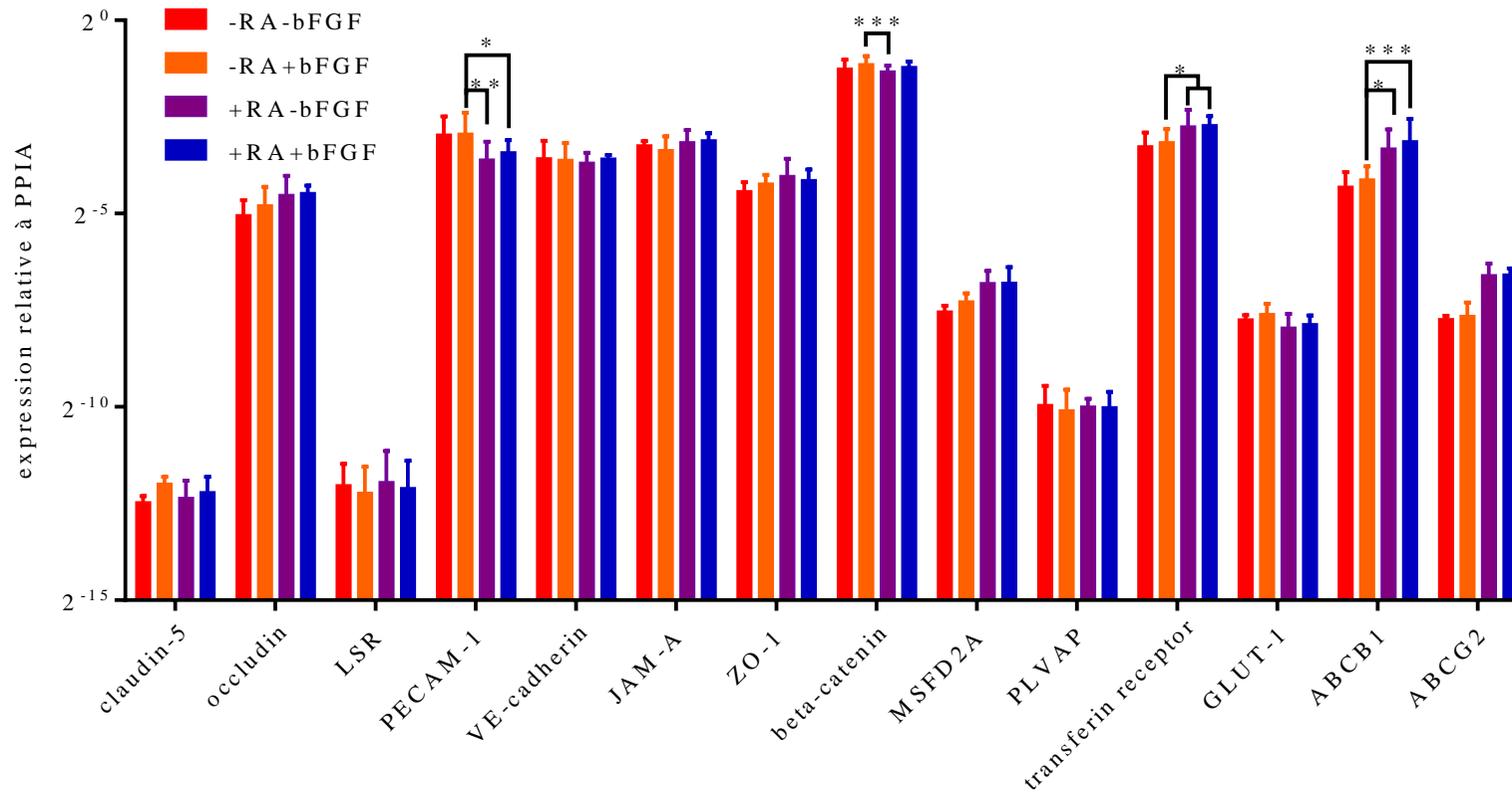


Figure 38 : L'influence de l'acide rétinoïque et de la déprivation en bFGF sur l'expression de marqueurs de cellules endothéliales cérébrales par les hCMEC/D3.

L'analyse statistique multiple associée au test ANOVA a été fait en comparant chaque condition à la condition -RA+bFGF, qui est la condition de culture native des cellules hCMEC/D3. * : $p < 0.05$; *** : $p < 0.001$. Les barres d'erreur sont en SD.

c) Ajout des astrocytes et péricytes au modèle

L'ajout de péricytes sous le filtre a été testé, puis les péricytes ont été marqués au DAPI et à la phalloïdine pour visualiser les cellules afin de s'assurer que leur attachement à leur matrice était suffisant pour les cultiver sous le filtre (Figure 39). Le marquage a montré que les péricytes étaient capables de proliférer sous le filtre, et de le recouvrir.

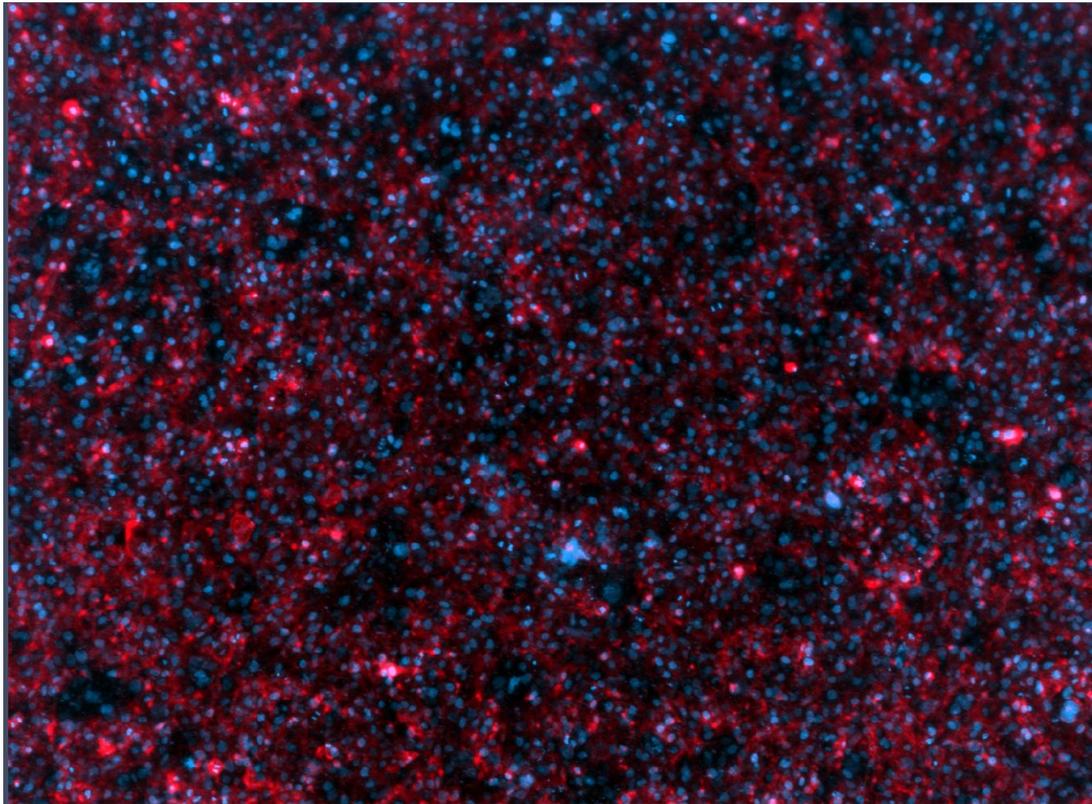


Figure 39 : Le marquage des péricytes en culture sous le filtre par DAPI (bleu) et phalloïdine (rouge).

Les péricytes recouvrent le filtre sur sa face inférieure montrant que leur accrochage est suffisant pour qu'ils soit maintenus sous le filtre, en culture à l'envers.

Un modèle de triculture a été réalisé en cultivant des cellules hCMEC/D3 sur le filtre dans l'insert, des HBVPi sous le filtre, et des astrocytes immortalisés au fond du puit de la plaque. L'ensemble a été cultivé dans le milieu des hCMEC/D3 complétement en acide rétinolique et non supplémenté en bFGF. Le TEER a été mesuré sur ce modèle, et comparé au TEER du modèle hCMEC/D3 seul. La mesure n'a été faite que sur un seul triplicat. Sur ce seul triplicat, la coculture a montré un impact négatif sur le TEER (Figure 40). Ce TEER qui reste trop faible montre que le modèle n'est pas assez efficace, surtout pour étudier le passage de chimiothérapies dont la taille est faible.

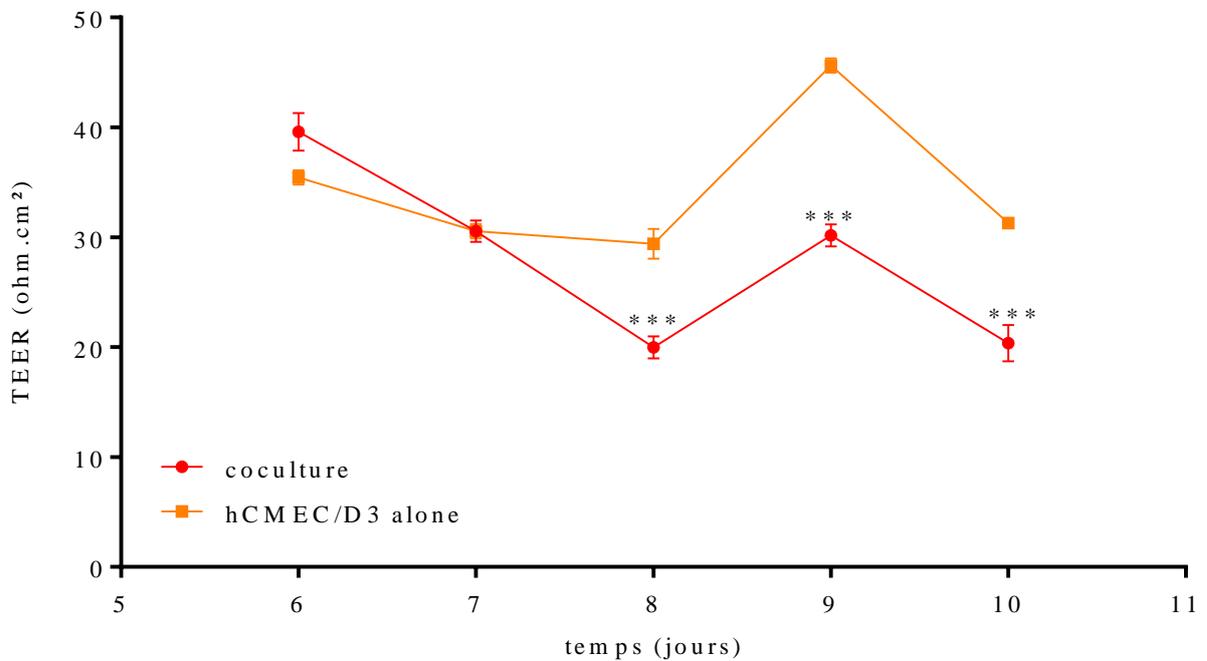


Figure 40 : La mesure du TEER sur un modèle en coculture composé de cellules hCMEC/D3, HBVPi et astrocytes immortalisés en comparaison avec le modèle monocouche constitué de cellules hCMEC/D3 seules.

*** : $p < 0.001$. Les barres d'erreur sont en SD.

3. Conclusion

Le modèle de péricytes immortalisés HBVPi conserve ses caractéristiques génétiques et anatomiques par rapport aux péricytes parentaux HBVP.

De façon cohérente avec la littérature, l'ajout d'acide rétinolique et la déprivation en bFGF ont augmenté la résistance électrique du modèle. Cependant, cette hausse du TEER n'a pas pour autant affecté la perméabilité au Lucifer yellow ou augmenté de façon générale l'expression de marqueurs spécifiques de la BHE. Ce modèle monocouche présente un TEER trop faible pour une utilisation comme modèle de passage de chimiothérapie. La coculture avec les astrocytes et péricytes n'a pas augmenté le TEER du modèle.

Le développement de ce modèle de BHE *in vitro* a démontré trop de faiblesses pour une utilisation efficace dans l'évaluation du passage de chimiothérapies au travers de la BHE. Les tentatives pour augmenter l'imperméabilité du ce modèle ont échoué. Puisque l'analyse de la littérature décrite dans la section IV.A.2. a apporté assez de données pour initier des études *in vivo*, la poursuite du développement de ce modèle n'était plus absolument nécessaire au projet. Le développement de ce modèle de BHE *in vitro* a donc été abandonné.

C. Ouverture de la barrière hémato-encéphalique aux agents anti-tumoraux

Une étude *in vivo* d'efficacité thérapeutique de trois chimiothérapies (carboplatine, doxorubicine liposomale, et l'irinotecan) a été réalisée avec une ouverture de la BHE par US adjuvante. Les résultats seront prochainement soumis à publication. Les données disponibles sont intégrées ci-après telles qu'elles seront soumises.

**Ultrasound/Microbubbles-mediated blood brain barrier opening increase drug delivery
and drug efficacy in preclinical models of glioblastoma**

Antonin Dréan and co-authors

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and the most aggressive primary brain cancer in adults with limited sensitivity to cytotoxic chemotherapies. The blood brain barrier (BBB) reducing penetration of chemotherapies from the blood to the brain is associated at least partly with this intrinsic chemoresistance of GBM cells. Overcoming the BBB might improve chemotherapies delivery and efficacy in GBM patients.

Ultrasound-mediated BBB opening (UMBO) has been shown: (i) to increase penetration of multiple chemotherapeutic agents within the brain of animals and, (ii) to be well-tolerated in a recent phase 1 clinical trial dedicated to recurrent GBM patients.

However, the clinical benefit in terms of survival and quality of life has rarely been investigated in preclinical setting in human GBM patient derived cell line (GBM-PDCL) bearing animals or in GBM patients. In the current study, we have investigated anti-tumor activity of Irinotecan, Liposomal doxorubicin (Lipo-Dox) and Carboplatin without and with UMBO in relevant preclinical models. In contrast to Irinotecan and Lipo-Dox, Carboplatin plus UMBO dramatically and consistently increase survival ($p=0.03$) of GBM bearing mice compared to Carboplatin alone with a 4.2-fold increase of Carboplatin penetration in the brain and without significant neurotoxicity.

Carboplatin appears as the most promising chemotherapeutic agent to combine with UMBO in a further efficacy clinical trial enrolling GBM patients. Further preclinical optimizations are required to understand and to improve in vivo anti-tumor activities of Irinotecan, Lipo-Dox and other candidate agents alone or after UMBO.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and the most aggressive primary central nervous system (CNS) malignancy, with an incidence from 0.6 to 3.7/100,000 individuals and a median overall survival of ~18 months after initial diagnosis [2]. Due to several primary and secondary mechanisms of resistance to treatments, GBM virtually always recur. The blood-brain barrier (BBB) dramatically hampers efficacy of chemotherapeutic agents. Indeed, BBB is a selective physico-biochemical barrier that maintains brain homeostasis and protects CNS cells from potentially harmful xenobiotics circulating in the blood flow stream including chemotherapeutic compounds. Most chemotherapeutic agents are not able to cross the BBB, reducing thus their efficacy in GBM patients [3].

To overcome the BBB, multiple methods have been developed with various efficacies and limitations [3]. Ultrasound (US)-induced BBB opening (UMBO) has recently reached a tremendous step with the first implantable device for clinical application investigated in the setting of a phase 1 clinical trial [1]. Briefly, after *i.v.* injection of microbubbles, US are delivered to the brain inducing acoustic cavitation of microbubbles within the blood vessels. This cavitation opens the BBB by disrupting the tight junctions between endothelial cells and by increasing transcytosis through endothelial cells.

UMBO has already shown efficacy to increase drug penetration in the brain of animals - *e.g.* Temozolomide, Irinotecan and Carboplatin - [4], [5]. Safety was also documented in animals, and more recently in patients [1]. UMBO were delivered using a small implantable transducer in the skull bone avoiding distortion of the UMBO signal by the skull bones. In the preliminary result of the phase 1 clinical trial, UMBO followed by Carboplatin infusion has been shown to be feasible and well tolerated [1]. However, to continue to a phase 2 clinical trial, anti-tumor efficacy should be demonstrated in preclinical setting.

The optimal chemotherapy to deliver after UMBO is pivotal. In a previously published review, we have identified Carboplatin as a good candidate [3] with : (i) poor brain penetrance, (ii) low neurotoxicity at high dose and, (iii) preserved from efflux pumps. Although, it can be expelled by efflux pumps, Irinotecan appears also as a good candidate. Based on literature, Liposomal Doxorubicin (Lipo-Dox) sounds also as a good candidate [6]–[9].

In this present study, we aim providing preclinical evidences for the most promising chemotherapeutic agent to combine with UMBO in an efficacy clinical trial.

Material and methods

GBM cell lines and Cell culture

Six GBM-patient derived cell lines (PDCL) named 4339, 7015, 3731, 7060, 6240 and 6190 were established in our laboratory. The molecular profile of these 6 GBM PDCL recapitulate the main alterations reported in GBM (The Cancer Genome Atlas) (table 1). Cell cultures were performed as previously described [10]. GBM-PDCL were established (passage > 5) and cultured in DMEM-F12 (Life Technologies, 31331028) supplemented with 1% penicillin/streptomycin, B27 supplement 50X (Life Technologies, 17504-044), 20 ng/mL human bFGF (Peprotech, 100-18B) and 20 ng/ml human EGF (Peprotech, 100-15). Cells were cultured as gliospheres. Dissociation was performed with Accutase StemPro (Life Technologies, A11105-11) after washing with HBSS (Life Technologies, 1150029). In addition, two commercial GBM cell lines - *i.e.* U251 and U87 – were purchased from ATCC and cultured in DMEM (Life Technologies,31885049) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Life) and 1% penicillin/streptomycin.

Viability test

For drug sensitivity assays, 96-well plates were used. For viability assay on PDCL, wells were coated with 10 µg/mL laminin (cat no. L2020, Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 hour for PDCL. Three thousand cells were plated per well. Carboplatin (Sigma-Aldrich, T2577) was resuspended in saline as a 10 mg/ml stock solution and was added 24 hours after plating. 72 hours after drug addition, WST-1 reagent (Roche) was added according to the manufacturer's instructions. WST-1 salt is cleaved to a soluble formazan dye by a NAD(P)H-dependent reaction in viable cells. Plates were incubated for 3 hours and read by spectrophotometry at 450 nm and 620 nm wavelength.

In vivo orthotopic and heterotopic models

All protocols involving work with live animals were reviewed and approved by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Paris, France) under the protocol #0113.02.

Mice were monitored and sacrificed when they lost more than 20% of their maximum weight or if they showed signs of pain or neural disorders or any sign of suffering. Athymic nude mice were used for studies.

For the orthotopic model, before grafting, GBM cells were transduced with the luciferase gene (Gentaur) - *i.e.* U87LN and 6240LN. GBM cells were implanted (1.4×10^5 cells/2 mL) into the brain of Athymic nude mice (7-weeks old females, 8-10 animals/group). A stereotaxic injection frame (David Kopf Instruments) was used to inject cells into the right caudate nucleus-putamen (ML +0.15 mm; AP +0.1 cm; DV +0.25 mm). Animals were imaged weekly using the IVIS Spectrum (Perkin-Elmer) 10 minutes after injection of 2 mg luciferin (Promega).

For the heterotopic (subcutaneous) model, 2×10^6 cells were resuspended in Hank's Buffered Salt Solution (Life Technologies), mixed with an equal volume of Matrigel (BD Biosciences), and injected into both flanks of 8-week-old Nu/Nu mice (Charles River Laboratories). Animals were randomly assigned to treatment or vehicle arm when tumors reach a volume of $250 \mu\text{L}^3$.

In vivo UMBO

For UMBO, mice were maintained under anesthesia with isoflurane, 200 μL Sonovue (Bracco, Italy) was injected intravenously by the retro-orbital route, and ultrasound were delivered to the brain immediately after the injection - acoustic pressure 0.3MPa, pulses of 23.810ms at a frequency of 1Hz for 120s -. For validation, a solution of 2% Evans blue was

injected at 4ml/kg intravenously 15 minutes after the end of the US. The brain was harvested 30 minutes later, and passage of Evans blue was assessed macroscopically and by fluorescence imaging.

In vivo chemotherapeutic treatments

For the *in vivo* heterotopic study, Carboplatin was injected intraperitoneally in a 120mg/kg single dose for a solution at 10 mg/ml in saline. Treatment started when the tumor volume reached 250 μ L. Mice were monitored for weight and tumor volume and sacrificed when the tumor reached 1200 μ L.

For the *in vivo* orthotopic studies, mice were monitored for weight and clinical behavior. Mice were randomized in different groups including “non-treated”, “UMBO alone”, “chemotherapy alone” and “chemotherapy + UMBO”. Carboplatin was injected intraperitoneally 15 minutes after the end of the ultrasound emission at 53 or 80 mg/kg/week. Irinotecan was injected intraperitoneally 15 minutes after the end of the UMBO at 50 mg/kg/week. Lipo-Dox was injected intravenously via the tail vein or the vein of the penis at 2mg/kg just before the UMBO procedure. Mice that did not reach the second treatment were not included in the analysis.

Carboplatin quantification in mice plasma and brain

Healthy nude mice were treated as detailed in the previous paragraphs for BBB opening and Carboplatin therapy at 53 mg/kg and sacrificed 40 minutes after Carboplatin injection. Blood was collected via heart puncture with a heparinized syringe and drawn in polyethylene tubes. Samples were immediately centrifuged at 5,000 rpm for 15 min and the plasma was removed and stored at -80 °C until analysis. Whole brains were collected, rinsed with 0.9% sodium chloride and directly frozen at -80°C in polyethylene tubes.

Carboplatin quantification in plasma and brain was developed and validated according to the FDA guidelines. The chromatographic separation was performed using a UPLC system coupled with MS/MS in a positive ionization mode. The method has a limit of quantification of 10 ng/mL in plasma samples and 62.5 ng/g in brain samples.

Histology

When necessary, brains were harvested at the death. For histologic analysis with H&E staining in paraffin included tissue, brains were fixed with PFA 4% for 24h before inclusion, staining and studied by a neuropathologist.

For immunohistochemistry, brains were frozen at -80°C after having been harvested. They were stored at -80°C until cryocutting in 10µm slices on a cryostat (Leica CM1950). Fluorescence imaging was performed on a scanner Nanozoomer RS 2.0 (Hamamatsu).

	3731	6240	6190	7060	4339	7015	Frequency	
							Alterations in TCGA	Our GBM-PDCL panel
TP53					S241F	C176F	35%	30%
PTEN				R173C	S113R		40%	30%
EGFR	Amp/ov exp	Amp/ov exp	Amp/ov exp	Amp/ov exp	Amp/ non ov exp		60%	60%
CDKN2A		Del/under exp	Del/under exp	Del/under exp		Del/under exp	60%	60%
MDM2	Amp/ov exp						10%	16%
NF1					W223*		13%	16%
RB1					W563S		12%	16%

Table 1 : Molecular alterations in the six GBM-PDCL used in the in vitro cytotoxicity assays. This table assesses frequencies of the common molecular alterations reported in human GBM (TCGA cohort) and in our GBM-PDCL panel. Amp: amplification ; del: deletion ; Ov exp: over-expressed ; under exp: under expressed.

Results

Carboplatin efficacy and model validation

Sensitivity to Carboplatin was measured *in vitro* in two commercial cell lines - U87 and U251 – and six GBM PDCL (Figure 1, Panel A). The concentration inhibiting 50% (IC50) for the 6 PDCL was ranging from 6.4 to 28.4 μ M. Commercial cell lines were more resistant with IC50 of 46 μ M and 82 μ M for the U87 and the U251 respectively. Two models have been used for the *in vivo* evaluations. U87 grows as bulk with altered BBB in the tumor core [11]. In contrast, 6240 PDCL was used as an invasive and infiltrative model with more preserved BBB.

To assess whether U87 is a good model *in vivo* on nude mice, the U87 cell line was xenografted subcutaneously to generate a tumor that is not protected by the BBB. Tumor growth and survival was delayed in mice treated with Carboplatin ($p < 0.05$) (Figures 1B and 1C), validating sensitivity of U87 xenograft in absence of BBB.

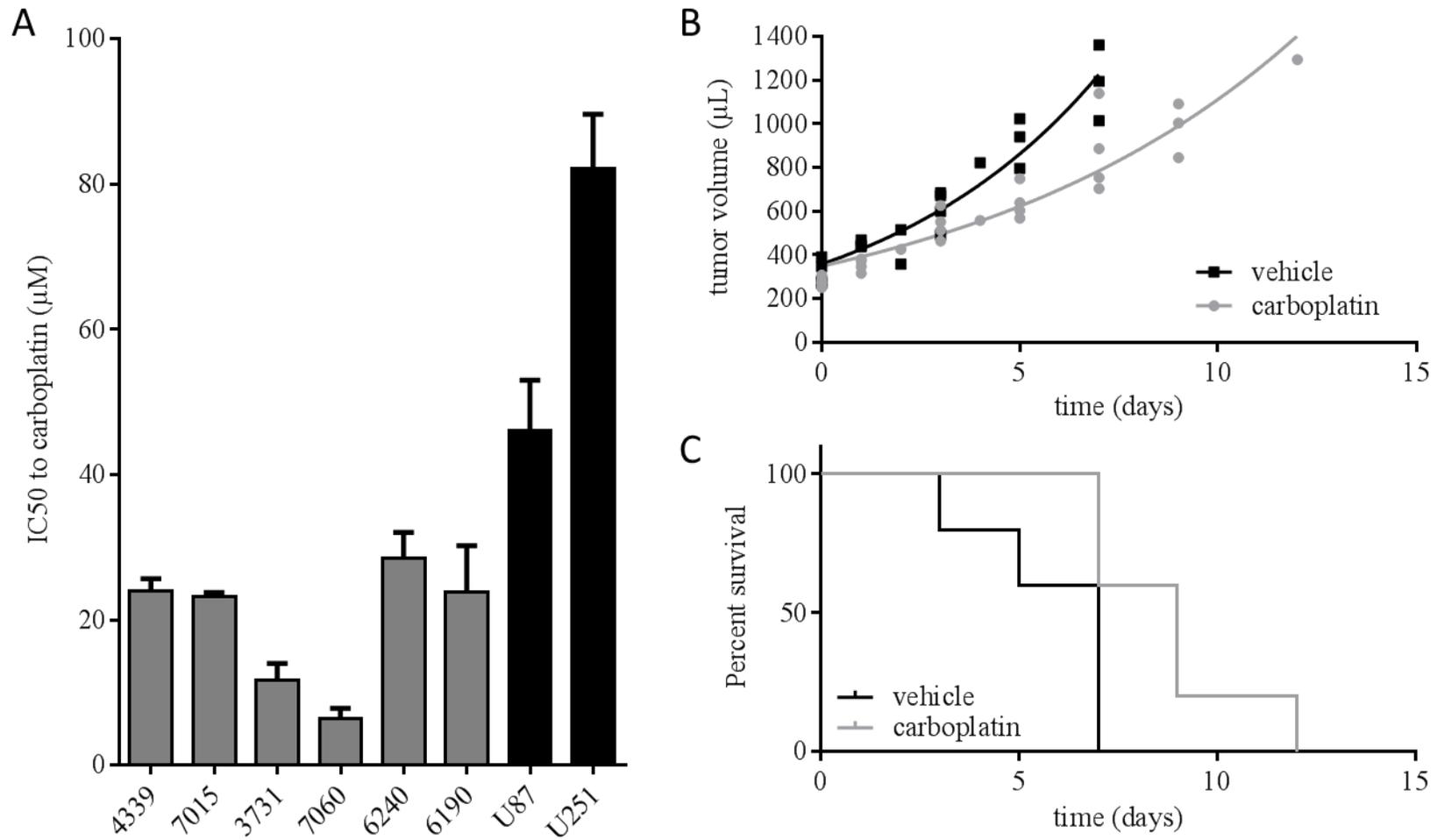


Figure 1 : Carboplatin is efficient in vitro and in vivo in absence of BBB

Panel A: IC50 measured in 6 PDCL (grey) and 2 commercial cell lines (black) in vitro after 72h exposure to Carboplatin (error bars are in SD)

Panel B: Tumor volume of heterotopic U87 xenograft in nude mice after a single dose injection of Carboplatin

Panel C: Survival of nude mice bearing heterotopic U87 xenograft treated with a single dose injection of Carboplatin

UMBO in vivo model

While the optimal pressure inducing an UMBO was reported at 0.4MPa for rats or rabbits, an UMBO was obtained in mice at 0.2MPa, was sustained at 0.3MPa without brain damages, and was associated with brain damages at 0.4MPa. Therefore, we have selected 0.3MPa for safe and sustained UMBO. Mice were treated with UMBO and injected with a solution of Evans blue. The opening was seen on the whole brain (Figure 2A) and by fluorescence on tumor sections (Figure 2B).

