



**HAL**  
open science

## Effet de la radiothérapie sur la libération de microvésicules tumorales par des cellules de glioblastome.

Haixia Ding

► **To cite this version:**

Haixia Ding. Effet de la radiothérapie sur la libération de microvésicules tumorales par des cellules de glioblastome.. Cancer. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0197 . tel-01751132v2

**HAL Id: tel-01751132**

**<https://hal.science/tel-01751132v2>**

Submitted on 17 Dec 2014

**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.



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

**Thèse**

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE**

**Mention: « Sciences de la vie et de la Santé »**

Par **Haixia DING**

**EFFET DE LA RADIOTHERAPIE SUR LA  
LIBERATION DE MICROVESICULES TUMORALES PAR  
DES CELLULES DE GLIOBLASTOME**

Le 10 décembre 2014

**Membres du jury :**

Rapporteurs :

Mr. Georges NOEL

PU-PH, EA3430- Strasbourg

Mme. Dominique HELLEY

HDR-PH, AP-HP INSERM 765-Paris

Examineurs:

Mme. Monique DONTENWILL

DR2, UMR7213 CNRS-Strasbourg

Mme. Emilie VELOT

MCF, IMOPA UMR7365-Nancy

Mme. Béatrice FAIVRE

PU, CRAN UMR7039 CNRS-Nancy

Mme. Sophie PINEL

MCF, CRAN UMR7039 CNRS-Nancy



## Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier le Docteur Dominique HELLEY ainsi que le Professeur Georges NOËL pour avoir accepté d'être membres de mon jury de doctorat et d'avoir consacré leur temps à la lecture et à l'appréciation de mon travail. Vous trouverez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement le Docteur Monique DONTENWILL ainsi que le Docteur Emilie VELOT pour avoir accepté d'examiner mon travail ; vous me faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

Je tiens à remercier profondément mes deux directrices de thèse :

Tout d'abord, je vous adresse ma gratitude pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire CRAN département SBS (ancien EA-SiGReTO).

Je remercie le Professeur Béatrice FAIVRE pour m'avoir encadrée et soutenue pendant ma thèse, ce qui m'a permis de mener à bien ces travaux. Je vous remercie pour votre point de vue toujours original et pertinent, et la confiance que vous m'avez accordée et trouvez ici les marques de mon profond respect.

Je remercie ma co-directrice, le Docteur Sophie PINEL, pour sa disponibilité, sa rigueur, son assistance, sa patience, son audace scientifique et ses précieux conseils qui m'ont aidé à m'orienter vers les bons chemins. Ton aide précieuse et ce que tu m'as enseigné m'ont permis de préserver ma motivation pour continuer ma thèse et m'ont mené là où je ne serais jamais arrivée seule. Trouve ici l'expression de toute mon estime et ma gratitude.

Je remercie toute l'équipe du laboratoire CRAN département SBS pour leur soutien, leur sympathie et leurs encouragements : M. PLENAT, M. RICHARD, Muriel, Noémie, Karima, Dominique, Tiphaine, Magalie, Meriem et M. Zaiou. Grâce à vous, j'ai pu passer mes 3 ans de thèse dans une ambiance super agréable.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de mes travaux :

Je remercie Valérie pour m'avoir formé à l'utilisation du cytomètre en flux et son aide dans les expérimentations.

Je remercie Paul pour m'avoir permis d'accéder à l'appareil de radiothérapie au service de radiothérapie CHR Metz-Thionville, Hôpital de Mercy.

Je remercie Alicia pour m'avoir appris les techniques expérimentales et son aide dans les expérimentations.

Je remercie Levy et Thierry BASTOGNE pour m'avoir aidé à analyser certains résultats avec patience.

Je remercie Cédric BOURA pour ses conseils et ses excellentes idées pendant ma thèse.

Je n'ai pas oublié les personnes qui m'ont emmené à Metz pour irradier les cellules : Sophie (qui a même perdu 3 points à cause de ça), Magali et Paul. Je vous remercie pour votre gentillesse.

Je souhaite remercier les responsables de la plateforme Nancytomique (CHU-Nancy Brabois) pour m'avoir permis d'accéder à la cytométrie en flux (Navios).

Je remercie les personnes de la plateforme "Service Commun de Microscopie" Université de Lorraine pour m'avoir aidé sur les expérimentations en microscopie électronique à balayage.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et mes amis pour m'avoir soutenue et encouragée pendant toute la durée de mes études et mes recherches.

## Liste des abbreviations

Ang-1	Angiopoïétine-1
Ang-2	Angiopoïétine-2
Akt	Serine threonine protein kinase B (ou PKB)
ARF6	ADP-ribosylation factor 6
mARN	Acide ribonucléique messenger
miARN	microARN
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BM	Membrane basale
BMDCs	Bone marrow-derived cells
CI	Cell Index
CD	Cluster de différenciation
CM	Milieu conditionée
CMF	Cytométrie en flux
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
Dll4	Delta-like ligand-4 (ligand de notch)
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Matrice extracellulaire
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFRvIII	Epidermal growth factor receptor variant III
EPCs	Endothelial progenitor cells
FAK	Focal adhesion kinase
FAS-L	Ligand de FAS
FGF	Fibroblast growth factor

FSC	Forward scatter collection
GBM	Glioblastome
GSCs	Glioma stem-like cells
GTPases	Guanosine triphosphate hydrolase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HIF	Hypoxia inducible factor
HRP	Horseradish peroxidase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells;
ICAM	Inter-cellular adhesion molecule
IDH1	Isocitrate dehydrogenase 1
IGF	Insulin -like growth factor
IGFBP1	Insulin-like growth factor-binding protein 1
IL	Interleukine (-1, -4, -8...)
ILV	vésicules intraluminales
IR	Ionizing irradiation;
LBPA	Lysophosphatidic acid
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCP-1	Monocytes chemotactic protein 1
MDM2	Mouse Double Minute 2
MEB	Microscope Électronique à Balayage
MMP	Matrix metalloprotease
mTOR	mammalian target of rapamycin
MVB	corps multivésiculaires
NTA	Nanoparticle Tracking Analysis
PAF	Paraformaldéhyde
PAI	Plasminogen activaton inhibitor
PBS	Phosphate Buffered Saline;
PDGF	Platelet-derived growth factor

PDFGR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PdI	Indice de polydispersité
PE	Phosphatyléthanolamine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase;
PIP2	Phosphatidyl inositol-diphosphate,
PIP3	Phosphatidyl inositol-triphosphate,
PIGF	Placenta growth factor
PS	Phosphatidylsérine
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RTCA	Real Time Cell Analyzer
SDF-1 $\alpha$	Stromal-derived factor-1 $\alpha$
SDS PAGE	Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
SNC	Système nerveux central
SR	Sulfo-rhodamine
SVF	Sérum de Veau Foetal
SVFd	Sérum de veau foetal déplété en microvésicules
Tampon TBST	Tris-buffered saline tween
TBS	Tampon Tris salin
TCGA	The Cancer Genome Atlas Research Network
TDECs	Tumor –derived endothelial cells
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF	Transforming growth factor
Tie-2	Tunica interna endothelial cell kinase (= TEK: tunica endothelial cell kinase)
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TMVs	Tumor-derived Microvesicles
TMZ	Temozolomide



TRAIL	Tumor necrosis factor-(TNF) related apoptosis-inducing ligand
uPA	Urokinase plasminogen activator
uPAR	Urokinase plasminogen activator receptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification OMS 2007 des gliomes et des tumeurs glioneuronales.....	3
Tableau 2 : Classification moléculaire des glioblastomes d'après les analyses des altérations oncogéniques du TCGA .....	5
Tableau 3 : Différents agents testés dans les GBM récurrents.....	20
Tableau 4 : Dommages radio-induits de l'ADN et leur spécifications physique et Biologique.....	24
Tableau 5 : Liste non-exhaustive des facteurs modifiant la libération des exosomes et "shedding vesicles" d'après la littérature.....	45
Tableau 6 : Liste non-exhaustive des études du profil protéomique des microvésicules tumorales issues de différents cancers.....	49
Tableau 7 : Différentes études sur le profil transcriptomique des TMV .....	50
Tableau 8 : Protéines portées par les TMVs et leur fonction potentielle dans la progression tumorale.....	54
Tableau 9 : Facteurs pro-angiogéniques endogènes dans les gliomes.....	68
Tableau 10 : Facteurs anti-angiogéniques endogènes dans les gliomes.....	69
Tableau 11 : Milieux de culture utilisés dans notre étude.....	91
Tableau 12 : Position des protéines sur la membrane détectées par le kit « Proteome ProfilerTM Human Angiogenesis Array Kit».....	108
Tableau 13 : Tampon de lyse pour l'extraction des protéines de cellules.....	110
Tableau 14 : Liste des tampons utilisés pour le Western-blot.....	110
Tableau 15 : Liste des anticorps avec leur dilution utilisés pour le western blot.....	110
Tableau 16 : Comparaison des techniques NTA et DLS.....	134
Tableau 17 : Synthèse de la modification de la libération des TMVs par les cellules de GBM après irradiation.....	140
Tableau 18 : Synthèse de l'effet de l'irradiation sur les cellules HUVEC et les cellules tumorales via Filtrat et TMVs issus de cellules tumorales.....	152



## Liste des figures

Figure 1 : Caractéristiques histologiques et radiologiques du GBM.....	4
Figure 2 : Principales voies altérées dans du GBM.....	6
Figure 3 : Interconnexions des principales voies de signalisation dérégulées dans les GBM.....	7
Figure 4 : Modèles stochastique et hiérarchique de la progression tumorale.....	8
Figure 5 : Modèle pathologique de l'invasion locale des gliomes.....	10
Figure 6 : Dégradation protéolytique de la membrane basale et la matrice extracellulaire.....	11
Figure 7 : Déstruction de la barrière hémato-encéphalique par les cellules de gliome .....	12
Figure 8 : Temozolomide et sa réaction avec l'ADN.....	15
Figure 9 : Effets des rayonnements ionisants sur les macromolécules intracellulaires.....	22
Figure 10 : Lésions directes et indirectes de l'ADN induites par radiation Ionisante <i>via</i> la radiolyse de l'eau (ROS).....	23
Figure 11 : Réponse cellulaire aux dommages de l'ADN radio-induits.....	24
Figure 12 : Schéma simplifié de la réponse aux dommages de l'ADN radio-induits.....	25
Figure 13 : L'activation d'ATM déclenche une stabilisation de p53, qui induit l'arrêt en G1/S et G2/M.....	26
Figure 14 : Principaux mécanismes de réparation des cassures double brin par ligature d'extrémités non homologues.....	27
Figure 15 : Représentation simplifiée des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque et du rôle central de p53.....	29
Figure 16 : Représentation de la mort mitotique.....	31
Figure 17 : Initiation et médiateurs moléculaires de la sénescence.....	32
Figure 18 : Effet <i>bystander</i> .....	34
Figure 19 : Schéma représentant l'invasion des cellules tumorales induite par l'irradiation.....	35
Figure 20 : Effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales et l'angiogenèse.....	36
Figure 21 : Représentation schématique des vésicules extracellulaires.....	40
Figure 22 : Schéma représentatif de la biogenèse des exosomes.....	41
Figure 23 : Schéma simplifié de la formation des ILV.....	41
Figure 24 : Fusion des MVB avec la membrane plasmique et morphologie des exosomes.....	42
Figure 25 : Fonctions des flippases, floppases et scramblases dans la membrane plasmique .....	43
Figure 26 : Mécanismes proposés pour la formation des "shedding vesicles" dérivés d'une Membrane.....	44
Figure 27 : Nombre d'études, d'investigations, et des différents contenus des microvésicules d'après la base de données EVpedia.....	46

Figure 28 : Constituants protéiques des exosomes.....	47
Figure 29 : Schéma montrant certaines protéines et des lipides généralement présents dans les TMVs.....	49
Figure 30 : Processus de l'interaction intercellulaire par les exosomes.....	51
Figure 31 : Principales voies d'internalisation des microvésicules dans les cellules réceptrices .....	53
Figure 32 : Représentation schématique des processus affectés par les TMV dans le cancer .....	57
Figure 33 : Protocoles pour la récupération de "shedding vesicles" et des exosomes.....	61
Figure 34 : Principaux mécanismes de néovascularisation dans le gliome.....	65
Figure 35 : Cooption vasculaire des cellules tumorales autour des vaisseaux pré-existants....	66
Figure 36 : Processus simplifié de l'angiogenèse.....	67
Figure 37 : Balance angiogénique entre les activateurs et inhibiteurs angiogéniques.....	67
Figure 38: Etapes de l'angiogenèse et molécules intervenant dans ce processus.....	75
Figure 39 : Vasculogenèse.....	77
Figure 40 : Mimétisme vasculaire.....	78
Figure 41 : Trans-différenciation des cellules glioblastome-endothéliales.....	80
Figure 42 : Schéma simplifié du contexte scientifique de la thèse.....	86
Figure 43: Schéma descriptif du protocole d'irradiation.....	92
Figure 44 : Exemple de l'analyse de l'apoptose en cytométrie en flux.....	94
Figure 45: Principe de mesure de la taille des particules en suspension par DLS.....	98
Figure 46 : Schéma descriptif de l'appareil Zétasizer NanoZS.....	98
Figure 47 : Configuration du NanoSight instrument.....	99
Figure 48 : Schéma descriptif de la procédure de la détermination de la taille par NTA.....	100
Figure 49 : Méthode de sélection des événements permettant l'analyse par cytométrie en flux des microvésicules.....	102
Figure 50 : Représentation schématique de la surveillance en temps réel des cellules adhérentes par le système RTCA.....	103
Figure 51 : Représentation schématique du test de blessure.....	104
Figure 52 : Système d'insert (la chambre de Boyden) pour le test d'invasion.....	106
Figure 53 : Effet de l'irradiation sur la prolifération des cellules tumorales.....	115
Figure 54 : Pourcentage de cellules vivantes normalisé à 0Gy après irradiation.....	116
Figure 55 : Evaluation de la mort cellulaire par apoptose après irradiation.....	117
Figure 56 : Evaluation de la mort mitotique des cellules de glioblastome induite par l'irradiation .....	118
Figure 57 : Détermination de la concentration de cellules HUVEC à ensemercer .....	121
Figure 58 : Normalisation des profils de croissance cellulaire.....	122

Figure 59 : Courbes de croissance des HUVEC ensemencées dans deux milieux différents .....	123
Figure 60 : Effet des CM recueillis 2h post-irradiation provenant de la culture de cellules T98G ou U87 sur le comportement global de cellules HUVEC.....	124
Figure 61 : Suivi du comportement global des HUVEC exposées aux CM récupérés des T98G ou U87 à H48.....	125
Figure 62 : Evaluation de la capacité de migration des cellules endothéliales par le test de blessure.....	126
Figure 63 : Effets des milieux conditionnés sur la formation des tubes pseudo-capillaires <i>in vitro</i> .....	127
Figure 64 : Observation par microscopie électronique à balayage de vésicules à la surface des cellules de GBM.....	132
Figure 65 : Distribution de la taille des TMVs présentes dans le milieu conditionné issu de cellules U87 non-irradiées.....	133
Figure 66 : Exemple de mesure directe des vésicules obtenue par NTA.....	135
Figure 67 : Analyse par NTA de distribution en fonction de taille des TMVs.....	136
Figure 68 : Quantification des TMVs libérées par les cellules T98G et U87 non-irradiées (0 Gy) ou irradiées à 2 ou 10 Gy H2 et H48 post-irradiation par NTA.....	138
Figure 69 : Effet de l'irradiation sur la libération des TMVs de taille supérieure à 300nm à H2, H24 et H48 post-radiothérapie.....	139
Figure 70 : Effet des TMVs recueillies à H2 sur le comportement global des cellules HUVEC .....	142
Figure 71 : Suivi en temps réel du comportement global des cellules HUVEC exposées aux filtrats ou aux TMVs récupérés à H48.....	144
Figure 72 : Détermination de la capacité migratoire des HUVEC par test de blessure.....	145
Figure 73 : Evaluation de la capacité d'invasion des cellules tumorales par le test d'invasion utilisant la chambre de Boyden recouverte de Matrigel.....	146
Figure 74 : Suivi en temps réel du comportement global des cellules tumorales exposées aux filtrats ou aux TMVs, récupérés à H48.....	147
Figure 75 : Protéines liées à l'angiogenèse exprimées dans le Filtrat et les TMVs.....	149
Figure 76 : Expression des récepteurs membranaires dans les HUVEC et les cellules de GBM.....	151



# Table des matières

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
Partie 1 : les glioblastomes.....	3
1. Classification histologique et moléculaire des gliomes.....	3
1.1. Caractéristiques histologiques des glioblastomes.....	4
1.2. Caractérisation moléculaire et sous-types de glioblastome.....	5
1.3. Gliomagenèse : « modèle stochastique » versus « modèle hiérarchique ».....	8
2. Caractéristiques clinico-biologiques des glioblastomes.....	9
2.1. Infiltration et invasion.....	9
2.2. Barrière hémato-encéphalique et barrière hémato-tumorale.....	11
3. Prise en charge thérapeutique des glioblastomes.....	12
3.1. Chirurgie.....	13
3.2. Radiothérapie.....	13
3.3. Chimiothérapie.....	14
4. Récidives des glioblastomes.....	17
4.1. Causes des récidives.....	17
4.2. Prise en charge de la récidive dans le glioblastome.....	18
Partie 2 : Effets biologiques de la radiothérapie.....	21
1. Différents types de rayonnements ionisants.....	21
2. Les événements radio-induits initiaux.....	21
2.1. Phase physique et importance des micro-dépôts d'énergie.....	21
2.2. Phases biochimique et biologique.....	22
3. Réponse cellulaire aux dommages radio-induits.....	24
3.1. Détection des lésions et arrêt du cycle cellulaire.....	24
3.2. Réparation des cassures double-brin.....	27
4. Mort cellulaire radio-induite:.....	28
5. Autres effets cellulaires de l'irradiation.....	33
5.1. L'effet « Bystander ».....	33
5.2. Irradiation et invasion.....	34
5.3. Irradiation et angiogenèse.....	36
Partie 3 : Microvesicules tumorales.....	39
1. Populations.....	39
2. Biogenèse de microvesicules tumorales.....	40
2.1. Exosomes.....	40
2.2. Shedding vesicles.....	43
3. Régulation de la libération des microvesicules tumorales.....	45



4. Composition des microvesicules tumorales .....	46
4.1. Cargos protéiques .....	47
4.2. Cargo d'ARN .....	50
5. Contact de microvesicules avec des cellules cibles .....	51
5.1. Fusion directe des TMVs avec les cellules réceptrices .....	52
5.2. Endocytose .....	52
6. Fonctions des microvesicules tumorales .....	54
6.1. Progression tumorale .....	54
6.2. Résistance aux médicaments .....	59
6.3. Intérêt de l'application clinique de TMVs .....	59
7. Méthodes de mise en évidence des microvesicules .....	60
7.1. Isolement des microvésicules .....	60
7.2. Détection de microvésicules .....	61
Partie 4 : Neovascularisation dans les gliomes .....	65
1. Cooption vasculaire .....	66
2. Angiogenèse par bourgeonnement .....	67
2.1. Déclenchement de l'angiogenèse .....	67
2.2. Voies de signalisation principales impliquées dans l'angiogenèse .....	69
2.3. Processus angiogénique et tests d'étude .....	71
3. Vasculogenèse .....	77
4. Mimétisme vasculaire (vascular mimicry): .....	78
5. Trans-différenciation des cellules souches cancéreuses en cellules endothéliales .....	79
6. Néovascularisation dans les gliomes récurrents .....	81
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>83</b>
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>87</b>
1. Culture cellulaire .....	89
1.1. Lignées cellulaires tumorales .....	89
1.2. Cellules endothéliales .....	90
2. Détermination des effets de l'irradiation sur les cellules tumorales .....	92
2.1. Irradiation des cellules .....	92
2.2. Numération cellulaire et viabilité par exclusion du bleu trypan .....	93
2.3. Analyse de la capacité clonogénique des cellules tumorales irradiées .....	93
2.4. Etude de l'apoptose et de la nécrose par cytométrie en flux .....	93
3. Mise en évidence et quantification des TMVs .....	95
3.1. Observation de TMVs à la surface cellulaire par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) .....	95