Brain penetration of Carboplatin in vivo after BBB opening

Dosage of Carboplatin was performed in eight healthy nude mice. Four received *i.v.* Carboplatin, and four were treated for UMBO and were injected with Carboplatin. 40 minutes after *i.v.* injection, brain and plasma were harvested. While plasmatic Carboplatin concentrations were similar between both groups, the blood to plasma ratio was increased by 4.2 fold from $10.2\% \pm 3.8\%$ to $42.9\% \pm 7.9\%$ ($p=0.0098$) (Figure 2C).

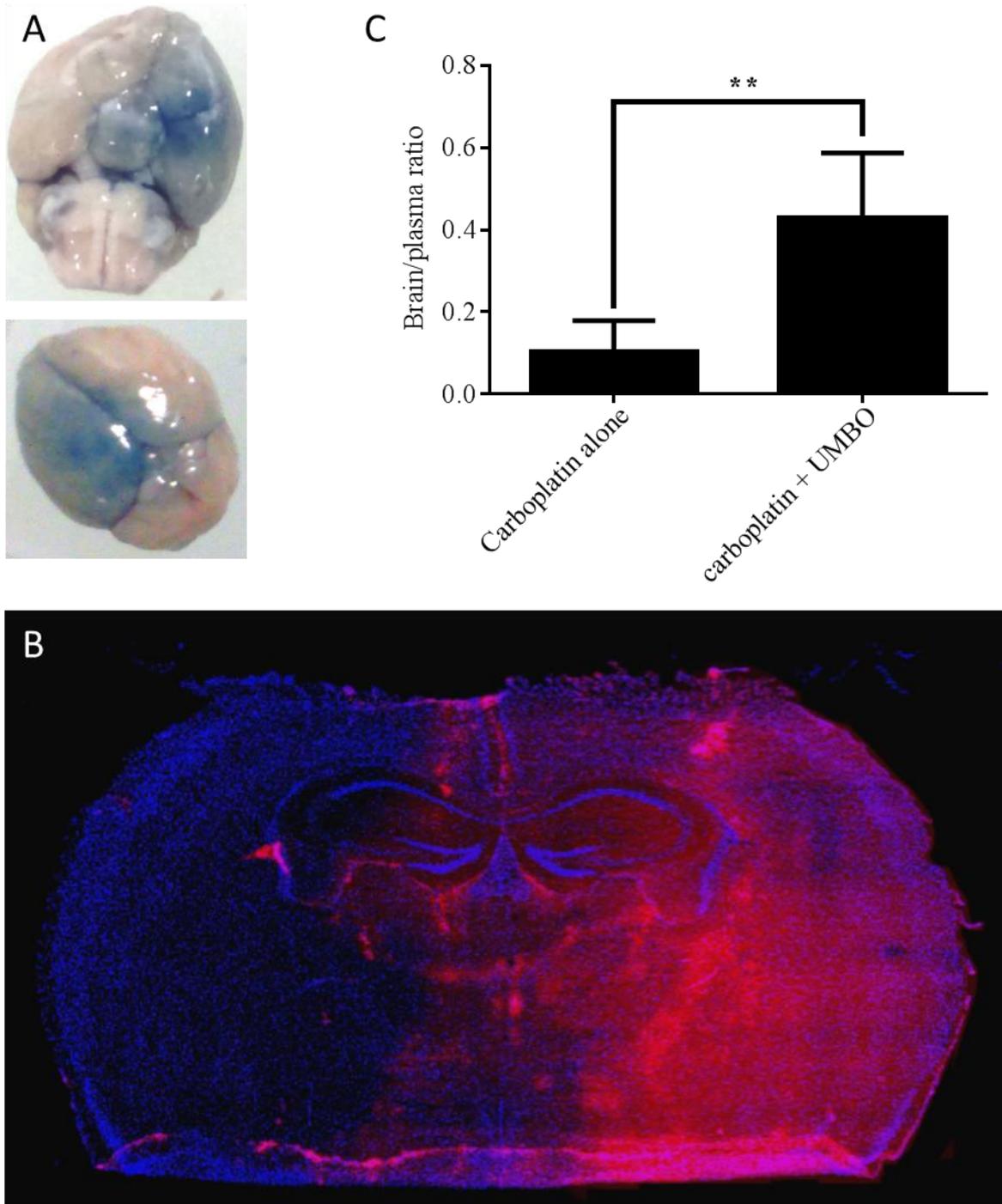


Figure 2 : Ultrasound mediated blood brain opening.

Panel A: Evans-blue enhanced penetration in the brain visualized in a whole brain.

Panel B: Evans-blue enhanced penetration in the brain visualized by fluorescence (Evans blue in red, DAPI in blue) in a brain cryofixed section.

Panel C: brain/plasma ratio of Carboplatin concentrations measured by mass spectrometry when injected without and with UMBO. Error bars are in SD. **: $p < 0.01$ in a t-test.

In vivo evaluation of Carboplatin after BBB opening in mice bearing human GBM xenograft

After xenografting orthotopically U87LN in nude mice, mice were randomized into 4 groups: (1) not treated, (2) UMBO alone, (3) Carboplatin alone and (4) Carboplatin + UMBO. One week after the xenograft, mice received the first treatment and were treated once a week for a total of 4 treatments and were monitored for weight, clinical examination and tumor growth.

In the first experiment, mice were treated twice with 80mg/kg of Carboplatin. This dose was poorly tolerated as illustrated in weight curves (Figure 3A-C). Therefore, for the two last treatments of the first experiment, Carboplatin dose was reduced at 53mg/kg with better tolerance. In a second experiment, we treated mice at 53mg/kg for the 4 treatments, and no toxicity was observed except for few hematomas at the injections sites (Figure 4A).

In both experiments, mice treated with UMBO + Carboplatin + UMBO survive longer compared to mice treated with the other modalities with a survival benefit of +50% compared to the non-treated group, and + 25% to Carboplatin alone (Figures 3D and 4B ; Table 2).

Although not statistically significant, in line with the impact on survival, a trend for tumor growth reduction was observed in the UMBO + Carboplatin versus the other groups (Figures 3E and 4C).

Two brains per group were harvested, FFPE included and H&E stained. Histological examination did not detect any difference between brains (data not shown).

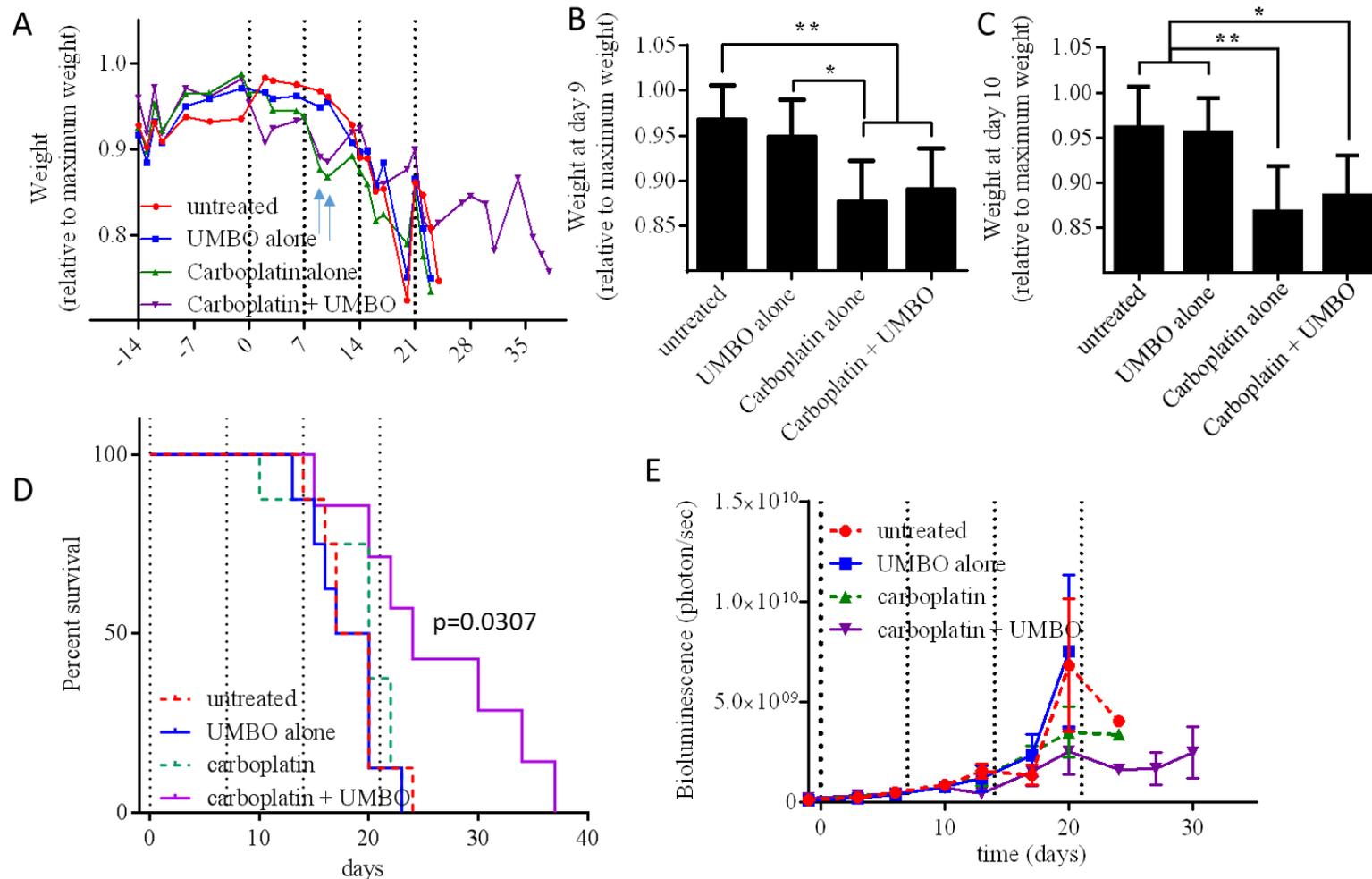


Figure 3 : Treatment with Carboplatin and UMBO in a U87-luc orthotopic model

One week after orthotopic xenograft of U87-luc cell line, mice were treated 4 times (vertical discontinuous lines) and monitored for tumor growth by bioluminescence and for their weight. Mice were sacrificed when the weight decreased by 20% of their maximum weight. The two first treatments were delivered at 80mg/kg Carboplatin, and the two last were reduced to 53mg/kg to reduce systemic toxicity.

Panel A: Monitoring of weight of mice over time (median). Blue arrows are detailed in panels B and C to confirm toxicity of Carboplatin at 80mg/kg (mean. Error bars are in SD).

Panel D: Survival of mice ($p=0.0307$; log-rank test).

Panel E: Monitoring of tumor growth over time using bioluminescence in mice. (Mean. Error bars are in SEM) (NS).

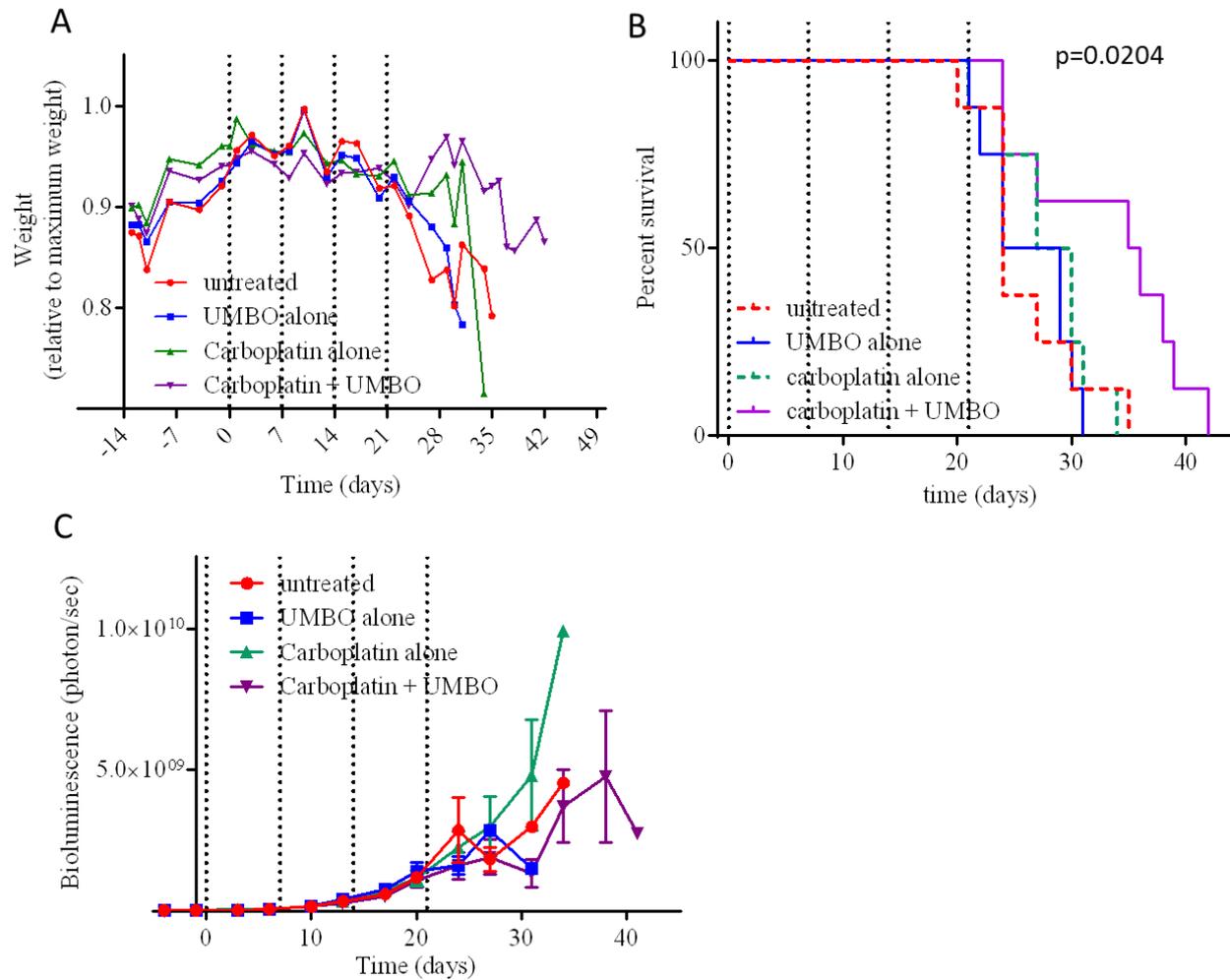


Figure 4: Treatment with Carboplatin and UMBO in a U87-luc orthotopic model (second experiment).

One week after orthotopic xenograft of U87-luc cell line, mice were treated 4 times (vertical discontinuous lines) and monitored for tumor growth by bioluminescence and for their weight. Mice were sacrificed when the weight decreased by 20% of their maximum weight. All treatments were made at 53mg/kg Carboplatin.

Panel A: Monitoring of weight of mice over time (median).

Panel B: Survival of mice ($p=0.0204$; log-rank test)

Panel C: Monitoring of tumor growth over time using bioluminescence in mice. (Mean. Error bars are in SEM) (NS).

		Experiment 1		Experiment 2	
Median survival	Not treated	18.5		24	
	UMBO Alone	18.5		26.5	
	Carboplatin alone	21.5		28.5	
	Carboplatin + UMBO	27		35.5	
Statistics and ratios of median survival	Carboplatin alone vs not treated	26%	p= 0.2089	25%	p= 0.6722
	Carboplatin + UMBO vs not treated	46%	p= 0.0057	48%	p= 0.0164
	Carboplatin + UMBO vs Carboplatin alone	26%	p= 0.037	25%	p= 0.0309

Table 2 : Statistical analysis of survival of U87 bearing mice treated +/- Carboplatin +/- UMBO. Comparisons were made using log-rank tests.

In vivo evaluation of Irinotecan and Liposomal Doxorubicin after UMBO in mice bearing orthotopic human GBM

Using the same experimental design, nude mice bearing orthotopic xenograft of U87LN were randomized into five groups: (1) not treated, (2) Irinotecan alone, (3) Irinotecan + UMBO, (4) Lipo-Dox alone and (5) Lipo-Dox + UMBO. Two independent experiments were conducted.

In the both experiments, no statistical survival benefit was observed in the groups treated with Irinotecan or Lipo-Dox + UMBO versus Irinotecan or Lipo-Dox alone.

For Lipo-Dox, a trend was observed in favor of the addition of UMBO. Surprisingly, for Irinotecan, a trend to a better efficacy without UMBO was observed (Figure 5A-C ; Table 3). In a second experiment, Irinotecan alone was more efficient than UMBO + Irinotecan, confirming the trend observed in the first experiment. For Lipo-Dox, a significant increase of survival was observed when UMBO was used, but not alone. The difference between the groups Lipo-Dox alone and Lipo-Dox + UMBO was not statistically significant (Figures 5D-F ; Table 3).

Therefore, we decided to continue with Carboplatin (Tables 2 and 3).

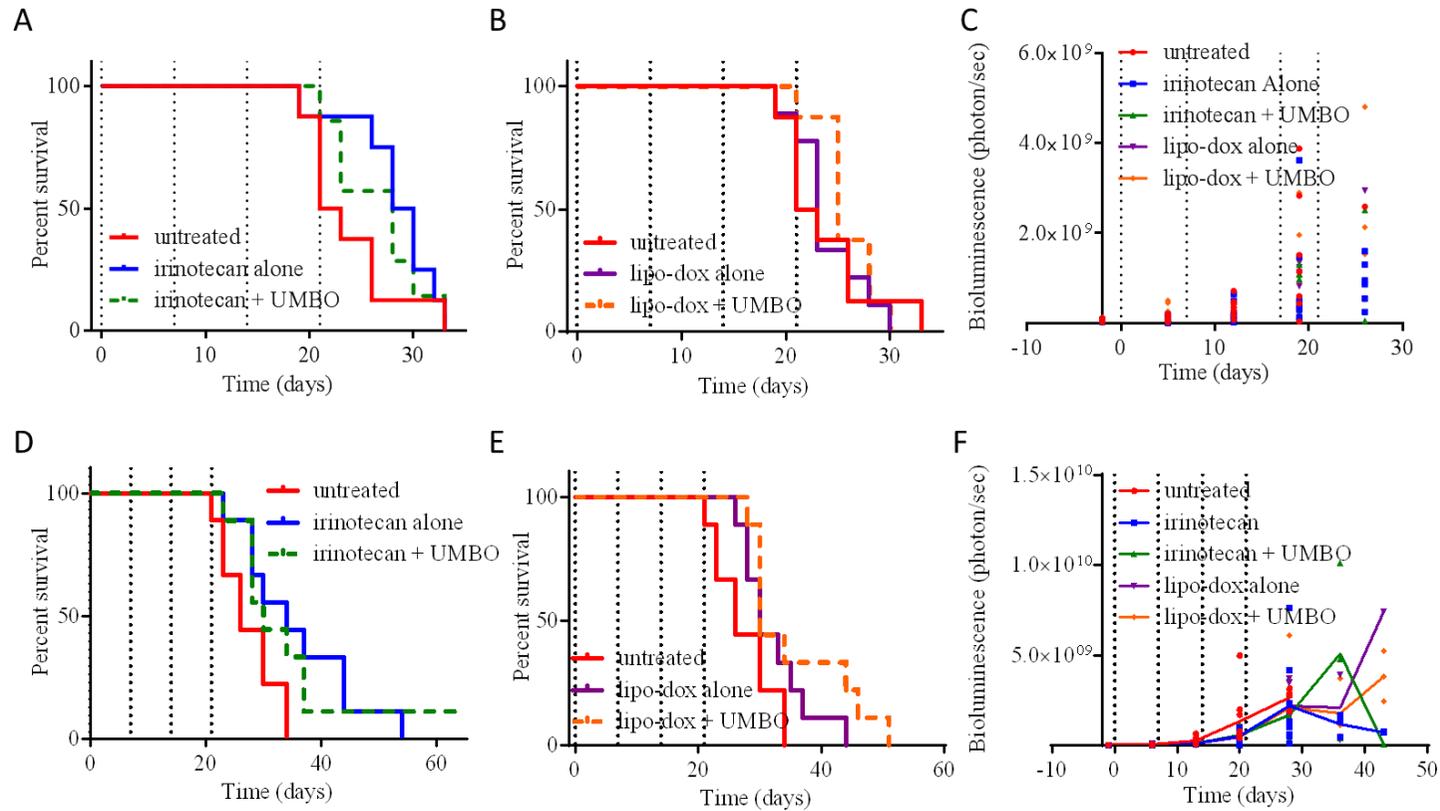


Figure 5 : Treatments with Lipo-Dox or Irinotecan and UMBO in a U87-luc orthotopic model.

One week after orthotopic xenograft of U87-luc cell line, mice were treated 4 times (vertical discontinuous lines) and monitored for tumor growth by bioluminescence and for their weight. Mice were sacrificed when the weight decreased by 20% of their maximum weight. Irinotecan was used at 50mg/ml, and Lipo-Dox was used at 2mg/ml.

Panel A: Survival of mice treated with Irinotecan with or without UMBO (NS) in the first experiment

Panel B: Survival of mice treated with Lipo-Dox with or without UMBO (NS) in the first experiment

Panel C: Monitoring of tumor growth over time using bioluminescence in mice. (NS) in the first experiment

Panel D: Survival of mice treated with Irinotecan with or without UMBO ($p=0.0337$ in a log rank test between Irinotecan alone and not treated) in the second experiment

Panel E: Survival of mice treated with Lipo-Dox with or without UMBO ($p=0.0292$ in a log rank test between Lipo-Dox + UMBO and not treated) in the second experiment

Panel F: Monitoring of tumor growth over time using bioluminescence in mice. (NS) in the second experiment.

		Experiment 1		Experiment 2	
Median survival	Not treated	22		26	
	Irinotecan alone	29		34	
	Irinotecan + UMBO	28		30	
	Lipo-Dox alone	23		30	
	Lipo-Dox + UMBO	25		30	
Statistics and ratios of median survival	Irinotecan alone vs Irinotecan + UMBO	3.6%	p= 0.6032	13.3%	p= 0.8175
	Irinotecan alone vs not treated	31.8%	p= 0.1599	30.8%	p= 0.0337
	Irinotecan + UMBO vs not treated	27.3%	p= 0.2841	15.4%	p= 0.0865
Statistics and ratios of median survival	Lipo-Dox alone vs Lipo-Dox + UMBO	8.7%	p= 0.3351	0%	p= 0.2097
	Lipo-Dox alone vs not treated	4.5%	p= 0.5169	15.4%	p= 0.0855
	Lipo-Dox + UMBO vs not treated	13.6%	p= 0.9808	15.4%	p= 0.0292

Table 3: Statistical analysis of the survival studies with U87 bearing mice receiving treatments +/- Carboplatin +/-UMBO. Statistics were made with a log rank test.

In vivo validation of the impact of Carboplatin + UMBO

After the orthotopic xenograft of 6240LN on nude mice, mice were randomly divided into 4 groups: (1) not treated, (2) UMBO alone, (3) Carboplatin alone and (4) Carboplatin + UMBO. A cumulative toxicity was observed in the groups treated with Carboplatin leading to toxic deaths (Figure 6A and B) reducing the positive trend in favor of Carboplatin + UMBO.

Indeed, a positive trend for an increased survival of mice was observed in the group Carboplatin + UMBO, but impaired by the cumulative toxicity of Carboplatin in cohort (Figure 6C).

Interestingly, using bioluminescence, tumor growth velocity was statistically significantly reduced in the group Carboplatin + UMBO versus the other groups ($p < 0.05$) (Figure 6D and Figure 7).

These experiments are currently being replicated.

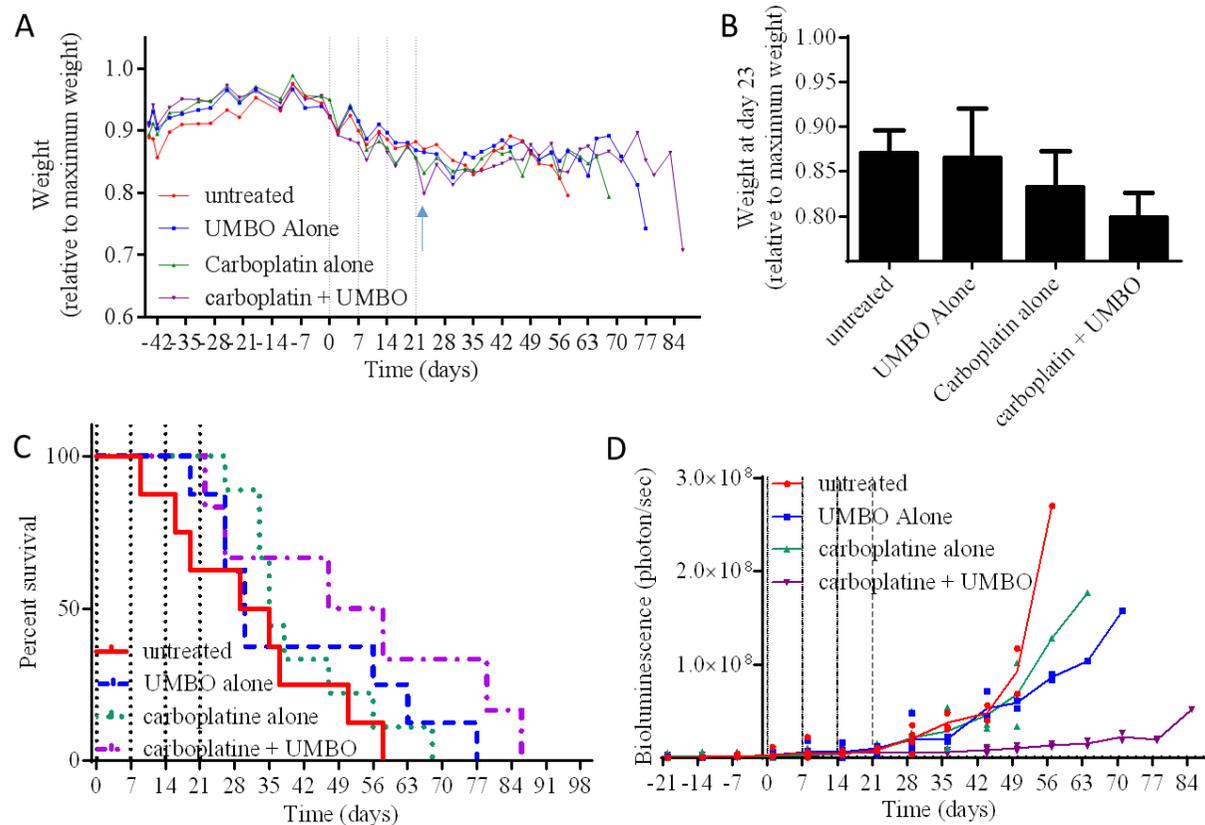


Figure 6 : Treatment with UMBO and Carboplatin in a 6240-luc PDCL orthotopic model.

45 days after orthotopic xenograft of 6240-luc cell line, mice were treated 4 times (vertical discontinuous lines) and monitored for tumor growth by bioluminescence and for their weight. Mice were sacrificed when the weight decreased by 20% of their maximum weight. All treatments were made at 53mg/kg Carboplatin.

Panel A: Monitoring of weight of mice over time (median). Blue arrow is detailed in panels B for a possible toxicity of Carboplatin at 53mg/kg. (mean. Error bars are in SD).

Panel C: Survival of mice (NS ; log-rank test).

Panel E: Monitoring of tumor growth over time using bioluminescence in mice. (Mean. Error bars are in SEM) (statistics detailed in figure 7).

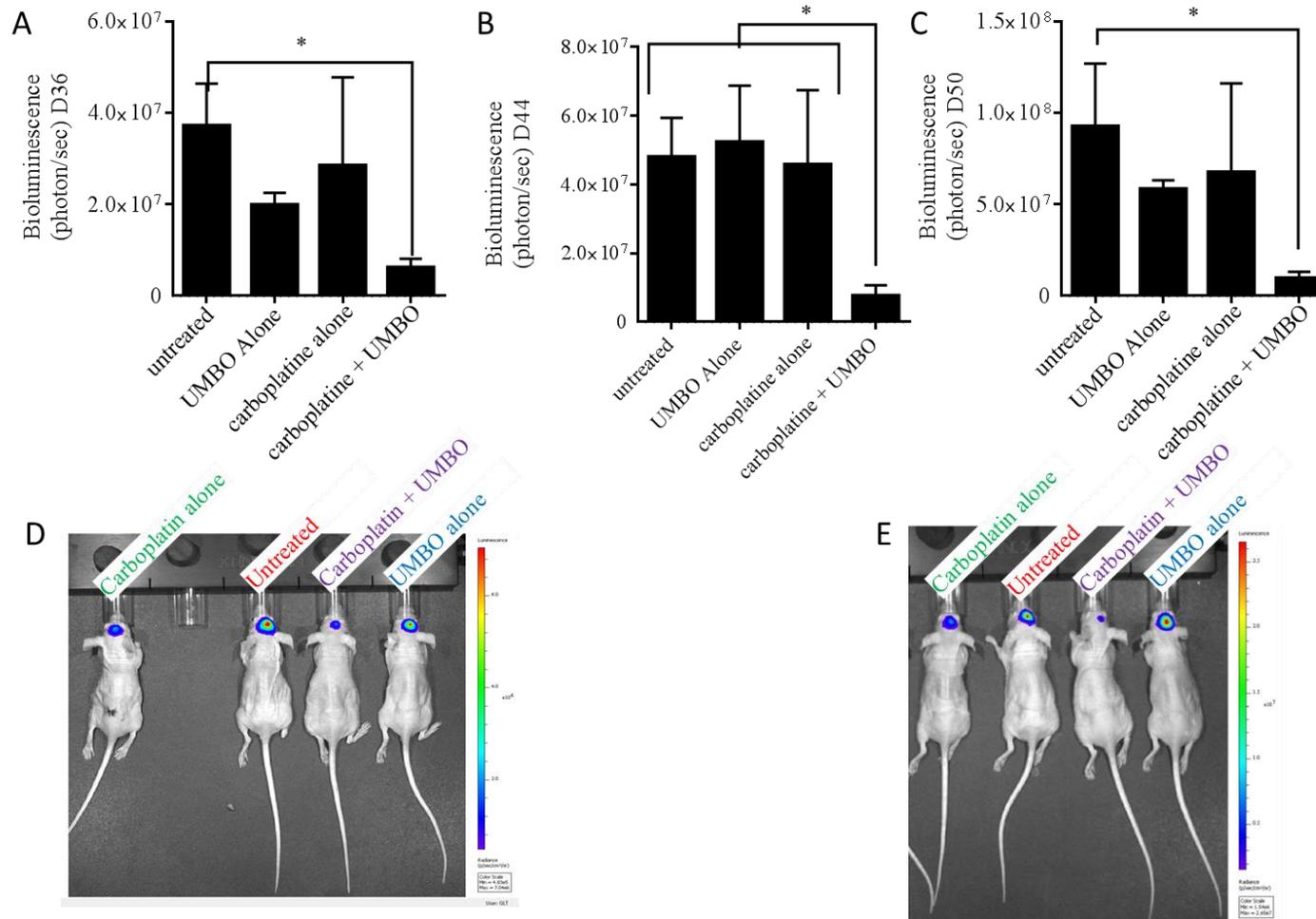


Figure 7: Treatments with Carboplatin and UMBO in a 6240-luc PDCL orthotopic model 45 days after orthotopic xenograft of 6240-luc cell line, mice were treated 4 times and monitored for tumor growth by bioluminescence (presented in figure 6 panel C). All treatments were made at 53mg/kg Carboplatin.
 Panels A, B and C: Bioluminescence measured on days 36, 44 and 50 respectively ($p < 0.05$)
 Panel D and E: Representative pictures of bioluminescences on days 36 and 50.

Discussion

Based on our experimental data, Carboplatin appears, so far, as the most promising chemotherapeutic agent, compared to Irinotecan and Lipo-Dox, for an efficacy clinical trial investigating UMBO + chemotherapy versus chemotherapy alone.

Indeed, discrepancies between *in vitro* and *in vivo* efficacy of Carboplatin in GBM preclinical models suggest a major impact of the BBB and a limited penetration of Carboplatin within the brain. Overcoming the BBB using UMBO significantly increase survival of GBM bearing mice treated with UMBO plus Carboplatin versus Carboplatin alone. This clinical benefit is associated with increased concentration of Carboplatin within the brain. Interestingly, no neurological toxicity was observed in mice treated with UMBO plus Carboplatin supporting the safety of UMBO but also of high concentrations of Carboplatin within the brain. High doses of Carboplatin within the brain have been already investigated in patients with good neurological and general safety profiles [12]. Our results support continuation of investigations of UMBO plus Carboplatin in a phase 2 clinical trial exploring clinical benefit in GBM patients.

In vivo data obtained with Irinotecan and Lipo-Dox alone or plus UMBO were less dramatic and less consistent.

Irinotecan alone demonstrated some limited efficacy in treated versus untreated mice. These data are consistent with the literature. Indeed, the efficacy of Irinotecan alone in glioma patients is reported to be too low [13]. Similarly, Lipo-Dox alone has been shown to be efficient in a limited number of patients [14]. In our data, Lipo-Dox alone only showed a trend for an increased efficacy. It suggests that drug delivery schedules might require further optimizations for dose and timing.

Addition of UMBO to both drugs did not change dramatically their impacts on in vivo tumor growth and mice survival.

Surprisingly, Irinotecan was even less efficient after UMBO while an increased penetration of Irinotecan in brain was documented in rabbits pre-treated with UMBO [4]. SN-38, the active metabolite of Irinotecan, is a good substrate of the efflux pumps ABCC2 and ABCG2. UMBO induces an increased expression of efflux pumps that expelled Irinotecan or SN-38, its active metabolite, out of the brain [15]. P-glycoprotein (Pgp) is the most expressed efflux pump in the BBB in mice and is a surrogate of overall expression of efflux pumps in the BBB. UMBO was reported preserving or decreasing Pgp BBB expression [16]–[18]. Therefore, modulation of efflux pumps expression by UMBO was unlikely responsible for reduced efficacy of Irinotecan when delivered after UMBO. However, the impact of UMBO on efflux pumps expression by the tumor cells is not documented yet. Irinotecan is converted into its active metabolite SN-38 through an enzymatic conversion. Although this conversion is possible directly in glioma cells, it is usually performed in liver cells [19]. We can hypothesize that UMBO promotes penetration of Irinotecan within the brain with less efficient conversion of Irinotecan toward SN-38 compared to liver. These results could also be explained by a neurotoxicity of Irinotecan. Indeed, increased penetration of Irinotecan within the normal brain after UMBO may induce neurotoxic death canceling putative anti-tumor activity in terms of survival [2], [20].

As discussed earlier, the dose and/or the delivery schedule for Lipo-Dox treatment with or without UMBO schedule might be suboptimal. However, in our experiments, Lipo-Dox when delivered after UMBO, showed a statistically significant impact on survival of GBM-bearing mice. In line with the literature, our data suggest that Lipo-Dox plus UMBO could be a good strategy to explore to treat GBM patients. Nonetheless, further investigations are required to demonstrate more dramatic and consistent effect in preclinical setting.

Lipo-Dox is a large therapeutic agent. New large therapeutic agents, including viruses, antibodies and other liposomal formulations have been shown to have dramatic efficacy in non-neurological cancers [20]–[22]. Their size, limiting their penetration within the brain, might discourage their investigations in brain diseases including brain cancers. Their delivery after UMBO might support their evaluation in brain tumors.

Conclusion

UMBO has been recently shown to be safe in animals and in recurrent GBM patients. Assessment of clinical benefits in GBM patients require further investigations. The optimal drug to combine with UMBO for a first efficacy clinical trial in recurrent GBM patients is debated. Our study showed statistically significant increased efficacy of Carboplatin in GBM-bearing mice when delivered after UMBO. Further studies are warranted to investigate additional drugs including large innovative agents (e.g. therapeutic antibodies, oncolytic viruses).

References

- [1] A. Carpentier *et al.*, “Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 8, no. 343, p. 343re2, Jun. 2016.
- [2] Q. T. Ostrom *et al.*, “The epidemiology of glioma in adults: a ‘state of the science’ review,” *Neuro-Oncol.*, vol. 16, no. 7, pp. 896–913, Jul. 2014.
- [3] A. Dréan *et al.*, “Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma,” *Expert Rev. Neurother.*, pp. 1–16, Jul. 2016.
- [4] K. Beccaria *et al.*, “Ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier to enhance temozolomide and irinotecan delivery: an experimental study in rabbits,” *J. Neurosurg.*, pp. 1–9, Nov. 2015.
- [5] L. Goldwirt *et al.*, “Enhanced brain distribution of Carboplatin in a primate model after blood-brain barrier disruption using an implantable ultrasound device,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 77, no. 1, pp. 211–216, Jan. 2016.
- [6] M. Aryal, N. Vykhodtseva, Y.-Z. Zhang, J. Park, and N. McDannold, “Multiple treatments with liposomal doxorubicin and ultrasound-induced disruption of blood-tumor and blood-brain barriers improve outcomes in a rat glioma model,” *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 169, no. 1–2, pp. 103–111, Jul. 2013.
- [7] F.-Y. Yang and S.-C. Horng, “Ultrasound Mediated Delivery of Liposomal Doxorubicin in Mice with Glioma,” *Engineering*, vol. 04, no. 10, p. 68, Jan. 2013.
- [8] L. H. Treat, N. McDannold, Y. Zhang, N. Vykhodtseva, and K. Hynynen, “Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 38, no. 10, pp. 1716–1725, Oct. 2012.
- [9] Z. Kovacs, B. Werner, A. Rassi, J. O. Sass, E. Martin-Fiori, and M. Bernasconi, “Prolonged survival upon ultrasound-enhanced doxorubicin delivery in two syngenic glioblastoma mouse models,” *J. Controlled Release*, vol. 187, pp. 74–82, Aug. 2014.
- [10] S. Rosenberg *et al.*, “Multi-omics analysis of primary glioblastoma cell lines shows recapitulation of pivotal molecular features of parental tumors,” *Neuro-Oncol.*, Aug. 2016.
- [11] S. Agarwal, P. Manchanda, M. A. Vogelbaum, J. R. Ohlfest, and W. F. Elmquist, “Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma,” *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, vol. 41, no. 1, pp. 33–39, Jan. 2013.
- [12] M. D. Prados *et al.*, “Intravenous Carboplatin for recurrent gliomas. A dose-escalating phase II trial,” *Am. J. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 6, pp. 609–612, Dec. 1996.
- [13] M. D. Prados *et al.*, “A phase 2 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study,” *Neuro-Oncol.*, vol. 8, no. 2, pp. 189–193, Apr. 2006.
- [14] K. Fabel *et al.*, “Long-term stabilization in patients with malignant glioma after treatment with liposomal doxorubicin,” *Cancer*, vol. 92, no. 7, pp. 1936–1942, Oct. 2001.
- [15] A. Sparreboom, R. Danesi, Y. Ando, J. Chan, and W. D. Figg, “Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy,” *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, vol. 6, no. 2, pp. 71–84, Apr. 2003.
- [16] M. Aryal, K. Fischer, C. Gentile, S. Gitto, Y.-Z. Zhang, and N. McDannold, “Effects on P-Glycoprotein Expression after Blood-Brain Barrier Disruption Using Focused Ultrasound and Microbubbles,” *PloS One*, vol. 12, no. 1, p. e0166061, 2017.
- [17] H. Baghirov *et al.*, “Ultrasound-mediated delivery and distribution of polymeric nanoparticles in the normal brain parenchyma of a metastatic brain tumour model,” *PLOS ONE*, vol. 13, no. 1, p. e0191102, Jan. 2018.

- [18] H. Cho *et al.*, “Localized Down-regulation of P-glycoprotein by Focused Ultrasound and Microbubbles induced Blood-Brain Barrier Disruption in Rat Brain,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 31201, Aug. 2016.
- [19] W. Wang *et al.*, “Effective conversion of irinotecan to SN-38 after intratumoral drug delivery to an intracranial murine glioma model in vivo. Laboratory investigation,” *J. Neurosurg.*, vol. 114, no. 3, pp. 689–694, Mar. 2011.
- [20] M. D. Pegram *et al.*, “Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment,” *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 16, no. 8, pp. 2659–2671, Aug. 1998.
- [21] D. E. Cohn *et al.*, “Randomized phase IIB evaluation of weekly paclitaxel versus weekly paclitaxel with oncolytic reovirus (Reolysin®) in recurrent ovarian, tubal, or peritoneal cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study,” *Gynecol. Oncol.*, vol. 146, no. 3, pp. 477–483, 2017.
- [22] M. Levinsen *et al.*, “Efficacy and Toxicity of Intrathecal Liposomal Cytarabine in First-line Therapy of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia,” *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, vol. 38, no. 8, pp. 602–609, 2016.

D. Transporteurs ATP binding cassette (ABC) : expression et valeur clinique dans le glioblastome

Une étude sur l'expression des transporteurs ABC dans le GBM et son impact sur la survie des patients traités par le protocole standard de première ligne a été réalisée. Celle-ci a été publiée dans le « Journal of Neuro-Oncology » (Dréan et al., 2018). Cette publication a été intégrée à ce manuscrit ci-après.

ATP Binding Cassette (ABC) transporters: expression and clinical value in glioblastoma

Dréan Antonin^{1,2}, Rosenberg Shai^{1,3}, Lejeune François-Xavier¹, Goli Larissa¹, Nadaradjane Aravindan Arun¹, Guehenec Jérémy¹, Schmitt Charlotte¹, Verreault Maïté¹, Bielle Franck^{1,4,7}, Mokhtari Karima^{1,4,7}, Sanson Marc^{1,5,7}, Carpentier Alexandre⁶, Delattre Jean-Yves^{1,5,7}, Idbaih Ahmed^{1,5}

1 Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 04 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, ICM, F-75013, Paris, France

2 Equipe de recherche CarThera, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Ipeps ICM, F-75013, Paris, France.

3 Hadassah - Hebrew University Medical Center, Israel (S.R.)

4 AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Service de Neuropathologie, F-75013, Paris, France.

5 AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Service de Neurologie 2-Mazarin, F-75013, Paris, France.

6 AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Service de Neurochirurgie, F-75013, Paris, France.

7 OncoNeuroTek, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière, Paris, France

Corresponding author

Ahmed Idbah. Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Service de Neurologie 2-Mazarin, F-75013, Paris, France. Tél: 00 33 1 42140385. Fax 00 33 1 42140418. Email ahmed.idbah@aphp.fr or ahmed.idbah@gmail.com

Abstract

ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) regulate traffic of multiple compounds, including chemotherapeutic agents, through biological membranes. They are expressed by multiple cell types and have been implicated in the drug resistance of some cancer cells. Despite significant research in ABC transporters in the context of many diseases, little is known about their expression and clinical value in glioblastoma (GBM).

We analyzed expression of 49 ABC transporters in both commercial and patient-derived GBM cell lines as well as from 51 human GBM tumor biopsies. Using The Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort as a training dataset and our cohort as a validation dataset, we also investigated the prognostic value of these ABC transporters in newly diagnosed GBM patients, treated with the standard of care.

In contrast to commercial GBM cell lines, GBM-patient derived cell lines (PDCL), grown as neurospheres in a serum-free medium, express ABC transporters similarly to parental tumors. Serum appeared to slightly increase resistance to temozolomide correlating with a tendency for an increased expression of ABCB1. Some differences were observed mainly due to expression of ABC transporters by microenvironmental cells. Together, our data suggest that the efficacy of chemotherapeutic agents may be misestimated *in vitro* if they are the targets of efflux pumps whose expression can be modulated by serum. Interestingly, several ABC transporters have prognostic value in the TCGA dataset. In our cohort of 51 GBM patients treated with radiation therapy with concurrent and adjuvant temozolomide, ABCA13 overexpression is associated with a decreased progression free survival in univariate ($p < 0.01$) and multivariate analyses including MGMT promoter methylation ($p = 0.05$) suggesting reduced sensitivity to temozolomide in ABCA13 overexpressing GBM.

Expression of ABC transporters is: (i) detected in GBM and microenvironmental cells and (ii) better reproduced in GBM-PDCL. ABCA13 expression is an independent prognostic factor in newly diagnosed GBM patients.

Further prospective studies are warranted to investigate whether ABCA13 expression can be used to further personalize treatments for GBM.

Keyword: Glioblastoma, resistance, ABC transporters, PDCL, ABCA13

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary brain cancer in adults, with a median overall survival below 20 months after the initial diagnosis [1]. Virtually, all GBM patients experience tumor relapse after first-line standard of care. The blood-brain barrier (BBB), a biophysical barrier limiting penetration of chemotherapeutic agents within the brain and the brain tumor, is one of the actors involved in intrinsic resistance of drugs in GBM patients [2].

ATP binding cassette (ABC) transporters are a family of 49 proteins that actively transport many substrates. This family contains the main efflux pumps that expel drugs out of cells, therefore impacting chemosensitivity [3]. Efflux pumps are expressed by many cells in the body. In the brain, they are expressed by microglial cells, astrocytes, neurons, pericytes and, endothelial cells [4]. Endothelial cells, which are involved in the normal functioning of the BBB, mainly express ABCB1 (P-gp) and ABCG2 (BCRP) to efflux xenobiotics from the brain parenchyma to the bloodstream [2]. In addition, many ABC transporters are involved in cell metabolism and/or transport of biologic molecules [3].

ABC transporters have a large spectrum of substrates, including many chemotherapeutic agents [5]. The efflux of these therapeutic agents from the brain to the blood by the BBB hampers their access to tumor cells and their efficacy. Efflux pumps, from the ABC transporter family, can also be expressed by tumor cells themselves, leading to the development of intrinsic chemoresistance [6].

Here the expression of all ABC transporters in GBM cells and their microenvironment was assessed and their potential prognostic impact in a homogeneous population of GBM patients was further investigated.

Material and methods

Public dataset

Levels of mRNA expression of the 49 ABC transporters were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) GBM dataset [7]. The threshold of z-scores (RNA Seq V2 RSEM) was set at ± 2 of distinguishing over- and under-expressing samples. Overall survival (OS; from diagnosis to death) and progression-free survival (PFS; from diagnosis to first tumor progression) were compared using log-rank test. P-values below 0.05 were considered significant. RNAseq data for the U251 cell line were obtained from Lundberg *et al.* [8]. Expression levels of ABCB1, ABCG1 and ABCG2 by normal CNS cells were obtained from http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html [9].

OncoNeuroTek tissue and data as validation cohort

For the validation, patients and tumors from the OncoNeuroTek tissue bank were selected according to the following inclusion criteria : (i) newly diagnosed and histologically proven GBM, (ii) age below 70 years, (iii) Karnofsky performance status above 70%, (iv) treated with radiation therapy with concurrent and adjuvant temozolomide [10], (v) available *MGMT* promoter methylation status, (vi) available clinical data, (vii) available tumor tissue for additional molecular analysis and, (viii) signed informed consent form for molecular analysis.

GBM cell lines

Nine GBM-patient derived cell lines (PDCL) named 4339, 4371, 5706, 6190, 6240, 7015, 7060, 7142 and N13-1520 were established in our laboratory. Tissue from the

paired human tumor samples was available for further molecular analysis. These samples and associated clinico-molecular annotations were previously reported [11].

Cell culture

Cell cultures were performed as previously described [11]. GBM-PDCL were established (passage > 5) and cultured in DMEM-F12 (Life Technologies, 31331028) supplemented with 1% penicillin/streptomycin, B27 supplement 50X (Life Technologies, 17504-044), 20 ng/mL human bFGF (Peprotech, 100-18B) and 20 ng/ml human EGF (Peprotech, 100-15). Cells were cultured as gliomaspheres. Dissociation was performed with Accutase StemPro (Life Technologies, A11105-11) after washing with HBSS (Life Technologies, 1150029). For culture in serum, PDCL were cultured in DMEM (Life Technologies, 31885049) supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Life) and 1% penicillin/streptomycin.

Viability test.

For drug sensitivity assays, 96-well plates were used. For viability assay on PDCL, wells were coated with 10 µg/mL laminin (cat no. L2020, Sigma-Aldrich) at 37°C for 1 hour for PDCL. Six thousand cells were plated per well. Temozolomide (Sigma-Aldrich, T2577) was resuspended in DMSO as a 20 mg/ml stock solution and was added 24 hours after plating. 150 hours after drug addition, WST-1 reagent (Roche) was added according to the manufacturer's instructions. WST-1 salt is cleaved to a soluble formazan dye by a NAD(P)H-dependent reaction in viable cells. Plates were incubated for 3 hours and read by spectrophotometry at 450 nm and 620 nm wavelength.

RNA extraction

RNA samples from the 9 GBM tumors and their 9 paired GBM-PDCL were provided by OncoNeuroTek tissue bank. RNA extraction for tumor samples was performed as previously described using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) [12].

For GBM-PDCL, 1×10^4 dissociated cells were cultured in a 75 cm² flask for four days, with culture medium changed at day 3, and cells were harvested the next day as a dry pellet and stored at -80°C as described previously [11]. RNA extraction was performed using the kit NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel, 740955) according to the manufacturer's guidelines.

Reverse Transcription and Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Reverse transcription was performed using the kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (ThermoScientific, K1442) according to the manufacturer's guidelines starting with 750 ng of RNA. cDNAs were stored at -20°C.

qPCR was used to examine expression levels of ABCA13, ABCB1, ABCG1, and ABCG2 in the GBM-PDCL cells. Paired tumor samples were analyzed using the LightCycler Probe Master mix 2X (Roche, 04887301001) and the UPL detection system (Roche, 04483433001; primers are listed in supplementary table 1) in a Light Cycler 96 (Roche). For each qPCR, we made a duplicate measure in each experiment and we ran three distinct experiments at three different passages. PPIA expression was used for normalization. qPCR was used to investigate expression levels of ABCA1, ABCA4, ABCA13, ABCC1, ABBCC12, ABCC13, and ABCG1 in the validation cohort of GBM patients were performed in a 1534 wells plate using a Sybr green detection system in a Light Cycler 1534 (Roche). PPIA and PPIB expression were used for normalization.

Immunohistochemistry

Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tumor tissue sections were deparaffinized, rehydrated, and incubated in citrate buffer at pH 4.0 for epitope retrieval in a microwave at 400W for 15 minutes. Blockade solution was made using PBS 0.1M supplemented with 0.4% triton, 3% BSA and 10% donkey serum. Anti-human ABCG2 antibody (BXP-21; Euromedex) and anti-human CD31 antibody (SP38; Thermo Fischer Scientific) were diluted at 1:100 in the blockade solution and incubated on the tissue slices overnight at 4°C. Secondary antibodies conjugated with Alexa 488 and 447 were incubated on the slices for 2h at room temperature. The slices were then mounted using fluoromount, supplemented with DAPI (0100-20; Clinisciences) and visualized using a microscope (Apotome Axio M2, Zeiss).

Statistical analysis

Comparison between ABC transporter expression in GBM-PDCL and tumors was performed by a paired t-test with a Bonferroni correction using R.

RT-qPCR data bar charts were plotted with GraphPad PRISM 4, and analyzed by a two-way ANOVA test.

For analysis of OS and PFS, patients were divided in two groups from each side of the median. Kaplan Meier survival curves were made on GraphPad PRISM 4. Survivals of groups with “low” versus “high” expression were compared using Log-rank (Mantel-Cox) test. Additional Cox test for survival in a multivariate modality was performed with R to assess the impact of *MGMT* promoter methylation status after a log₂ transformation of ABCA13 expression.

Results

Expression of ABC transporters in the commercial U251 GBM cell line, in GBM-PDCL and paired-GBM tumors

Out of the 49 ABC transporters, 19 are measurably expressed in U251 GBM cell lines versus 42/49 in the GBM-PDCL line [8]. This highlights that GBM cell lines may lose ABC transporter expression over time in adherent culture conditions including bovine fetal serum (Fig. 1, Panel A). When cultured in a differentiating medium containing fetal calf serum, the N13-1520 PDCL shows a slight non-significant trend for increased expression of ABCB1 in RT-qPCR (Fig. 1C) associated with higher resistance to temozolomide in an *in vitro* viability assay ($p < 0.0001$) (Fig. 1D). These results suggest that the expression loss of most of the ABC transporters may be due to the high passages after cell line establishment rather than exposure to fetal calf serum. It also highlights the importance of using a non-differentiating serum-free medium.