3.2. Les milieux conditionnés, les TMVs et les Filtrats :	95
3.3. Analyse de la taille des microvésicules par granulométrie laser	97
3.4. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA, Nanosight)	99
3.5. Quantification des TMVs par cytométrie en flux	101
4. Effets des milieux conditionnés, des TMVs et des filtrats sur les cellules receveuses	102
4.1. Real Time Cell Analyzer (xCELLigence)	102
4.2. Test de blessure (Wound-healing assay)	104
4.3. Test d'invasion (Chambre de Boyden)	105
4.4. Etude de la formation des structures pseudo-capillaires <i>in vitro</i>	106
5. Analyses protéiques des filtrats / TMVs et des cellules	107
5.1. Extraction et dosages des protéines totales contenues dans les filtrats et les TMVs	107
5.2. Analyse protéomique des filtrats et des TMVs par Proteome Profiler™ Array	107
5.3. Analyse des récepteurs membranaires des cellules par Western-Blot	109
5.4. Extraction et dosage des ARN totaux contenus dans les TMVs	111
6. Analyses statistiques	111
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	113
Partie 1 : Evaluation de la sensibilité de 3 lignées cellulaires de glioblastome à l'irradiation	115
1. Effet de l'irradiation sur la prolifération des cellules de glioblastome	115
2. Effet de l'irradiation sur la mort cellulaire radio-induite	117
2.1. Evaluation de l'apoptose radio-induite	117
2.2. Evaluation de la mort mitotique radio-induite	118
3. Discussion	118
Partie 2 : influence des milieux conditionnés obtenus après irradiation sur le comportement cellulaire.	120
1. Suivi de la prolifération et de la survie des HUVEC soumises aux milieux conditionnés des cellules tumorales	120
1.1. Optimisation de la technique RTCA pour les HUVEC	120
1.2. Effet des milieux conditionnés des cellules tumorales après irradiation sur le comportement des HUVEC	123
2. effet des milieux conditionnés sur les capacités de migration des HUVEC	125
3. effet des milieux conditionnés sur les capacités des HUVEC à s'organiser en tubules	126
4. Discussion	128
Partie 3 : Influence de l'irradiation sur la libération de microvésicules tumorales (TMVs) par les cellules de glioblastome	131
1. Mise en évidence de la présence de microvésicules tumorales dans les milieux conditionnés issus des cellules tumorales	131

1.1. Observation des microvésicules tumorales à la surface des cellules tumorales ...	131
1.2. Mise en évidence des microvésicules tumorales dans les milieux conditionnés issus des cellules tumorales .....	132
2. Impact de l'irradiation sur la quantité de TMVs libérées par les cellules tumorales .....	137
2.1. Quantification par NTA des TMVs sécrétées par les cellules de GBM avec ou sans irradiation.....	137
2.2. Quantification par cytométrie en flux des TMVs sécrétées par les cellules de GBM avec ou sans irradiation .....	138
2.3. Synthèse des données quantitatives concernant la libération des TMVs par les cellules de GBM avec ou sans irradiation .....	140
3. Discussion.....	140
Partie 4 : Réponse des cellules cibles receveuses exposées aux TMVs ou aux facteurs solubles contenus dans les milieux conditionnés .....	142
1. REPONSE DES HUVEC EXPOSEES AUX TMVS OU AUX FACTEURS SOLUBLES	142
1.1. Analyse temps réel du comportement global des HUVEC .....	142
1.2. Influence des TMVs et des facteurs solubles sur les capacités migratoires des HUVEC.....	144
2. Réponse des cellules tumorales soumises aux TMVs et aux facteurs solubles .....	146
2.1. Migration des cellules tumorales.....	146
2.2. Prolifération/survie des cellules tumorales .....	147
3. Analyses protéiques des Filtrats/TMV's et des cellules .....	148
3.1 Contenu des Filtrats/TMV's en lien avec la migration et l'angiogenèse.....	148
3.2 Expression des récepteurs membranaires des cellules par Western-blot .....	151
4. Discussion.....	151
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>161</b>

# INTRODUCTION



## PARTIE 1 : LES GLIOBLASTOMES

Les tumeurs cérébrales malignes ne représentent que 2% de tous les cancers de l'adulte. Cependant, ces tumeurs provoquent une quantité disproportionnée de handicaps et de décès. En France, on compte aujourd'hui environ 6000 nouveaux cas par an de tumeurs primaires du système nerveux central (SNC). Les gliomes sont les tumeurs primitives du SNC les plus fréquentes chez l'adulte.

### 1. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE ET MOLECULAIRE DES GLIOMES

Les glioblastomes font partie des gliomes malins. Les gliomes naissent des cellules gliales qui se situent à côté des neurones, et dont on distingue trois types : les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies. Les astrocytes sont des cellules activées qui ont une forme d'étoile, d'où leur nom dérivé de « aster » (étoile). Ils constituent, avec les oligodendrocytes et les cellules microgliales, la glie (de glu, colle). La classification internationalement reconnue est celle de l'OMS de 2007 [1] (Tableau 1).

Tableau 1. Classification OMS 2007 des gliomes et des tumeurs glioneuronales (Extrait de Figarella-Branger, Bulletin de cancer, 2013) [2]

<b>1. Gliomes astrocytaires</b>	
Astrocytome pilocytique	Grade I
Variant : astrocytome pilomyxoïde	Grade II
Astrocytome à cellules géantes sous épendymaire	Grade I
Xanthoastrocytome pléomorphe	Grade II
Astrocytome diffus (fibrillaire, protoplasmique, gémistocytique)	Grade II
Astrocytome anaplasique	Grade III
<b>Glioblastome</b>	
Variant : glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	
Gliomatose cérébrale	Grade III
<b>2. Gliomes oligodendrogliaux</b>	
Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
<b>3. Gliomes mixtes</b>	
Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III
Si nécrose	Grade IV
<b>4. Tumeurs glioneuronales</b> (classées dans le groupe « tumeurs neuronales et glioneuronales »)	
Gangliogliome	Grade I
Gangliogliome anaplasique	Grade III
Astrocytome/gangliogliome desmoplasique infantile	Grade I
Tumeur neuroépithéliale dysembryoplasique	Grade I
Tumeur glioneuronale papillaire	Grade I
Tumeur glioneuronale à rosettes du IV <sup>e</sup> ventricule	Grade I

Les gliomes sont classés selon leur degré de malignité, déterminé par l'examen histologique (*grade I à IV*). Cette classification prend en compte le degré de différenciation, la densité cellulaire, les atypies nucléaires, l'activité mitotique, la nécrose et la prolifération vasculaire. Les tumeurs du *grade I* sont des gliomes bénins dont la démarcation est nette. Les *grades II, et III* sont des gliomes diffus infiltrant le cerveau sain. Le glioblastome (GBM), également connu sous le nom d'astrocytome de *grade IV*, constitue 80% des gliomes intracrâniens et 20% de toutes les tumeurs intracrâniennes. C'est la tumeur primitive du SNC la plus agressive, avec une survie médiane inférieure à 1 an sans traitement [3] et un taux de survie globale à 2 ans de 15,4% [4].

### 1.1. Caractéristiques histologiques des glioblastomes

La plupart des glioblastomes apparaissent comme une lésion hétérogène dans la substance blanche profonde et ont une tendance à l'infiltration rapide dans le parenchyme environnant [5]. L'observation histologique des GBM (Figure 1) montre une anaplasie importante, des atypies nucléaires nombreuses et une activité mitotique élevée.

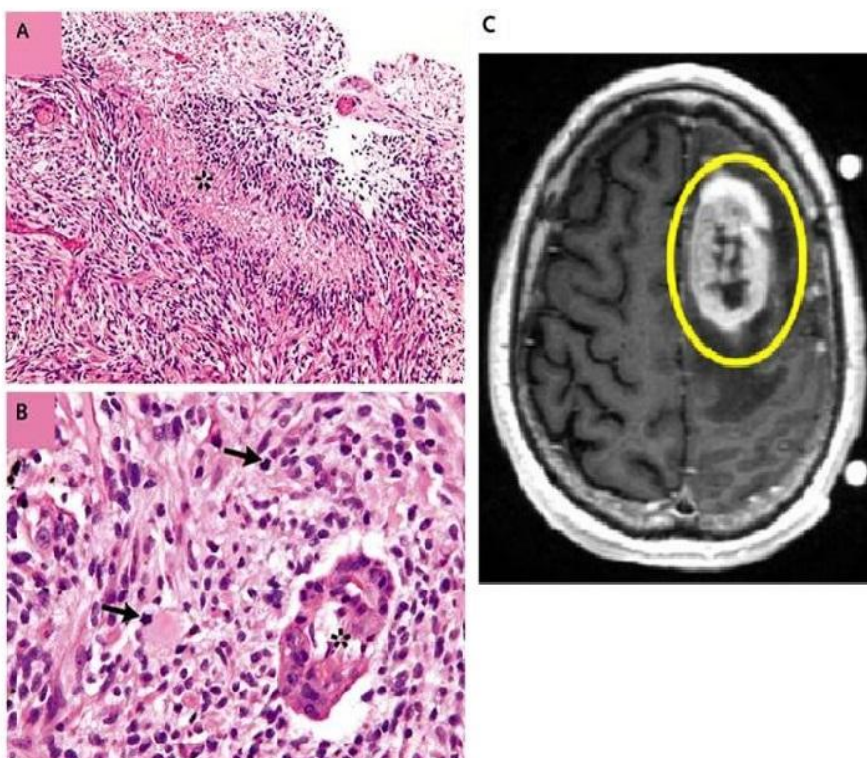


Figure 1. Caractéristiques histologiques et radiologiques du GBM.

**A,B.** Coupe histologique de glioblastome après coloration hématoxyline / éosine : on observe un polymorphisme nucléaire, une forte densité cellulaire, et une nécrose pseudopalisadique (astérisque), ainsi que la prolifération de l'endothélium vasculaire (astérisque) et mitose (flèches) (Extrait de Wen, N Engl J Med, 2008) [3]. **C.** Image IRM de GBM (ovale jaune) (Extrait de Graner, Pharmgenomics Pers Med, 2014) [6]

Ces tumeurs très hétérogènes présentent souvent de petites zones de nécrose centrale, entourées de cellules pseudopalisadiques, distinctes des cellules gliales anaplasiques. A cela, s'ajoute une vasculaire hyperplasique et hyperperméable, qui différencie ces tumeurs des astrocytomes de

grade inférieur.

## 1.2. Caractérisation moléculaire et sous-types de glioblastome

Des études de caractérisation des altérations génétiques dans les gliomes malins ont récemment été publiées dans le cadre du programme TCGA (The Cancer Genome Atlas Research Network) [7, 8].

S'appuyant sur l'identification d'anomalies génétiques récurrentes, touchant notamment les gènes PTEN, TP53, EGFR, PIK3, NF1, IDH1 et PDGFRA, les GBM peuvent être sub-divisés en 4 sous-classes : Classique, Mésenchymateux, Proneural, et Neural [7]. Les principales caractéristiques de ces sous-classes sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2. Classification moléculaire de glioblastomes d'après les analyses des altérations oncogéniques du TCGA (Extrait de Graner, *Pharmacogenomics Pers Med*, 2014) [6]

Subclass	Chromosome alterations	Gene/protein expression changes
Classical	cs7 gain with cs10 loss; loss 9p21.3	↓ <i>CDKN2A</i> , <i>PTEN</i> ↑ <i>NES</i> <i>NOTCH3</i> <i>JAG1</i> <i>LFNG</i> <i>SMO</i> <i>GAS1</i> <i>GLI1</i> <i>EGFR</i> amplified; EGFRvIII expression
Mesenchymal	Loss 17q11.2	↑ <i>CH3L1/YKL40</i> <i>MET</i> <i>CD44</i> <i>MERTK</i> ↑ <i>TNF</i> and <i>NFKB</i> family Mutated p53 PTEN NF1
Proneural	Amplification cs7; loss cs10; amplification 4q12, but low amplification of 7p11.2	↑ <i>PDGFRA</i> <i>OLIG2</i> <i>TCF3</i> <i>NKX2-2</i> <i>SOX</i> <i>DCX</i> <i>DLL3</i> <i>ASCL1</i> <i>TCF4</i> Mutated IDH1 p53 PIK3CA/PIK3R1
Neural	cs7 gain cs10 loss	↑ <i>NEFL</i> <i>GABRA1</i> <i>SYT1</i> <i>SLC12A5</i>

Par exemple, l'amplification de l'EGFR a été observée dans 97% des tumeurs du sous-type classique et très rarement dans les autres sous-types. Le sous-type mésenchymateux est caractérisé la suppression du gène NF1 tandis que le sous-type proneural est caractérisé par la présence d'altérations de PDGFRA et de mutations ponctuelles de IDH1. La mutation de TP53 est trouvée dans tous les sous-types sauf classique.

Par ailleurs, ces études montrent l'exclusion mutuelle entre des altérations affectant la voie p53 (MDM2, MDM4, et TP53), la voie de Rb (CDK4, CDK6, CCND2, CDKN2A / B, et RB1), et divers éléments qui influencent la voie PI3K (PIK3CA, PIK3R1, PTEN, EGFR, PDGFRA, et



NF1) [8]. Les voies cellulaires altérées dans les GBM résumées dans les figures 2 et 3 [9].

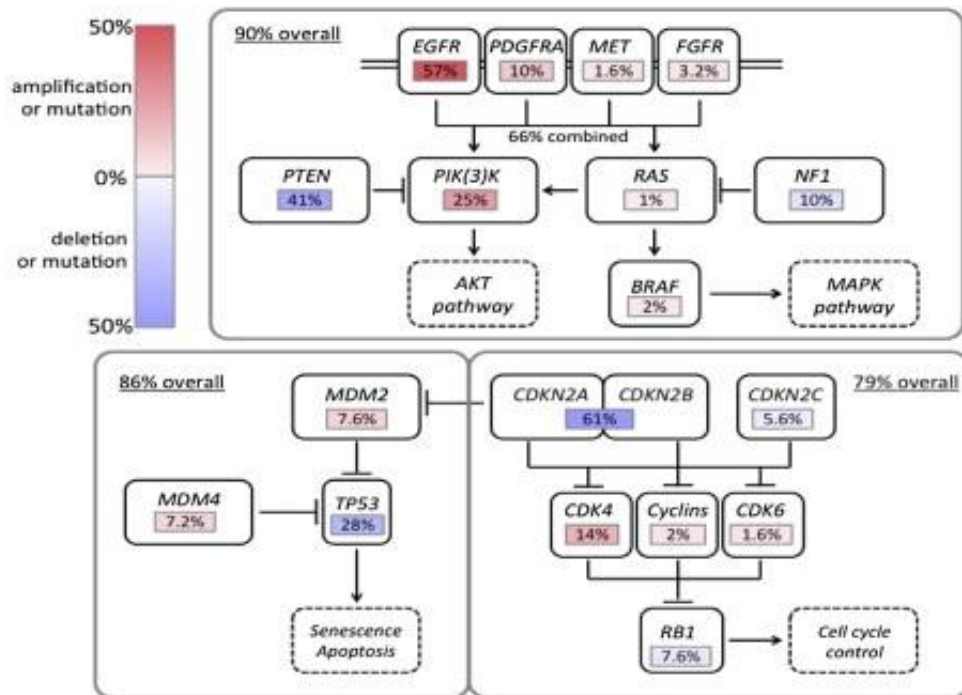


Figure 2. Principales voies altérées dans le GBM (Extrait de Brennan, Cell, 2013) [82]

- **la voie EGFR/PTEN/Akt/mTOR** est importante pour la survie et la croissance cellulaire. EGFR est activé par la liaison de facteurs de croissance comme EGF à son domaine extracellulaire. Cette activation provoque la phosphorylation de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate) par l'intermédiaire de la kinase PI3K. Ceci permet l'activation de molécules en aval comme Akt et mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). Akt favorise la survie des cellules en bloquant l'apoptose. La protéine PTEN peut inhiber l'activité de PIP3. Mais le gène PTEN peut être muté dans 41% des GBM. De plus, EGFR est amplifié dans 57 % des GBM, par conséquent, ces mutations favorisent la survie et la croissance. Plusieurs mutants de l'EGFR sont connus, la forme la plus commune est appelée EGFRvIII. L'amplification ou la surexpression de ce mutant est corrélée à un mauvais pronostic.

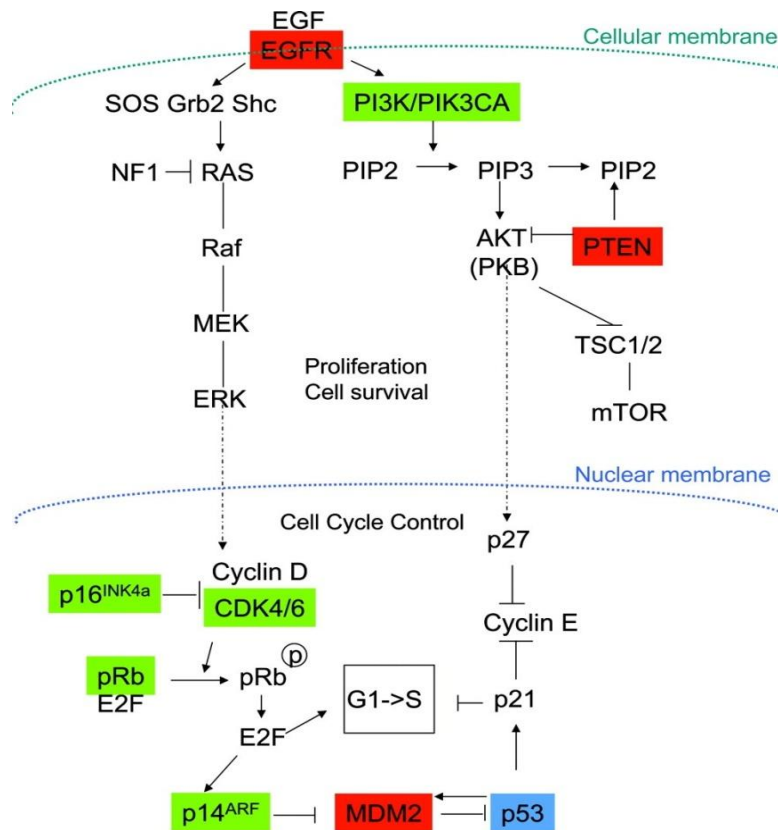


Figure 3. Interconnexions des principales voies de signalisation dérégulées dans les GBM (Extrait e Magnani, Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2009) [9]

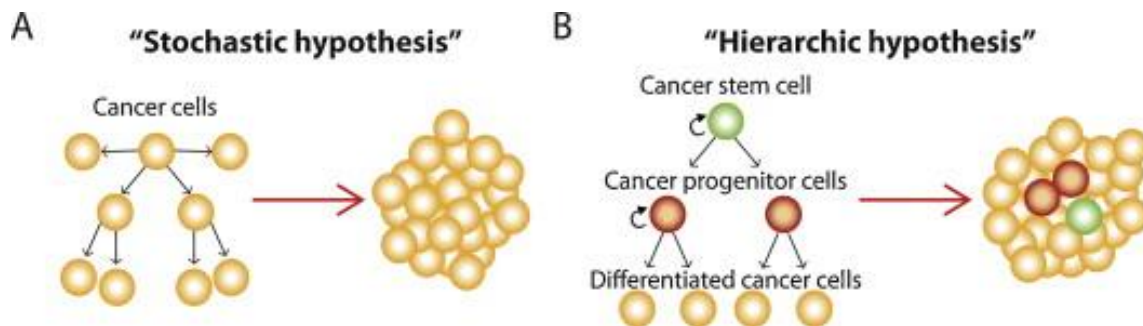
- **la voie TP53/MDM2/p14<sup>ARF</sup>** est fortement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, ou la réponse des cellules aux lésions de l'ADN. Après lésion de l'ADN, la protéine p53 est activée et induit la transcription des gènes comme *P21* ou *MDM2* (Mouse Double Minute 2). La protéine p21 ainsi induite va inhiber la progression du cycle cellulaire dans la phase G1. La protéine MDM2 induit la dégradation de p53 pour bloquer et réguler son activité transcriptionnelle. MDM2 est elle-même sous le contrôle négatif de la protéine p14<sup>ARF</sup> codée par *CDKN2A*. Dans les GBM, il a été observé que la voie de p53 est dérégulée dans 85,3% des GBM : cette dérégulation résulte soit de mutations/déletion du gène TP53 (27,9%), soit de la perte d'expression de p14<sup>ARF</sup> (60-80%), soit de l'amplification de MDM2 (7,6%), ce qui peut entraîner une perte de fonctionnalité de la protéine p53.
- **la voie p16<sup>INK4a</sup>/CDK4/Rb1** est, elle aussi, fortement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine Rb1 contrôle la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. Le complexe CDK4/cyclinD1 phosphoryle la protéine Rb1, provoquant ainsi la libération du facteur de transcription E2F qui active la transcription des gènes impliqués dans la transition G1-S. La protéine p16<sup>INK4a</sup>, également codée par le gène *CDKN2A*, liée à CDK4, inhibe le complexe CDK4/cyclinD1 et donc bloque la transition G1-S. Par

conséquent, la perte de la fonction normale de Rb1 ou des anomalies touchant CDKN2A /P16<sup>INK4a</sup> ou CDK4 favorisent la prolifération tumorale. Toutes ces altérations ont été rapportées dans le GBM (figure 3).

### 1.3. La gliomagenèse : « mod èle stochastique » versus « mod èle hi éarchique »

Pour expliquer l'hétérogénéité tumorale caractéristique des glioblastomes, deux hypothèses de gliomagenèse s'opposent.

L'hypothèse classique de formation des gliomes est basée sur le modèle «stochastique», qui prévoit que toutes les cellules d'une tumeur possèdent un potentiel tumorigénique similaire. Ainsi, chacune d'entre elles peut fonctionner comme une cellule initiatrice de tumeur (Figure 4A). Les cellules hyper-prolifératives acquièrent au fur et à mesure de la progression de nouvelles mutations et rencontrent différents microenvironnements capables de sélectionner les «meilleures» cellules soutenant une croissance cellulaire illimitée [10].