We already showed that, overall, GBM-PDCL are molecularly very close to their parental human tumors in a multi-omics analysis when cultured in a non-differentiating serum-free medium [11]. We analyzed the same data set (*i.e.* 9 GBM-PDCL and their tumor of origin) with a specific focus on expression levels of the 49 ABC transporters acquired using Affymetrix® expression profiling microarray and RNA Seq platforms. Three ABC transporters were differentially expressed between the GBM-PDCL and their parental tumor in both transcriptomes (*i.e.* Affymetrix and RNA Seq): ABCB1, ABCG1 and ABCG2 (Figures 1B, 2A and 2B, and Table 1).

RT-qPCR validated the difference of expression for the three transporters (Figs. 2C, 2D and 2E; Supp. Fig. 1).

ABC transporters differentially expressed in GBM-PDCL compared to their parental tumors are expressed in the microenvironment

We hypothesized that ABC transporters are differentially expressed between GBM-PDCL and their parental tumors (*i.e.* underexpression in GBM-PDCL *versus* paired human tumors) due to the expression by microenvironmental cells present in bulk tumor. We questioned http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html for expression of ABCB1, ABCG1 and ABCG2 in normal murine cells [13]. ABCB1, ABCG1 and ABCG2 are expressed by endothelial cells supporting our hypothesis. ABCG1 and ABCG2 are also expressed in additional cell types (*i.e.* astrocytes, neurons, oligodendrocytes) (Figs. 2E, 2F and 2G). Indeed, ABCG2 and CD31 expression are colocalized using immunohistochemistry in a human GBM (Fig. 2H).

Clinical value of ABC transporter expression in GBM patients

We then investigated the prognostic value of the 49 ABC transporters in the 2013 TCGA GBM cohort. An overview of the expression of these transporters is presented in supplementary Fig. 2. Kaplan-Meier analysis highlighted an unfavorable prognostic impact of: (i) over-expression of ABCA1, ABCA4, ABCC12 and ABCG1 on OS, and (ii) over-expression of ABCA13, ABCC1 and ABCC13 on PFS (Table 2).

To validate this finding, expression of ABCA1, ABCA4, ABCA13, ABCC1, ABCC12, ABCC13 and ABCG1 was assessed in a homogeneously treated cohort of 51 newly diagnosed GBM patients (Fig. 3A). Only overexpression of ABCA13 was validated as negative prognostic factor in terms of PFS ($p=0.004$, Figure 3B) and OS in univariate analysis ($p=0.047$, Figure 3C). In multivariate analysis, ABCA13 overexpression was found to be an independent poor prognostic factor of PFS ($p=0.05$ for ABCA13, HR=

1.12) when MGMT promoter methylation status ($p=0.002$ for MGMT, HR=3.13) is included in the statistical model, but not for OS.

Discussion

GBM is a challenging cancer to treat. Indeed, GBM cells are highly resistant to treatments. The blood-brain and blood-tumor barriers limit the efficacy of drug treatments in GBM patients and are a major factor in primary resistance of GBM cells to chemotherapy.

The blood-brain and blood-tumor barriers are physical and biological barriers. ABC transporters play a pivotal role in the biology of both barriers. Indeed, they can expel chemotherapeutic agents from the brain tissue to the bloodstream [2]. Expression of ABC transporters by the tumor cells themselves can also be responsible for tumor resistance to chemotherapies. Therefore, in the current work we have investigated their expression in GBM cell lines used for preclinical investigations of new therapeutic compounds and in human tumors.

Commercial GBM cell lines lack expression of most ABC transporters. Additional *in vitro* models that better recapitulate ABC transporter expression patterns of human tumors must be also used before moving drugs to *in vivo* investigations. GBM-PDCL is an important tool expressing a larger number of ABC transporters expressed in human GBM. However, addition of serum in the culture medium appeared to change expression patterns of ABC transporters. A trend to the increased expression of ABCB1 and an increased resistance to temozolomide in a serum-complemented medium is consistent with the fact that temozolomide is a substrate of ABCB1 [14]. Together, our data suggest that the efficacy of chemotherapeutic agents might be changed *in vitro*, if they are substrates of efflux pumps not expressed in the cell line used and whose expression can be modulated by fetal calf serum. Using GBM-PDCL closer to human GBM may reduce this overestimation and may be more relevant.

To identify ABC transporters impacting response to the standard of care of newly diagnosed GBM patients, we have correlated prognosis of GBM patients to ABC transporter expression in a training dataset (*i.e.* TCGA) and a validation dataset (*i.e.* personal cohort). ABCA13 expression was found to be a prognostic factor for PFS and OS in univariate analyses. Interestingly, based on multivariate analysis, ABCA13 expression provides additional prognostic information, in terms of PFS, to MGMT promoter methylation in young patients (<70 years), in good clinical condition (KPS>70%) suffering from newly diagnosed GBM and treated with the standard of care. This supports for the first time ABCA13 expression as an independent prognostic biomarker in newly diagnosed GBM patients. Additional prospective and functional studies are warranted to investigate our findings further.

Little is known about ABCA13. ABCA13 is a large protein of 5058 amino acids encoded by *ABCA13* located on chromosome region 7p12.3 that is often polysomic in GBM. ABCA13 is highly expressed in the bone marrow, but not in normal brain [9]. Therefore, in GBM, ABCA13 is likely to be primarily expressed by tumor cells rather than microenvironmental cells. The molecular function of ABCA13 remains largely unknown [15]. However, ABCA13 has been linked to multiple human diseases, including cancer. ABCA13 genetic polymorphisms have been associated with psychiatric disorders [16–21] and success of coronary artery bypass surgery [22]. ABCA13 expression has also been linked to outcome in various cancers. In line with our study, ABCA13 overexpression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma [23], in gastric adenocarcinoma [24], and in ovarian serous carcinoma [25]. In contrast, ABCA13 overexpression is associated with improved outcomes in breast cancer [26] and in colorectal cancer [27]. Yun *et al.* reported an association of ABCA13 and stem-like phenotype in the “side population” of metastatic renal cell carcinoma.

Overexpression of ABCA13 was also correlated with drug resistance, suggesting a potential role in drug efflux [23].

Overall our study suggests that ABC binding cassette transporters, particularly ABCA13, are important in both preclinical and clinical research in GBM. We have found that ABCA13 is a potential prognostic factor in GBM patients and a putative actor of therapy resistance. Further studies are warranted to support our findings and to better understand the role of ABCA13.

Acknowledgments

Institut Universitaire de Cancérologie

Fondation ARC pour la recherche sur le cancer

Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales

Dr Michael Canney.

OncoNeuroTek tissue bank, Paris.

Compliance with Ethical Standards

This study was funded by the Fondation ARC pour la recherche sur le cancer and the Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales.

All authors declare they have no conflict of interest with the present study.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Informed consent was obtained from participants included in the study.

References

1. Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, et al (2014) The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol* 16:896–913 . doi: 10.1093/neuonc/nou087
2. Dréan A, Goldwirt L, Verreault M, et al (2016) Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma. *Expert Rev Neurother* 1–16 . doi: 10.1080/14737175.2016.1202761
3. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 3:281–290
4. Hartz AMS, Bauer B (2011) ABC transporters in the CNS - an inventory. *Curr Pharm Biotechnol* 12:656–673
5. Sparreboom A, Danesi R, Ando Y, et al (2003) Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 6:71–84
6. Khamisipour G, Jadidi-Niaragh F, Jahromi AS, et al (2016) Mechanisms of tumor cell resistance to the current targeted-therapy agents. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:10021–10039 . doi: 10.1007/s13277-016-5059-1
7. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, et al (2013) The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155:462–477 . doi: 10.1016/j.cell.2013.09.034
8. Lundberg E, Fagerberg L, Klevebring D, et al (2010) Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines. *Mol Syst Biol* 6:450 . doi: 10.1038/msb.2010.106
9. Uhlén M, Hallström BM, Lindskog C, et al (2016) Transcriptomics resources of human tissues and organs. *Mol Syst Biol* 12:862
10. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987–996 . doi: 10.1056/NEJMoa043330
11. Rosenberg S, Verreault M, Schmitt C, et al (2016) Multi-omics analysis of primary glioblastoma cell lines shows recapitulation of pivotal molecular features of parental tumors. *Neuro-Oncol*. doi: 10.1093/neuonc/now160
12. Kamoun A, Idbaih A, Dehais C, et al (2016) Integrated multi-omics analysis of oligodendroglial tumours identifies three subgroups of 1p/19q co-deleted gliomas. *Nat Commun* 7:11263 . doi: 10.1038/ncomms11263
13. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, et al (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:11929–11947 . doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014

14. Goldwirt L, Beccaria K, Carpentier A, et al (2014) Irinotecan and temozolomide brain distribution: a focus on ABCB1. *Cancer Chemother Pharmacol* 74:185–193 . doi: 10.1007/s00280-014-2490-0
15. Tomioka M, Toda Y, Kurisu J, et al (2012) The effects of neurological disorder-related codon variations of ABCA13 on the function of the ABC protein. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:2289–2293 . doi: 10.1271/bbb.120563
16. Knight HM, Pickard BS, Maclean A, et al (2009) A cytogenetic abnormality and rare coding variants identify ABCA13 as a candidate gene in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Am J Hum Genet* 85:833–846 . doi: 10.1016/j.ajhg.2009.11.003
17. Dwyer S, Williams H, Jones I, et al (2011) Investigation of rare non-synonymous variants at ABCA13 in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 16:790–791 . doi: 10.1038/mp.2011.2
18. Pickard BS, Van Den Bossche MJA, Malloy MP, et al (2012) Multiplex amplicon quantification screening the ABCA13 gene for copy number variation in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatr Genet* 22:269–270 . doi: 10.1097/YPG.0b013e32835185b3
19. Degenhardt F, Priebe L, Strohmaier J, et al (2013) No evidence for an involvement of copy number variation in ABCA13 in schizophrenia, bipolar disorder, or major depressive disorder. *Psychiatr Genet* 23:45–46 . doi: 10.1097/YPG.0b013e328358645b
20. Ma J, Lan X, Gao N, et al (2013) A genetic association study between common variants in the ABCA13 gene and schizophrenia in a Han Chinese population. *Psychiatry Res* 209:748–749 . doi: 10.1016/j.psychres.2013.07.013
21. Chen J, Khan RAW, Wang M, et al (2016) Association between the variability of the ABCA13 gene and the risk of major depressive disorder and schizophrenia in the Han Chinese population. *World J Biol Psychiatry Off J World Fed Soc Biol Psychiatry* 1–7 . doi: 10.1080/15622975.2016.1245442
22. Shah AA, Haynes C, Craig DM, et al (2015) Genetic variants associated with vein graft stenosis after coronary artery bypass grafting. *Heart Surg Forum* 18:E1-5
23. Yun E-J, Zhou J, Lin C-J, et al (2017) The network of DAB2IP-miR-138 in regulating drug resistance of renal cell carcinoma associated with stem-like phenotypes. *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.17756
24. Araújo TM, Seabra AD, Lima EM, et al (2016) Recurrent amplification of RTEL1 and ABCA13 and its synergistic effect associated with clinicopathological data of gastric adenocarcinoma. *Mol Cytogenet* 9:52 . doi: 10.1186/s13039-016-0260-x
25. Nymoën DA, Holth A, Hetland Falkenthal TE, et al (2015) CIAPIN1 and ABCA13 are markers of poor survival in metastatic ovarian serous carcinoma. *Mol Cancer* 14:44 . doi: 10.1186/s12943-015-0317-1

26. Hlaváč V, Brynychová V, Václavíková R, et al (2013) The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* 14:515–529 . doi: 10.2217/pgs.13.26
27. Hlavata I, Mohelnikova-Duchonova B, Vaclavikova R, et al (2012) The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* 27:187–196 . doi: 10.1093/mutage/ger075

Figure 1: mRNA expression levels of the 49 ABC transporters. Panel A: Expression of the ABC transporters in nine previously characterized GBM-PDCL and the adherent, serum-cultured human GBM cell line U251 MG. U251 MG transcriptome was extracted from published data [8]. Panel B: Expression of the ABC transporters in the nine GBM-PDCL and their parental tumors. Panel C: Expression of ABCB1, ABCA13 and ABCG2 in the N13-1520 PDCL grown in its serum-free versus serum-complemented medium measured by RT-qPCR (T-test: $p=0.0620$ for ABCB1; NS for each couples ; error bars are in SD). Panel D: viability test of the N13-1520 PDCL grown in serum-free and serum-complemented medium after exposure to temozolomide ($p<0.0001$; error bars are in SEM).

Figure 2

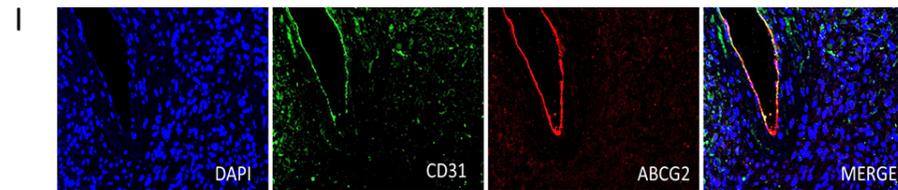
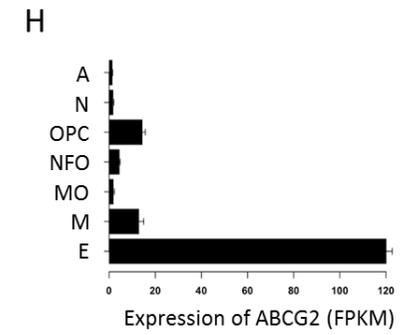
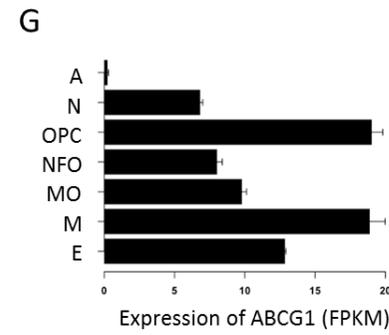
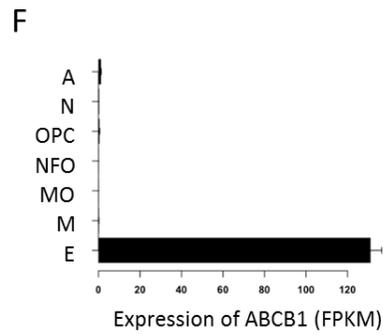
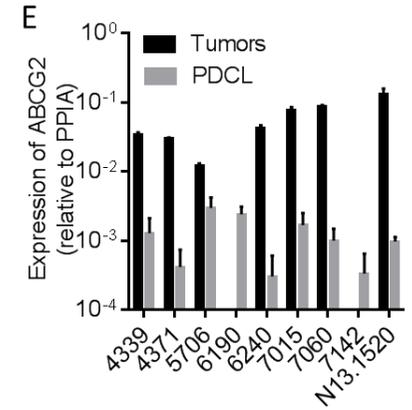
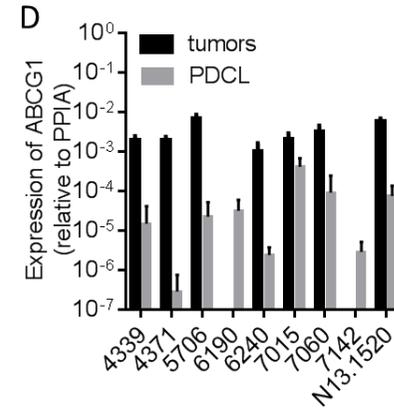
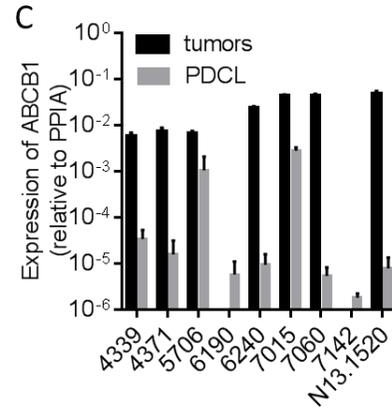
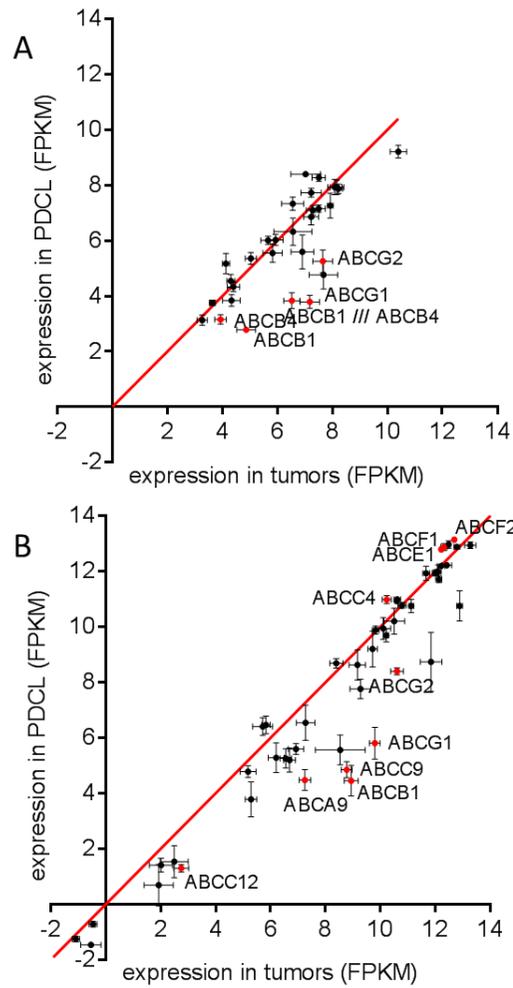


Figure 2: Correlation of mRNA expression levels of the 49 ABC transporters in the nine GBM-PDCL versus their matched parental tumors. Panel A: Using transcriptome from Affymetrix expression profiling micro-arrays. Panel B: Using transcriptome from RNA sequencing. In both panels, red dots indicate the ABC transporters differentially expressed between the GBM-PDCL and their paired parental tumor in the paired t-test. Panels C, D and E represent qPCR data validating the expression of the three ABC transporters (i.e. ABCB1, ABCG1 and ABCG2 respectively) differentially, in both expression profiling platforms, expressed between GBM-PDCL and paired parental tumors. Tumor samples for the 4190 and the 7142 PDCL were ran out and could not be used for RT-qPCR. T-test PDCL vs tumor for ABCB1, ABCG1 and ABCG2 : $p < 0.05$. Error bars are in SD. Bar charts in panels F, G and H represent the expression of ABCB1, ABCG1 and ABCG2 respectively by the different cell types in the brain extracted from a database [9]. E : endothelial cells ; M : Microglia ; MO : myelinating oligodendrocytes ; NFO : Newly formed oligodendrocytes ; OPC : oligodendrocyte progenitor cells ; N : Neurons ; A : Astrocytes. Panel I shows colocalization of ABCG2 and CD31 in immunofluorescence in a human GBM.

Figure 3

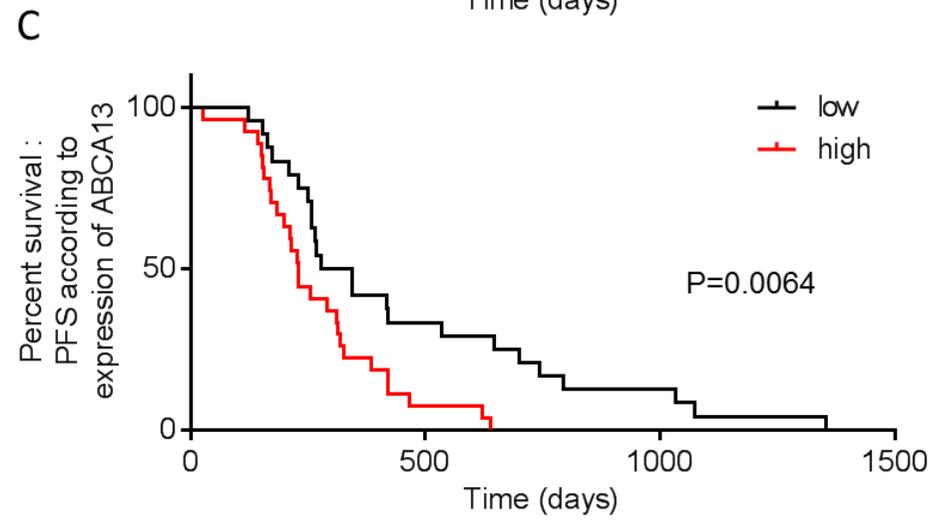
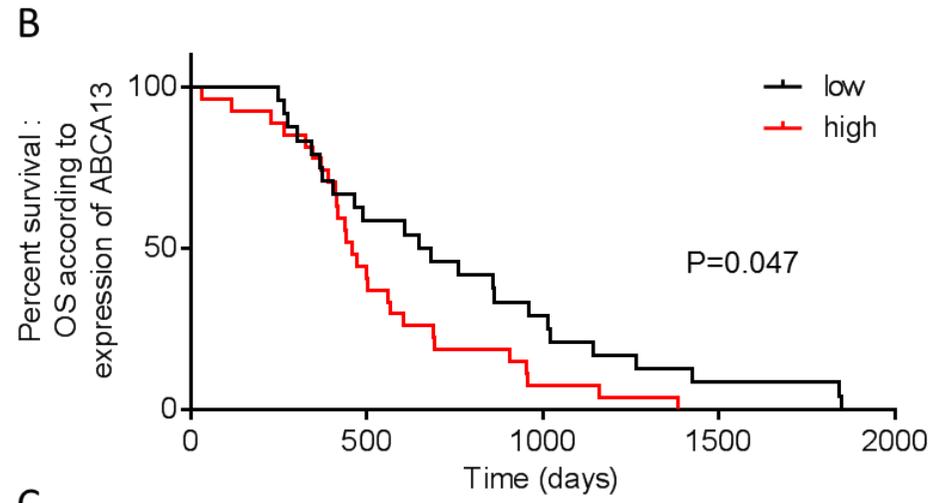
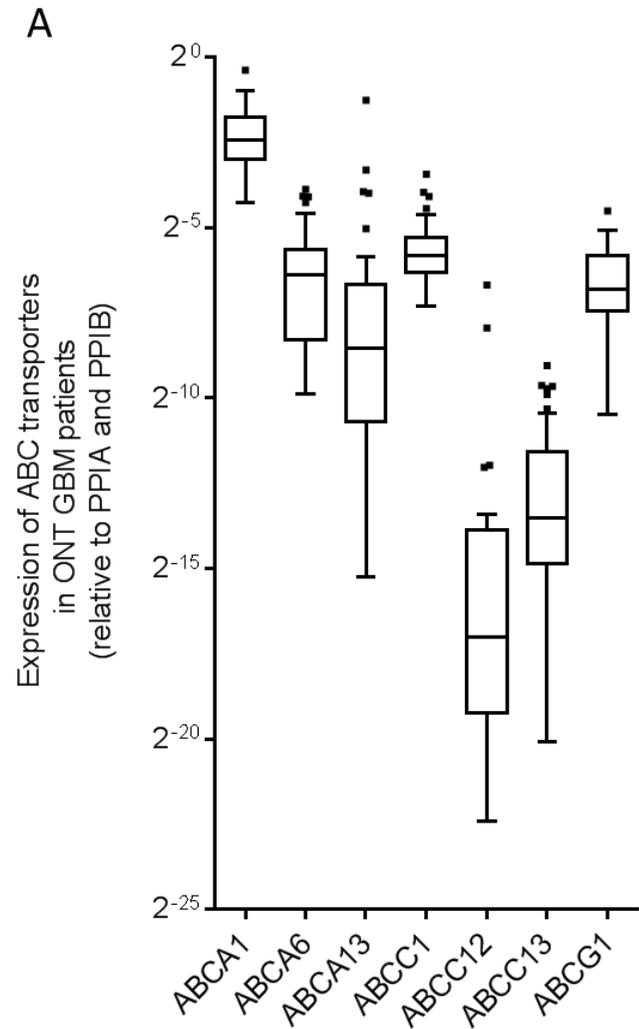
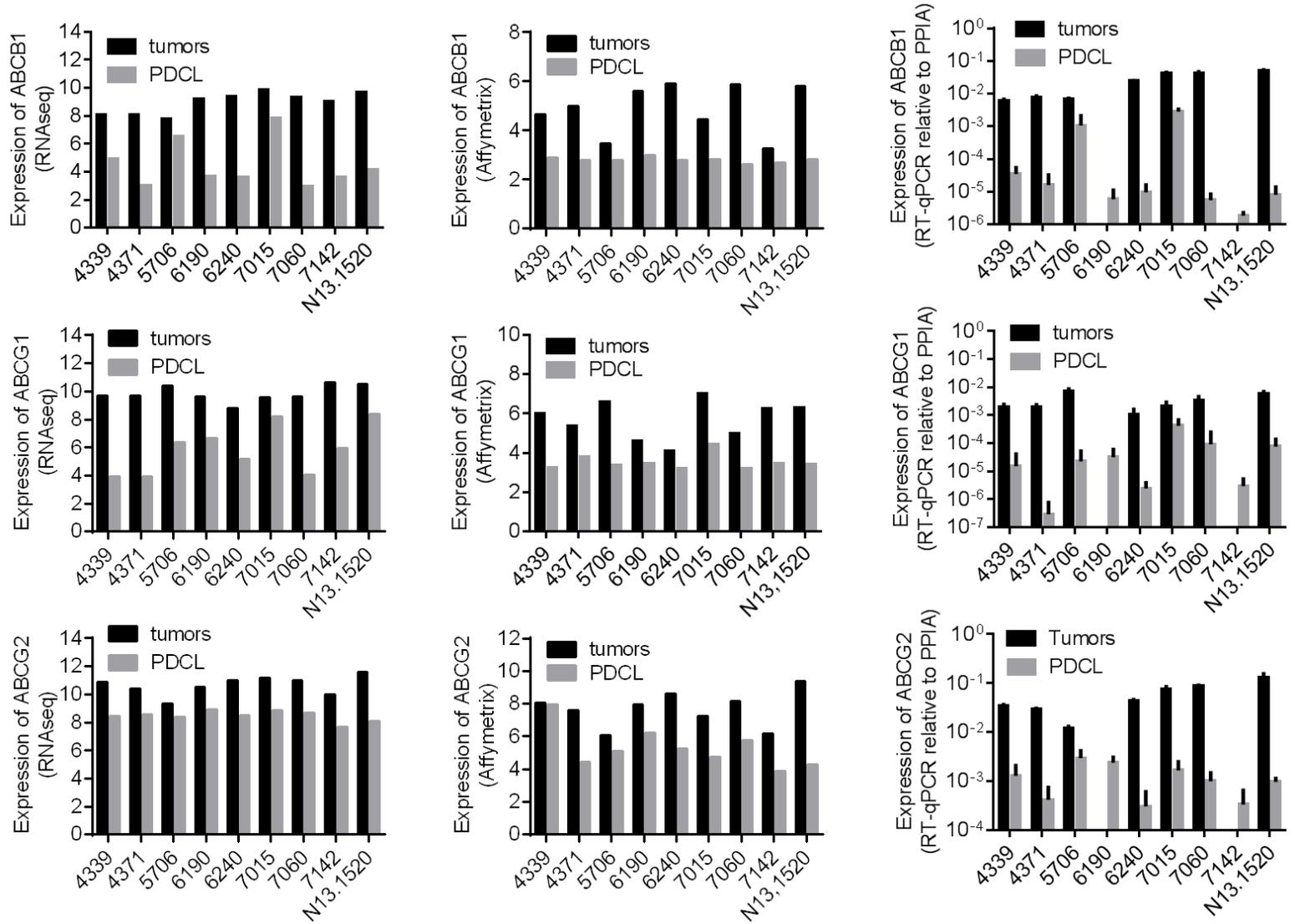


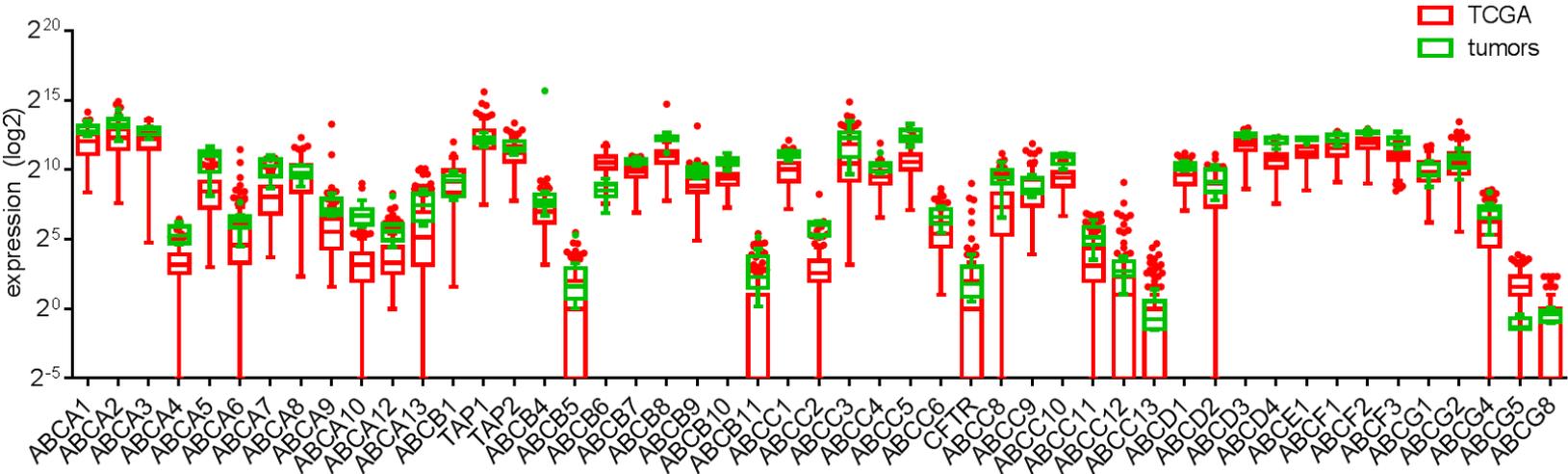
Figure 3: impact of ABCA1, ABCA4, ABCA13, ABCC1, ABCC12, ABCC13 and ABCG1 in clinic. Panel A: Expression of ABCA1, ABCA4, ABCA13, ABCC1, ABCC12, ABCC13 and ABCG1 measured by RT-qPCR in the 51 GBM from OncoNeuroTek. Panel B: ABCA13 overexpression is significantly associated with shorter OS. Panel C: ABCA13 overexpression is significantly associated with shorter PFS.