Contrairement au modèle stochastique, un nouveau modèle de carcinogenèse nommé "modèle hiérarchique" a été fondé sur l'accumulation d'évidences. Dans ce modèle, il est proposé que les tumeurs malignes soient initiées et maintenues par une sous-population minoritaire de cellules tumorales qui partagent quelques propriétés biologiques avec les cellules souches normales, à savoir en particulier, la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier dans les différents sous-types cellulaires qui forment la tumeur [12] (Figure 4B). Cette sous-population définie comme «Cancer stem cells» (CSC) a été mise en évidence dans les années 2000 [13]. Cette

sous-population de CSC, qui se trouve au sommet de la "hiérarchie de différenciation" de la tumeur, devrait être en mesure de donner naissance à des progéniteurs présentant un fort taux de prolifération puis, par différenciation terminale de ces derniers, à toutes les cellules différenciées de la masse tumorale [14].

Le GBM est l'une des tumeurs dont les cellules souches cancéreuses ont été identifiées, appelées « *Glioma Stem-like Cells* » (GSC). Ignatova et al. ont été les premiers à isoler les GSC *via* la culture de sphères dans un milieu appauvri en sérum [15], et les GSC ont été validées *in vivo* chez les souris immunodéficientes en 2004 par Singh et al. [16]. Ces GSC expriment à la fois des marqueurs neuronaux et astrocytaires de la différenciation cellulaire. Le marqueur de surface des GSC le plus utilisé à ce jour est la prominin-1, ou CD133. Une forte expression de CD133 dans une variété de cancers est associée à un mauvais pronostic, car il est en corrélation avec l'agressivité de la tumeur et récurrence [17]. Parmi les autres marqueurs souvent utilisés pour l'identification et l'isolement des GSC, on trouve la nestine, SOX2, Bmi1, CD44, CD15.

D'après des observations histologiques, les GSC s'organiseraient sous forme de niches fonctionnelles, localisées soit à proximité des vaisseaux (niches vasculaires) soit dans les zones hypoxiques (niches hypoxiques) [18, 19]. Dans les deux cas, les GSC sont en contact direct avec des cellules endothéliales et il existe une communication intercellulaire bidirectionnelle entre ces deux populations. D'une part, les GSC semblent dotées d'un fort pouvoir angiogénique favorisant la prolifération des cellules endothéliales et sont capables d'induire la formation de néovaisseaux lors de la tumorigénèse. D'autre part, le contact GSC/cellules endothéliales apparaît indispensable au maintien du caractère indifférencié des GSC et de leur potentiel d'auto-renouvellement.

## 2. CARACTERISTIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES DES GLIOBLASTOMES

### 2.1. Infiltration et invasion

Contrairement à la plupart des autres tumeurs qui peuvent métastaser dans des organes distants *via* le système lymphatique et vasculaire, les gliomes malins (GBM inclus) ne métastasent que très rarement en dehors du système nerveux central [20]. En ce sens, les GBM peuvent être considérés comme des tumeurs "locales". A l'inverse, une caractéristique biologique majeure des GBM est leur capacité à envahir les structures cérébrales normales. En effet, les cellules de gliome diffusent et imprègnent le parenchyme cérébral avoisinant et peuvent même traverser la ligne médiane du cerveau contralatéral [21] (Figure 5). Ces cellules tumorales isolées infiltrant

le parenchyme cérébral normal, échappent ainsi aux actions thérapeutiques [22], et peuvent être à l'origine d'une récurrence tumorale.

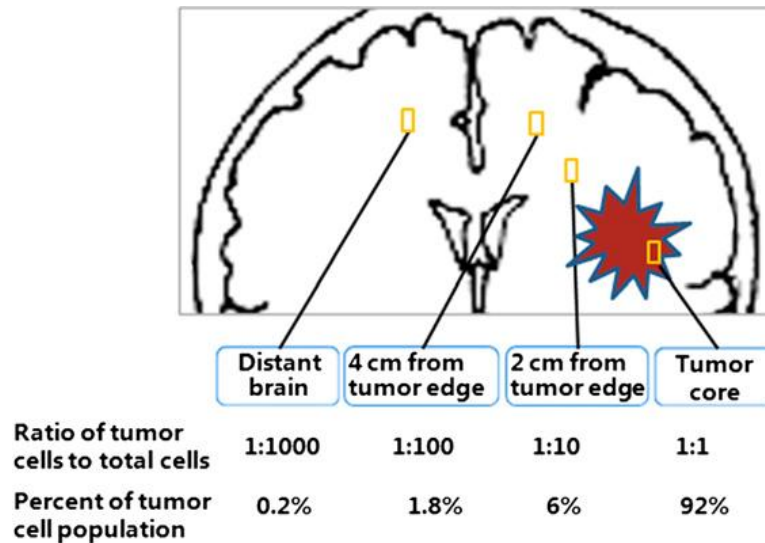


Figure 5. Modèle pathologique de l'invasion locale des gliomes. Les cellules de gliome migrent le long de structures cérébrales préexistantes. En conséquence d'une telle invasion étendue de tissu, la résection chirurgicale est généralement non curative et suivie par la survie des cellules et la repousse des zones d'invasion au-delà des marges de résection (Extrait de Wang, Cancer Letters, 2013) [21]

Les voies par lesquelles les cellules de gliome migrent peuvent être séparées en deux parties: l'espace péri-vasculaire et le parenchyme cérébral. L'espace péri-vasculaire est rempli de fluide, en continuité avec l'espace sous-arachnoïdien et entoure les vaisseaux sanguins. Le parenchyme contient des neurones et des corps des cellules gliales et leurs prolongements. Ces 2 compartiments contiennent une combinaison de molécules formant la matrice extracellulaire, et dont les principales sont l'acide hyaluronique (HA), la tétrascine, et lecticans, les collagènes I et IV, la laminine, la fibronectine, la vitronectine. Reliés les unes avec les autres, ces molécules forment un réseau et remplissent l'espace intercellulaire [23, 24].

Cette matrice qui remplit l'espace extracellulaire peut donc être un obstacle pour la migration des cellules de gliome. Pour remédier à cela, les cellules de gliome sécrètent un grand nombre de protéases, y compris les MMPs (matrix metalloproteinases, MMP2 et MMP9) et les sérine protéases uPA. En outre, elles recrutent les cellules de la microglie, les astrocytes et les cellules endothéliales pour sécréter également des protéases. L'activité combinée de ces protéases remodèle la matrice extracellulaire pour favoriser la migration et l'invasion tumorale (Figure 6). En même temps, l'activité de facteurs de croissance et des chimiokines augmente la prolifération et la migration des cellules de gliomes. Fait intéressant, les gliomes fixent leurs propres

protéines pro-migratoires de la matrice extracellulaire et sécrètent brevicanne et téncines afin de renforcer leur invasion [25, 26].

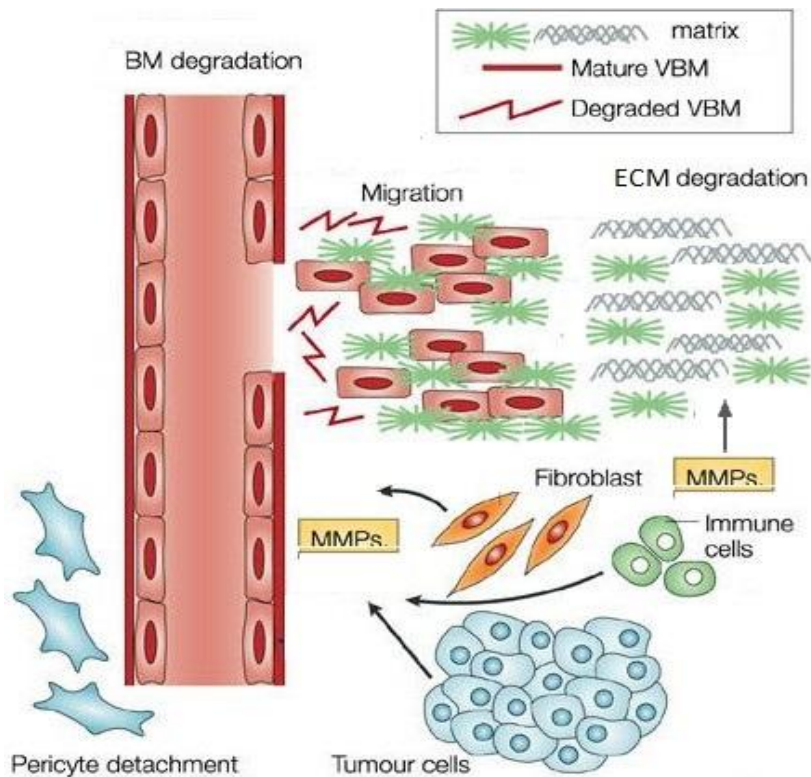
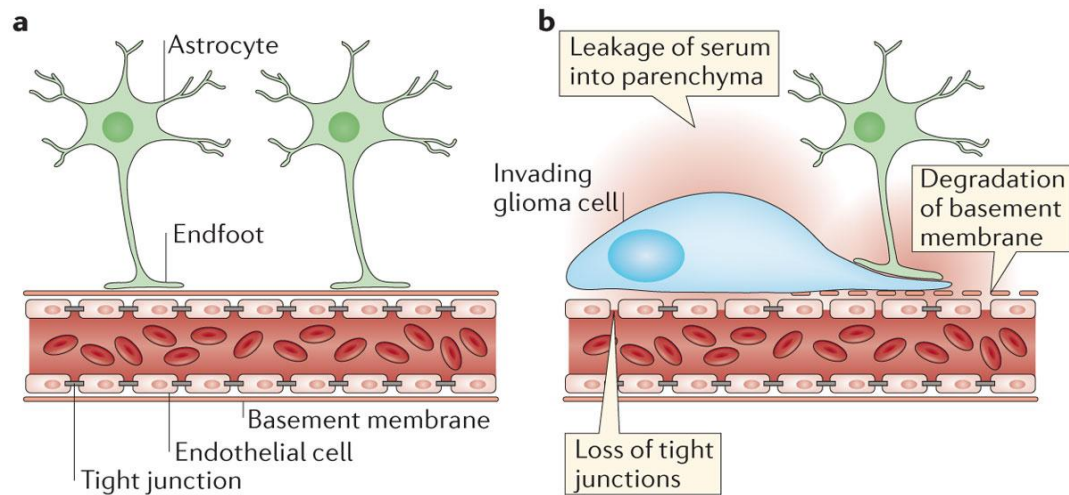


Figure 6. Dégradation protéolytique de la membrane basale (BM) et la matrice extracellulaire (ECM) est médiée par des proteases, telles que les métalloprotéases de matrice (MMP), sécrétés par les cellules tumorales et stromales (Adapté de Raudino, Evolution of the Molecular Biology of Brain Tumors and the Therapeutic Implications, 2013) [27]

## 2.2. Barrière hémato-encéphalique et barrière hémato-tumorale

Grâce à la barrière hémato-encéphalique (BHE), le cerveau est un organe hautement protégé des agents pathogènes, des toxines et des hormones circulant dans le sang. Les cellules endothéliales, qui sont reliées entre elles par des jonctions serrées et qui tapissent les capillaires du côté du flux sanguin sont les composants essentiels de cette barrière. Le développement et le maintien de la barrière hémato-encéphalique sont régies par des éléments cellulaires et non cellulaires qui interagissent avec les cellules endothéliales. Ainsi, les cellules endothéliales sont ancrées sur une ou deux membranes basales. Les membranes basales qui entourent les vaisseaux sanguins sont des feuilles spéciales et hautement organisées, de 50-100 nm d'épaisseur, composées de collagène IV, de laminines, de protéoglycanes, d'héparane-sulfate [23], également la fibronectine et la vitronectine. Les péricytes et les pieds des astrocytes, qui sont également fixés à la membrane basale, associés à la matrice extracellulaire fournissent un soutien structurel et fonctionnel de la BHE. Ils servent de deuxième barrière physique [28, 29].



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 7. Déstruction de la barrière hémato-encéphalique par les cellules des gliomes. **a.** Dans le cerveau sain, "endfeet" des astrocytes entourent les vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales vasculaires forment la barrière hémato-encéphalique (BHE) par les jonctions serrées, le piégeage des cellules et des composants du sérum dans la lumière vasculaire. **b.** les cellules de gliome migrent le long des vaisseaux sanguins, conduisant à un déplacement de "endfeet" astrocytaire, la dégradation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales et la répartition de la membrane basale autour des vaisseaux sanguins (Extrait de Cuddapah, Nature Reviews Neuroscience, 2014) [29]

Dans le cas des gliomes, la barrière hémato-encéphalique est rompue et on parle de barrière hémato-tumorale (Figure 7). Quand les cellules de gliome humain sont implantées dans le cerveau de rongeurs, la grande majorité de cellules de gliomes s'associent avec les vaisseaux sanguins et se déplacent le long de leur surface pour envahir le parenchyme cérébral sain avoisinant. Dans ce processus, les cellules de gliome entourent les vaisseaux sanguins et semblent « lever le pied des astrocytes » car elles dégradent la membrane basale péri-vasculaire [23].

### 3. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES GLIOBLASTOMES

Le traitement standard actuel des GBM est le « protocole Stupp » [30] (Stupp, 2005) qui inclut une résection la plus large possible, suivie d'une radio-chimiothérapie concomitante (RT) impliquant le Témazolomide (TMZ), suivie par des cures de TMZ adjuvant. Ce protocole a permis d'améliorer la survie médiane des patients qui atteint ici 14,6 mois, alors qu'elle n'était que de 6 mois en cas de résection chirurgicale seule ou de 12,1 mois en cas de chirurgie plus radiothérapie [5, 31].

### 3.1. Chirurgie

Le traitement par chirurgie est le traitement de première intention pour les patients atteints de GBM. Cependant, et contrairement à d'autres tumeurs, la chirurgie ne peut pas être curative.

En effet, la nature «infiltrante » des GBM rend la résection totale difficile, d'autant plus que certaines structures cérébrales délicates et dont on doit préserver la fonctionnalité ne permettent pas une résection large. Dans une tentative de préserver la fonction neurologique et maintenir la qualité de vie des patients, la résection subtotale est parfois préférée, comme par exemple, lorsque les tumeurs infiltrent les zones de l'élocution. Dans ces conditions, la tumeur résiduelle est traitée avec la radiothérapie et de la chimiothérapie conventionnelle [32].

Les buts de la chirurgie des tumeurs cérébrales sont multiples : établir le diagnostic histologique, améliorer les symptômes neurologiques, apporter un contrôle local de la maladie pour améliorer le pronostic vital. Les données accumulées ont suggéré qu'une résection chirurgicale plus agressive était fortement associée à une amélioration des résultats pour les GBM [33], et pouvait potentiellement augmenter l'efficacité de la chimiothérapie et la radiothérapie qui lui succèdent [34]. En particulier, une étude randomisée de phase II a proposé une approche de résection guidée par imagerie de fluorescence, où la fluorescence induite par l'acide 5-aminolévulinique sert à identifier la tumeur résiduelle, pour permettre une résection la plus complète possible et conduire à une amélioration de la survie sans progression [35].

C'est pourquoi, il est établi aujourd'hui que les patients doivent si possible, subir une résection chirurgicale maximale [36].

### 3.2. Radiothérapie

La radiothérapie reste un outil fondamental pour une prise en charge optimale des patients atteints de cancer. La radiothérapie peut compléter et parfois, lorsque la tumeur est inopérable, remplacer le geste chirurgical.

L'efficacité de la radiothérapie dans le glioblastome a été montrée par trois essais randomisés contrôlés du «*Brain Tumor Study Group* »(essai BTSG 66-01, essai BTSG 69-01 et essai BTSG 72-01) donc les résultats sont publiés entre 1976 et 1980 [37, 38]. Ces études ont collectivement établi le rôle prépondérant de la radiothérapie pour le traitement du glioblastome. Une méta-analyse de ces trois essais [39] a démontré que les patients qui n'ont pas reçu la radiothérapie ou ont été traités avec moins de 45Gy montraient un taux de survie plus faible (médiane de survie de 4,2 et 3,1 mois, respectivement). A l'opposé les patients traités avec 50, 55 et 60 Gy ont été associés à une meilleure survie (médiane survie de 6,5, 8,4 et 9,8 mois,



respectivement). L'escalade de dose au-delà 60Gy menée ultérieurement a révélé une augmentation de la neuro-toxicité sans démontrer d'avantage thérapeutique significatif [40].

La dose prescrite et la largeur de la marge de sécurité sont établies en fonction du grade, du type histologique, du volume tumoral et de la localisation de la lésion ainsi que de la proximité des structures à risque dans le cerveau. Il est aujourd'hui recommandé de traiter les glioblastomes avec une dose totale de 60 Gy, fractionnée à raison de 1.8-2 Gy par jour d'ivés 5 jours par semaine [41, 42]. Le glioblastome est une tumeur particulièrement radio-résistante qui siège au sein d'un organe radiosensible. Une dose plus forte par fractions pourrait améliorer l'efficacité de ce traitement mais cette perspective est limitée en raison de la toxicité tardive sur le parenchyme cérébral.

La dose thérapeutique totale d'ivée en 30 séances et sous forme de faisceaux multiples permet de minimiser les risques sur le tissu cérébral sain adjacent. Le volume cible à irradier est défini d'après les critères de l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) [43]. Il s'agit de volume tumoral macroscopique (GTV) correspondant à la région de renforcement dans les scans CT / IRM préopératoires ou postopératoires. Le volume cible clinique (CTV) est défini comme le GTV plus une marge de 2 à 3 cm pour permettre la diffusion microscopique.

La radiochirurgie est une approche basée sur l'emploi des rayonnements ionisants qui permettent de traiter des petits volumes intracrâniens avec une très grande précision. Cette technique consiste à focaliser des faisceaux multiples au niveau de la lésion et à déposer une dose forte en une seule fraction (par exemple, 7Gy) [44]. La radiochirurgie semble d'être utile dans certaines circonstances. Toutefois, un essai de phase III du *Radiation Therapy Oncology Group*, RTOG 93-05, n'a pas pu démontrer d'avantage de l'utilisation de la radiochirurgie pour les gliomes [45].

### 3.3. Chimiothérapie

Les molécules de chimiothérapie les plus actives, et les plus étudiées, sont en particulier les nitrosurées, les composés dérivés du platine (cisplatine, carboplatine, oxaliplatine) et la procarbazine. L'intérêt d'une chimiothérapie adjuvante a été confirmé par les résultats d'une méta-analyse du *Glioma Meta-analysis Trialist Group* [46], basée sur 12 essais randomisés. Ces auteurs ont montré que l'adjonction de chimiothérapie améliorerait significativement la survie à 2 ans de 9% à 13%, avec une diminution du risque relatif de décès de 15 % et apportait un gain en médiane de survie de 2 mois de façon indépendante de l'âge.

### 3.3.1. Le temozolomide

Actuellement, la chimiothérapie de référence dans le GBM est le temozolomide (Figure 8), un agent alkylant administré par voie orale, qui peut facilement traverser la BHE [47] et arriver au système nerveux central à la concentration thérapeutique [48]. Son action passe principalement par le transfert d'un groupe méthyle sur la position O<sup>6</sup> et N<sup>7</sup> des guanines dans la molécule d'ADN. Ceci est à l'origine d'une réplication de l'ADN défectueuse et déclenche une cascade d'événements conduisant à l'apoptose des cellules tumorales [49].

L'utilisation du témozolomide date de 1999, suite à 2 essais de phase II de Yun et al. qui ont montré une meilleure survie (survie globale à 6 mois et la survie sans progression) et une toxicité modérée comparé à procarbazine [50, 51] chez des patients présentant un GBM récidivant.