Supplementary
Figure 1



Supplementary Figure 1: mRNA expression levels of ABCB1, ABCG1 and ABCG2 (from top to bottom) in the 9 GBM-PDCL versus their paired parental tumors measured used RNAseq and Affymetrix microarray expression profiling and validated using qPCR (from left to right). RNAseq levels are closer to qPCR level compared to Affymetrix microarray expression profiling. Error bars are in SD.

Supplementary
Figure 2



Supplementary Figure 2: mRNA expression levels of the 49 ABC transporters using RNA sequencing for the TCGA set of patients compared to the 9 tumors corresponding to our PDCL presented in Figure 1.

Table 1: Expression level of the ABC transporters in GBM-PDCL compared to their parental tumors using two gene expression profiling platforms (*i.e.* RNA-seq and Affymetrix gene expression profiling microarray)

ADJUSTED P-VALUES	RNASEQ	AFFYMETRIX
ABCB1	0.004	0.008
ABCB1/ABCB4	NA	0.004
ABCG1	0.004	<0.001
ABCG2	0.001	0.031

Legend : NA. not available in the design of the microarray. pval. p-value in the paired t-test. p_adjusted.

Table 2: Prognostic value. on overall and progression free survival of expression level of the 49 ABC transporters in glioblastoma patients from the TCGA dataset

ABC TRANSPORTERS	OVERALL SURVIVAL	PROGRESSION FREE SURVIVAL
	(p-value)	(p-value)
ABCA1	0.006	NS
ABCA6	0.013	NS
ABCA13	NS	0.014
ABCC1	NS	0.031
ABCC12	0.002	NS
ABCC13	NS	0.012
ABCG1	0.017	NS

Legend: NS. not statistically significant

Supplementary Table 1: qPCR primers and UPL probes

GENE	PRIMER LEFT	PRIMER RIGHT	UPL (IF USED)
ABCA1	tgctgcatagtcttgggactc	acctcctgtcgcatgtcact	
ABCA6	aaccatctacgggcatagacc	taacgactgcctggattgc	
ABCA13	aagccctgctgtggaaga	ggccagaagaattcagcaag	Probe #21
ABCB1	gaaatttagaagatctgatgtcaaaca	actgtaataataggcatacctggta	Probe #65
ABCC1	ccatgtgggaaaacacatctt	ctgtgcgtgaccaagatcc	
ABCC12	gaggaagatgctggtataatcgtt	gagctggtgctcaggaact	
ABCC13	gccactcataatgaagcaaa	cagagtttgcaaaaagactacaaca	
ABCG1	tcagggaccttcctattcg	ttccttcaggagggtcttgt	Probe #22
ABCG2	tggttagactcaagcacagc	tcgtccctgcttagacatcc	Probe #56

V. Discussion

A. Conception d'un modèle *in vitro* de BHE

La balance « haut-débit » / « efficacité » reste un point crucial pour ces modèles de BHE *in vitro*. Les modèles existants présentent chacun des avantages, mais aussi des inconvénients qui mettent en évidence un besoin d'optimisation de ces modèles pour répondre aux besoins d'évaluation du passage cérébral de nombreuses molécules thérapeutiques. Il faudrait par conséquent soit augmenter l'efficacité des modèles utilisant des cellules faciles d'accès et d'utilisation, soit simplifier l'utilisation des modèles complexes à efficacité prouvée. Le modèle *in vitro* de BHE développé dans ce projet visait ce premier objectif. Il a cependant montré trop de limites d'efficacité pour permettre d'analyser le passage de chimiothérapies. Ce projet nécessitant plus de temps et d'investissement que celui imparti dans cette thèse, l'optimisation de ce modèle n'a pas été poursuivie. Il reste cependant essentiel de développer de tels modèles dans l'objectif d'évaluer à haut débit le passage de molécules innovantes au travers de la BHE tout en réduisant l'utilisation des modèles *in vivo* dans le respect des normes d'éthique sur l'utilisation des animaux de laboratoire.

Bien qu'idéal pour de nombreuses études, le modèle de cellules endothéliales cérébrales humaines immortalisées hCMEC/D3 n'est pas assez efficace pour réaliser un modèle dans cet objectif. D'autres modèles cellulaires doivent donc être envisagés tels que la lignée hBMEC qui montre une meilleure efficacité dans des modèles simples (Eigenmann et al., 2013).

Malgré les limites du modèle de BHE *in vitro* que nous avons essayé d'adapter ici, ce travail a permis de développer et valider un nouveau modèle de péricytes humains immortalisés. Ce modèle, pourtant recherché, n'avait jusque-là jamais été développé ou publié. Très récemment, un modèle équivalent a été publié, et sa validation complète en fera un bon outil

pour le développement de futurs modèles (Umehara et al., 2017). En particulier, son utilisation dans les nouveaux modèles microfluidiques devrait permettre d'accroître leur efficacité.

Une question est également apparue importante au cours de ce projet : peut-on réaliser une ouverture de la BHE par US sur un modèle de BHE *in vitro* ? Dans l'affirmative, le développement de ce modèle aurait eu une importance plus forte, et les tentatives pour l'établir auraient certainement été poursuivies. Cependant, l'ouverture de la BHE par US étant dépendante de la cavitation des MB, on peut se demander si elle aurait le même impact sur un endothélium en culture 2D que sur un vaisseau sanguin. Ici encore, l'investissement est important. Le développement de ce modèle de BHE *in vitro*, les investigations sur son efficacité, et l'étude de la faisabilité de l'ouverture de ce modèle de BHE par US représente un projet à part entière.

B. Validation de l'efficacité de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons pour potentialiser l'effet des chimiothérapies dans le traitement du glioblastome

1. Vers une étude clinique de phase 2

Nos expérimentations *in vivo* nous ont permis de montrer l'efficacité du traitement par injection de carboplatine couplé à l'ouverture de la BHE par US dans le cadre des GBM. Cette même procédure fait l'objet d'une étude clinique de phase 1 avec le dispositif SonoCloud[®], et doit ensuite faire l'objet d'une étude clinique de phase 2 pour valider l'impact thérapeutique de ce traitement. Les données générées pendant cette thèse en termes de ralentissement de la croissance tumorale et de l'amélioration de la survie des souris traitées par chimiothérapie et

ouverture de la BHE par US s'ajoutent aux autres données déjà acquises par CarThera, et viendront enrichir le dossier d'autorisation que la société s'apprête à soumettre pour la mise en place de l'étude clinique de phase 2. Cependant, le carboplatine présente une forte toxicité systémique pouvant conduire à des effets secondaires importants. Une résistance accrue au carboplatine peut aussi survenir chez certains patients (Stewart, 2007). Malgré une efficacité apparente moins importante pour la doxorubicine liposomale (lipo-dox) que pour le carboplatine dans nos conditions expérimentales, cette chimiothérapie apparaît tout de même être une bonne alternative pour le traitement des patients atteints de GBM. Alors que la lipo-dox montre une efficacité seule chez quelques patients atteints de gliomes, nos résultats ne montrent pas d'impact aussi important (Fabel et al., 2001). L'efficacité accrue de la lipo-dox injecté avant l'ouverture de la BHE par US suggère qu'avec des doses et temps de traitements optimisés, ce traitement pourrait bénéficier aux patients, rejoignant les résultats décrits dans le tableau 7.

2. Recherche de nouveaux agents anti-tumoraux pour le traitement du glioblastome

a) Implications directes des recherches menées dans ce projet

L'efficacité relative de la lipo-dox dans notre modèle permet d'étendre les possibilités de chimiothérapies candidates. Alors que la doxorubicine est neurotoxique, la Lipo-dox n'a pas montré de neurotoxicité. L'encapsulation de chimiothérapies sous une forme liposomale permet de réduire la toxicité des agents, très probablement par une libération plus lente du composé (Golan et al., 2015). Elle permet aussi de protéger la chimiothérapie de l'efflux immédiat. Cela permet alors d'envisager l'utilisation d'autres molécules potentiellement neurotoxique. Des formes liposomales de paclitaxel ont d'ailleurs montré une bonne efficacité en association avec l'ouverture de la BHE par US (Shen et al., 2017). De plus, l'ouverture de la BHE à une particule

de taille importante que représente un liposome permet d'envisager l'utilisation d'autres agents anti-tumoraux de grande taille. L'utilisation de virus oncolytiques se développe dans le traitement de nombreux cancers (Cohn et al., 2017; Heinzerling et al., 2005). L'évaluation de cette classe d'agents anti-tumoraux dans le glioblastome a montré une efficacité parfois importante en cas d'injection intra-tumorale, mais une efficacité plus restreinte en cas d'injection *i.v.* de virus (Freeman et al., 2006; Hellums et al., 2005; Patel et al., 2016). L'ouverture de la BHE par US à ces virus est donc une stratégie à explorer. Enfin, les anticorps, dont la taille de 150 KDa est un frein à leur pénétration cérébrale, sont des agents dont l'activité anti-tumorale est prouvée dans plusieurs cancers (Pegram et al., 1998). Comme décrit précédemment dans la section I.E.5, l'ouverture de la BHE par US a déjà montré une efficacité sur les anticorps, dont l'évaluation dans le traitement des GBM semble prometteuse.

Les immunothérapies par des anticorps anti-CTLA-4 et anti PD-1 ont déjà montré une efficacité dans le traitement de modèles murins de GBM orthotopiques sans ouverture de la BHE (Reardon et al., 2016). Une ouverture de la BHE à ces anticorps thérapeutiques serait très probablement favorable à l'efficacité de ce traitement. De plus, l'impact pro-inflammatoire de l'ouverture de la BHE par US décrit dans la section I.D.3.b). semble synergique avec le concept de traitement immunothérapeutique, et donc en la faveur de l'efficacité de ces traitements. Nous avons mené une étude préliminaire d'ouverture de la BHE par US pour augmenter la pénétration cérébrale d'un anticorps anti-CTLA-4. Les résultats encore trop insuffisants requièrent de plus amples études pour évaluer l'efficacité des immunothérapies anti-CTLA-4, mais aussi anti-PD-L1, dans le contexte d'une BHE ouverte par US. Ces études seront prochainement menées au sein de l'équipe.

Dans notre étude, l'irinotecan montre une meilleure efficacité seul qu'associés à une ouverture de la BHE par US. Bien qu'efficace seul, l'irinotecan a montré chez les patients une trop faible efficacité (Prados et al., 2006). Ces résultats sont surprenants car il a été précédemment démontré qu'avec notre dispositif d'ultrasons sur le lapin sain, l'ouverture de la BHE par US accroît le passage cérébral de SN-38, le métabolite actif de l'irinotecan (Beccaria et al., 2015). De nombreuses différences existent entre cette étude et la nôtre. D'une part, les différences d'efflux, de métabolisme et de clairance entre les deux espèces peuvent intervenir dans la perte d'efficacité de l'irinotecan lorsqu'il est utilisé avec une ouverture de la BHE par US. D'autre part, alors que les animaux étaient sains dans l'étude de passage chez le lapin, la présence de GBM dans le cerveau de nos modèles murins peut avoir modifié les paramètres pharmacocinétiques de cet agent thérapeutique entre autre par l'altération de l'expression de pompes d'efflux (Aronica et al., 2005; Zhang et al., 2003). Le SN-38 est substrat des pompes d'efflux ABCC2 et ABCG2 (section I.D.2.). Alors qu'une baisse d'expression de pompes d'efflux a été rapportée dans la BHE après son ouverture par US (section I.E.2.), l'impact de l'ouverture de la BHE par US sur l'expression des pompes d'efflux par les cellules tumorales n'est pas documenté. On ne peut donc pas exclure qu'une hausse de l'efflux par les cellules tumorales dans le champ acoustique soit responsable d'une résistance à l'irinotecan. Enfin, alors que nous avons travaillé avec l'irinotecan, l'étude menée sur le lapin a été conduite sur son métabolite actif, le SN-38. Cette conversion est généralement effectuée par le métabolisme hépatique. Cependant, cette conversion est possible directement dans la tumeur (Wang et al., 2011). On peut tout de même supposer que le métabolisme hépatique est plus efficace pour cette conversion, et que l'augmentation de l'entrée cérébrale de l'irinotecan le séquestre là où sa conversion en SN-38 est la moins efficace. Dans notre cas, une étude pharmacocinétique

complémentaire pour analyser le passage de l'irinotecan et du SN-38 ainsi que l'étape de conversion de la molécule mère en son métabolite actif permettrait d'évaluer cette hypothèse.

Ces résultats suggèrent aussi que le gain d'efficacité des chimiothérapies utilisées sur un patient dont la BHE a été ouverte par US ne peut être extrapolé d'après sa seule augmentation de passage au travers de la BHE. L'identification de ces paramètres devrait rétablir une prédictibilité de l'efficacité des chimiothérapies sur des patients dont la BHE a été ouverte par US. Il est cependant évident que la réalisation d'études précliniques sur des modèles animaux a une importance majeure pour prouver cette efficacité avant une utilisation clinique. En effet, à ce jour, aucun modèle *in silico* ou *in vitro* ne permet d'obtenir des données complètes sur la pharmacocinétique et la métabolisation des chimiothérapies qui sont essentielles à l'évaluation de l'efficacité de cette méthode de traitement.

La revue de la littérature réalisée dans ce projet a aussi révélé un impact potentiel de la bléomycine dans le traitement du GBM avec une BHE ouverte. Son évaluation non clinique est de fait envisageable pour pouvoir augmenter le nombre de chimiothérapies potentiellement utilisables à l'avenir dans le contexte d'une BHE ouverte par US. Comme l'irinotecan, le topotecan apparaissait comme un agent potentiellement efficace dans ce traitement. Etant une chimiothérapie de la même famille, il est nécessaire de comprendre pourquoi l'injection d'irinotecan après ouverture de la BHE par US a abouti à une perte d'efficacité de l'agent avant d'envisager d'évaluer le topotecan.

b) Autres molécules possibles

De nombreuses études démontrent l'efficacité d'agents anti-tumoraux dans le traitement des GBM. Il est important de ne pas oublier que l'efficacité mesurée *in vitro* ne suffit

pas pour qu'un agent puisse avoir un impact positif sur les traitements des GBM dont la BHE est ouverte par US.

Par exemple, très récemment, une étude à haut débit de sensibilité à 85 chimiothérapies a été menée sur des PDCL de GBM par une autre équipe de recherche. Ils ont montré une forte cytotoxicité envers de cellules de GBM *in vitro* pour trois chimiothérapies : la mitoxantrone, le bortezomib et l'actinomycine-D (Yu et al., 2018). Leur forte efficacité est tentante pour associer ces molécules à l'ouverture de la BHE par US. Ces données doivent cependant être analysées en tenant compte des autres paramètres liés à ces chimiothérapies. La neurotoxicité est un frein potentiellement important avec deux de ces molécules. Le bortezomib peut conduire à la mort du patient en cas d'injection intrathécale (Gilbar and Seger, 2012). Paradoxalement, il est utilisé en cas d'hémorragie intra-cérébrale pour ses propriétés neuroprotectrice et anti-inflammatoire (Sinn et al., 2007). Sa neurotoxicité est donc potentiellement importante, certainement de façon dépendante de la dose utilisée, ce qui l'exclut à priori des molécules intéressantes pour une association avec l'ouverture de la BHE par le SonoCloud®. La neurotoxicité de la mitoxantrone est similaire à celle de la doxorubicine qui fait partie de la même famille de chimiothérapies. Même si des injections intra-artérielles ont été bien tolérées, son injection intrathécale conduit à des complications suggérant une forte neurotoxicité (Ellis et al., 2016; Hall et al., 1989). L'actinomycine-D n'a quant-à elle aucune neurotoxicité rapportée, ce qui associé à son efficacité en fait un bon candidat pour une étude d'utilisation avec une ouverture de la BHE par US.

3. Ouverture au traitement d'autres tumeurs cérébrales

La démonstration de l'efficacité du carboplatine et de la lipo-dox pour traiter des GBM après ouverture de la BHE par US ouvre au traitement de nombreuses tumeurs cérébrales et au passage d'autres agents thérapeutiques. En général, les gliomes de bas grade sont moins invasifs

que les GBM, et peuvent donc le plus souvent être efficacement réséqués. Des traitements adjuvants sont tout de même nécessaires. Ces tumeurs pourront alors bénéficier d'une ouverture de la BHE par US pour améliorer l'efficacité des chimiothérapies. Dans le protocole PCV (Procarbazine, CCNU, Vincristine) souvent utilisé pour le traitement des gliomes, la lomustine possède une bonne pénétration cérébrale, mais celle de la procarbazine est limitée, et celle de la vincristine presque inexistante au travers de la BHE saine. Associer l'ouverture de la BHE à ce régime chimiothérapeutique pourrait alors permettre aux chimiothérapies d'agir au-delà de la seule zone d'altération de la BHE dans la tumeur. Etendre alors la zone d'effet de ces chimiothérapies autour du cœur de la tumeur pourrait permettre d'accroître encore la survie des patients. Parmi les tumeurs primitives du SNC, les gliomes présentant des mutations de l'histone H3 sont parmi les plus agressifs avec des GBM. Rares chez les adultes avec quelques cas de gliomes de la ligne médiane, ces mutations sont fréquentes dans les gliomes pédiatriques. On les trouve surtout dans les gliomes du tronc cérébral. La haute fréquence des mutations de cette histone dans ces tumeurs pédiatriques en fait une cible thérapeutique intéressante. Cependant, les inhibiteurs des HDAC pouvant cibler cette altération sont généralement de grosses molécules. Le panobinostat, avec ses 349g/mol, ne pénètre pas au travers de la BHE. Une ouverture de la BHE pour faire passer cette molécule thérapeutique est donc une stratégie envisagée. Aujourd'hui, des modèles murins de gliomes diffus du tronc cérébral aussi invasifs que les tumeurs des patients pourraient permettre une étude efficace du traitement par le panobinostat avec une BHE ouverte par US (Plessier et al., 2017). Cette stratégie fait déjà l'objet d'une évaluation par un partenaire de CarThera. Enfin, les gliomes étant des tumeurs très angiogéniques, les thérapies par Bevacizumab ont été envisagées pour les traiter. D'un point de vue clinique pourtant, les résultats n'ont pas atteint les objectifs escomptés. Chez l'adulte, le Bevacizumab permet une augmentation de la survie sans progression, mais pas de

la survie globale. Les tumeurs sont très impactées par l'effet anti-angiogénique, conduisant à un ralentissement de la croissance tumorale. Cependant, après son adaptation, la tumeur reprend le dessus et se développe par la suite de façon agressive et très étendue (Tipping et al., 2017). Chez l'enfant, le Bevacizumab n'a montré aucun impact dans le traitement des gliomes (Grill et al., 2018). Ces résultats restent tout de même très cohérents. Bien que l'effet anti-angiogénique du Bevacizumab soit en défaveur de la tumeur, la normalisation des vaisseaux tumoraux va renforcer la BHE dans la tumeur, et ainsi limiter l'efficacité des chimiothérapies concomitantes. Dans ce contexte, une ouverture de la BHE par US permettrait de contrebalancer la normalisation des vaisseaux et restaurer l'efficacité des chimiothérapies concomitantes au traitement par Bevacizumab. Il a déjà été montré chez la souris que l'ouverture de la BHE par US associée à un traitement par Bevacizumab augmentait l'efficacité de ce traitement (Liu et al., 2016c).

Le procédé d'ouverture de la BHE par US combiné avec une chimiothérapie peut aussi être étendu aux autres tumeurs du SNC en dehors des gliomes. Pour le traitement des lymphomes cérébraux, le méthotrexate est généralement utilisé. Sa pénétration cérébrale est elle aussi limitée, et son action pourrait donc être potentialisée par l'ouverture de la BHE. Enfin, le traitement des métastases cérébrales pourrait aussi en bénéficier. Le traitement de métastases cérébrales de cancer du sein par Trastuzumab a été évalué dans des modèles précliniques, et a montré une meilleure efficacité avec une ouverture de la BHE (Kinoshita et al., 2006b).

4. Ouverture au traitement d'autres pathologies du système nerveux central

Nos résultats ouvrent aussi de nouvelles portes vers le traitement d'autres pathologies du SNC. En effet, de nombreuses molécules thérapeutiques souffrent d'un mauvais passage de la BHE. La preuve de concept obtenue pour le traitement des GBM ouvre la voie au

développement dans d'autres pathologies. Les maladies neuro-dégénératives ont une incidence en constante hausse. Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, il a été montré que l'ouverture de la BHE par US suffit à elle seule à induire une élimination des plaques amyloïde- β et à restaurer les capacités mémorielles (Leinenga and Götz, 2015). Ces résultats semblent liés à l'activation des cellules microgliales vraisemblablement par l'influx d'anticorps ou d'albumine lors de l'ouverture de la BHE (Jolesz, 2014; Leinenga and Götz, 2015). C'est dans cet objectif qu'une étude clinique de phase 1 a été initiée à l'hôpital de la Pitié Salpêtrière pour évaluer l'impact de l'ouverture de la BHE par le SonoCloud[®] sur des patients atteints de GBM (NCT03119961). Une étude menée à Toronto avec un autre dispositif est aussi mise en place pour ce même traitement (NCT02986932). L'ouverture de la BHE par US a aussi montré une augmentation du passage cérébral d'anticorps anti-amyloïde beta sur des souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer (Raymond et al., 2008). Une étude d'ouverture de la BHE pour le traitement de la sclérose amyotrophique latérale est aussi menée à Toronto (NCT03321487). Dans le traitement de la maladie de Parkinson et de la schizophrénie, l'utilisation d'un anticorps anti-domaine extracellulaire du récepteur à la dopamine D4 a montré une augmentation de pénétration cérébrale après ouverture de la BHE par US (Kinoshita et al., 2006c). La schizophrénie et l'épilepsie, sont des pathologies nécessitant des traitements à long terme, mais qui peuvent souffrir d'un manque d'efficacité chez certains patients développant des pertes de sensibilité. Des patients traités pour une épilepsie ont reçu en plus de leur traitement un inhibiteur de la Pgp, conduisant à un meilleur contrôle de la maladie (Asadi-Pooya et al., 2013). L'implication de l'efflux des molécules thérapeutiques par cette pompe d'efflux au niveau de la BHE semble donc conditionner l'efficacité de ces traitements. L'ouverture de la BHE par US pourrait alors permettre d'augmenter l'efficacité de ces traitements. Le SonoCloud[®] est un dispositif implanté, et ne nécessite que le générateur pour être activé et pas

de gros appareil tels qu'un IRM pour les traitements. Il pourrait alors permettre un traitement à la demande pour des pathologies nécessitant un traitement régulier en ambulatoire ou même à domicile. Aujourd'hui, l'ensemble de ces pathologies et d'autres maladies du SNC sont donc des cibles envisageables avec le SonoCloud®. Le gain serait alors potentiellement double, sur l'efficacité et la facilité de mise en place des traitements.

C. Impact de l'expression des transporteurs ABC sur le glioblastome

1. Profil d'expression des quarante-neuf transporteurs ABC

Nous avons établi le profil d'expression des gènes des transporteurs ABC dans le GBM. Cette vue globale des quarante-neuf membres de cette famille de gènes n'était pas encore établie. De cette analyse, on peut constater que ABCA2 est l'un des transporteurs ABC les plus exprimés dans les GBM, et ce de façon équivalente par tous les échantillons et lignées.

- Il est intéressant de noter que parmi les transporteurs ABC dont les gènes sont les plus exprimés dans nos échantillons tumoraux, plusieurs sont impliqués dans le transport de lipides (ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCB4 et ABCD3), dont les trois plus exprimés.
- Certains sont impliqués dans le transport de peptides (ABCB8, TAP1 et TAP2).
- ABCE1 présente un rôle potentiellement important dans le GBM. D'une part, il régule la traduction, en contribuant à l'initiation de ce processus, et au recyclage des ribosomes en fin de traduction (Mancera-Martínez et al., 2017). D'autre part, il a été montré que ABCE1 était un régulateur de la prolifération

et de la migration de cellules tumorales en régulant la dynamique du cytosquelette d'actine (Yu et al., 2017). Cette fonction lui confère un rôle de point de contrôle de l'entrée en mitose dans le cycle cellulaire (Jiao et al., 2017). Il a aussi été montré que la forte expression du gène de ABCE1 était corrélée à une hausse de prolifération de cellules tumorales, et à l'inhibition des voies apoptotiques (Wei et al., 2017).

- ABCF1 est impliqué dans la régulation de l'immunité innée (Guo et al., 2015; Powell et al., 2013; Wilcox et al., 2017).
- Enfin, certaines pompes d'efflux responsables de résistances aux chimiothérapies sont représentées (ABCF2, ABCC5, ABCC3 et ABCC1) (Fletcher et al., 2010; Vasiliou et al., 2009).

Il semble donc que le trafic des lipides soit particulièrement important dans les tumeurs de GBM. Il n'est cependant pas possible d'exclure que cette expression soit normale dans le cerveau ou de façon ubiquitaire, et ne soit pas seulement due au caractère tumoral des échantillons. Il est aussi intéressant de signaler que les transporteurs ABCA2 et ABCA3 sont impliqués dans des mécanismes de résistance à la mitoxantrone et aux anthracyclines respectivement (Boonstra et al., 2004; Koch et al., 2016). Cette donnée est cependant nuancée par l'efficacité de la mitoxantrone rapportée sur des PDCL de GBM (Yu et al., 2018). La forte expression d'ABCA2 dans nos échantillons de GBM devrait contribuer à une résistance de ces cellules. Il est tout de même possible qu'ABCA2 interfère bien avec la mitoxantrone, mais de façon insuffisante par rapport à sa grande efficacité. On peut aussi se demander si, comme nos PDCL, celles utilisées par ce groupe de recherche ont bien conservé cette expression d'ABCA2 lors de sa mise en culture.

Le profil d'expression des transporteurs ABC dans la lignée U251 est nettement différent de celui de nos lignées et tumeurs.

- L'expression des transporteurs ABCA1, ABCA2, ABCA3 et ABCB4 est nettement réduite, soulevant la question du caractère essentiel envisagé dans le paragraphe suivant. Cependant, ABCD3 impliqué aussi dans le transport de lipides est nettement plus exprimé dans la lignée U251, pouvant contrebalancer la perte d'expression des gènes des quatre autres.
- Le maintien de l'expression d'ABCE1 dans la lignée U251 semble en adéquation avec son rôle dans la tumorigénèse décrit dans le paragraphe précédent.
- Hormis TAP2 dont l'expression est maintenue, l'expression des gènes des transporteurs ABC impliqués dans le transport de peptides est réduite.
- L'expression du gène *ABCF1* impliqué dans la régulation de l'immunité innée est nettement accrue dans la lignée U251, soulevant un impact potentiellement plus important de cette lignée sur le système immunitaire en cas de greffe sur un modèle murin.
- L'expression de la majorité des transporteurs ABC impliqués dans la résistance aux chimiothérapies est perdue, sauf pour ABCC5 dont l'expression est maintenue, et ABCC3 dont l'expression est nettement augmentée dans la lignée U251.
- *ABCB6* est très fortement exprimé dans la lignée U251. Il n'était cependant pas parmi les transporteurs ABC les plus exprimés dans nos lignées et tumeurs. *ABCB6* est impliqué dans le transport de métaux pour la synthèse d'hèmes (cofacteurs renfermant un atome de fer). Il serait aussi impliqué dans la

réduction du stress oxydatif, et la résistance à des agents thérapeutiques (Boswell-Casteel et al., 2017).

2. Evaluation clinique de l'impact de l'expression des gènes des transporteurs ABC sur le pronostic des patients atteints de glioblastome

L'identification d'ABCA13 comme marqueur pronostique des GBM soulève de nombreuses questions, puisque son rôle physiologique et ses substrats ne sont pas connus. Hormis une implication dans quelques cancers, la littérature est très pauvre. L'ensemble des patients évalués dans ce projet ont été traités par le protocole standard incluant une radiothérapie avec TMZ concomitant et une chimiothérapie adjuvante au TMZ. Nous avons alors envisagé qu'ABCA13 soit impliqué dans l'efflux du TMZ, puisque la forte expression de ABCA13 était de mauvais pronostic chez ces patients. Nous n'avons pas constaté de corrélation entre son expression et la sensibilité au TMZ sur plusieurs PDCL. Cependant, le TMZ est substrat de la Pgp etABCC1, et pourtant aucune corrélation n'a été établie entre l'expression de ces deux transporteurs ABC à la sensibilité des PDCL au TMZ. La résistance au TMZ étant clairement multifactorielle, une simple étude de corrélation n'a pas permis d'affirmer si ABCA13 était impliqué. Dans la littérature, ABCA13 a été corrélé à des résistances aux chimiothérapies dans les carcinomes rénaux (Yun et al., 2017). Cette étude va alors dans le sens d'une implication dans la résistance au TMZ dans le GBM. Cependant, très récemment, ABCA13 a été identifié comme un gène majeur dans la régulation de la progression métastatique des cancers du sein (Krøigård et al., 2018). Cette étude va plus dans le sens d'une implication d'ABCA13 dans la tumorigénèse et l'agressivité des tumeurs. L'extinction d'ABCA13 dans les neurones de drosophiles a conduit au développement de troubles du spectre de l'autisme, de façon cohérente avec les observations faites chez des singes (Ueoka et al., 2018; Yoshida et al., 2016).

L'implication d'ABCA13 dans la survenue de la maladie, et non dans son traitement, va aussi dans le sens d'un rôle fonctionnel et non de résistance.

Le rôle d'ABCA13 reste donc à élucider dans le GBM. L'induction de son expression dans une PDCL qui ne l'exprime pas, et son extinction dans une PDCL qui l'exprime fortement est nécessaire pour comprendre son rôle. Des tests de viabilité sur ces lignées vis-à-vis du TMZ et de la radiothérapie permettront de savoir si elle intervient dans un mécanisme de résistance. Des greffes et tests d'invasion/migration permettront de savoir si son implication influe sur l'agressivité de ces tumeurs.

VI. Conclusion

Il était initialement envisagé de sélectionner des chimiothérapies candidates d'après la littérature et de les valider sur un modèle de BHE *in vitro*. La relativement grande quantité de données disponibles dans la littérature a permis à elle seule une sélection raisonnée des chimiothérapies à évaluer, compensant l'inefficacité du modèle *in vitro* évalué. Le développement de ce modèle de BHE *in vitro* a néanmoins permis de développer un modèle de péricytes humains immortalisés efficace.

Les chimiothérapies identifiées ont été évaluées avec ou sans ouverture de la BHE par US sur un modèle in-vivo. Nous avons démontré ici l'efficacité du carboplatine pour traiter des modèles murins de GBM lorsque la BHE est préalablement ouverte par US. Cette efficacité accrue du carboplatine est corrélée à une hausse significative de l'entrée du carboplatine dans le cerveau, et une baisse du volume tumoral. Ces données viennent renforcer le bien fondé du passage de cette procédure déjà évaluée en étude clinique de phase 1 vers une prochaine étude clinique de phase 2 permettant d'évaluer l'efficacité du traitement chez les patients. Contrairement à l'irinotecan, la lipo-dox a lui aussi montré une efficacité dans le cadre de ce traitement, certes moins importante que le carboplatine, mais qui permettra de proposer une alternative au carboplatine le cadre d'autres essais cliniques. L'inefficacité de l'irinotecan dans notre modèle soulève quant-à lui des interrogations sur les paramètres ayant conduit à ce résultat. Il est donc nécessaire de mieux comprendre ce phénomène pour rétablir la corrélation entre hausse de passage et hausse d'efficacité.

Nous avons aussi pu établir le profil d'expression des transporteurs ABC dans le GBM. Ce profil d'expression est conservé par les PDCL, mais s'est perdu à mesure des dérives pour la lignée commerciale U251, qui en fait un modèle moins adapté à l'étude de ces transporteurs et de leur impact sur la sensibilité des cellules aux chimiothérapies.

Nous avons aussi pu montrer qu'ABCA13 est un marqueur pronostique indépendant pour les patients atteints de GBM traités par le protocole standard de première ligne.

La BHE et la BHT sont des obstacles biophysiques à l'efficacité des traitements des tumeurs cérébrales. Une meilleure compréhension de leur fonctionnement biologique et physique permet (*e.g.* ultrasons) et permettra (*e.g.* ciblage des pompes d'efflux) de développer des stratégies pour les contourner et accroître l'efficacité des traitements neuro-oncologiques.

VII. Bibliographie

- Abbott, N.J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 200, 629–638.
- Abolhoda, A., Wilson, A.E., Ross, H., Danenberg, P.V., Burt, M., and Scotto, K.W. (1999). Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after in vivo exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 3352–3356.
- Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J. Clin. Invest.* 112, 1142–1151.
- Alavijeh, M.S., Chishty, M., Qaiser, M.Z., and Palmer, A.M. (2005). Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2, 554–571.
- Anand, P., Kunnumakkara, A.B., Kunnumakara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai, O.S., Sung, B., and Aggarwal, B.B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* 25, 2097–2116.
- Aparicio-Blanco, J., Martín-Sabroso, C., and Torres-Suárez, A.-I. (2016). In vitro screening of nanomedicines through the blood brain barrier: A critical review. *Biomaterials* 103, 229–255.
- Aronica, E., Gorter, J.A., Redeker, S., van Vliet, E.A., Ramkema, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van der Valk, P., Leenstra, S., Baayen, J.C., et al. (2005). Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia* 46, 849–857.
- Aryal, M., Vykhodtseva, N., Zhang, Y.-Z., Park, J., and McDannold, N. (2013). Multiple treatments with liposomal doxorubicin and ultrasound-induced disruption of blood-tumor and blood-brain barriers improve outcomes in a rat glioma model. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 169, 103–111.
- Aryal, M., Park, J., Vykhodtseva, N., Zhang, Y.-Z., and McDannold, N. (2015). Enhancement in blood-tumor barrier permeability and delivery of liposomal doxorubicin using focused ultrasound and microbubbles: evaluation during tumor progression in a rat glioma model. *Phys. Med. Biol.* 60, 2511–2527.
- Aryal, M., Fischer, K., Gentile, C., Gitto, S., Zhang, Y.-Z., and McDannold, N. (2017). Effects on P-Glycoprotein Expression after Blood-Brain Barrier Disruption Using Focused Ultrasound and Microbubbles. *PloS One* 12, e0166061.
- Asadi-Pooya, A.A., Razavizadegan, S.M.A., Abdi-Ardekani, A., and Sperling, M.R. (2013). Adjunctive use of verapamil in patients with refractory temporal lobe epilepsy: a pilot study. *Epilepsy Behav.* EB 29, 150–154.

- Baghirov, H., Snipstad, S., Sulheim, E., Berg, S., Hansen, R., Thorsen, F., Mørch, Y., Davies, C. de L., and Åslund, A.K.O. (2018). Ultrasound-mediated delivery and distribution of polymeric nanoparticles in the normal brain parenchyma of a metastatic brain tumour model. *PLOS ONE* *13*, e0191102.
- Bakay, L., Ballantine, H.T., Hueter, T.F., and Sosa, D. (1956). Ultrasonically produced changes in the blood-brain barrier. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* *76*, 457–467.
- Basto, D., Trovisco, V., Lopes, J.M., Martins, A., Pardal, F., Soares, P., and Reis, R.M. (2005). Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *109*, 207–210.
- Beccaria, K., Canney, M., Goldwirt, L., Fernandez, C., Adam, C., Piquet, J., Autret, G., Clément, O., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., et al. (2013). Opening of the blood-brain barrier with an unfocused ultrasound device in rabbits. *J. Neurosurg.* *119*, 887–898.
- Beccaria, K., Canney, M., Goldwirt, L., Fernandez, C., Piquet, J., Perier, M.-C., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., and Carpentier, A. (2015). Ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier to enhance temozolomide and irinotecan delivery: an experimental study in rabbits. *J. Neurosurg.* 1–9.
- Beier, D., Schulz, J.B., and Beier, C.P. (2011). Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells - much more complex than expected. *Mol. Cancer* *10*, 128.
- Bello, M.J., de Campos, J.M., Kusak, M.E., Vaquero, J., Sarasa, J.L., Pestaña, A., and Rey, J.A. (1994). Molecular analysis of genomic abnormalities in human gliomas. *Cancer Genet. Cytogenet.* *73*, 122–129.
- Bhattacharya, S., Das, A., Mallya, K., and Ahmad, I. (2007). Maintenance of retinal stem cells by Abcg2 is regulated by notch signaling. *J. Cell Sci.* *120*, 2652–2662.
- Bickel, U. (2005). How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *2*, 15–26.
- Bigner, S.H., Mark, J., Burger, P.C., Mahaley, M.S., Bullard, D.E., Muhlbaier, L.H., and Bigner, D.D. (1988). Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res.* *48*, 405–411.
- Bing, K.F., Howles, G.P., Qi, Y., Palmeri, M.L., and Nightingale, K.R. (2009). Blood-brain barrier (BBB) disruption using a diagnostic ultrasound scanner and Definity in Mice. *Ultrasound Med. Biol.* *35*, 1298–1308.
- Bonakdar, M., Graybill, P.M., and Davalos, R.V. (2017). A microfluidic model of the blood-brain barrier to study permeabilization by pulsed electric fields. *RSC Adv.* *7*, 42811–42818.

Boonstra, R., Timmer-Bosscha, H., van Echten-Arends, J., van der Kolk, D.M., van den Berg, A., de Jong, B., Tew, K.D., Poppema, S., and de Vries, E.G.E. (2004). Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. *Br. J. Cancer* 90, 2411–2417.

Boswell-Casteel, R.C., Fukuda, Y., and Schuetz, J.D. (2017). ABCB6, an ABC Transporter Impacting Drug Response and Disease. *AAPS J.* 20, 8.

Burgio, D.E., Gosland, M.P., and McNamara, P.J. (1996). Modulation effects of cyclosporine on etoposide pharmacokinetics and CNS distribution in the rat utilizing microdialysis. *Biochem. Pharmacol.* 51, 987–992.

Büsches, R., Weber, R.G., Actor, B., Lichter, P., Collins, V.P., and Reifenberger, G. (1999). Amplification and expression of cyclin D genes (CCND1, CCND2 and CCND3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 9, 435–442; discussion 432-433.

Butt, A.M., Jones, H.C., and Abbott, N.J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol.* 429, 47–62.

Calmon, R., Puget, S., Varlet, P., Dangouloff-Ros, V., Blauwblomme, T., Beccaria, K., Grevent, D., Sainte-Rose, C., Castel, D., Debily, M.-A., et al. (2017). Cerebral blood flow changes after radiation therapy identifies pseudo-progression in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Neuro-Oncol.*

Candelario-Jalil, E., Yang, Y., and Rosenberg, G.A. (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 158, 983–994.

Carpentier, A., Canney, M., Vignot, A., Reina, V., Beccaria, K., Horodyckid, C., Karachi, C., Leclercq, D., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., et al. (2016). Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci. Transl. Med.* 8, 343re2.

Caskey, C.F., Stieger, S.M., Qin, S., Dayton, P.A., and Ferrara, K.W. (2007). Direct observations of ultrasound microbubble contrast agent interaction with the microvessel wall. *J. Acoust. Soc. Am.* 122, 1191–1200.

Caspani, E.M., Crossley, P.H., Redondo-Garcia, C., and Martinez, S. (2014). Glioblastoma: a pathogenic crosstalk between tumor cells and pericytes. *PloS One* 9, e101402.

Chatterjee, S., and Naik, U.P. (2012). Pericyte-endothelial cell interaction: a survival mechanism for the tumor vasculature. *Cell Adhes. Migr.* 6, 157–159.

Chaves, C., Shawahna, R., Jacob, A., Scherrmann, J.-M., and Declèves, X. (2014). Human ABC transporters at blood-CNS interfaces as determinants of CNS drug penetration. *Curr. Pharm. Des.* 20, 1450–1462.

- Chen, C.C., Taniguchi, T., and D'Andrea, A. (2007). The Fanconi anemia (FA) pathway confers glioma resistance to DNA alkylating agents. *J. Mol. Med.* 85, 497–509.
- Chen, P.-Y., Liu, H.-L., Hua, M.-Y., Yang, H.-W., Huang, C.-Y., Chu, P.-C., Lyu, L.-A., Tseng, I.-C., Feng, L.-Y., Tsai, H.-C., et al. (2010). Novel magnetic/ultrasound focusing system enhances nanoparticle drug delivery for glioma treatment. *Neuro-Oncol.* 12, 1050–1060.
- Chen, Y.-C., Chiang, C.-F., Wu, S.-K., Chen, L.-F., Hsieh, W.-Y., and Lin, W.-L. (2015). Targeting microbubbles-carrying TGF β 1 inhibitor combined with ultrasound sonication induce BBB/BTB disruption to enhance nanomedicine treatment for brain tumors. *J. Controlled Release* 211, 53–62.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139–152.
- Chiang, M.-H., Chang, L.-W., Wang, J.-W., Lin, L.-C., and Tsai, T.-H. (2015). Herb-drug pharmacokinetic interaction of a traditional chinese medicine jia-wei-xiao-yao-san with 5-Fluorouracil in the blood and brain of rat using microdialysis. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* 2015, 729679.
- Cho, E.E., Drazic, J., Ganguly, M., Stefanovic, B., and Hynynen, K. (2011). Two-photon fluorescence microscopy study of cerebrovascular dynamics in ultrasound-induced blood-brain barrier opening. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 1852–1862.
- Cho, H., Lee, H.-Y., Han, M., Choi, J.-R., Ahn, S., Lee, T., Chang, Y., and Park, J. (2016). Localized Down-regulation of P-glycoprotein by Focused Ultrasound and Microbubbles induced Blood-Brain Barrier Disruption in Rat Brain. *Sci. Rep.* 6, 31201.
- Choi, J.J., Feshitan, J.A., Baseri, B., Wang, S., Tung, Y.-S., Borden, M.A., and Konofagou, E.E. (2010). Microbubble-size dependence of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening in mice in vivo. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 57, 145–154.
- Choi, J.J., Selert, K., Vlachos, F., Wong, A., and Konofagou, E.E. (2011). Noninvasive and localized neuronal delivery using short ultrasonic pulses and microbubbles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16539–16544.
- Chu, P.-C., Chai, W.-Y., Tsai, C.-H., Kang, S.-T., Yeh, C.-K., and Liu, H.-L. (2016). Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening: Association with Mechanical Index and Cavitation Index Analyzed by Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic-Resonance Imaging. *Sci. Rep.* 6, 33264.
- Cohn, D.E., Sill, M.W., Walker, J.L., O'Malley, D., Nagel, C.I., Rutledge, T.L., Bradley, W., Richardson, D.L., Moxley, K.M., and Aghajanian, C. (2017). Randomized phase IIB evaluation

of weekly paclitaxel versus weekly paclitaxel with oncolytic reovirus (Reolysin®) in recurrent ovarian, tubal, or peritoneal cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.* *146*, 477–483.

Colone, M., Calcabrini, A., Toccaceli, L., Bozzuto, G., Stringaro, A., Gentile, M., Cianfriglia, M., Ciervo, A., Caraglia, M., Budillon, A., et al. (2008). The multidrug transporter P-glycoprotein: a mediator of melanoma invasion? *J. Invest. Dermatol.* *128*, 957–971.

Crespo, I., Vital, A.L., Nieto, A.B., Rebelo, O., Tão, H., Lopes, M.C., Oliveira, C.R., French, P.J., Orfao, A., and Taberner, M.D. (2011). Detailed characterization of alterations of chromosomes 7, 9, and 10 in glioblastomas as assessed by single-nucleotide polymorphism arrays. *J. Mol. Diagn. JMD* *13*, 634–647.

Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *N. Engl. J. Med.* *358*, 502–511.

Crone, C., and Olesen, S.P. (1982). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* *241*, 49–55.

Cserr, H.F., and Ostrach, L.H. (1974). Bulk flow of interstitial fluid after intracranial injection of blue dextran 2000. *Exp. Neurol.* *45*, 50–60.

Cuadrado, E., Ortega, L., Hernández-Guillamon, M., Penalba, A., Fernández-Cadenas, I., Rosell, A., and Montaner, J. (2008). Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 207–214.

Cucullo, L., Hossain, M., Puvenna, V., Marchi, N., and Janigro, D. (2011). The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci.* *12*, 40.

Curran, C.S., and Bertics, P.J. (2012). Eosinophils in glioblastoma biology. *J. Neuroinflammation* *9*, 11.

Davis, W., Boyd, J.T., Ile, K.E., and Tew, K.D. (2004). Human ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) positively regulates low-density lipoprotein receptor expression and negatively regulates cholesterol esterification in Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1683*, 89–100.

De Carli, E., Wang, X., and Puget, S. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* *360*, 2248; author reply 2249.

Declèves, X., Amiel, A., Delattre, J.-Y., and Scherrmann, J.-M. (2006). Role of ABC transporters in the chemoresistance of human gliomas. *Curr. Cancer Drug Targets* *6*, 433–445.

Deng, J., Huang, Q., Wang, F., Liu, Y., Wang, Z., Wang, Z., Zhang, Q., Lei, B., and Cheng, Y. (2012). The role of caveolin-1 in blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound combined with microbubbles. *J. Mol. Neurosci. MN* *46*, 677–687.

- Deshpande, A., Sicinski, P., and Hinds, P.W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* 24, 2909–2915.
- Di, L., Kerns, E.H., Fan, K., McConnell, O.J., and Carter, G.T. (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* 38, 223–232.
- Dogan, S., Hedberg, M.L., Ferris, R.L., Rath, T.J., Assaad, A.M., and Chiosea, S.I. (2014). Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma in a low-incidence population. *Head Neck* 36, 511–516.
- Dong, J., Zhao, Y., Huang, Q., Fei, X., Diao, Y., Shen, Y., Xiao, H., Zhang, T., Lan, Q., and Gu, X. (2011). Glioma stem/progenitor cells contribute to neovascularization via transdifferentiation. *Stem Cell Rev.* 7, 141–152.
- Dréan, A., Goldwirt, L., Verreault, M., Canney, M., Schmitt, C., Guehenec, J., Delattre, J.-Y., Carpentier, A., and Idhah, A. (2016). Blood-brain barrier, cytotoxic chemotherapies and glioblastoma. *Expert Rev. Neurother.* 16, 1285–1300.
- Dréan, A., Rosenberg, S., Lejeune, F.-X., Goli, L., Nadaradjane, A.A., Guehenec, J., Schmitt, C., Verreault, M., Bielle, F., Mokhtari, K., et al. (2018). ATP binding cassette (ABC) transporters: expression and clinical value in glioblastoma. *J. Neurooncol.*
- Dubois, L.G., Campanati, L., Righy, C., D'Andrea-Meira, I., Spohr, T.C.L. de S.E., Porto-Carreiro, I., Pereira, C.M., Balça-Silva, J., Kahn, S.A., DosSantos, M.F., et al. (2014a). Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 418.
- Dubois, M., Le Joncour, V., Tonon, M.-C., Anouar, Y., Proust, F., Morin, F., Gandolfo, P., Joly, F., Hilber, P., and Castel, H. (2014b). Evaluation of the impact of the cancer therapy everolimus on the central nervous system in mice. *PLoS One* 9, e113533.
- Eich, M., Roos, W.P., Nikolova, T., and Kaina, B. (2013). Contribution of ATM and ATR to the resistance of glioblastoma and malignant melanoma cells to the methylating anticancer drug temozolomide. *Mol. Cancer Ther.* 12, 2529–2540.
- Eigenmann, D.E., Xue, G., Kim, K.S., Moses, A.V., Hamburger, M., and Oufir, M. (2013). Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood–brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS* 10, 33.
- El Hallani, S., Colin, C., El Houfi, Y., Idhah, A., Boisselier, B., Marie, Y., Ravassard, P., Labussière, M., Mokhtari, K., Thomas, J.-L., et al. (2014). Tumor and endothelial cell hybrids participate in glioblastoma vasculature. *BioMed Res. Int.* 2014, 827327.

- Ellingson, B.M., Chung, C., Pope, W.B., Boxerman, J.L., and Kaufmann, T.J. (2017). Pseudoprogression, radionecrosis, inflammation or true tumor progression? challenges associated with glioblastoma response assessment in an evolving therapeutic landscape. *J. Neurooncol.* *134*, 495–504.
- Ellis, J.A., Cooke, J., Singh-Moon, R.P., Wang, M., Bruce, J.N., Emala, C.W., Bigio, I.J., and Joshi, S. (2016). Safety, feasibility, and optimization of intra-arterial mitoxantrone delivery to gliomas. *J. Neurooncol.* *130*, 449–454.
- Eramo, A., Ricci-Vitiani, L., Zeuner, A., Pallini, R., Lotti, F., Sette, G., Piloizzi, E., Larocca, L.M., Peschle, C., and De Maria, R. (2006). Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* *13*, 1238–1241.
- Erasimus, H., Gobin, M., Niclou, S., and Van Dyck, E. (2016). DNA repair mechanisms and their clinical impact in glioblastoma. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* *769*, 19–35.
- Erber, R., Thurnher, A., Katsen, A.D., Groth, G., Kerger, H., Hammes, H.-P., Menger, M.D., Ullrich, A., and Vajkoczy, P. (2004). Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 338–340.
- Evan, G., and Littlewood, T. (1998). A matter of life and cell death. *Science* *281*, 1317–1322.
- Fabel, K., Dietrich, J., Hau, P., Wismeth, C., Winner, B., Przywara, S., Steinbrecher, A., Ullrich, W., and Bogdahn, U. (2001). Long-term stabilization in patients with malignant glioma after treatment with liposomal doxorubicin. *Cancer* *92*, 1936–1942.
- Fan, C.-H., Ting, C.-Y., Lin, H.-J., Wang, C.-H., Liu, H.-L., Yen, T.-C., and Yeh, C.-K. (2013a). SPIO-conjugated, doxorubicin-loaded microbubbles for concurrent MRI and focused-ultrasound enhanced brain-tumor drug delivery. *Biomaterials* *34*, 3706–3715.
- Fan, C.-H., Ting, C.-Y., Liu, H.-L., Huang, C.-Y., Hsieh, H.-Y., Yen, T.-C., Wei, K.-C., and Yeh, C.-K. (2013b). Antiangiogenic-targeting drug-loaded microbubbles combined with focused ultrasound for glioma treatment. *Biomaterials* *34*, 2142–2155.
- Fan, C.-H., Ting, C.-Y., Chang, Y.-C., Wei, K.-C., Liu, H.-L., and Yeh, C.-K. (2015). Drug-loaded bubbles with matched focused ultrasound excitation for concurrent blood-brain barrier opening and brain-tumor drug delivery. *Acta Biomater.* *15*, 89–101.
- Fan, C.-H., Cheng, Y.-H., Ting, C.-Y., Ho, Y.-J., Hsu, P.-H., Liu, H.-L., and Yeh, C.-K. (2016). Ultrasound/Magnetic Targeting with SPIO-DOX-Microbubble Complex for Image-Guided Drug Delivery in Brain Tumors. *Theranostics* *6*, 1542–1556.
- Fife, B.T., and Bluestone, J.A. (2008). Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* *224*, 166–182.