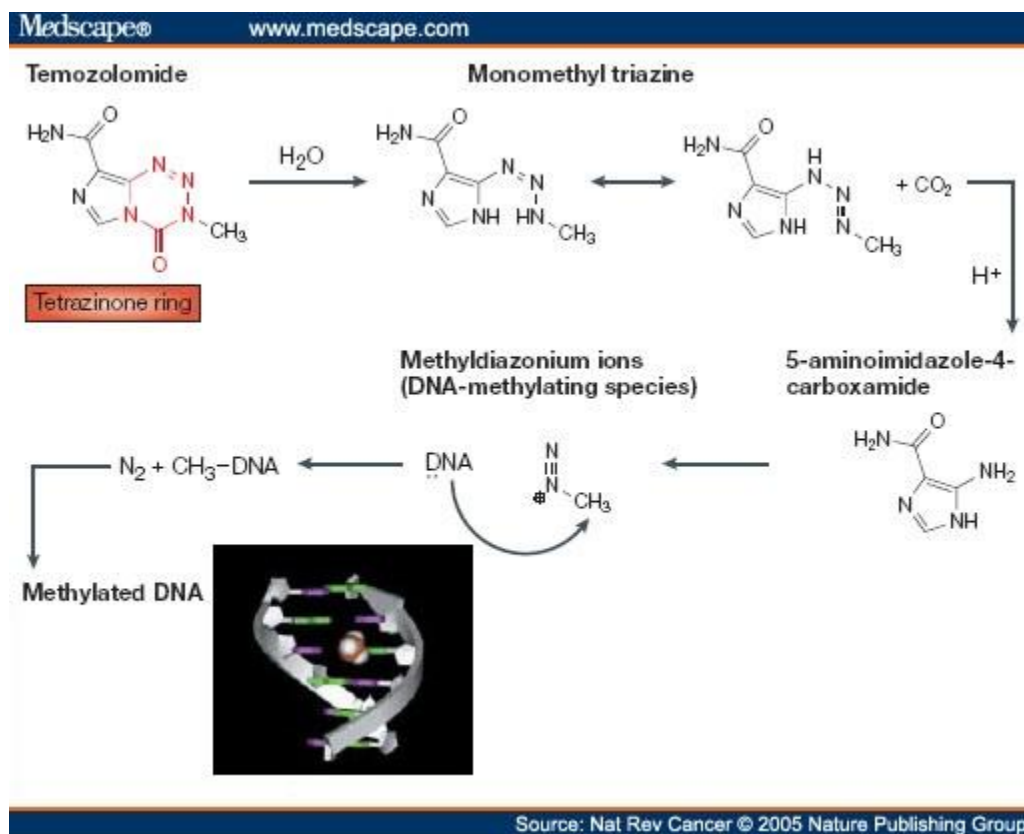


Figure 8. Temozolomide et sa réaction avec l'ADN (Extrait de Neidle, Nature Reviews Cancer, 2005)[52]

Un essai thérapeutique de phase III, menée par l'EORTC, a pu évaluer l'efficacité du temozolomide dans le GBM. L'administration concomitante de TMZ avec la radiothérapie standard a conduit à une survie médiane de 14.6 mois *versus* 12.1 mois pour la radiothérapie seule ( $p < 0.001$ ) [30]. La survie globale à 3 ans était de 16% pour temozolomide + radiothérapie

*versus* 4,4% pour la radiothérapie seule dans le GBM [53]. Compte tenu de sa bonne pénétration dans la BHE et de sa facilité d'administration par voie orale, le temozolomide est devenu la molécule standard. Il est délivré quotidiennement à raison de 75mg/m<sup>2</sup> de façon concomitante avec la radiothérapie, puis de façon adjuvante après la radiothérapie à la dose de 150 à 200 mg/m<sup>2</sup>, 5 jours sur 28, en six cycles.

### 3.3.2. Place des thérapies ciblées

Les découvertes des voies de signalisation impliquées dans la gliomagenèse ont permis de développer de thérapies moléculaires agissant spécifiquement sur les voies de signalisations intracellulaires perturbées. Les groupes principaux de ces traitements ciblés sont les inhibiteurs de l'EGFR (*Erlotinib*, *Gefitinib*, *Cetuximab*, *Loapatinib*), les inhibiteurs de PDGFR (*Sorafenib*), les inhibiteurs de VEGF (*Bevacizumab*, *Cilengitide*), les inhibiteurs de farnésyltransferase (*Zarnestra*®), de PI3K (*BLK 120*) et les inhibiteurs de mTOR (*dérivés de la Rapamycine*), de p53 (Ad5CMV-953 gene) [54]. Leurs effets anti-prolifératives, pro-apoptotiques et anti-angiogéniques permettent dans les études précliniques d'augmenter la sensibilité vis-à-vis des traitements classiques de chimio-radiothérapie, mais les résultats des études cliniques sont le plus souvent décevants.

Le VEGF est impliqué dans la pathogenèse du GBM où il est généralement fortement exprimé. Des études ont prouvé que l'inhibition de VEGF inhibait la croissance des gliomes et permettait une régression des vaisseaux sanguins [55]. Le Bevacizumab (*Avastin*®) est le médicament anti-VEGF le plus évalué : il a obtenu une autorisation de la *Food and Drug Administration* pour le traitement des GBM récidivants. Le Bevacizumab se lie spécifiquement au VEGF et l'empêche d'activer son récepteur, le VEGFR, bloquant ainsi l'angiogenèse. Trois grands essais cliniques ont montré que l'ajout de Bevacizumab au standard radiothérapie-temozolomide n'améliorait pas la survie des patients atteints de glioblastome [56–58]. Selon l'étude la plus récente utilisant Bevacizumab plus radiothérapie-temozolomide, la survie globale des patients recevant le Bevacizumab (*versus* placebo) étaient de 72,4% (*vs* 66,3%) à 1 an et de 33,9% (*vs* 30,1%) à 2 ans ; la médiane de survie sans progression était 10,6 mois dans le groupe Bevacizumab *vs* 6,2 mois dans le groupe placebo. La qualité de vie a été mieux maintenue avec le Bevacizumab [58], confirmant les résultats d'une étude précédente [59].

L'utilisation du Cilengitide, un pentapeptide cyclique inhibiteur spécifique de l'intégrine  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  et  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ , fait l'objet d'investigations en cours. Un essai de phase I/II, utilisant Cilengitide plus radiothérapie-temozolomide, a montré que la survie sans progression à 6 mois était de 69% et 33%

à 12 mois. La médiane de survie sans progression était de 8 mois. La survie globale à 12 et 24 mois étaient de 68% et 35%, avec un médiane de survie globale de 16,1 mois comparée à la donnée standard de 14,6 mois pour radiothérapie-temozolomide [20].

#### 4. RECIDIVES DES GLIOBLASTOMES

Malgré la lourdeur de ces protocoles de traitement standards, le taux de récurrence des glioblastomes reste très élevé et les récurrences quasiment inévitables (plus de 90% des cas).

Ainsi, il a été montré que 90% des récurrences de glioblastome survenaient à proximité de la cavité de résection ou dans le volume cible de la radiothérapie post-opératoire [60]. Seule une petite fraction des glioblastomes (de 5 à 10%) récidivent à une plus grande distance de la masse tumorale principale [61]. Des études ont montré que les récurrences des GBM se produisaient le plus souvent sous la forme d'une croissance continue locale, à 2 - 3 cm de la frontière de la lésion d'origine [62]. Ces observations sont concordantes avec le bord du volume cible clinique (CTV) de la radiothérapie, soulignant l'incapacité de la radiothérapie post-opératoire à éradiquer toutes les cellules tumorales restant dans le CTV après chirurgie.

##### 4.1. Causes des récurrences

Les échecs thérapeutiques quasi-systématiques dans les glioblastomes s'expliquent par (i) le caractère invasif et infiltrant de ces cellules tumorales ; (ii) leur grande radio- et chimiorésistance ; (iii) la présence des cellules souches de gliomes (GSC).

###### 4.1.1. Le caractère infiltrant des glioblastomes

Comme expliqué précédemment, les cellules tumorales de GBM ont tendance à envahir le parenchyme cérébral sain avoisinant, rendant la résection chirurgicale complète impossible et donc le geste chirurgical moins efficace. De même, les cellules infiltrées sont moins accessibles aux agents de chimiothérapie [63] à cause de la BHE qui joue le rôle de barrière protectrice vis-à-vis du parenchyme cérébral [64, 65].

###### 4.1.2. Radio- et chimiorésistance des glioblastomes

Les glioblastomes sont parmi les tumeurs les plus radio-résistantes et chimiorésistantes, et ce, pour des raisons multifactorielles. Tout d'abord, les cellules de glioblastomes présentent des capacités de réparation de l'ADN augmentées rendant moins cytotoxiques les lésions induites par la radiothérapie et la chimiothérapie. D'ailleurs, les lésions  $O^6$  méthylguanine induites par temozolomide peuvent être spécifiquement réparées par une protéine  $O^6$ -methylguanine-DNA

méthyltransférase (MGMT). L'expression de la MGMT permet aux cellules de lutter contre les effets cytotoxiques des temozolomide et contribue à la chimiorésistance [66], si bien que l'inhibition de l'expression de la MGMT par méthylation de son promoteur est un facteur prédictif positif de réponse au traitement [67, 68].

De même, les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et p53 étant très souvent altérées dans ces cellules, les processus de contrôle du cycle cellulaire, de mort par apoptose ou de mort mitotique sont plus difficiles à déclencher [69].

Les glioblastomes sont des tumeurs ayant une importante composante hypoxique. Or, l'absence d'oxygène est délétère pour l'action des radiations ionisantes. De plus, les cellules tumorales adaptées aux conditions hypoxiques, présentent des capacités très augmentées de survie *via* l'activation du facteur inductible par l'hypoxie 1 (HIF-1), qui en retour, stimule la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'angiogénèse, la survie et prolifération cellulaires, l'efflux des chimiothérapies [70].

#### **4.1.3. Récidives et GSC**

Des études récentes ont montrées que les GSC sont responsables du maintien de ces tumeurs après traitement. En effet, les GSC ont été identifiées comme plus résistantes à la radiothérapie par rapport aux cellules non-GSC [71] et sont capables de survivre après une exposition à des doses fortes de carmustine. Il a été montré une augmentation dans ces cellules, de l'expression de divers gènes codant pour des composants de la MDR (multidrug resistance), y compris de l'enzyme de réparation MGMT [72]. Grâce à leur grande capacité à s'auto-renouveler, à proliférer et à se différencier (modèle hiérarchique), elles seraient responsables du «repeuplement», c'est-à-dire de la formation d'une nouvelle tumeur [73].

## **4.2. Prise en charge de la récurrence dans le glioblastome**

### **4.2.1. Intervention chirurgicale**

Chez les patients sans contre-indication médicale, la chirurgie peut confirmer la récurrence de la tumeur, réduire la pression intracrânienne, améliorer l'état neurologique, et éventuellement améliorer l'efficacité de la thérapie adjuvante [62, 74]. Des études ont montré une survie globale de 9 mois après réopération [75]. Deux études ont montré l'avantage de la résection combinée avec une chimiothérapie, par rapport à l'administration d'une chimiothérapie seule en survie

sans progression et médiane de survie [47, 76]. Mais la réopération est réservée pour les tumeurs opérables chez les patients ayant une bonne performance [77].

Une grande analyse de l'EORTC a conclu que la chirurgie dans les récurrences de GBM n'a pas d'incidence significative sur la survie, mais peut améliorer la qualité de vie et la fonctionnalité des patients [78].

Récemment, une étude rapporte que des patients subissant de multiples micro-réssections après récurrence seraient susceptibles de voir leur survie prolongée (une médiane de survie de 26 mois *versus* 16 mois chez les patients ayant subi une résection unique) [79].

#### *4.2.2. La réirradiation*

Actuellement, dans le cadre des GBM récurrents, la réirradiation utilisant des techniques classiques est peu employée. En effet, 90% des récurrences survenant dans la zone de la première irradiation, la possibilité de réirradier en toute sécurité est très limitée [80]. Avec les progrès de la technologie, d'autres modalités d'irradiation ont été étudiées. Le Gamma-knife a été comparé avec la chirurgie conventionnelle dans les GBM récurrents : une amélioration de la médiane de survie a été observée avec le Gamma-knife (12 mois *vs* 6 mois) associé un faible taux de complications [81]. Plusieurs groupes ont montré que la radiothérapie stéréotaxique fractionnée peut être bénéfique pour ces patients [82, 83]. Dans l'étude de Torok et al, la survie globale après réirradiation était de 79% à 6 mois et 30% à 1 an [82]. Il a également été montré que les implants interstitiels cœturaux d'iode-125 à haute activité amène la médiane de survie de 10,5 à 12 mois [75], mais seulement 20-30% des GBMs récidivants répondent aux critères morphologiques et focaux nécessaires [84].

#### *4.2.3. Place de la chimiothérapie ou des thérapies ciblées*

Les options concernant les agents de chimiothérapie sont très limitées. Une variété d'agents a été utilisée dans ce cadre avec des résultats plutôt décevants. Le taux de réponse avec différents agents de la chimiothérapie systémique, tels que le temozolomide, les nitrosourées, les platines, la procarbazine, l'irinotécan, et l'étoposide, étaient toujours inférieurs 10-15% chez les patients atteints de GBM récidivants [85].

Un grand nombre d'agents de thérapies ciblées ont été évalués dans les récurrences de GBM. Les agents testés sont des inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosines kinases tels que l'EGFR, le VEGFR, et le PDGFR. Des inhibiteurs des voies de signalisation dirigés contre mTOR, PI3K, histone désacétylases (HDAC), et les farnésyltransférases ont également été évalués (tableau 3).

Tableau 3. Différents agents testés dans les GBM récurrents (Extrait de Mrugala, Discov Med, 2013)[80]

Agents	Target	Reference
Cediranib	pan-VEGFR	Batchelor <i>et al.</i> , 2010
Erlotinib	EGFR	van den Bendt <i>et al.</i> , 2009
Gefitinib	EGFR	Franceschi <i>et al.</i> , 2007 Rich <i>et al.</i> , 2004
Bevacizumab	VEGF-A	Zhang <i>et al.</i> , 2012
Cilengitide	A and $\beta$ integrins	Reardon <i>et al.</i> , 2008 Gilbert <i>et al.</i> , 2012
Rindopepimut	EGFRvIII	Sampson <i>et al.</i> , 2009
Vorinostat	HDAC	Galanis <i>et al.</i> , 2009
XL-184	EGFR, C-MET	Wen <i>et al.</i> , 2010
Tipifarnib	Farnesyltransferase	Cloughsey <i>et al.</i> , 2006
Enzasturin	PKC	Wick <i>et al.</i> , 2010 Kreisl <i>et al.</i> , 2010
Temsirolimus	mTOR	Galanis <i>et al.</i> , 2005 Chang <i>et al.</i> , 2005

Par exemple, un essai clinique de phase II sur les GBM récurrents, utilisant le Cilengitide pré- et post-opération a montré une survie sans progression à 6 mois de 12%, la médiane de survie sans progression était 8 semaines [56].

En mai 2009, la FDA a accordé l'autorisation pour l'utilisation du bevacizumab (Avastin) dans le traitement des GBM récidivants, en s'appuyant sur les résultats de deux essais : l'essai AV3708g qui rapporte une réponse sensible (26%) avec une durée médiane de réponse de 4,2 mois ; et l'étude NCI 06-C-0064E qui montre 20% de réponse avec une durée médiane de 3,9 mois [32].

Parallèlement, le bevacizumab a été utilisé en association avec l'irinotécan [86], le carboplatine [80, 87], l'étoposide [88]. L'association du Bevacizumab avec l'irinotecan était la plus prometteuse puisque les auteurs ont observé une survie sans progression à 6 mois de 50% et la survie globale de 8,7 mois, *versus* 42% et de 9,2 mois respectivement avec le bevacizumab seul [89].

## **PARTIE 2 : EFFETS BIOLOGIQUES DE LA RADIOTHERAPIE**

Bien que considérée comme un moyen thérapeutique fondamental pour la prise en charge optimale des patients atteints de GBM, la radiothérapie est capable d'induire pléthore d'effets cellulaires, certains recherchés dans le contexte thérapeutique, d'autres plus délétères, que l'on souhaiterait réduire. En effet, en plus de l'action cytotoxique sur les cellules tumorales, il est clairement établi aujourd'hui que l'irradiation peut aussi favoriser la progression ou la récurrence tumorale, en raison de la sélection d'une sous-population de cellules tumorales plus radio-résistantes présentant des capacités prolifératives et des propriétés invasives et pro-angiogéniques accrues.

### **1. DIFFERENTS TYPES DE RAYONNEMENTS IONISANTS**

Plusieurs types de rayonnements ionisants sont utilisés en radiothérapie : photons X ou gamma, électrons, protons, ions, *etc...* Les rayons X restent les plus largement utilisés.

Les photons X, fabriqués dans des tubes à rayons X ou des accélérateurs de particules, font partie des ondes électromagnétiques et constituent les rayonnements les plus énergétiques. Ils sont électriquement neutres. Au cours de l'interaction des photons X avec le tissu biologique, des électrons secondaires, produits par phénomène d'ionisation, sont responsables des effets biologiques.

### **2. LES EVENEMENTS RADIO-INDUITS INITIAUX**

#### **2.1. Phase physique et importance des micro-dépôts d'énergie**

Lorsqu'un rayonnement pénètre dans la matière, il peut interagir avec les atomes rencontrés et perdre, à chacune de ses interactions, une partie de son énergie. En radiobiologie, la notion de dose absorbée est couramment exprimée en Gray (Gy), mais cette notion a ses limites dès lors qu'il s'agit d'apprécier les effets biologiques des radiations. En effet, à l'échelle microscopique, l'énergie n'est pas délivrée de façon homogène, mais par paquets, variables en nombre et en densité d'énergie : ce sont les micro-dépôts d'énergie. L'énergie des rayonnements X incidents est transférée sous forme d'ionisations et/ou d'excitations constituant autant de micro-dépôts d'énergie dont la densité d'énergie conditionnera la nature biochimique des dommages induits dans la cellule [90].



## 2.2. Phases biochimique et biologique

Les ionisations et/ou excitations de la phase physique sont à l'origine de réarrangements moléculaires nombreux. Cette phase est classiquement appelée « phase biochimique ».

Lorsqu'elles rencontrent la matière, les radiations ionisantes peuvent interagir directement avec les macromolécules intracellulaires (protéines, acides nucléiques, lipides, *etc.*) : c'est l'effet direct (Figure 9).

Néanmoins, le corps humain étant composé d'environ 70% d'eau, l'interaction la plus probable reste celle entre les rayonnements ionisants et les molécules d'eau, conduisant à la radiolyse de l'eau. Les rayonnements sont capables de décomposer l'eau intracellulaire et entraînent une dissociation de la molécule d'eau en radicaux libres : l'ion  $\text{H}_2\text{O}^+$  et un électron  $\text{e}^-$ . Les réactions suivantes avec l'eau environnante se traduisent par la formation de plusieurs espèces réactives, qui sont appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS) [91] (Figure 9).

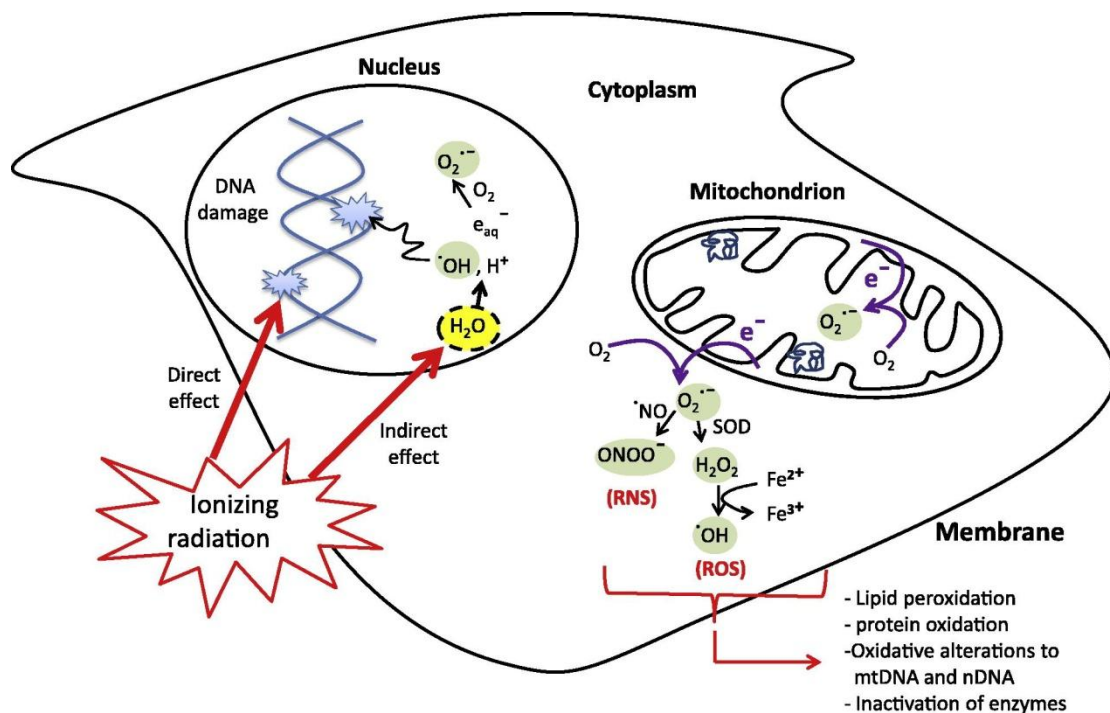


Figure 9. Effets des rayonnements ionisants sur les macromolécules intracellulaires. L'absorption d'un rayonnement ionisant par les cellules vivantes perturbe directement les structures chimiques et induit indirectement par la radiolyse de l'eau cellulaire et la production d'espèces réactives l'oxygène (ROS), provoquant *in fine* des modifications biologiques. Les principaux ROS sont l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$ , l'oxygène singulet  $\text{O}_2^{\cdot}$ , l'électron libre hydraté  $\text{e}^-_{\text{aq}}$ , le radical hydroxyle  $\text{OH}^{\cdot}$ , et le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Extrait de Azzam, Cancer Letters, 2012) [91]

Les ROS, qui sont des espèces chimiques très instables et très réactives, interagissent notamment avec les macromolécules à proximité. Les ROS peuvent attaquer les fonctions

carboxyles de certains acides aminés et détruire leurs fonctions biologiques ; les ribosomes et les mitochondries peuvent être également être leur cible, mais l'altération de ces sites ne sont pas fatales. Les ROS attaquent également les doubles liaisons. Ainsi, les acides gras sont particulièrement touchés. La rupture des doubles liaisons des lipides insaturés et la peroxydation des lipides détruit la structure des membranes et modifie la fluidité membranaire, ce qui peut entraîner la mort cellulaire [91].

L'ADN est la cible principale des radiations ionisantes et des ROS [92].

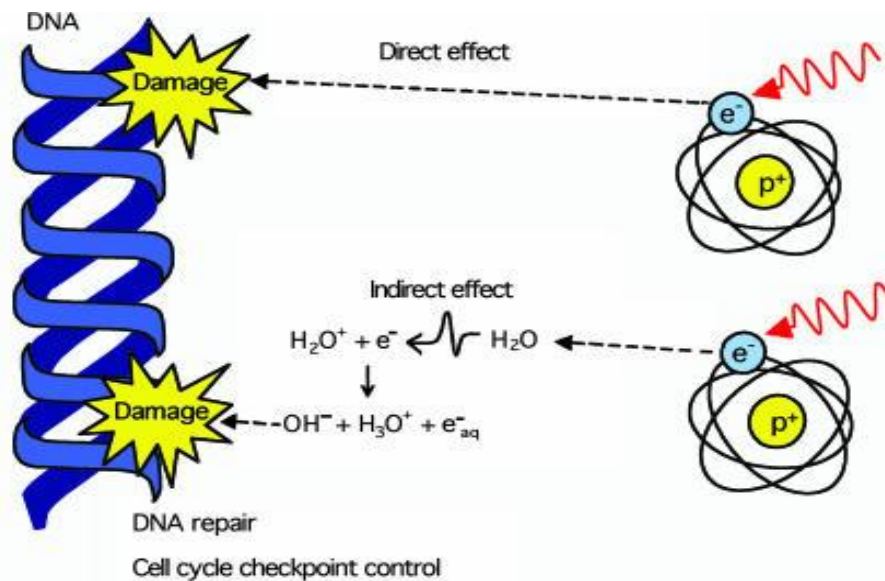


Figure 10. Lésions directes et indirectes de l'ADN induites par radiation ionisante via la radiolyse de l'eau (ROS) (Extrait de Morgan, Proc Natl Acad Sci, 2005)[93]

Les lésions de l'ADN peuvent donc être directes, liées à l'interaction d'un électron d'ionisation avec la molécule d'ADN. Le dépôt d'énergie au niveau de la chaîne d'ADN peut entraîner une cassure. Cette rupture peut se faire sur un brin ou sur les deux brins. De façon indirecte, les ROS peuvent induire des lésions sévères du génome [92] (Figure 10). Les sucres peuvent être oxydés puis hydrolysés, ce qui provoque la libération d'une base et la rupture de la liaison phosphodiester. De même, les bases sont particulièrement sujettes aux attaques des ROS. Il en résulte des cassures simple-brin ou double-brin, des oxydations de bases, des pontages entre les bases voisines, ou la perte d'une base de l'ADN [94], des liaisons ADN-protéine [95]. Le tableau 4 présente la fréquence de quelques types de lésions.

Tableau 4. Dommages radio-induits de l'ADN et leur spécifications physique et biologique : le dépôt d'énergie minimal nécessaire pour la formation de DB, CSB ou CDB, leur incidence par Gray de rayons X, leur demi-vie de réparation (Adapté de Joubert, New research on DNA repair, 2006) [96]

	Dommage de base (DB)	Cassure simple-brin (CSB)	Cassure double-brin (CDB)
Energie nécessaire	>1 eV/nm <sup>3</sup>	>10 eV/nm <sup>3</sup>	>100 eV/nm <sup>3</sup>
Incidence	~ 10 000 / Gy	~ 1000 / Gy	~ 40 / Gy
50 % de dommages réparés	5-10 min	10-20 min	>50 min

### 3. REPONSE CELLULAIRE AUX DOMMAGES RADIO-INDUITS

#### 3.1. Détection des lésions et arrêt du cycle cellulaire

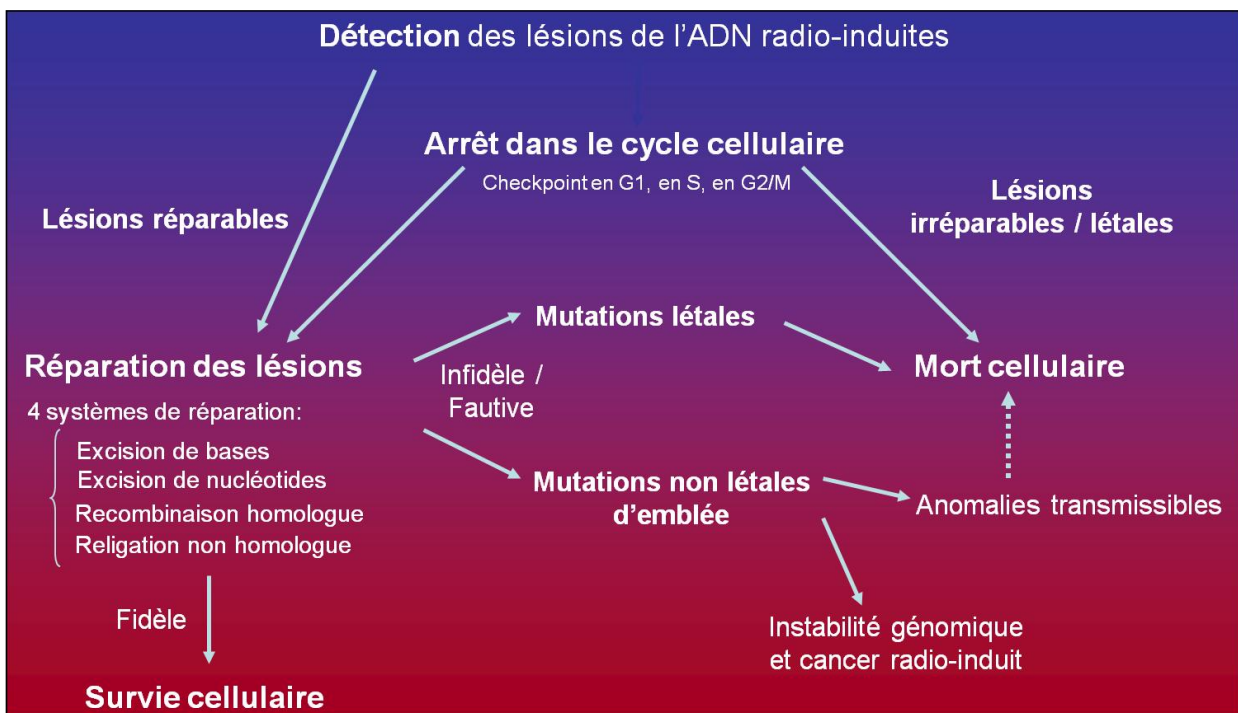


Figure 11. Réponse cellulaire aux dommages de l'ADN radio-induits

La conséquence des dommages de l'ADN est parfois une erreur de lecture lors de la transcription donc la formation d'ARN anormaux, puis de la traduction, entraînant la formation de protéines modifiées. La discontinuité des brins en cas de cassures déclenche des changements complexes de l'ADN et l'acétylation des histones. La cassure du brin dévoilé est reconnue par le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) (Figure 12). Les complexes MRN

activent en aval des kinases ATM, ATR et DNA-PKcs. ATM est recruté par le complexe MRN sur les sites de cassures double-brin, et activé par autophosphorylation. ATR est recruté au niveau des cassures simple-brin. DNA-PKcs est activé par Ku70/Ku80 pour former le complexe DNA-PK, ATM et ATR interviennent dans la réponse cellulaire aux cassures de l'ADN et dans la réparation des cassures (Figure 14). Par ailleurs, les protéines Chk1 (phosphorylé par ATR) et Chk2 (phosphorylé par ATM) sont essentielles au déclenchement des points de contrôle du cycle cellulaire [97].

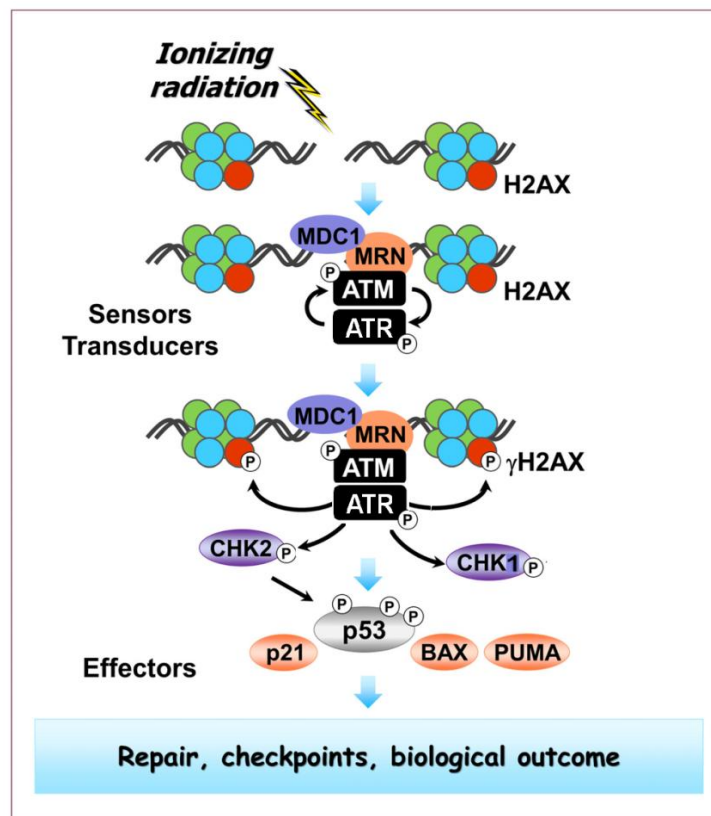


Figure 12. Schéma simplifié de la réponse aux dommages de l'ADN radio-induits (Adapté de Mirzayans, Int. J. Mol. Sci. 2013) [98].

### *P53 et le blocage du cycle cellulaire*

Le maintien du blocage de cycle cellulaire à long terme implique surtout l'activation de la protéine p53. Le suppresseur de tumeur p53, codé par le gène TP53, est un élément clé du réseau de surveillance des lésions de l'ADN pour limiter la croissance cellulaire aberrante en réponse aux stress génotoxiques tels que l'irradiation [98].

Comme présent dans la figure 13, la kinase ATM phosphoryle le suppresseur de tumeur p53, et une autre kinase, Chk2. Chk2 phosphorylé, phosphoryle à son tour, à la fois p53 et MDM2. Ces phosphorylations stabilisent p53 en perturbant son association avec MDM2, une protéine

qui cible la dégradation de p53 [97]. WIP1, un type de sérine / thréonine phosphatase, inactive p53, ATM et CHK2 par déphosphorylation. Il peut aussi influencer l'interaction MDM2-p53 [98].

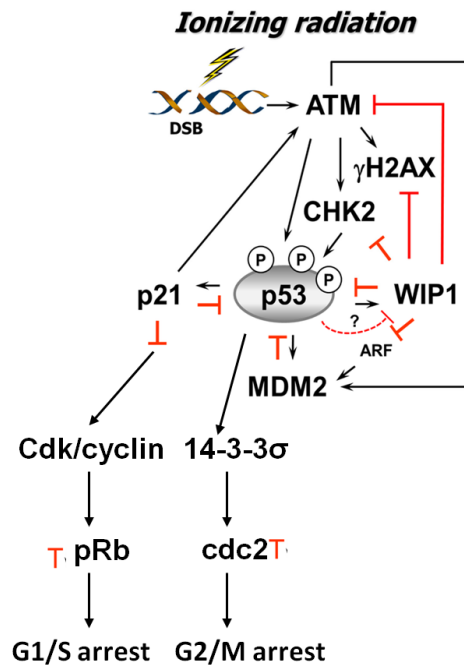


Figure 13. L'activation d'ATM déclenche une stabilisation de p53, qui induit l'arrêt en G1/S (par induction de la transcription de p21) et en G2/M (par induction de la protéine 14-3-3σ) (Adapté de Mirzayans, Int J Mol Sci, 2013) [98].

P53 activé induit alors la transcription de ses gènes cible, qui incluent le régulateur critique de la transition G1-S : p21. La liaison de p21 au complexe cycline-CDK empêche la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb), puis prévient la transcription de gènes nécessaires pour la progression de la phase G1 en phase S. Le cycle cellulaire est bloqué à la phase G1. Pour le point de contrôle G2-M, l'activation d'ATM provoque la transcription p53-dépendante de 14-3-3σ. La protéine 14-3-3σ s'associe au complexe cyclinB-cdc2 dans le cytoplasme et empêche la progression G2/M [97].

La mutation du gène *TP53* est l'une des modifications génétiques les plus fréquentes dans la majorité des cancers, en particulier dans les gliomes. Cette anomalie conduit à l'accumulation nucléaire de la protéine p53 mutante induisant l'activation de la transcription de gènes qui ne sont pas activés par p53 sauvage. Ces gènes comprennent l'EGF, c-Myc, Fos, et MDR-1, qui peuvent promouvoir des signaux pro-tumoraux [99].

### 3.2. Réparation des cassures double-brin

Le blocage du cycle cellulaire laisse du temps à la cellule pour assurer la réparation des dommages de l'ADN. Les complexes MRN, outre l'activation des points de contrôle par la voie ATM/ATR, permettent le recrutement des protéines de réparation des cassures [100]. Les principales voies de réparation des dommages de l'ADN sont la ligature d'extrémités non homologues (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR) [101]. Nous nous focalisons sur le NHEJ, car le HR est opérationnel seulement dans les phases G2/M du cycle cellulaire, alors que NHEJ, qui lie simplement des extrémités de l'ADN cassées et fonctionne dans toutes les phases du cycle cellulaire, est la voie de réparation prédominante dans les cellules de mammifères [102].

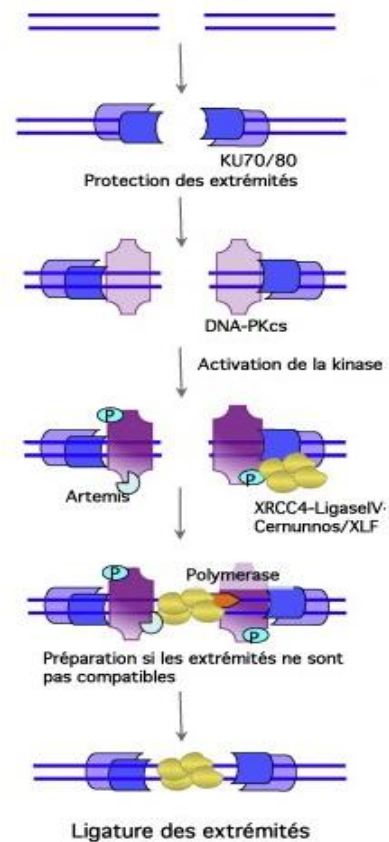


Figure 14 : Principaux mécanismes de réparation des cassures double brin par ligature d'extrémités non homologues (Extrait de Rass, Cancer/Radiothérapie, 2012) [103]

La procédure de NHEJ (Nonhomologous end-joining) (Figure 14) peut être initiée par le complexe MRN. La protéine Ku80 s'associe à la protéine Ku70 [104], et cet hétérodimère coulisse le long de l'ADN et recrute la protéine DNA-PKcs. Ces trois protéines forment le complexe DNA-PK, essentielle pour la réparation NHEJ : cette kinase phosphoryle certaines protéines comme le variant  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX. La phosphorylation de l'histone H<sub>2</sub>AX par DNA-PK produit une distorsion de l'ADN qui pousse le complexe DNA-PK à s'éloigner du site de la cassure. Les protéines de réparation par suture (Ligase 4 et XRC4) sont ensuite recrutées pour réunir les deux extrémités de l'ADN. L'autophosphorylation du complexe DNA-PK provoque son détachement de l'ADN [103].

Lorsque les lésions de l'ADN sont réparables, le blocage du cycle cellulaire permet le bon déroulement des mécanismes de réparation. Ces lésions cellulaires vont largement dépendre des capacités et des modalités de la réparation de l'ADN, si bien que l'on distingue :

- **la réparation complète** : Les lésions radio-induites, même les cassures double-brin sont susceptibles d'être réparées complètement (réparation fidèle), permettant une restitution du génome de la cellule irradiée. La cellule irradiée s'engage dans la reprise de la prolifération et retrouve une vie normale.
- **la réparation fautive** : Malgré les performances de la réparation de l'ADN, le dommage peut être mal réparé induisant des altérations des gènes, qui entraînent les instabilités génomiques ou la mort cellulaire. Certaines de ces altérations n'empêchent pas la cellule de vivre et de se multiplier, mais finalement arrive à la mort cellulaire (Figure 11).

#### 4. MORT CELLULAIRE RADIO-INDUITE:

En radiobiologie, la mort d'une cellule est définie comme la perte irréversible de sa capacité à former une colonie. Ainsi, une cellule présente dans un tissu, encore capable de synthétiser des protéines ou de l'ADN peut malgré tout être radiobiologiquement morte. Puck et al. ont établi un seuil arbitraire de la viabilité *in vitro*: une cellule irradiée subit rarement plus de 4 ou 5 divisions cellulaires, et est donc radiobiologiquement morte. Par conséquent, en radiobiologie, la survie d'une cellule se traduit par le développement d'une colonie, définie par la présence d'au moins 50 cellules [105].

- **L'apoptose** est une mort dite « programmée » qui peut être déclenchée par différents facteurs, une cassure double brin non réparée par exemple [106]. Elle est caractérisée par des changements de morphologie : contraction de la cellule, condensation et fragmentation de la chromatine, diminution du volume nucléaire, puis la transformation ultime de la cellule en corps apoptotiques. L'apoptose est généralement présentée comme la voie de mort empruntée préférentiellement lorsque les cellules sont trop endommagées. Il concerne de nombreux types cellulaires, incluant des lignées tumorales.

Comme présenté dans la figure 15, la voie extrinsèque implique la liaison d'un ligand de mort extracellulaire à un récepteur de mort, comprenant Fas/FasL, TRAIL/TRAIL-R, TNF- $\alpha$ /TNF-R1, puis une voie de signalisation est déclenchée, qui a son tour active les caspases 8 et 10 [107]. La voie intrinsèque (voie mitochondriale) dépend de la famille Bcl-2 : une rupture de la

balance entre les facteurs pro-apoptiques (BAX, Bcl-Xs, Bid, Bad) et les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W, A1, Boo) peut déterminer l'entrée en apoptose par l'activation de la caspase 9. Les 2 voies aboutissent à l'activation ultime des caspases 3, puis permet le déclenchement de l'apoptose, comme la dégradation de l'ADN associée aux changements de morphologie cellulaire et nucléaire [108].

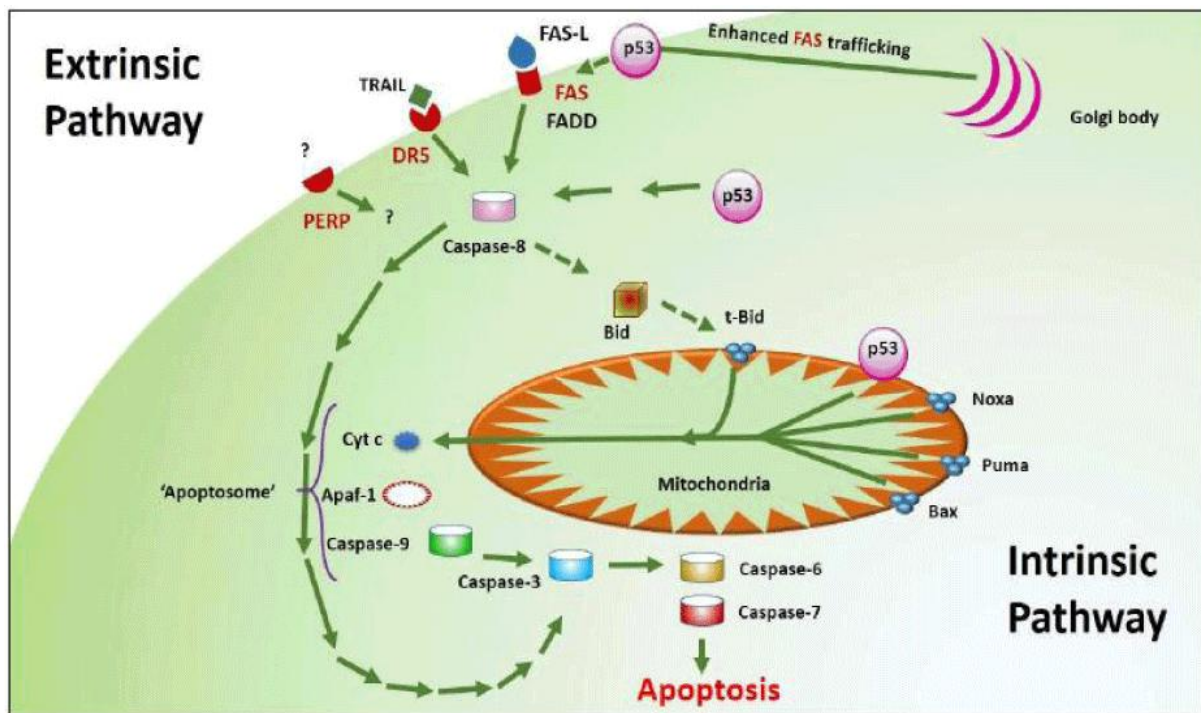


Figure 15 : Représentation simplifiée des voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque et du rôle central de p53 (Adapté de Kumariya, J Cancer Sci, 2012) [109]

Après les lésions de l'ADN, p53 est activé et peut induire l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation. Si les lésions sont non-réparables, p53 peut initier l'apoptose en activant les voies intrinsèques et extrinsèques *via* l'induction de l'expression de gènes codant pour différentes protéines: Bax, Puma et Noxa dans la voie intrinsèque, ou Fas, TNF-R1 et DR5 (famille de TNFR) pour la voie extrinsèque [109, 110]. En outre, la protéine p53 peut directement aller se localiser sur la mitochondrie, où elle induit la trimérisation des protéines Bax, Puma Noxa en réponse à l'altération radio-induite de l'ADN, conduisant à la formation de pores dans les mitochondries et la libération de cytochrome c et les protéines pro-apoptotiques qui ensuite activent la caspase 9 [111, 112].