- Figarella-Branger, D., Colin, C., Coulibaly, B., Quilichini, B., Maues De Paula, A., Fernandez, C., and Bouvier, C. (2008). [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev. Neurol. (Paris)* *164*, 505–515.
- Fischer, U., Müller, H.W., Sattler, H.P., Feiden, K., Zang, K.D., and Meese, E. (1995). Amplification of the MET gene in glioma. *Genes. Chromosomes Cancer* *12*, 63–65.
- Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J., and Norris, M.D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 147–156.
- Freeman, A.I., Zakay-Rones, Z., Gomori, J.M., Linetsky, E., Rasooly, L., Greenbaum, E., Rozenman-Yair, S., Panet, A., Libson, E., Irving, C.S., et al. (2006). Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *13*, 221–228.
- Gandhi, M.K., Tellam, J.T., and Khanna, R. (2004). Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* *125*, 267–281.
- Ghebranious, N., and Donehower, L.A. (1998). Mouse models in tumor suppression. *Oncogene* *17*, 3385–3400.
- Gilbar, P., and Seger, A.C. (2012). Deaths reported from the accidental intrathecal administration of bortezomib. *J. Oncol. Pharm. Pract. Off. Publ. Int. Soc. Oncol. Pharm. Pract.* *18*, 377–378.
- Goh, K.Y.C., Poon, W.S., Chan, D.T.M., and Ip, C.P. (2005). Tissue plasminogen activator expression in meningiomas and glioblastomas. *Clin. Neurol. Neurosurg.* *107*, 296–300.
- Golan, T., Grenader, T., Ohana, P., Amitay, Y., Shmeeda, H., La-Beck, N.M., Tahover, E., Berger, R., and Gabizon, A.A. (2015). Pegylated liposomal mitomycin C prodrug enhances tolerance of mitomycin C: a phase 1 study in advanced solid tumor patients. *Cancer Med.* *4*, 1472–1483.
- Goldwirt, L., Beccaria, K., Carpentier, A., Farinotti, R., and Fernandez, C. (2014). Irinotecan and temozolomide brain distribution: a focus on ABCB1. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *74*, 185–193.
- Goldwirt, L., Canney, M., Horodyckid, C., poupon, J., Mourah, S., Vignot, A., Chapelon, J.-Y., and Carpentier, A. (2015). Enhanced brain distribution of carboplatin in a primate model after blood-brain barrier disruption using an implantable ultrasound device. *Cancer Chemother. Pharmacol.*
- Goutal, S., Langer, O., Auvity, S., Andrieux, K., Coulon, C., Caillé, F., Gervais, P., Cisternino, S., Declèves, X., and Tournier, N. (2018). Intravenous infusion for the controlled exposure to

the dual ABCB1 and ABCG2 inhibitor elacridar in nonhuman primates. *Drug Deliv. Transl. Res.*

Grill, J., Massimino, M., Bouffet, E., Azizi, A.A., McCowage, G., Cañete, A., Saran, F., Le Deley, M.-C., Varlet, P., Morgan, P.S., et al. (2018). Phase II, Open-Label, Randomized, Multicenter Trial (HERBY) of Bevacizumab in Pediatric Patients With Newly Diagnosed High-Grade Glioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* JCO2017760611.

Guo, F., Ding, Y., Caberoy, N., Alvarado, G., Wang, F., Chen, R., and Li, W. (2015). ABCF1 extrinsically regulates retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* 26, 2311–2320.

Hall, C., Dougherty, W.J., Lebish, I.J., Brock, P.G., and Man, A. (1989). Warning against use of intrathecal mitoxantrone. *Lancet Lond. Engl.* 1, 734.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., and Phipps, R.P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 23, 144–150.

Hartz, A.M.S., and Bauer, B. (2011). ABC transporters in the CNS - an inventory. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12, 656–673.

Hatherell, K., Couraud, P.-O., Romero, I.A., Weksler, B., and Pilkington, G.J. (2011). Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J. Neurosci. Methods* 199, 223–229.

Heinzerling, L., Künzi, V., Oberholzer, P.A., Kündig, T., Naim, H., and Dummer, R. (2005). Oncolytic measles virus in cutaneous T-cell lymphomas mounts antitumor immune responses in vivo and targets interferon-resistant tumor cells. *Blood* 106, 2287–2294.

Hellums, E.K., Markert, J.M., Parker, J.N., He, B., Perbal, B., Roizman, B., Whitley, R.J., Langford, C.P., Bharara, S., and Gillespie, G.Y. (2005). Increased efficacy of an interleukin-12-secreting herpes simplex virus in a syngeneic intracranial murine glioma model. *Neuro-Oncol.* 7, 213–224.

van der Helm, M.W., van der Meer, A.D., Eijkel, J.C.T., van den Berg, A., and Segerink, L.I. (2016). Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. *Tissue Barriers* 4, e1142493.

van der Helm, M.W., Odijk, M., Frimat, J.-P., van der Meer, A.D., Eijkel, J.C.T., van den Berg, A., and Segerink, L.I. (2017). Fabrication and Validation of an Organ-on-chip System with Integrated Electrodes to Directly Quantify Transendothelial Electrical Resistance. *J. Vis. Exp. JoVE.*

Helms, H.C., Abbott, N.J., Burek, M., Cecchelli, R., Couraud, P.-O., Deli, M.A., Förster, C., Galla, H.J., Romero, I.A., Shusta, E.V., et al. (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 862–890.

Hilgendorf, C., Ahlin, G., Seithel, A., Artursson, P., Ungell, A.-L., and Karlsson, J. (2007). Expression of Thirty-six Drug Transporter Genes in Human Intestine, Liver, Kidney, and Organotypic Cell Lines. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1333–1340.

Hillen, F., and Griffioen, A.W. (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 489–502.

Hirano, A., Kawanami, T., and Llena, J.F. (1994). Electron microscopy of the blood-brain barrier in disease. *Microsc. Res. Tech.* 27, 543–556.

Horodyckid, C., Canney, M., Vignot, A., Boisgard, R., Drier, A., Huberfeld, G., Francois, C., Prigent, A., Santin, M., Adam, C., et al. (2015). Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device : a multiparametric study in primates. *J Neurosurg.*

Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., and Sarkar, S. (2014). Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers* 6, 1769–1792.

Huang, Y., Hoffman, C., Rajappa, P., Kim, J.-H., Hu, W., Huse, J., Tang, Z., Li, X., Weksler, B., Bromberg, J., et al. (2014). Oligodendrocyte progenitor cells promote neovascularization in glioma by disrupting the blood-brain barrier. *Cancer Res.* 74, 1011–1021.

Hunter, C., Smith, R., Cahill, D.P., Stephens, P., Stevens, C., Teague, J., Greenman, C., Edkins, S., Bignell, G., Davies, H., et al. (2006). A Hypermutation Phenotype and Somatic MSH6 Mutations in Recurrent Human Malignant Gliomas after Alkylator Chemotherapy. *Cancer Res.* 66, 3987–3991.

Ichimura, K., Schmidt, E.E., Goike, H.M., and Collins, V.P. (1996). Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13, 1065–1072.

Ihara, A., Wada, K., Yoneda, M., Fujisawa, N., Takahashi, H., and Nakajima, A. (2007). Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer. *J. Pharmacol. Sci.* 103, 24–32.

Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., et al. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci. Transl. Med.* 4, 147ra111.

Ilf, J.J., Wang, M., Zeppenfeld, D.M., Venkataraman, A., Plog, B.A., Liao, Y., Deane, R., and Nedergaard, M. (2013). Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 18190–18199.

Iyer, L., and Ratain, M.J. (1998). Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. *Eur. J. Cancer* *34*, 1493–1499.

Jacobs, S., McCully, C.L., Murphy, R.F., Bacher, J., Balis, F.M., and Fox, E. (2010). Extracellular fluid concentrations of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in brain, muscle, and blood measured using microdialysis in nonhuman primates. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *65*, 817–824.

Jalali, S., Huang, Y., Dumont, D.J., and Hynynen, K. (2010). Focused ultrasound-mediated bbb disruption is associated with an increase in activation of AKT: experimental study in rats. *BMC Neurol.* *10*, 114.

Jenkins, R.B., Blair, H., Ballman, K.V., Giannini, C., Arusell, R.M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P.D., et al. (2006). A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* *66*, 9852–9861.

de Jesus, B.B., and Blasco, M.A. (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet. TIG* *29*, 513–520.

Jiao, X.-F., Huang, C.-J., Wu, D., Zhang, J.-Y., Long, Y.-T., Chen, F., Li, X., and Huo, L.-J. (2017). Abce1 orchestrates M-phase entry and cytoskeleton architecture in mouse oocyte. *Oncotarget* *8*, 39012–39020.

Jolesz, F.A. (2014). Science to practice: opening the blood-brain barrier with focused ultrasound—a potential treatment for Alzheimer disease? *Radiology* *273*, 631–633.

Kannan, K., Inagaki, A., Silber, J., Gorovets, D., Zhang, J., Kasthuber, E.R., Heguy, A., Petrini, J.H., Chan, T.A., and Huse, J.T. (2012). Whole-exome sequencing identifies ATRX mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. *Oncotarget* *3*, 1194–1203.

Kansy, M., Senner, F., and Gubernator, K. (1998). Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* *41*, 1007–1010.

Karpel-Massler, G., Pareja, F., Aimé, P., Shu, C., Chau, L., Westhoff, M.-A., Halatsch, M.-E., Cray, J.F., Canoll, P., and Siegelin, M.D. (2014). PARP inhibition restores extrinsic apoptotic sensitivity in glioblastoma. *PloS One* *9*, e114583.

Karsy, M., Guan, J., Cohen, A.L., Jensen, R.L., and Colman, H. (2017). New Molecular Considerations for Glioma: IDH, ATRX, BRAF, TERT, H3 K27M. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17, 19.

Khuong-Quang, D.-A., Buczkowicz, P., Rakopoulos, P., Liu, X.-Y., Fontebasso, A.M., Bouffet, E., Bartels, U., Albrecht, S., Schwartzentruber, J., Letourneau, L., et al. (2012). K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 439–447.

Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L.A., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovannella, B.C., et al. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 6021–6026.

Kim, D.C., Kim, K.U., and Kim, Y.Z. (2016). Prognostic Role of Methylation Status of the MGMT Promoter Determined Quantitatively by Pyrosequencing in Glioblastoma Patients. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 59, 26–36.

Kim, N.K., Ahn, J.Y., Song, J., Kim, J.K., Han, J.H., An, H.J., Chung, H.M., Joo, J.Y., Choi, J.U., Lee, K.S., et al. (2003). Expression of the DNA repair enzyme, N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG) in astrocytic tumors. *Anticancer Res.* 23, 1417–1423.

Kim, Y.S., Kim, S.S., Cho, J.J., Choi, D.H., Hwang, O., Shin, D.H., Chun, H.S., Beal, M.F., and Joh, T.H. (2005). Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 3701–3711.

Kimura, T., Watanabe, T., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., et al. (2000). Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem. J.* 348 Pt 1, 71–76.

Kinoshita, M., McDannold, N., Jolesz, F.A., and Hynynen, K. (2006a). Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood–brain barrier disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 11719–11723.

Kinoshita, M., McDannold, N., Jolesz, F.A., and Hynynen, K. (2006b). Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood–brain barrier disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11719–11723.

Kinoshita, M., McDannold, N., Jolesz, F.A., and Hynynen, K. (2006c). Targeted delivery of antibodies through the blood–brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340, 1085–1090.

Kiviniemi, V., Wang, X., Korhonen, V., Keinänen, T., Tuovinen, T., Autio, J., LeVan, P., Keilholz, S., Zang, Y.-F., Hennig, J., et al. (2016). Ultra-fast magnetic resonance

encephalography of physiological brain activity - Glymphatic pulsation mechanisms? *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 1033–1045.

Klotz, A.R., Lindvere, L., Stefanovic, B., and Hynynen, K. (2010). Temperature change near microbubbles within a capillary network during focused ultrasound. *Phys. Med. Biol.* 55, 1549–1561.

Knobbe, C.B., and Reifenberger, G. (2003). Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B (Akt) signal transduction pathway in glioblastomas. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 13, 507–518.

Knobbe, C.B., Reifenberger, J., and Reifenberger, G. (2004). Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 108, 467–470.

Kobus, T., Zervantonakis, I.K., Zhang, Y., and McDannold, N.J. (2016). Growth inhibition in a brain metastasis model by antibody delivery using focused ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption. *J. Controlled Release* 238, 281–288.

Koch, R., Aung, T., Vogel, D., Chapuy, B., Wenzel, D., Becker, S., Sinzig, U., Venkataramani, V., von Mach, T., Jacob, R., et al. (2016). Nuclear Trapping through Inhibition of Exosomal Export by Indomethacin Increases Cytostatic Efficacy of Doxorubicin and Pixantrone. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 22, 395–404.

Komori, T. (2017). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 57, 301–311.

Kore, R.A., and Abraham, E.C. (2014). Inflammatory cytokines, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, upregulated in glioblastoma multiforme, raise the levels of CRYAB in exosomes secreted by U373 glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453, 326–331.

Kovacs, Z., Werner, B., Rassi, A., Sass, J.O., Martin-Fiori, E., and Bernasconi, M. (2014). Prolonged survival upon ultrasound-enhanced doxorubicin delivery in two syngenic glioblastoma mouse models. *J. Controlled Release* 187, 74–82.

Kovacs, Z.I., Kim, S., Jikaria, N., Qureshi, F., Milo, B., Lewis, B.K., Bresler, M., Burks, S.R., and Frank, J.A. (2017). Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E75–E84.

Krøigård, A.B., Larsen, M.J., Lænkholm, A.-V., Knoop, A.S., Jensen, J.D., Bak, M., Mollenhauer, J., Thomassen, M., and Kruse, T.A. (2018). Identification of metastasis driver genes by massive parallel sequencing of successive steps of breast cancer progression. *PloS One* 13, e0189887.

Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F., and Lammers, T. (2013). Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65, 1852–1865.

Kuss, B.J., Corbo, M., Lau, W.M., Fennell, D.A., Dean, N.M., and Cotter, F.E. (2002). In vitro and in vivo downregulation of MRP1 by antisense oligonucleotides: a potential role in neuroblastoma therapy. *Int. J. Cancer* 98, 128–133.

de Lange, E.C., Danhof, M., de Boer, A.G., and Breimer, D.D. (1997). Methodological considerations of intracerebral microdialysis in pharmacokinetic studies on drug transport across the blood-brain barrier. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 25, 27–49.

Lecointre, C., Desrues, L., Joubert, J.E., Perzo, N., Guichet, P.-O., Le Joncour, V., Brulé, C., Chabbert, M., Leduc, R., Prézeau, L., et al. (2015). Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: prototypic chemotaxic mechanism in glioma. *Oncogene* 34, 5080–5094.

Lee, B.H., Taylor, M.G., Robinet, P., Smith, J.D., Schweitzer, J., Sehayek, E., Falzarano, S.M., Magi-Galluzzi, C., Klein, E.A., and Ting, A.H. (2013). Dysregulation of Cholesterol Homeostasis in Human Prostate Cancer through Loss of ABCA1. *Cancer Res.* 73, 1211–1218.

Lee, J., Lund-Smith, C., Borboa, A., Gonzalez, A.M., Baird, A., and Eliceiri, B.P. (2009). Glioma-induced remodeling of the neurovascular unit. *Brain Res.* 1288, 125–134.

Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I., and Hla, T. (1999). Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99, 301–312.

Lee, S.-R., Guo, S.-Z., Scannevin, R.H., Magliaro, B.C., Rhodes, K.J., Wang, X., and Lo, E.H. (2007). Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci. Lett.* 417, 1–5.

Leinenga, G., and Götz, J. (2015). Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci. Transl. Med.* 7, 278ra33.

Leslie, E.M., Deeley, R.G., and Cole, S.P.C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 216–237.

Lesueur, P., Chevalier, F., El-Habr, E.A., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., Castera, L., Müller, E., Stefan, D., and Saintigny, Y. (2018). Radiosensitization Effect of Talazoparib, a Parp Inhibitor, on Glioblastoma Stem Cells Exposed to Low and High Linear Energy Transfer Radiation. *Sci. Rep.* 8, 3664.

- Li, Y., Zhou, H., Xing, E., Dassarath, M., Ren, J., Dong, X., Liu, H., Yang, K., and Wu, G. (2011). Contribution of decreased expression of Ku70 to enhanced radiosensitivity by sodium butyrate in glioblastoma cell line (U251). *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 31, 359–364.
- Liao, Z., Robey, R.W., Guirouilh-Barbat, J., To, K.K.W., Polgar, O., Bates, S.E., and Pommier, Y. (2008). Reduced Expression of DNA Topoisomerase I in SF295 Human Glioblastoma Cells Selected for Resistance to Homocamptothecin and Difelamotecan. *Mol. Pharmacol.* 73, 490–497.
- Lin, J.H. (2008). CSF as a surrogate for assessing CNS exposure: an industrial perspective. *Curr. Drug Metab.* 9, 46–59.
- Lin, Q., Mao, K.-L., Tian, F.-R., Yang, J.-J., Chen, P.-P., Xu, J., Fan, Z.-L., Zhao, Y.-P., Li, W.-F., Zheng, L., et al. (2015). Brain tumor-targeted delivery and therapy by focused ultrasound introduced doxorubicin-loaded cationic liposomes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 77, 269–280.
- Lin, Y.-L., Wu, M.-T., and Yang, F.-Y. (2018). Pharmacokinetics of doxorubicin in glioblastoma multiforme following ultrasound-Induced blood-brain barrier disruption as determined by microdialysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 149, 482–487.
- Lippmann, E.S., Al-Ahmad, A., Azarin, S.M., Palecek, S.P., and Shusta, E.V. (2014). A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci. Rep.* 4, 4160.
- Liu, A., Hou, C., Chen, H., Zong, X., and Zong, P. (2016a). Genetics and Epigenetics of Glioblastoma: Applications and Overall Incidence of IDH1 Mutation. *Front. Oncol.* 6, 16.
- Liu, H.-L., Pan, C.-H., Ting, C.-Y., and Hsiao, M.-J. (2010a). Opening of the blood-brain barrier by low-frequency (28-kHz) ultrasound: a novel pinhole-assisted mechanical scanning device. *Ultrasound Med. Biol.* 36, 325–335.
- Liu, H.-L., Hua, M.-Y., Yang, H.-W., Huang, C.-Y., Chu, P.-C., Wu, J.-S., Tseng, I.-C., Wang, J.-J., Yen, T.-C., Chen, P.-Y., et al. (2010b). Magnetic resonance monitoring of focused ultrasound/magnetic nanoparticle targeting delivery of therapeutic agents to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15205–15210.
- Liu, H.-L., Hua, M.-Y., Chen, P.-Y., Chu, P.-C., Pan, C.-H., Yang, H.-W., Huang, C.-Y., Wang, J.-J., Yen, T.-C., and Wei, K.-C. (2010c). Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment. *Radiology* 255, 415–425.

Liu, H.-L., Fan, C.-H., Ting, C.-Y., and Yeh, C.-K. (2014). Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors: current progress and overview. *Theranostics* 4, 432–444.

Liu, H.-L., Hsu, P.-H., Lin, C.-Y., Huang, C.-W., Chai, W.-Y., Chu, P.-C., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Yang, L.-Y., Kuo, J.S., et al. (2016b). Focused Ultrasound Enhances Central Nervous System Delivery of Bevacizumab for Malignant Glioma Treatment. *Radiology* 152444.

Liu, H.-L., Hsu, P.-H., Lin, C.-Y., Huang, C.-W., Chai, W.-Y., Chu, P.-C., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Yang, L.-Y., Kuo, J.S., et al. (2016c). Focused Ultrasound Enhances Central Nervous System Delivery of Bevacizumab for Malignant Glioma Treatment. *Radiology* 281, 99–108.

Lo, E.H., Pan, Y., Matsumoto, K., and Kowall, N.W. (1994). Blood-brain barrier disruption in experimental focal ischemia: comparison between in vivo MRI and immunocytochemistry. *Magn. Reson. Imaging* 12, 403–411.

López-Lázaro, M. (2008). The warburg effect: why and how do cancer cells activate glycolysis in the presence of oxygen? *Anticancer Agents Med. Chem.* 8, 305–312.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820.

Ludwig, K., and Kornblum, H.I. (2017). Molecular markers in glioma. *J. Neurooncol.*

Lyck, R., Ruderisch, N., Moll, A.G., Steiner, O., Cohen, C.D., Engelhardt, B., Makrides, V., and Verrey, F. (2009). Culture-induced changes in blood-brain barrier transcriptome: implications for amino-acid transporters in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1491–1502.

Mancera-Martínez, E., Brito Querido, J., Valasek, L.S., Simonetti, A., and Hashem, Y. (2017). ABCE1: A special factor that orchestrates translation at the crossroad between recycling and initiation. *RNA Biol.* 14, 1279–1285.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 23, 549–555.

Marty, B., Larrat, B., Van Landeghem, M., Robic, C., Robert, P., Port, M., Le Bihan, D., Pernot, M., Tanter, M., Lethimonnier, F., et al. (2012). Dynamic study of blood-brain barrier closure after its disruption using ultrasound: a quantitative analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1948–1958.

McDannold, N., Vykhodtseva, N., Jolesz, F.A., and Hynynen, K. (2004). MRI investigation of the threshold for thermally induced blood-brain barrier disruption and brain tissue damage in the rabbit brain. *Magn. Reson. Med.* *51*, 913–923.

McDannold, N., Vykhodtseva, N., and Hynynen, K. (2008a). Effects of acoustic parameters and ultrasound contrast agent dose on focused-ultrasound induced blood-brain barrier disruption. *Ultrasound Med. Biol.* *34*, 930–937.

McDannold, N., Vykhodtseva, N., and Hynynen, K. (2008b). Blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound and circulating preformed microbubbles appears to be characterized by the mechanical index. *Ultrasound Med. Biol.* *34*, 834–840.

McDannold, N., Zhang, Y., and Vykhodtseva, N. (2011). Blood-brain barrier disruption and vascular damage induced by ultrasound bursts combined with microbubbles can be influenced by choice of anesthesia protocol. *Ultrasound Med. Biol.* *37*, 1259–1270.

McDannold, N., Arvanitis, C.D., Vykhodtseva, N., and Livingstone, M.S. (2012). Temporary disruption of the blood-brain barrier by use of ultrasound and microbubbles: safety and efficacy evaluation in rhesus macaques. *Cancer Res.* *72*, 3652–3663.

McMahon, D., and Hynynen, K. (2017). Acute Inflammatory Response Following Increased Blood-Brain Barrier Permeability Induced by Focused Ultrasound is Dependent on Microbubble Dose. *Theranostics* *7*, 3989–4000.

McMahon, D., Bendayan, R., and Hynynen, K. (2017). Acute effects of focused ultrasound-induced increases in blood-brain barrier permeability on rat microvascular transcriptome. *Sci. Rep.* *7*, 45657.

Mei, J., Cheng, Y., Song, Y., Yang, Y., Wang, F., Liu, Y., and Wang, Z. (2009). Experimental Study on Targeted Methotrexate Delivery to the Rabbit Brain via Magnetic Resonance Imaging-Guided Focused Ultrasound. *J. Ultrasound Med.* *28*, 871–880.

Mensch, J., Melis, A., Mackie, C., Verreck, G., Brewster, M.E., and Augustijns, P. (2010). Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* *74*, 495–502.

Mezhybovska, M., Wikström, K., Ohd, J.F., and Sjölander, A. (2006). The inflammatory mediator leukotriene D4 induces beta-catenin signaling and its association with antiapoptotic Bcl-2 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 6776–6784.

Mizee, M.R., Wooldrik, D., Lakeman, K.A.M., van het Hof, B., Drexhage, J.A.R., Geerts, D., Bugiani, M., Aronica, E., Mebius, R.E., Prat, A., et al. (2013). Retinoic acid induces blood-brain barrier development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 1660–1671.

Müller, J., Esső, K., Dargó, G., Könczöl, Á., and Balogh, G.T. (2015). Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 79, 53–60.

Nakagawa, S., Deli, M.A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., Tanaka, K., and Niwa, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* 54, 253–263.

Newton, H.B. (2012). Neurological complications of chemotherapy to the central nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* 105, 903–916.

Noell, S., Wolburg-Buchholz, K., Mack, A.F., Ritz, R., Tatagiba, M., Beschorner, R., Wolburg, H., and Fallier-Becker, P. (2012). Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma. *Cell Tissue Res.* 347, 429–441.

Ohtsuki, S., Ikeda, C., Uchida, Y., Sakamoto, Y., Miller, F., Glacial, F., Decleves, X., Scherrmann, J.-M., Couraud, P.-O., Kubo, Y., et al. (2013). Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model. *Mol. Pharm.* 10, 289–296.

O'Reilly, M.A., and Hynynen, K. (2012a). Ultrasound enhanced drug delivery to the brain and central nervous system. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* 28, 386–396.

O'Reilly, M.A., and Hynynen, K. (2012b). Blood-brain barrier: real-time feedback-controlled focused ultrasound disruption by using an acoustic emissions-based controller. *Radiology* 263, 96–106.

O'Reilly, M.A., Hough, O., and Hynynen, K. (2017). Blood-Brain Barrier Closure Time After Controlled Ultrasound-Induced Opening Is Independent of Opening Volume. *J. Ultrasound Med.* 36, 475–483.

Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncol.* 16, 896–913.

Pahud, B.A., and Ault, K.A. (2015). The Expanded Impact of Human Papillomavirus Vaccine. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 29, 715–724.

Pallis, M., and Russell, N. (2000). P-glycoprotein plays a drug-efflux-independent role in augmenting cell survival in acute myeloblastic leukemia and is associated with modulation of a sphingomyelin-ceramide apoptotic pathway. *Blood* 95, 2897–2904.

- Park, E.-J., Zhang, Y.-Z., Vykhodtseva, N., and McDannold, N. (2012a). Ultrasound-mediated blood-brain/blood-tumor barrier disruption improves outcomes with trastuzumab in a breast cancer brain metastasis model. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *163*, 277–284.
- Park, J., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., Jolesz, F.A., and McDannold, N.J. (2012b). The kinetics of blood brain barrier permeability and targeted doxorubicin delivery into brain induced by focused ultrasound. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *162*, 134–142.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807–1812.
- Patel, D.M., Foreman, P.M., Nabors, L.B., Riley, K.O., Gillespie, G.Y., and Markert, J.M. (2016). Design of a Phase I Clinical Trial to Evaluate M032, a Genetically Engineered HSV-1 Expressing IL-12, in Patients with Recurrent/Progressive Glioblastoma Multiforme, Anaplastic Astrocytoma, or Gliosarcoma. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* *27*, 69–78.
- Patrick, J.T., Nolting, M.N., Goss, S.A., Dines, K.A., Clendenon, J.L., Rea, M.A., and Heimburger, R.F. (1990). Ultrasound and the blood-brain barrier. *Adv. Exp. Med. Biol.* *267*, 369–381.
- Peaston, A.E., Gardaneh, M., Franco, A.V., Hocker, J.E., Murphy, K.M., Farnsworth, M.L., Catchpoole, D.R., Haber, M., Norris, M.D., Lock, R.B., et al. (2001). MRP1 gene expression level regulates the death and differentiation response of neuroblastoma cells. *Br. J. Cancer* *85*, 1564–1571.
- Pegram, M.D., Lipton, A., Hayes, D.F., Weber, B.L., Baselga, J.M., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, S.A., Twaddell, T., Glaspy, J.A., et al. (1998). Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *16*, 2659–2671.
- Pinkham, M.B., Telford, N., Whitfield, G.A., Colaco, R.J., O’Neill, F., and McBain, C.A. (2015). FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation. *Clin. Oncol.* *27*, 445–453.
- Plessier, A., Le Dret, L., Varlet, P., Beccaria, K., Lacombe, J., Mériaux, S., Geffroy, F., Fiette, L., Flamant, P., Chrétien, F., et al. (2017). New in vivo avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget* *8*, 52543–52559.
- Powell, T.R., Tansey, K.E., Breen, G., Farmer, A.E., Craig, I.W., Uher, R., McGuffin, P., D’Souza, U.M., and Schalkwyk, L.C. (2013). ATP-binding cassette sub-family F member 1 (ABCF1) is identified as a putative therapeutic target of escitalopram in the inflammatory cytokine pathway. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* *27*, 609–615.