Le p21, protéine en aval de p53, peut réguler l'apoptose. La phosphorylation de p21 down-régule la cascade mitogen-activated protein kinase (MAPK) induite par le stress, et induit la



résistance des cellules à l'apoptose induite par différents stimuli. De plus, p21 peut former un complexe avec la pro-caspase 3 et inhiber son activation [99].

L'influence du statut de P53 sur la radiosensibilité *via* l'apoptose a fait l'objet de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. La réponse n'est pas parfaitement claire car selon les études et les localisations tumorales, les résultats sont contradictoires [98]. Les mutations de P53 ont été observées dans 31% des cas de GBM. Certaines études n'ont affiché aucune relation entre le statut TP53 et le résultat chez les patients atteints de GBM, alors que plusieurs rapports ont montré que la mutation du gène TP53 est un facteur pronostique favorable, ce qui est contradictoire [113].

Les phosphatidylsérines sont généralement situées sur le feuillet intérieur de la membrane plasmique dans les cellules vivantes, et au moment du processus d'apoptose, se relocalisent en partie sur le feuillet extérieur, pour se retrouver exposées vers l'espace extracellulaire [114]. Ce processus peut être utilisé pour détecter les cellules en apoptose grâce à la reconnaissance des phosphatidylsérines par l'annexine V marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) [115]. Grâce à cette méthode, différentes études ont montré l'apoptose induite par l'irradiation dans les glioblastomes, [116, 117]. Néanmoins, la mort par apoptose des cellules de GBM après irradiation n'est pas la voie majoritaire.

- **La mort mitotique** : Plus souvent, les cellules irradiées conservent leur viabilité immédiate assurant leurs fonctions métaboliques, mais lorsqu'elles atteignent la mitose, les dommages radio-induits au niveau de l'ADN les empêchent de se diviser. C'est la mort mitotique. Ce processus est particulièrement présent quand il s'agit de l'irradiation de tumeurs solides dans lesquelles la fonction de p53 est altérée [118].

Autre possibilité, c'est que la cellule irradiée, malgré une réparation fautive, réussisse à se diviser sur 2 à 5 générations donnant naissance à plusieurs cellules filles, mais la probabilité que ces cellules filles puissent se diviser pendant un grand nombre de générations ensuite diminue rapidement. Ce phénomène correspond à la perte des capacités clonogéniques, appelé aussi mort cellulaire retardée (Figure 16).

Dans ce cas, suite à un premier arrêt du cycle cellulaire et à la mise en actions des systèmes de réparation, les cellules peuvent reprendre leur cycle et entrer en mitose malgré la présence de lésions persistantes de l'ADN non-réparées [119]. Par conséquent, se déroule une mitose aberrante [120], caractérisée sur le plan morphologique par l'apparition de cellules géantes multinucléées et de micronoyaux. Les cellules multinucléées avec deux ou plusieurs noyaux

provenant d'une séparation insuffisante pendant la mitose tandis que les micronoyaux sont dus à des chromosomes et/ou des fragments de chromosomes qui n'ont pas été distribués de manière égale entre les noyaux fille.

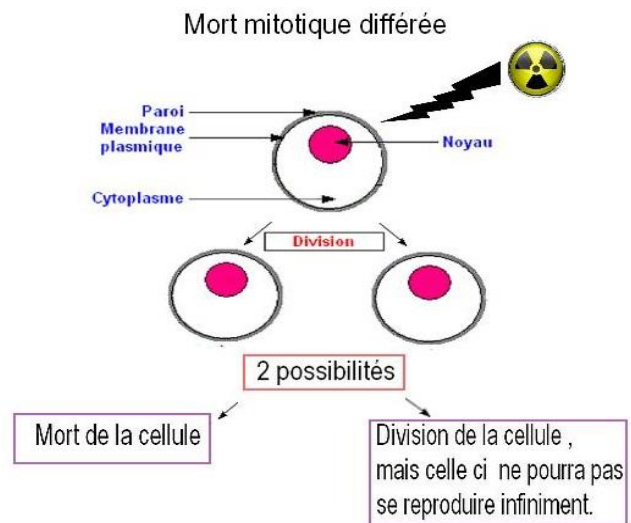


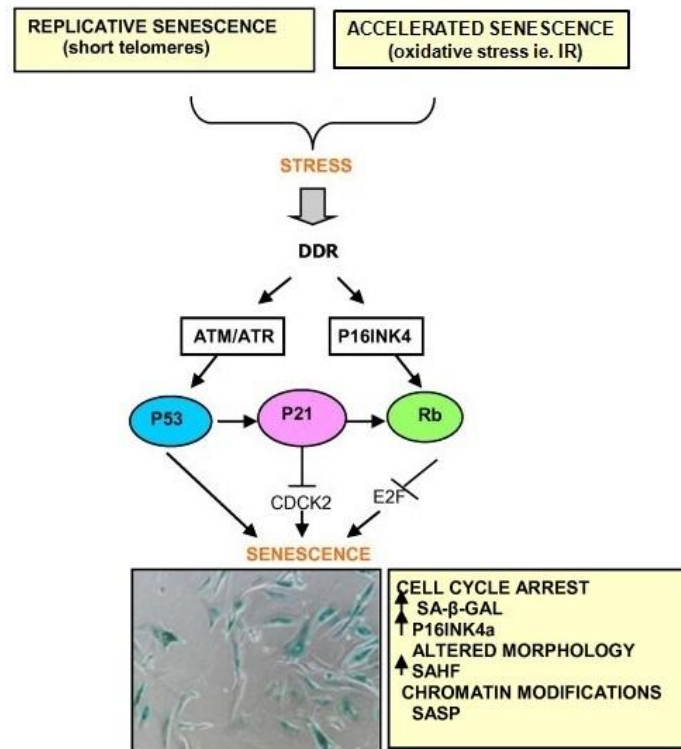
Figure 16: Représentation de la mort mitotique [121]

Les catastrophes mitotiques sont d'autant plus nombreuses que les cellules tumorales présentent un défaut des points de contrôle du cycle cellulaire (checkpoint). Les défauts aux points de contrôle peuvent survenir au niveau des phases G1 et G2. Contribuant à la régulation du cycle G1/S et G2/M, la protéine P53 est impliquée dans la mort mitotique.

Des études ont mis en évidence que l'irradiation des différentes cellules tumorales induisait des catastrophes mitotiques de manière dose-dépendante [122–124], y compris pour les cellules de glioblastome [117, 125, 126]

**-La sénescence** La cellule irradiée arrête définitivement son cycle en phase G1 et cesse donc toute synthèse d'ADN, mais reste viable métaboliquement et sécrète des facteurs de croissance, adoptant une morphologie large, plate et granuleuse, avec un cytoplasme très vacuolisé. Parallèlement, les cellules présentent une activité élevée de la  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal), connue comme le marqueur de sénescence [99, 127]. La sénescence peut être déclenchée par 2 facteurs principaux : le raccourcissement des télomères (sénescence répllicative) et les dommages de l'ADN causés par des stress génotoxiques comme les rayonnements ionisants (sénescence accélérée) (Figure 17). Deux voies de signalisation sont impliquées dans la sénescence : la voie p53 et la voie pRb [128, 129].

Figure 17 : Initiation et médiateurs moléculaires de la sénescence (Adapté de Sabin, Genome Integr, 2011) [130]



Comme décrit précédemment, les lésions de l'ADN radio-induites sont détectées et induisent l'activation de p53, qui à son tour active p21, qui inhibe l'action de la kinase CDK2 et arrête le cycle cellulaire en G1 (voir P26). L'activation de p53 et p21 dans les cellules sénescents n'est que transitoire, le niveau des protéines p53 et p21 diminue après la mise en place d'arrêt de croissance. Quand l'expression de p21 diminue, un autre inhibiteur de CDK, p16<sup>Ink4a</sup> devient élevé ce qui suggère que p16 peut être responsable de l'entretien de l'arrêt de croissance [131]. La protéine p16<sup>Ink4a</sup> assure le maintien de la protéine Rb dans sa forme active, bloquant ainsi l'activation du facteur de transcription E2F, responsable de la progression en phase S [130]. En plus, p21 peut activer aussi pRb par l'inhibition de la cycline E/CDK2 [131].

Grâce à la mesure de l'activité de la β-galactosidase, la sénescence induite par irradiation a été observée dans des lignées de glioblastomes [132]. La sénescence radio-induite semble survenir dans les cellules tumorales après une exposition à des doses relativement élevées (10 Gy) [130].

La sénescence pourrait favoriser la récurrence tumorale après radiothérapie, compte tenu des effets SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) après irradiation : les cellules sénescents sécrètent différents facteurs tels que des interleukines, des chimiokines, des facteurs de croissance et des protéases, qui contribuent à l'entretien de la tumeur et à la communication

avec le microenvironnement local [128]. Nous pouvons imaginer que le profil de sécrétion par les cellules tumorales irradiées peut agir sur d'autres cellules dans le microenvironnement [130].

## 5. AUTRES EFFETS CELLULAIRES DE L'IRRADIATION

### 5.1. L'effet « Bystander »

L'effet « *bystander* » est un effet non ciblé des radiations ionisantes, exercé sur les cellules non irradiées, situées à proximité des cellules irradiées. Cet effet est un phénomène par lequel des dommages cellulaires radio-induits (mutations géniques, aberrations chromosomiques, apoptose, micronoyaux, transformations, etc...) sont exprimés dans des cellules non irradiées voisines de cellules irradiées.

Ces dernières années, quelques équipes ont démontré l'existence de l'effet « bystander » (Figure 18). Dans les études de Nagasawa et Little [133], des cellules ont été exposées à un flux très bas de particules  $\alpha$ , tel que seulement 1% des cellules ont été traversées par les radiations, mais 30 à 50% des cellules de la population présentaient des échanges de chromatides sœurs, attestant de lésions radio-induites. De même, Zhou et al. ont démontré que les cellules, irradiées avec la même source, pouvaient induire un effet mutagène dans les cellules voisines non directement irradiées et la communication intercellulaire jouait un rôle critique dans ce processus [134]. L'effet « *bystander* » dans ce contexte pourrait favoriser l'instabilité génomique et être à l'origine des complications tardives en radiothérapie, comme la croissance d'une tumeur secondaire de la même origine ou différente.

Plus récemment, sur des cellules de mélanome et de leucémie myéloïde aigue de type 6, l'équipe de Rzeszowska-Wolny a rapporté que la majorité des modifications transcriptionnelles changeaient de manière similaire (augmentation, diminution ou aucun changement) dans les cellules irradiées et dans les cellules non-irradiées mais cultivées dans le milieu conditionné des premières [135]. Przybyszewski et al. ont rapporté une augmentation significative de l'apoptose dans des cellules non-irradiées après avoir été exposées aux signaux libérés par les cellules de mélanome directement irradiées [136]. Les résultats obtenus par Sedelnikova et al. ont montré que les cassures double-brin de l'ADN dans les cellules « non-cible » voisines, sont suivies par une apoptose accrue et la formation de micronoyaux, et une augmentation de la fraction de cellules sénescents [137]. Ce type de communication intercellulaire semble contribuer dans ce cas, aux effets anti-tumoraux de l'irradiation.

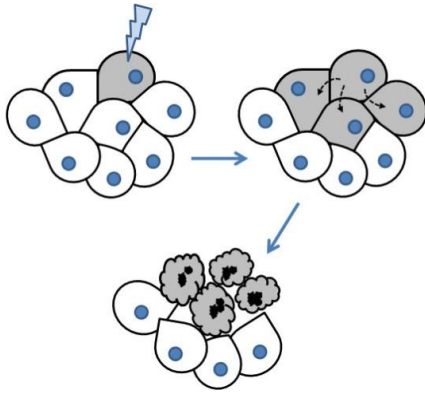


Figure 18. Effet bystander. Un signal fatal provoqué par irradiation, déclenchée en une seule cellule est transmise, à travers certains mécanismes, à des cellules voisines. Ces cellules bystanding sont, à leur tour, destinés à mourir sans être directement visés par les stimuli cytotoxiques (Extrait de Kandouz, Hopes and Disillusions in Therapeutic Targeting of Intercellular Communication in Cancer, 2011) [138]

Le transfert des dommages des cellules irradiées à leur voisines non irradiées, correspondant à cet effet « *bystander* », peut suivre, d'après les nombreuses études, au moins trois voies différentes : les jonctions de cellule à cellule (*gap junctions*), par des facteurs solubles ou par des microvésicules [139].

Azzam et ses collaborateurs [140] ont démontré dans des cultures confluentes de fibroblastes exposés aux flux bas d'irradiation  $\alpha$ , que l'effet « *bystander* » dépendait de la communication intercellulaire par les jonctions serrées. Ils ont prouvé que les voies métaboliques p53 et p21 sont activées, confirmées par une autre étude [141].

Le deuxième mécanisme de l'effet « *bystander* » proposé concerne la sécrétion de facteurs dans le milieu de culture. Une série d'études suggèrent un mécanisme par lequel les cellules irradiées sécrètent des cytokines ou d'autres facteurs qui agissent pour augmenter les taux intracellulaires de formes réactives d'oxygène dans les cellules non irradiées. Iyer et al. ont démontré que le milieu de culture issu de cellules irradiées peut induire une augmentation des échanges de chromatides soeurs lorsqu'il est utilisé pour incuber des cellules non irradiées [142].

De même, Herok et al. ont trouvé que les cellules cultivées dans un milieu de cellules irradiées, comparé avec les cellules directement irradiées, montre des changements de transcriptomes, similaires, en particulier l'up-régulation de plusieurs transcrits codant les protéines qui soutiennent la prolifération et la survie cellulaire [143].

## 5.2. Irradiation et invasion

Les cellules tumorales qui parviennent à échapper à l'effet létal de l'irradiation s'adaptent pour acquies souvent des propriétés plus invasives : elles prolifèrent plus rapidement et montrent un potentiel migratoire, invasif et angiogénique renforcé [144, 145].

Ainsi, il a été montré que l'irradiation de cellule d'hépatome humain augmentait la sécrétion de VEGF, stimulait la croissance des cellules *in vivo*, et favorisait également l'angiogenèse intratumorale. Ainsi, la radiothérapie peut entraîner l'excroissance des micro-tumeurs dormantes [146]. De façon similaire, l'irradiation sublétales de xénogreffes de mélanome humain conduit à une augmentation du nombre de métastases ganglionnaires par l'induction de l'hypoxie et de la régulation positive de l'uPAR (urokinase-type plasminogen activator receptor), un important médiateur de l'invasion des cellules tumorales [147].

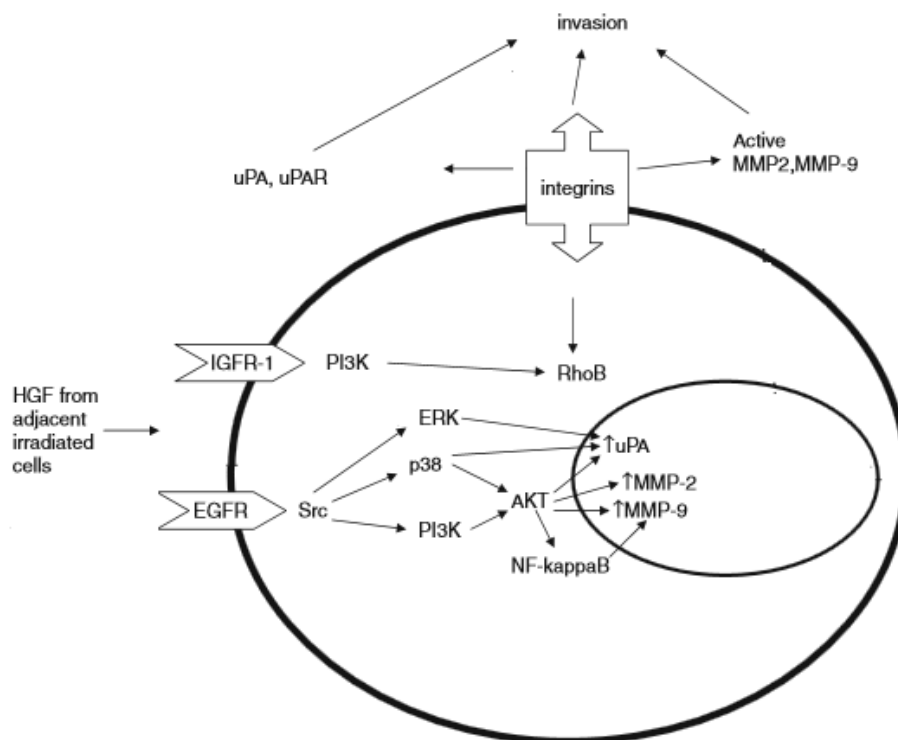


Figure 19. Schéma représentant l'invasion des cellules tumorales induite par l'irradiation (Adapté de Kargiotis, J Neurooncol, 2010) [70]

Dans les gliomes, des doses sublétales induisent la migration et l'invasion des cellules de gliome, qui s'accompagnent d'une expression renforcée de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  et de l'expression et l'activité accrues des métalloprotéases MMP-2, MMP-9, TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) ; il semblerait que l'irradiation puisse favoriser la résistance à l'apoptose en modifiant également le rapport BCL-2/BAX [144, 148]. Park et al. ont étudié le mécanisme possible de l'effet pro-invasif radio-induit. Ils ont montré que l'irradiation augmente la MMP-2 en augmentant son activité dans des cellules dépourvues de PTEN fonctionnel et ont impliqué les voies de signalisation Src/EGFR/p38/Akt et PI3K/Akt [149]. Kil et al. ont montré que l'irradiation des cellules de glioblastome renforce la sécrétion de VEGF et promeut la mobilité cellulaire par la stimulation de la voie de VEGFR2 [150] (Figure 19).

### 5.3. Irradiation et angiogénèse

Un nombre considérable d'études soutiennent que l'irradiation ionisante est capable d'améliorer l'angiogénèse induite par la tumeur [151], soit par effet direct des rayons X sur les cellules endothéliales, soit par effet indirect résultant de communications intercellulaires complexes. Comme l'angiogénèse est importante pour la prolifération des cellules tumorales, cela peut probablement expliquer en partie les échecs de la radiothérapie.

Geng *et al.* ont montré que les faibles doses de rayons X (2-3 Gy) peuvent directement potentialiser l'angiogénèse tumorale dans les GBM [152], en mettant en évidence une vascularisation et un flux sanguin plus élevés dans les xénotreffes de glioblastome après radiothérapie. *In vitro*, Vincenti *et al.* ont observé une formation tubulaire plus importante quand les HUVEC sont irradiés à 1 Gy [153]. Sofia Vala *et al.* ont montré que les cellules endothéliales HMVEC-L (*human lung micro-vascular endothelial cells*) irradiés (<0.8 Gy) montrent une capacité migratoire renforcée sans effet sur la prolifération ou la survie cellulaire [154]. *In vivo*, la même équipe a trouvé qu'une faible dose peut significativement promouvoir l'angiogénèse et la croissance tumorale est alors accélérée.

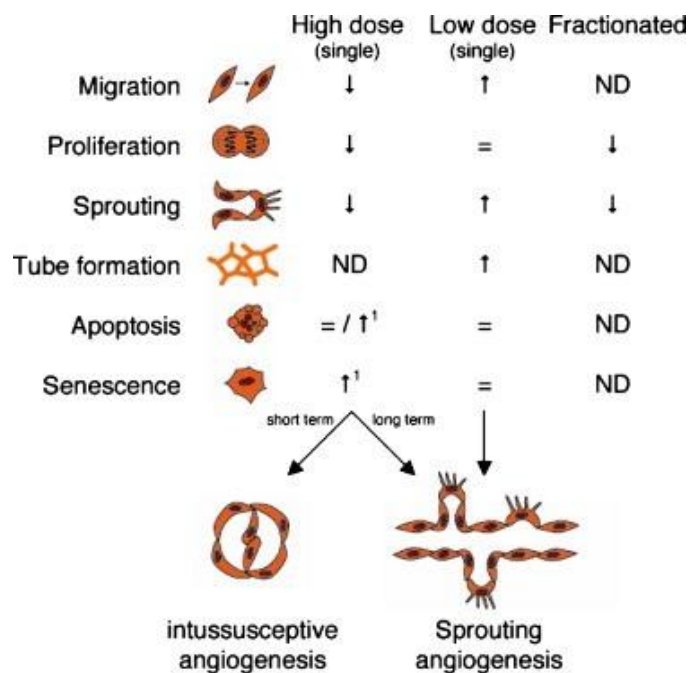


Figure 20. Effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales et l'angiogénèse. <sup>1</sup>L'effet dépend de l'état de confluence des cellules. Confluent, c'est à dire de quiescence, les cellules sont résistantes à l'apoptose, sous-confluentes, les cellules deviennent sénescents. Nd = non déterminé (Extrait de Kleibeuker, Drug Resistance Update, 2012) [155]

Les effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales et l'angiogenèse a été résumé dans la figure 20.

De plus il a été montré que l'irradiation peut induire l'up-régulation de NOS (*Nitric oxide synthase*), qui stimule la migration des cellules endothéliales *via* la voie de signalisation PI3K [70].

Kleibeuker et al. ont supposé que ces observations peuvent être transposées à la situation clinique, puisque les patients reçoivent souvent la radiothérapie sous forme fractionnée à raison de 2 Gy par jour. En outre, les effets pro-angiogéniques de l'irradiation à 2 Gy semblent être rapides et transitoires, mais la même dose répétée quotidiennement pourrait stimuler l'angiogenèse à plusieurs reprises. Dans le cas où la radiothérapie fractionnée ne conduit pas à l'élimination complète de la tumeur, un tel effet pro-angiogénique pourrait contribuer à renforcer la re-croissance tumorale et les métastases. Cependant, jusqu'à maintenant, il est difficile d'apporter les preuves cliniques de cette théorie [155].

Outre l'effet direct des radiations ionisantes sur les cellules endothéliales, plusieurs études ont montré que l'irradiation peut aussi influencer l'angiogenèse indirectement. En effet, il est largement admis qu'en dehors de la communication entre les cellules tumorales irradiées et non-irradiées, les cellules tumorales exposées aux rayons X peuvent libérer des signaux qui influencent les cellules hôte avoisinantes non ciblées [156], telles que les cellules endothéliales, nécessaires au processus angiogénique. Les cellules tumorales irradiées peuvent stimuler de façon notable l'angiogénèse *in vitro* mais également *in vivo* dans des tissus humains [146, 157]. Maddirela et al. ont observé que les cellules endothéliales traitées avec le milieu conditionné (CM) obtenu à partir de cellules de GBM irradié à 8Gy présentaient une capacité augmentée à former des microtubules [158]. Parthymou et al. ont observé que l'irradiation de cellules de gliome (C6) aboutissait à l'augmentation de l'expression de MMP-2, MMP-9 et de l'intégrine  $\alpha_v$ , ce qui s'accompagnait d'une stimulation significative de la prolifération et l'invasion des cellules endothéliales *in vitro*, ainsi que de l'angiogenèse *in vivo* [159]. Une étude récente montre que l'irradiation fractionnée (2 Gy x 3) provoque la stabilisation de la protéine HIF-1 $\alpha$ , favorisant ainsi la formation de tubules des cellules endothéliales et la migration/invasion des cellules de GBM [160]. De plus, il a été montré par différentes équipes que la libération de VEGF, plus élevée pour les cellules tumorales irradiées, pouvait stimuler la prolifération des cellules endothéliales [145, 161]. Ces résultats signifient que les cellules tumorales survivantes après irradiation peuvent initier un échange des signaux à l'origine d'une réponse endothéliale et angiogénique, qui pourrait favoriser la récurrence tumorale.



En résumé :

L'apoptose, la sénescence et la mort mitotique sont les trois processus possibles de la mort des cellules après irradiation. Ces trois types de mort participent de façon inégale à la perte de la capacité clonogénique des cellules tumorales après irradiation. La propension des cellules à mourir selon un processus mitotique ou apoptotique conditionne la radiosensibilité. En effet, si la cellule meurt principalement par mort mitotique, l'inhibition d'une ou de plusieurs voies apoptotiques n'a que peu d'influence sur sa radiosensibilité. Les tumeurs qui répondent bien aux irradiations entrent facilement en apoptose.

Malgré sa capacité à induire la mort cellulaire selon les 3 modalités précédemment décrites (apoptose, sénescence et mort mitotique), l'irradiation peut également contribuer à favoriser la survie cellulaire. Des études ont montré pour des cellules survivantes après radiothérapie, une meilleure capacité proliférative ainsi que des propriétés invasives et angiogéniques augmentées, favorisant de fait la progression tumorale post-irradiation [70, 162].

## PARTIE 3 : MICROVESICULES TUMORALES

Les microvésicules sont des vésicules extracellulaires, petits fragments cellulaires sphériques libérés par toutes cellules pendant leur apoptose ou en réponse à différents stimuli. Elles sont présentes dans les différents fluides biologiques des sujets sains et sont retrouvées, en quantité plus importante, dans de nombreuses pathologies. Elles peuvent jouer un rôle clé dans la communication intercellulaire et la propagation de divers messages à travers l'organisme. Durant ces vingt dernières années, de nombreuses études ont révélé que la plupart des cellules en culture sécrètent des microvésicules, comme par exemple les plaquettes, les cellules endothéliales, de nombreuses cellules du système immunitaire, ainsi les cellules tumorales. Les microvésicules provenant des cellules tumorales sont définies comme microvésicules tumorales (TMVs, Tumor-derived microvesicles) [163]. Comme toutes les microvésicules, ces TMVs fonctionnent comme un médiateur pour l'échange d'informations intercellulaires. Elles possèdent un mode de communication intercellulaire particulier appelé mode "reocrine". Les types classiques de communication intercellulaire: autocrine, juxtacrine et paracrine, font appel à des relations ligand/récepteurs destinés à induire une activation ou réponse de la cellule cible. Dans le mode «reocrine», des récepteurs transmembranaires fonctionnels voire activés (phosphorylés) peuvent être transmis de cellules à cellules par l'intermédiaire de ces TMVs et aboutir non pas à une activation de la cellule cible mais à l'acquisition par celle-ci de nouvelles fonctionnalités voire un changement de phénotype [164]. Il a été démontré que par ce mode, les TMV libérés par les cellules tumorales représentent un médiateur important de la communication de cellule à cellule et ces TMVs sont une partie intégrante du microenvironnement tumoral [165].

### 1. POPULATIONS

Il existe plusieurs types de microvésicules tumorales (Figure 21). Les 3 principales populations sont les exosomes, les "shedding vesicles" et les corps apoptotiques. La distinction entre eux est basée sur leur biogénèse, leurs caractéristiques morphologiques, leur densité leur contenu («cargo», etc [166]).

Les exosomes ont comme origine des endosomes ou des corps multivésiculaires, qui les contiennent et ont une taille de 30 à 150nm ; ils ont une forme particulière et homogène, ronde et aplatie au centre ("cup-shaped", figure.X). Sur gradient de sucrose, ils ont une densité comprise entre 1.12 et 1.19 g/ml.

Les "shedding vesicles" sont directement formées à partir de la membrane plasmique des cellules et ont une taille de 100nm à 1µm ; ils ont une forme hétérogène et leur densité n'est pas définie à notre connaissance [167].

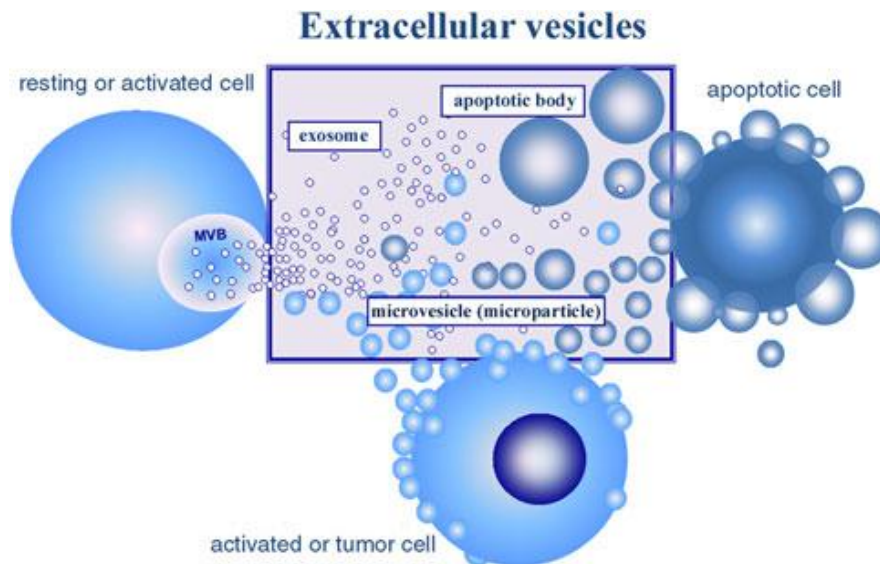


Figure 21. Représentation schématique des vésicules extracellulaires. La population majeure comprend exosomes, MV et de corps apoptotiques. Pour simplifier la figure, les cellules ne sont pas représentés à libérer tous les types de vésicules (Extrait de György, Cell. Mol. Life Sci., 2011) [168]

Les corps apoptotiques résultent de la décomposition cellulaire et de la fragmentation nucléaire. Même si la plupart des auteurs considèrent que la taille du corps apoptotique varie de 1 à 5µm [169, 170], certains auteurs ont décrit une répartition entre 500 nm et 5 µm [171]. Des différences dans le type cellulaire et les conditions de culture pourraient expliquer ces écarts.

Dans notre travail de doctorat, nous nous focaliserons sur les exosomes et les "shedding vesicles".

## 2. BIOGENESE DE MICROVESICULES TUMORALES

### 2.1. Exosomes

Les exosomes proviennent de la fusion d'endosomes particuliers, appelés corps multivésiculaires (MVB), avec la membrane plasmique des cellules (Figure 22). Les corps multivésiculaires (MVB) mesurent 200 à 500nm de diamètre et sont remplis de vésicules intraluminales (ILV), d'une taille de 30 à 100nm. Ces vésicules intraluminales proviennent du détachement de la partie vacuolaire des endosomes précoces précurseurs des MVB [172].

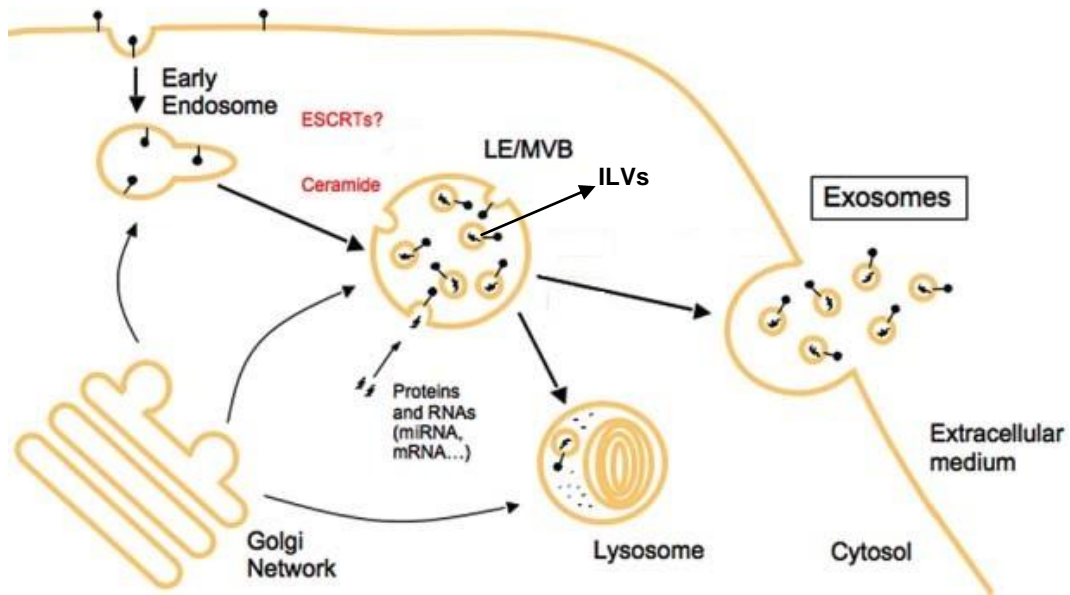


Figure 22. Schéma représentatif de la biogenèse des exosomes (Adapté de Boborie, Traffic, 2011) [172]

Les MVB contiennent des lipides et des protéines, comme des sphingolipides, céramides et le cholestérol ; des tétraspanines comme le CD63 [173]. Les MVB peuvent soit fusionner avec les lysosomes pour détruire des vésicules intraluminales et leur contenu, soit fusionner avec la membrane plasmique, pour déverser à l'extérieur les vésicules intraluminales (figure. 22). Ces vésicules intraluminales une fois retrouvées dans les fluides extracellulaires sont appelées exosomes. Ces derniers sont porteurs de protéines soit provenant de l'appareil de Golgi, soit internalisés par endocytose [172].

La formation des vésicules intraluminales (ILV), est une étape essentielle. Concernant les mécanismes, les principaux font appel aux Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT).

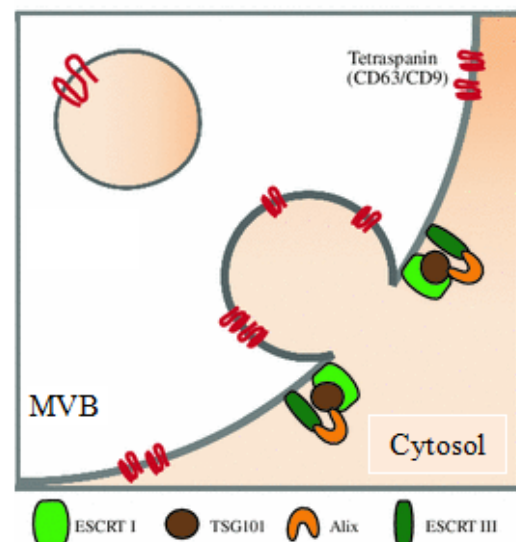


Figure 23. Schéma simplifié de la formation des ILV (Extrait de Akers, Journal of Neuro-Oncology, 2013) [174]

Il existe 5 complexes différents : ESCRT 0, I, II, III et Vsp4 (Vascular protein sorting-associated protein 4). A la surface de l'endosome précoce ou du MVB, l'ESCRT-I recrute Tsg101 pour former un complexe qui recrute ESCRT-III par l'intermédiaire d'Alix, une protéine qui se lie à la fois à la Tsg101 et à ESCRT-III [175]. ESCRT III ainsi recruté permettrait la cisssion de la membrane plasmique [174] (Figure 23).

Différentes molécules peuvent influencer le processus de formation des ILV.

Ainsi, les céramides, provenant du clivage des sphingomyélines, sont des lipides avec une forme en cône, dont la présence pourrait incurver la membrane et aboutir à la formation des vésicules intraluminales (Figure 22) [176].

Le LBPA (lysophosphatidic acid) et Alix quant à eux peuvent modifier la fonction des rafts lipidiques et influencer la courbure membranaire. Il a été démontré qu'un anticorps contre le LBPA désorganise la morphologie des MVB [177], que l'ajout d'Alix sur des liposomes riches en LBPA inhibe fortement la génération des ILV, que *in vivo*, la déplétion d'Alix par des siRNA réduit le nombre des endosomes [178] et que la déplétion en Tsg101 par des siRNA diminue de 40% la formation des vésicules intraluminales [179].

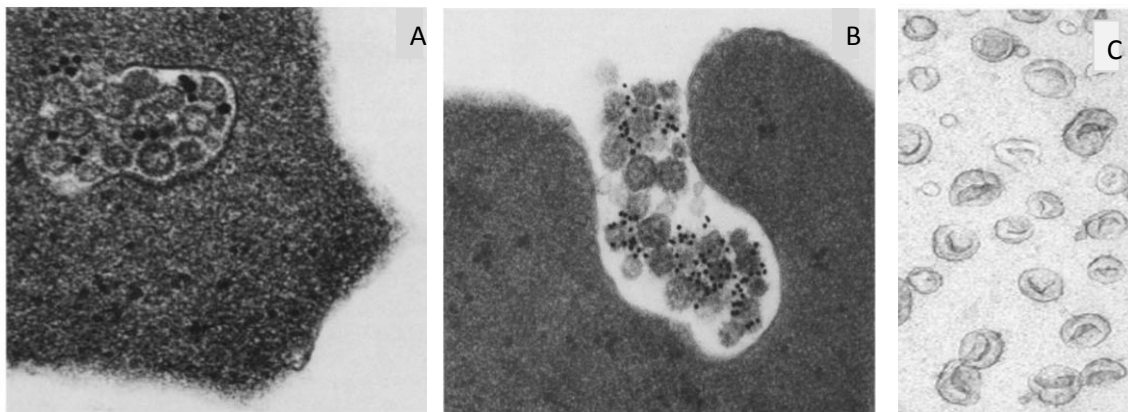


Figure 24. Fusion des MVB avec la membrane plasmique et morphologie des exosomes. **A.** dans la MVE, les billes d'or sont proches des petits corps denses de ~50nm qui sont à l'intérieur de MVB de taille entre 300-500nm. **B.** Exocytose des petits corps denses marqués avec billes d'or vers l'extérieur cellulaire. (Extrait de Pan, the journal of Cell Biology, 1985). **C.** Visualisation par microscopie électronique des exosomes. Les exosomes apparaissent sous forme de coupe (cup-shaped) de diamètre compris entre 50 et 100 nm (Extrait de Fevrier, Curr Opin Cell Biol, 2004) [180]

Dès 1985, les premières images de l'exocytose de vésicules intraluminales d'une cinquantaine de nanomètres sont observées en microscopie électronique [181]. Les auteurs observent que certains MVB fusionnent avec la membrane plasmique, et libèrent ainsi dans le milieu

extracellulaire les ILV appelés alors exosomes de 50 à 100nm portant des transferrines marqués avec les billes d'or (Figure. 24).

## 2.2. Shedding vesicles

La formation de "shedding vesicles" est très différente, elle est le résultat d'une interaction dynamique entre la redistribution des phospholipides et la contraction des protéines du cytosquelette.

La distribution des protéines et des phospholipides dans la membrane plasmique n'est pas uniforme et forme des micro-domaines. Dans une membrane plasmique normale, le feuillet interne est riche en phosphatidyl-sérine et phosphatidyl-éthanolamine, le feuillet externe en phosphatidyl-choline et sphingomyéline. Cette distribution asymétrique est sous le contrôle de 3 enzymes [182] (Figure 25): 1 - les flippases qui pompent spécifiquement les aminophospholipides de type phosphatidyl-sérine du feuillet externe vers le feuillet interne. Elles sont inhibées par augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire ; 2 - les floppases qui est une pompe qui transfère les phosphatidyl-cholines du feuillet interne vers le feuillet externe. de la membrane. Elles sont dépendantes de l'ATP ; 3 - les scramblases qui favorisent la redirection non spécifique bidirectionnelle des différents phospholipides pour les rééquilibrer à travers la membrane. Elle est activée par augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$ .

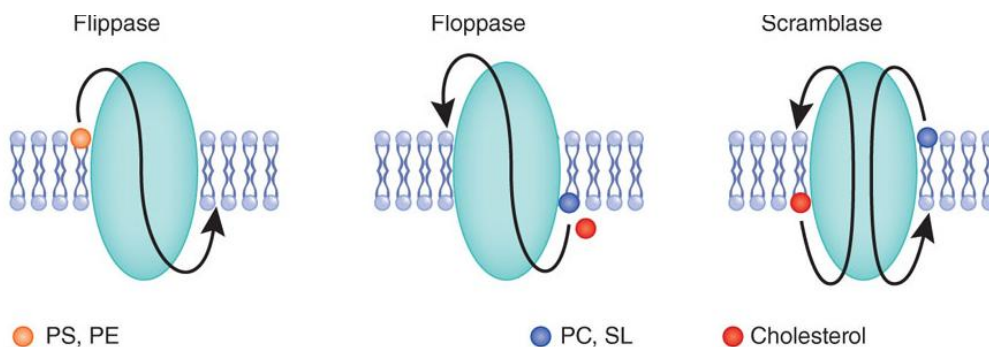


Figure 25. Fonctions de flippases, floppases et scramblases dans la membrane plasmique (Extrait de Clark, Nature Immunology, 2011) [182]

En situation de stimulation cellulaire, il existe une augmentation significative et soutenue de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique qui stimule les scramblases et les floppases mais inhibe les flippases. Une translocation rapide de phosphatidyl-sérine et phosphatidyl-éthanolamine se produit depuis le feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique, suivie d'un influx lent de la phosphatidyl-sérine vers le feuillet interne, produisant un déséquilibre phospholipidique transitoire dans 2 feuillets membranaires [183, 184].