- Prados, M.D., Lamborn, K., Yung, W.K.A., Jaeckle, K., Robins, H.I., Mehta, M., Fine, H.A., Wen, P.Y., Cloughesy, T., Chang, S., et al. (2006). A phase 2 trial of irinotecan (CPT-11) in patients with recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *Neuro-Oncol.* 8, 189–193.
- Puget, S., Beccaria, K., Blauwblomme, T., Roujeau, T., James, S., Grill, J., Zerah, M., Varlet, P., and Sainte-Rose, C. (2015). Biopsy in a series of 130 pediatric diffuse intrinsic Pontine gliomas. *Childs Nerv. Syst. ChNS Off. J. Int. Soc. Pediatr. Neurosurg.* 31, 1773–1780.
- Pullen, N.A., Anand, M., Cooper, P.S., and Fillmore, H.L. (2012). Matrix metalloproteinase-1 expression enhances tumorigenicity as well as tumor-related angiogenesis and is inversely associated with TIMP-4 expression in a model of glioblastoma. *J. Neurooncol.* 106, 461–471.
- Raymond, S.B., Skoch, J., Hynynen, K., and Bacskai, B.J. (2007). Multiphoton imaging of ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 393–403.
- Raymond, S.B., Treat, L.H., Dewey, J.D., McDannold, N.J., Hynynen, K., and Bacskai, B.J. (2008). Ultrasound enhanced delivery of molecular imaging and therapeutic agents in Alzheimer’s disease mouse models. *PloS One* 3, e2175.
- Reardon, D.A., Gokhale, P.C., Klein, S.R., Ligon, K.L., Rodig, S.J., Ramkissoon, S.H., Jones, K.L., Conway, A.S., Liao, X., Zhou, J., et al. (2016). Glioblastoma Eradication Following Immune Checkpoint Blockade in an Orthotopic, Immunocompetent Model. *Cancer Immunol. Res.* 4, 124–135.
- Reijerkerk, A., Kooij, G., van der Pol, S.M.A., Khazen, S., Dijkstra, C.D., and de Vries, H.E. (2006). Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 2550–2552.
- Reni, M., Mazza, E., Zanon, S., Gatta, G., and Vecht, C.J. (2017). Central nervous system gliomas. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 113, 213–234.
- Reynés, G., Vila, V., Martín, M., Parada, A., Fleitas, T., Reganon, E., and Martínez-Sales, V. (2011). Circulating markers of angiogenesis, inflammation, and coagulation in patients with glioblastoma. *J. Neurooncol.* 102, 35–41.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824–828.
- Robinson, L.J., Roberts, W.K., Ling, T.T., Lamming, D., Sternberg, S.S., and Roepe, P.D. (1997). Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 11169–11178.

Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J.M., Noel, A., and Cataldo, D. (2008). Emerging roles of ADAM and ADAMTS metalloproteinases in cancer. *Biochimie* 90, 369–379.

Rosenberg, G.A., and Yang, Y. (2007). Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg. Focus* 22, E4.

Roukos, D.H. (2009). Genome-wide association studies: how predictable is a person's cancer risk? *Expert Rev. Anticancer Ther.* 9, 389–392.

Samiotaki, G., Vlachos, F., Tung, Y.-S., and Konofagou, E.E. (2012). A quantitative pressure and microbubble-size dependence study of focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening reversibility in vivo using MRI. *Magn. Reson. Med.* 67, 769–777.

Santaguida, S., Janigro, D., Hossain, M., Oby, E., Rapp, E., and Cucullo, L. (2006). Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier in vitro: a permeability study. *Brain Res.* 1109, 1–13.

Sarkaria, J.N., Hu, L.S., Parney, I.F., Pafundi, D.H., Brinkmann, D.H., Laack, N.N., Giannini, C., Burns, T.C., Kizilbash, S.H., Laramy, J.K., et al. (2017). Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? - A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncol.*

Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V.O., Hatem, S.N., Cohen Aubart, F., Russel, F.G., Mougnot, N., Vrignaud, C., Lechat, P., et al. (2008). Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J. Clin. Invest.* 118, 2747–2757.

Sato, K., Malchinkhuu, E., Horiuchi, Y., Mogi, C., Tomura, H., Tosaka, M., Yoshimoto, Y., Kuwabara, A., and Okajima, F. (2007). Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes. *J. Neurochem.* 103, 2610–2619.

Sboros, V. (2008). Response of contrast agents to ultrasound. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 1117–1136.

Schaich, M., Kestel, L., Pfirrmann, M., Robel, K., Illmer, T., Kramer, M., Dill, C., Ehninger, G., Schackert, G., and Krex, D. (2009). A MDR1 (ABCB1) gene single nucleotide polymorphism predicts outcome of temozolomide treatment in glioblastoma patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 20, 175–181.

Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, C., Schmieider, K., Wesseling, P., Mawrin, C., Hasselblatt, M., et al. (2011). Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 121, 397–405.

Schlegel, J., Stumm, G., Brändle, K., Merdes, A., Mechtersheimer, G., Hynes, N.E., and Kiessling, M. (1994). Amplification and differential expression of members of the erbB-gene family in human glioblastoma. *J. Neurooncol.* 22, 201–207.

Schneider, S.W., Ludwig, T., Tatenhorst, L., Braune, S., Oberleithner, H., Senner, V., and Paulus, W. (2004). Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 107, 272–276.

Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.

Sheikov, N., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Jolesz, F., and Hynynen, K. (2004). Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* 30, 979–989.

Sheikov, N., McDannold, N., Jolesz, F., Zhang, Y.-Z., Tam, K., and Hynynen, K. (2006). Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med. Biol.* 32, 1399–1409.

Sheikov, N., McDannold, N., Sharma, S., and Hynynen, K. (2008). Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med. Biol.* 34, 1093–1104.

Shen, Y., Pi, Z., Yan, F., Yeh, C.-K., Zeng, X., Diao, X., Hu, Y., Chen, S., Chen, X., and Zheng, H. (2017). Enhanced delivery of paclitaxel liposomes using focused ultrasound with microbubbles for treating nude mice bearing intracranial glioblastoma xenografts. *Int. J. Nanomedicine* 12, 5613–5629.

Shin, J., Kong, C., Cho, J.S., Lee, J., Koh, C.S., Yoon, M.-S., Na, Y.C., Chang, W.S., and Chang, J.W. (2018). Focused ultrasound-mediated noninvasive blood-brain barrier modulation: preclinical examination of efficacy and safety in various sonication parameters. *Neurosurg. Focus* 44, E15.

Siflinger-Birnboim, A., Del Vecchio, P.J., Cooper, J.A., Blumenstock, F.A., Shepard, J.M., and Malik, A.B. (1987). Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. *J. Cell. Physiol.* 132, 111–117.

Sinn, D.-I., Lee, S.-T., Chu, K., Jung, K.-H., Kim, E.-H., Kim, J.-M., Park, D.-K., Song, E.-C., Kim, B.-S., Yoon, S.-S., et al. (2007). Proteasomal inhibition in intracerebral hemorrhage: neuroprotective and anti-inflammatory effects of bortezomib. *Neurosci. Res.* 58, 12–18.

Smith, B., and Land, H. (2012). Anticancer Activity of the Cholesterol Exporter ABCA1 Gene. *Cell Rep.* 2, 580–590.

Song, K.-H., Fan, A.C., Hinkle, J.J., Newman, J., Borden, M.A., and Harvey, B.K. (2017). Microbubble gas volume: A unifying dose parameter in blood-brain barrier opening by focused ultrasound. *Theranostics* 7, 144–152.

Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G.M., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., and Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 4009–4014.

Sparreboom, A., Danesi, R., Ando, Y., Chan, J., and Figg, W.D. (2003). Pharmacogenomics of ABC transporters and its role in cancer chemotherapy. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 6, 71–84.

Steiner, O., Coisne, C., Engelhardt, B., and Lyck, R. (2011). Comparison of Immortalized bEnd5 and Primary Mouse Brain Microvascular Endothelial Cells as in vitro Blood–Brain Barrier Models for the Study of T Cell Extravasation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 315–327.

Stewart, D.J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 63, 12–31.

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

Surget, S., Khoury, M.P., and Bourdon, J.-C. (2013). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets Ther.* 7, 57–68.

Syn, N.L., Teng, M.W.L., Mok, T.S.K., and Soo, R.A. (2017). De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol.* 18, e731–e741.

Taccola, C., Cartot-Cotton, S., Valente, D., Barneoud, P., Aubert, C., Boutet, V., Gallen, F., Lochus, M., Nicolic, S., Dodacki, A., et al. (2018). High brain distribution of a new central nervous system drug candidate despite its P-glycoprotein-mediated efflux at the mouse blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 117, 68–79.

Tafani, M., Di Vito, M., Frati, A., Pellegrini, L., De Santis, E., Sette, G., Eramo, A., Sale, P., Mari, E., Santoro, A., et al. (2011). Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J. Neuroinflammation* 8, 32.

Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669.

Thirant, C., Gavard, J., Junier, M.-P., and Chneiweiss, H. (2013). Critical multiple angiogenic factors secreted by glioblastoma stem-like cells underline the need for combinatorial anti-angiogenic therapeutic strategies. *Proteomics Clin. Appl.* 7, 79–90.

Tilling, T., Engelbertz, C., Decker, S., Korte, D., Hüwel, S., and Galla, H.-J. (2002). Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. *Cell Tissue Res.* 310, 19–29.

Timbie, K.F., Afzal, U., Date, A., Zhang, C., Song, J., Wilson Miller, G., Suk, J.S., Hanes, J., and Price, R.J. (2017). MR image-guided delivery of cisplatin-loaded brain-penetrating nanoparticles to invasive glioma with focused ultrasound. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*

Ting, C.-Y., Fan, C.-H., Liu, H.-L., Huang, C.-Y., Hsieh, H.-Y., Yen, T.-C., Wei, K.-C., and Yeh, C.-K. (2012). Concurrent blood-brain barrier opening and local drug delivery using drug-carrying microbubbles and focused ultrasound for brain glioma treatment. *Biomaterials* 33, 704–712.

Tipping, M., Eickhoff, J., and Ian Robins, H. (2017). Clinical outcomes in recurrent glioblastoma with Bevacizumab therapy: An analysis of the literature. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 44, 101–106.

Treat, L.H., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Zhang, Y., Tam, K., and Hynynen, K. (2007). Targeted delivery of doxorubicin to the rat brain at therapeutic levels using MRI-guided focused ultrasound. *Int. J. Cancer* 121, 901–907.

Treat, L.H., Zhang, Y., McDannold, N., and Hynynen, K. (2009). Impact of Focused Ultrasound-enhanced Drug Delivery on Survival in Rats with Glioma. In *AIP Conference Proceedings*, (AIP Publishing), pp. 443–447.

Treat, L.H., McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., and Hynynen, K. (2012). Improved anti-tumor effect of liposomal doxorubicin after targeted blood-brain barrier disruption by MRI-guided focused ultrasound in rat glioma. *Ultrasound Med. Biol.* 38, 1716–1725.

Ueki, K., Ono, Y., Henson, J.W., Efird, J.T., von Deimling, A., and Louis, D.N. (1996). CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 56, 150–153.

Ueoka, I., Kawashima, H., Konishi, A., Aoki, M., Tanaka, R., Yoshida, H., Maeda, T., Ozaki, M., and Yamaguchi, M. (2018). Novel Drosophila model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A. *Exp. Neurol.* 300, 51–59.

Umehara, K., Sun, Y., Hiura, S., Hamada, K., Itoh, M., Kitamura, K., Oshima, M., Iwama, A., Saito, K., Anzai, N., et al. (2017). A New Conditionally Immortalized Human Fetal Brain

Pericyte Cell Line: Establishment and Functional Characterization as a Promising Tool for Human Brain Pericyte Studies. *Mol. Neurobiol.*

Urich, E., Lazic, S.E., Molnos, J., Wells, I., and Freskgård, P.-O. (2012). Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One* 7, e38149.

Van Meir, E.G., Hadjipanayis, C.G., Norden, A.D., Shu, H.-K., Wen, P.Y., and Olson, J.J. (2010). Exciting new advances in neuro-oncology: the avenue to a cure for malignant glioma. *CA. Cancer J. Clin.* 60, 166–193.

Vander Borgh, S., Komuta, M., Libbrecht, L., Katoonizadeh, A., Aerts, R., Dymarkowski, S., Verslype, C., Nevens, F., and Roskams, T. (2008). Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 28, 1370–1380.

Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D.W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics* 3, 281–290.

Vlachos, F., Tung, Y.-S., and Konofagou, E. (2011). Permeability dependence study of the focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening at distinct pressures and microbubble diameters using DCE-MRI. *Magn. Reson. Med.* 66, 821–830.

Voon, H.P.J., Collas, P., and Wong, L.H. (2016). Compromised Telomeric Heterochromatin Promotes ALternative Lengthening of Telomeres. *Trends Cancer* 2, 114–116.

Vykhodtseva, N.I., Hynynen, K., and Damianou, C. (1995). Histologic effects of high intensity pulsed ultrasound exposure with subharmonic emission in rabbit brain in vivo. *Ultrasound Med. Biol.* 21, 969–979.

Waldron-Lynch, F., Deng, S., Preston-Hurlburt, P., Henegariu, O., and Herold, K.C. (2012). Analysis of human biologics with a mouse skin transplant model in humanized mice. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 12, 2652–2662.

Wang, J.D., Khafagy, E.-S., Khanafer, K., Takayama, S., and ElSayed, M.E.H. (2016). Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood–Brain Barrier. *Mol. Pharm.* 13, 895–906.

Wang, W., Ghandi, A., Liebes, L., Louie, S.G., Hofman, F.M., Schönthal, A.H., and Chen, T.C. (2011). Effective conversion of irinotecan to SN-38 after intratumoral drug delivery to an intracranial murine glioma model in vivo. *Laboratory investigation. J. Neurosurg.* 114, 689–694.

Wang, X., Liu, P., Yang, W., Li, L., Li, P., Liu, Z., Zhuo, Z., and Gao, Y. (2014). Microbubbles coupled to methotrexate-loaded liposomes for ultrasound-mediated delivery of methotrexate across the blood-brain barrier. *Int. J. Nanomedicine* 9, 4899–4909.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.

Warren, M.S., Zerangue, N., Woodford, K., Roberts, L.M., Tate, E.H., Feng, B., Li, C., Feuerstein, T.J., Gibbs, J., Smith, B., et al. (2009). Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 59, 404–413.

Warth, A., Kröger, S., and Wolburg, H. (2004). Redistribution of aquaporin-4 in human glioblastoma correlates with loss of agrin immunoreactivity from brain capillary basal laminae. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 107, 311–318.

Weber, A.M., and Ryan, A.J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* 149, 124–138.

Wei, D., Yang, L., Lv, B., and Chen, L. (2017). Genistein suppresses retinoblastoma cell viability and growth and induces apoptosis by upregulating miR-145 and inhibiting its target ABCE1. *Mol. Vis.* 23, 385–394.

Wei, K.-C., Chu, P.-C., Wang, H.-Y.J., Huang, C.-Y., Chen, P.-Y., Tsai, H.-C., Lu, Y.-J., Lee, P.-Y., Tseng, I.-C., Feng, L.-Y., et al. (2013). Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening to enhance temozolomide delivery for glioblastoma treatment: a preclinical study. *PloS One* 8, e58995.

Weksler, B.B., Subileau, E.A., Perrière, N., Charneau, P., Holloway, K., Leveque, M., Tricoire-Leignel, H., Nicotra, A., Bourdoulous, S., Turowski, P., et al. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 1872–1874.

Welsh, J.W., Ellsworth, R.K., Kumar, R., Fjerstad, K., Martinez, J., Nagel, R.B., Eschbacher, J., and Stea, B. (2009). Rad51 protein expression and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 74, 1251–1255.

Wikstrand, C.J., McLendon, R.E., Friedman, A.H., and Bigner, D.D. (1997). Cell surface localization and density of the tumor-associated variant of the epidermal growth factor receptor, EGFRvIII. *Cancer Res.* 57, 4130–4140.

Wilcox, S.M., Arora, H., Munro, L., Xin, J., Fenninger, F., Johnson, L.A., Pfeifer, C.G., Choi, K.B., Hou, J., Hoodless, P.A., et al. (2017). The role of the innate immune response regulatory gene ABCF1 in mammalian embryogenesis and development. *PloS One* 12, e0175918.

- Wilhelm, I., and Krizbai, I.A. (2014). In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol. Pharm.* *11*, 1949–1963.
- Wilkins, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Rep.* *7*, 14.
- de Wit, M.C.Y., de Bruin, H.G., Eijkenboom, W., Sillevius Smitt, P. a. E., and van den Bent, M.J. (2004). Immediate post-radiotherapy changes in malignant glioma can mimic tumor progression. *Neurology* *63*, 535–537.
- Witsch, E., Sela, M., and Yarden, Y. (2010). Roles for growth factors in cancer progression. *Physiol. Bethesda Md* *25*, 85–101.
- Wolburg, H., Noell, S., Fallier-Becker, P., Mack, A.F., and Wolburg-Buchholz, K. (2012). The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol. Aspects Med.* *33*, 579–589.
- Wolchok, J.D., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Rutkowski, P., Grob, J.-J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Wagstaff, J., Schadendorf, D., Ferrucci, P.F., et al. (2017). Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* *377*, 1345–1356.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 6899–6903.
- Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T.A., Lu, C., Paugh, B.S., Becksfors, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., et al. (2012). Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat. Genet.* *44*, 251–253.
- Wuest, D.M., Wing, A.M., and Lee, K.H. (2013). Membrane configuration optimization for a murine in vitro blood-brain barrier model. *J. Neurosci. Methods* *212*, 211–221.
- Xia, C., Zhang, Z., Xue, Y., Wang, P., and Liu, Y. (2009). Mechanisms of the increase in the permeability of the blood-tumor barrier obtained by combining low-frequency ultrasound irradiation with small-dose bradykinin. *J. Neurooncol.* *94*, 41–50.
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., et al. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* *342*, 373–377.
- Xu, Y., and Villalona-Calero, M.A. (2002). Irinotecan: mechanisms of tumor resistance and novel strategies for modulating its activity. *Ann. Oncol.* *13*, 1841–1851.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* *360*, 765–773.

Yang, F.-Y., and Horng, S.-C. (2013a). Ultrasound Mediated Delivery of Liposomal Doxorubicin in Mice with Glioma. *Engineering* 04, 68.

Yang, F.-Y., and Horng, S.-C. (2013b). Chemotherapy of glioblastoma by targeted liposomal platinum compounds with focused ultrasound. *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf. 2013*, 6289–6292.

Yang, F.-Y., Wong, T.-T., Teng, M.-C., Liu, R.-S., Lu, M., Liang, H.-F., and Wei, M.-C. (2012a). Focused ultrasound and interleukin-4 receptor-targeted liposomal doxorubicin for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect in glioblastoma multiforme. *J. Controlled Release* 160, 652–658.

Yang, F.-Y., Wang, H.-E., Liu, R.-S., Teng, M.-C., Li, J.-J., Lu, M., Wei, M.-C., and Wong, T.-T. (2012b). Pharmacokinetic analysis of ¹¹¹In-labeled liposomal Doxorubicin in murine glioblastoma after blood-brain barrier disruption by focused ultrasound. *PloS One* 7, e45468.

Yang, F.-Y., Teng, M.-C., Lu, M., Liang, H.-F., Lee, Y.-R., Yen, C.-C., Liang, M.-L., and Wong, T.-T. (2012c). Treating glioblastoma multiforme with selective high-dose liposomal doxorubicin chemotherapy induced by repeated focused ultrasound. *Int. J. Nanomedicine* 7, 965–974.

Yang, J.J., Milton, M.N., Yu, S., Liao, M., Liu, N., Wu, J.-T., Gan, L., Balani, S.K., Lee, F.W., Prakash, S., et al. (2010). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein affect disposition of tandutinib, a tyrosine kinase inhibitor. *Drug Metab. Lett.* 4, 201–212.

Yin, S., and Van Meir, E. (2009). p53 Pathway Alterations in Brain Tumors. In *CNS Cancer: Models, Markers, Prognostic Factors, Targets and Therapeutic Approaches*, pp. 283–314.

Yoh, K., Ishii, G., Yokose, T., Minegishi, Y., Tsuta, K., Goto, K., Nishiwaki, Y., Kodama, T., Suga, M., and Ochiai, A. (2004). Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 1691–1697.

Yoshida, K., Go, Y., Kushima, I., Toyoda, A., Fujiyama, A., Imai, H., Saito, N., Iriki, A., Ozaki, N., and Isoda, M. (2016). Single-neuron and genetic correlates of autistic behavior in macaque. *Sci. Adv.* 2, e1600558.

Yu, D.M.T., Huynh, T., Truong, A.M., Haber, M., and Norris, M.D. (2015). ABC transporters and neuroblastoma. *Adv. Cancer Res.* 125, 139–170.

Yu, K.K.-H., Taylor, J.T., Pathmanaban, O.N., Youshani, A.S., Beyit, D., Dutko-Gwozdz, J., Benson, R., Griffiths, G., Peers, I., Cueppens, P., et al. (2018). High content screening of patient-derived cell lines highlights the potential of non-standard chemotherapeutic agents for the treatment of glioblastoma. *PloS One* 13, e0193694.

Yu, Q., Han, X., and Tian, D.-L. (2017). Deficiency of Functional Iron-Sulfur Domains in ABCE1 Inhibits the Proliferation and Migration of Lung Adenocarcinomas By Regulating the Biogenesis of Beta-Actin In Vitro. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *44*, 554–566.

Yun, E.-J., Zhou, J., Lin, C.-J., Xu, S., Santoyo, J., Hernandez, E., Lai, C.-H., Lin, H., He, D., and Hsieh, J.-T. (2017). The network of DAB2IP-miR-138 in regulating drug resistance of renal cell carcinoma associated with stem-like phenotypes. *Oncotarget* *8*, 66975–66986.

Zeng, H.-Q., Lü, L., Wang, F., Luo, Y., and Lou, S.-F. (2012). Focused ultrasound-induced blood–brain barrier disruption enhances the delivery of cytarabine to the rat brain. *J. Chemother.* *24*, 358–363.

Zhang, N., Wu, X., Yang, L., Xiao, F., Zhang, H., Zhou, A., Huang, Z., and Huang, S. (2012). FoxM1 inhibition sensitizes resistant glioblastoma cells to temozolomide by downregulating the expression of DNA-repair gene Rad51. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 5961–5971.

Zhang, W., Mojsilovic-Petrovic, J., Andrade, M.F., Zhang, H., Ball, M., and Stanimirovic, D.B. (2003). The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *17*, 2085–2087.

Zhao, G., Huang, Q., Wang, F., Zhang, X., Hu, J., Tan, Y., Huang, N., Wang, Z., Wang, Z., and Cheng, Y. (2018). Targeted shRNA-loaded liposome complex combined with focused ultrasound for blood brain barrier disruption and suppressing glioma growth. *Cancer Lett.* *418*, 147–158.

Zhao, Y.-Z., Chen, L.-J., Lin, Q., Cai, J., Yu, W.-Z., Zhao, Y.-P., Xu, C.-Y., Mao, K.-L., Tian, F.-R., Li, W.-F., et al. (2015). Using FUS induced BBB/BTB-opening technique combined with Doxorubicin liposomes to improve glioma-targeted inhibition. *ResearchGate*.

Zhou, W., Chen, C., Shi, Y., Wu, Q., Gimple, R.C., Fang, X., Huang, Z., Zhai, K., Ke, S.Q., Ping, Y.-F., et al. (2017). Targeting Glioma Stem Cell-Derived Pericytes Disrupts the Blood-Tumor Barrier and Improves Chemotherapeutic Efficacy. *Cell Stem Cell* *21*, 591-603.e4.

Zöchbauer-Müller, S., Filipits, M., Rudas, M., Brunner, R., Krajnik, G., Suchomel, R., Schmid, K., and Pirker, R. (2001). P-glycoprotein and MRP1 expression in axillary lymph node metastases of breast cancer patients. *Anticancer Res.* *21*, 119–124.

Titre : Potentialisation des chimiothérapies dans le traitement du glioblastome : étude des transporteurs ABC et ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons.

Mots clés : chimiothérapie ; ultrasons ; barrière hémato-encéphalique ; glioblastome ; transporteurs ABC

Résumé : Le glioblastome (GBM) est le cancer du cerveau le plus fréquent et grave chez l'adulte. Son pronostic sombre est en partie dû à la résistance de ces tumeurs aux chimiothérapies. L'une des principales causes de ces résistances est l'incapacité des chimiothérapies à pénétrer dans le cerveau depuis le sang à cause de la barrière hémato-encéphalique (BHE), une spécificité des vaisseaux sanguins cérébraux. Par l'injection de microbulles et l'envoi d'ultrasons dans le cerveau, il est possible d'ouvrir cette BHE pour permettre à des chimiothérapies d'entrer dans le cerveau. Nous avons montré que la chimiothérapie carboplatine gagnait en efficacité lorsqu'elle était injectée après ce procédé.

Les GBM peuvent aussi montrer une résistance aux chimiothérapies par des mécanismes génétiques intrinsèques à la tumeur. Nous avons étudié l'expression et l'impact sur le pronostic des patients atteints de GBM des gènes de la famille des transporteurs ABC, dont le membre ABCA13 s'est avéré important.

Title : Potentiation of chemotherapies in the treatment of glioblastoma: study of ABC transporters and opening of the blood-brain barrier by ultrasound

Keywords : chemotherapy ; ultrasound ; blood-brain barrier ; glioblastoma ; ABC transporters

Abstract: Glioblastoma (GBM) is the most frequent and severe brain cancer for adults. Its dark prognosis is partly due to the resistance of these tumors to chemotherapies. One of the main causes of these resistances is the incapacity of chemotherapies to enter the brain from the blood circulation because of the blood-brain barrier (BBB), a specificity of cerebral blood vessels. By the injection of microbubbles and the delivery of ultrasound into the brain, it is possible to open this BBB to allow chemotherapies to enter the brain. We have showed that the chemotherapeutic agent carboplatin gained efficacy when it was injected after this procedure.

GBM can also exhibit resistance to chemotherapies by genetic mechanisms intrinsic to the tumor. We studied the expression and the impact on prognosis for GBM patients of the genes of the ABC transporters family, which member ABCA13 appeared important.