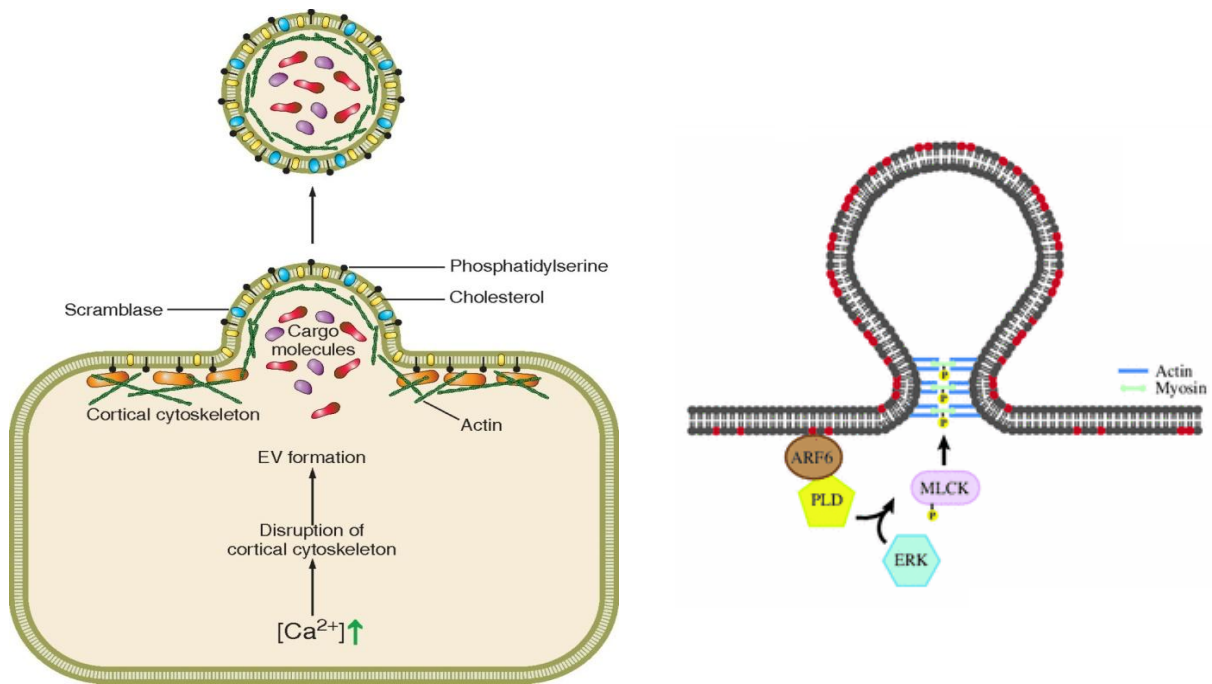


Figure 26. Mécanismes proposés pour la formation des "shedding vesicles" dérivés d'une membrane. Gauche, formation de shedding vesicles par une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire responsable de l'activation de la scramblase et du passage de la phosphatidylsérine de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane plasmique. La perturbation du cytosquelette a également été observée (Extrait de Turturici, American Journal of Physiology, 2014). Droite, formation via ARF6 qui peut initier ERK phosphorylation afin de déclencher la libération de "shedding vesicles" (Extrait de Akers, Journal of Neuro-Oncology, 2013) [174]

L'asymétrie dans la membrane plasmique entraîne des tensions responsables de la formation de bulles membranaires qui permettent de former des vésicules. La vésiculation est facilitée par la contraction de protéines contractiles et par la rupture  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante du réseau protéique du cytosquelette. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  contribue à la réorganisation du cytosquelette en activant des protéases cytosoliques qui clivent la taline et l'activine et ainsi induisent une rupture du cytosquelette permettant la vésiculation.

Il a été démontré que dans un modèle de mélanome, la surexpression de GTP-binding protein ADP-ribosylation factor 6 (ARF6), conduit à une sécrétion accrue de "shedding vesicles". La forme activée de l'ARF6 initie une cascade de signalisation qui recrute la kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase), qui à son tour phosphoryle et active la kinase MLCK (myosin light-chain kinase), qui déclenche la libération de "shedding vesicles" (Figure 26). Fait intéressant, cette cascade de signalisation ne modifie pas significativement la libération des exosomes, confortant le fait que la biogenèse des "shedding vesicles" et des exosomes sont distincts [185].

### 3. REGULATION DE LA LIBERATION DES MICROVESICULES TUMORALES

Différentes études ont montré que différents facteurs mécaniques, chimiques et biologiques stimulent la libération des différents types de microvésicules tumorales, nous en avons précisé certains (Tableau 5) :

Tableau 5. Liste non-exhaustive des facteurs modifiant la libération des exosomes et "shedding vesicles" d'après la littérature.

Population	Factures	Référence
Exosomes	Calcium intracellulaire	Savina, 2005; Qu, 2009; Hoffman, 2009
	Rab11	Van Blitterswijk, 2003
	Cholestérol	Faure, 2006; Liorente, 2007
	Voie de NFκB	Arita, 2008
	PH acide	Parolini, 2009
	Détachement des cellules adhérentes	Koumangoye, 2011
	GTPase RhoA	Li, 2012
	Hypoxie	King, 2012
	Rab27a	Borbie, 2012; Peinado, 2012
	Héparanase	Thompson, 2013
	Irradiation	Yu, 2006; Lehmann, 2008; Arscotte, 2013
	Temozolodmide	Shao, 2012
	Platelet-derived growth factor	Lopatina, 2014
	Shedding vesicles	Force de cisaillement
ATP		Frenkel, 1986
Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate(PIP2)		Raucher, 2000; Flaumenhaft, 2006
Calcium intracellulaire		VanWijk, 2003
Cytokines comme TNF-α, IL-1		Ratajczak, 2006
C5b-9 complexe		Ratajczak, 2006
EGFRvIII		Al-Nedawi, 2008
Hypoxie		Wysoczynski, 2009
Irradiation		Wysoczynski, 2009
Cholestérol		Muralidharan-Chari, 2009
ARF6		Muralidharan-Chari, 2009

-Plusieurs études suggèrent très fortement que le calcium intracellulaire jouerait un rôle important dans l'étape de fusion des MVB avec la membrane plasmique et la sécrétion des exosomes [186], ainsi que lors de la vésiculation des shedding vesicles [187]. Il a été démontré que l'utilisation du l'EGTA (*ethylene glycol tetraacetic acid*) en bloquant l'augmentation du calcium cytosolique diminue la libération de microvésicules [187].

- La condition hypoxique peut stimuler aussi la libération des deux types de microvésicules [188, 189]. Des traitements anticancéreux peuvent aussi affecter cette libération. Deux équipes ont montré que la sénescence induite par irradiation peut activer le p53 qui peut lui-même stimuler la libération des exosomes [190, 191]. L'irradiation peut aussi induire 4 fois plus la libération de shedding vesicles [188]. Par ailleurs, Shao et al. ont montré que le Temozolomide à 100μM et



250µM peut diminuer respectivement de 40% et 50% la libération des exosomes [192].

Le bourgeonnement a lieu à des endroits spécifiques de la membrane : les rafts lipidiques sont importants pour l'initiation du bourgeonnement. Il a en effet été démontré que la déplétion pharmacologique en cholestérol inhibait le bourgeonnement des shedding vesicles [193].

#### 4. COMPOSITION DES MICROVESICULES TUMORALES

Les deux types de microvésicules ont une structure de bicouche lipidique et portent un large répertoire d'informations, comprenant des protéines (par exemple, des cytokines, des récepteurs membranaires, des récepteurs et des ligands), des acides nucléiques (par exemple, l'ADN, l'ARNm, l'ARN non codant), et des lipides. Leur contenu reflète généralement la nature et le statut de la cellule d'origine. Ils ne contiennent pas d'organites.

Updated on April 2014			
	All	Eukaryotes	Prokaryotes
<b>Publications</b>			
Articles	6,879	6,021	858
Principal investigators	3,336	2,886	483
<b>Proteomes</b>			
Studies	117	97	20
Datasets	176	148	28
Proteins	78,971	74,696	4,275
<b>Transcriptomes</b>			
mRNA			
Studies	17	17	0
Datasets	28	28	0
mRNAs	74,430	74,430	0
miRNA			
Studies	11	11	0
Datasets	29	29	0
miRNAs	18,119	18,119	0
<b>Lipidomes</b>			
Studies	22	21	1
Datasets	29	28	1
Lipids	550	534	16
<b>Metabolomes</b>			
Studies	1	1	0
Datasets	1	1	0
Metabolites	10	10	0
<b>Participating Laboratories (Countries)</b>		75 (20)	
<b>Accesses (Countries)</b>		30,004 (69)	

EVpedia

<http://evpedia.info>

Figure 27. Nombre d'études, d'investigations, et des différents contenus des microvésicules d'après la base de données EVpedia (<http://evpedia.info>).

Il y a des bases de données qui précisent les compositions des microvésicules : la base Exocarta, renommée Vesiclepedia en 2012, concerne les exosomes; la base EVpedia concernent les 2 populations microvésiculaires. En avril 2014, plus de 74,696 protéines, 534 lipides, 74,430 ARNm et 18,119 microARN avaient été identifiés dans différents microvésicules provenant de

différents types de cellules d'après cette base de données EVpedia (Figure 27, <http://evpedia.info>).

Ainsi les microvésicules sont des cargos permettant de transporter des protéines communes ou tumorales ainsi que des ARN.

## 4.1. Cargos protéiques

### 4.1.1 Cargo commun

#### - Exosomes [194]

De nombreuses protéines sont retrouvées dans les exosomes. Certaines sont spécifiques du type cellulaire, d'autres sont communes à tous les exosomes quelle que soit la cellule qui les sécrète. Dans la littérature, les principales protéines décrites sont les suivantes (Figure 28).

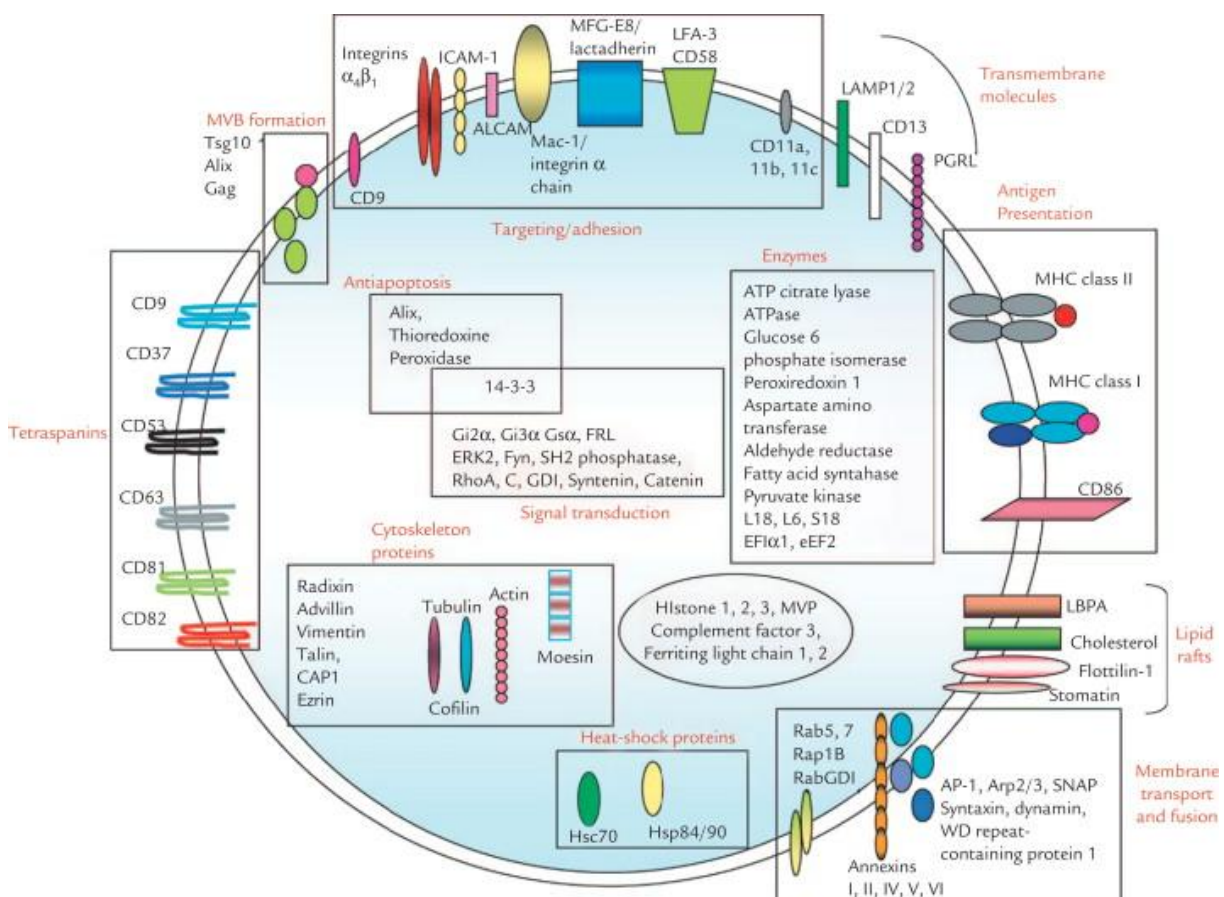


Figure 28. Constituants protéiques des exosomes, y compris les tétraspanines, des protéines de la formation des corps multivésiculaires, des molécules transmembranaires, des protéines de la présentation des antigènes, des enzymes, des protéines anti-apoptotiques, des molécules d'adhésion, des protéines de transduction du signal, cytosquelette des protéines, des protéines de choc thermique, les radeaux lipidiques et le transport membranaire et des protéines de fusion (Extrait de Natasha, Clinical therapeutic, 2014) [195]

- des intégrines :  $\alpha 4\beta 1$
- des t $\acute{a}$ raspanines : CD63, CD81
- les mol $\acute{e}$ cules impliqu $\acute{e}$ es dans la pr $\acute{e}$ sentation d'antig $\acute{e}$ ne : MHC I et MHC II
- des chaperons : Hsp70, Hsp90
- des mol $\acute{e}$ cules du cytosquelette ou associ $\acute{e}$ s au cytosquelette : Actine, Tubuline,
- des prot $\acute{e}$ ines de signalisation intracellulaire : 14-3-3, ERK2
- des prot $\acute{e}$ ines impliqu $\acute{e}$ s dans le trafic membranaire : Rab, et des Annexines
- des prot $\acute{e}$ ines impliqu $\acute{e}$ s dans la voie endocyttaire : Alix, la clathrine, Tsg101
- des enzymes du m $\acute{e}$ tabolisme cellulaire: pyruvate kinase.

Parmi les prot $\acute{e}$ ines recens $\acute{e}$ es dans les exosomes, on peut souligner celles qui sont sp $\acute{e}$ cifiquement concentr $\acute{e}$ es dans les fractions exosomales par rapport aux autres v $\acute{e}$ sicules s $\acute{e}$ cr $\acute{e}$ t $\acute{e}$ es par les cellules : hsp70, Alix, CD63 (t $\acute{a}$ raspanine), et Tsg101. Ces prot $\acute{e}$ ines sont impliqu $\acute{e}$ es dans les m $\acute{e}$ canismes de formation des ILV  $\grave{a}$  l'int $\acute{e}$ rieur des MVB. Dans les  $\acute{e}$ tudes, ces prot $\acute{e}$ ines sont ainsi classiquement utilis $\acute{e}$ es comme marqueurs sp $\acute{e}$ cifiques des exosomes.

#### - *Shedding vesicles*

La pr $\acute{e}$ sence des prot $\acute{e}$ ines dans les "shedding vesicles" est s $\acute{e}$ lective en fonction du type cellulaire, ainsi que du site du bourgeonnement. Des prot $\acute{e}$ ines sp $\acute{e}$ cifiques peuvent  $\hat{e}$ tre incluses ou exclues de la membrane, ce qui conduit  $\grave{a}$  une expression globale diff $\acute{e}$ rente de prot $\acute{e}$ ines de celle de la surface des cellules d'origine [196]. Par exemple, les v $\acute{e}$ sicules lib $\acute{e}$ r $\acute{e}$ es par les leucocytes polymorphonucl $\acute{e}$ aires (PMC) expriment la s $\acute{e}$ lectine, les int $\acute{e}$ grines, mais pas le CD14, les v $\acute{e}$ sicules lib $\acute{e}$ r $\acute{e}$ es par les monocytes sont charg $\acute{e}$ es avec de l'IL-1 $\beta$  [165]. L'expression de EGFRvIII est trouv $\acute{e}$ e dans les microv $\acute{e}$ sicules issues des glioblastomes [164]. Ces exemples montrent que le transfert de mol $\acute{e}$ cules dans les "shedding vesicles" est un processus s $\acute{e}$ lectif, leur conf $\acute{e}$ rant des propri $\acute{e}$ t $\acute{e}$ s et des r $\hat{o}$ les fonctionnels qui diff $\acute{e}$ rent de ceux de leurs cellules parentales [165]. Jusqu' $\grave{a}$  maintenant, un marqueur sp $\acute{e}$ cifique de "shedding vesicles" reste inconnu.

#### 4.1.2. *Cargo tumoral*

En plus des cargos prot $\acute{e}$ iques communs; les microv $\acute{e}$ sicules d'origine tumorale (TMV) contiennent des antig $\acute{e}$ nes tumoraux ou des r $\acute{e}$ cepteurs tumoraux provenant des tumeurs  $\grave{a}$  partir de laquelle elles sont d $\acute{e}$ riv $\acute{e}$ es, tels que le carcinoembryonic antigen (CEA), le human epidermal growth factor receptor 2 (Her2), et l'EGFRvIII (glioma) [197]. Par ex, les exosomes

provenant des cellules de carcinomes du système Oto-rhino-laryngologique ou de cellules dendritiques normales portent des marqueurs communs comme CD63 et LAMP-1, mais seuls les exosomes tumoraux portent le FasL et TRAIL (tumeur-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand) [198]. Whiteside et al. ont conclu que les exosomes tumoraux sont enrichies en TAAs (tumeur-associated antigens), MHC I et MHC II, facteurs de croissance comme EGFR ou HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2), ainsi que Fas, TRAIL etc [199] (Figure 29).

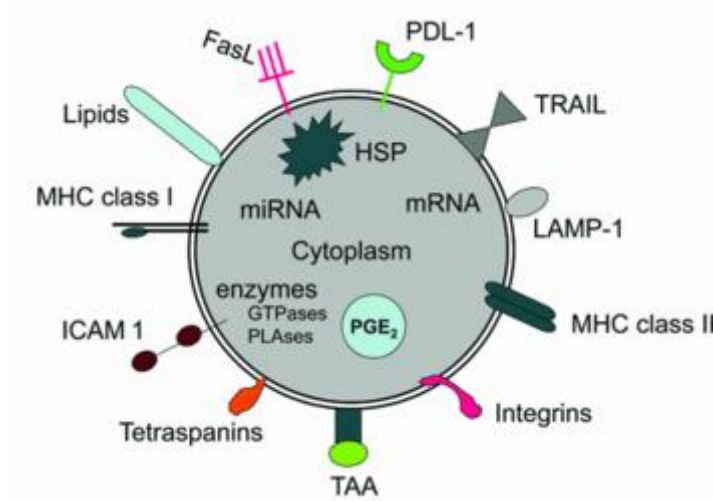


Figure 29. Schéma montrant certaines protéines et des lipides généralement présents dans les TMVs (Extrait de Whiteside, Biochemical Society Transactions, 2013) [199]

Tableau 6 : Liste non-exhaustive des études du profil protéomique des microvésicules tumorales issues de différents cancers.

Origine of TMV	Comments	Reference
Colorectal cancer cell (HT29)	957 proteins	Choi, 2011
Lung cancer cell (pleural effusion)	Totally 264 proteins identified, Enrichment of proteins related to EGFR signaling	Park, 2013
Prostate cancer cell (PC-3)	Specific proteins: Tetraspanin CD151 and the glycoprotein CUB domain-containing protein 1	Sandvig, 2012
Melanoma cell	41 Proteins identified	Mears, 2004
Breast adenocarcinoma (BT-474,MDA-MB-231)	HER2 identified	Koga, 2005
GBM:		
U373	EGFRvIII,	Al-Nedawi, 2008
Multiple lines	EGFR, EGFRvIII, TGF- $\beta$	Graner, 2009
U87	VEGF-A	Skog,2009
Cell lines and samples	EGFR, EGFRvIII, PDPN, IDH1	Shao, 2012

Par ailleurs, différentes études se sont focalisées sur l'analyse protéomique des microvésicules provenant des cellules tumorales ou du liquide corporel des patients atteints de différents types de cancers, tel que le cancer colorectal [200], le cancer du prostate [201], le cancer du poumon [202], le glioblastome [203], nous avons résumé dans le Tableau 6 les résultats de certaines études.

Dans le Glioblastome, on constate que, la protéine marqueur la plus connue et la plus spécifique est le récepteur EGFRvIII qui a été identifié dans les TMV provenant à la fois des lignées cellulaires et du sérum de patients [164, 192, 203]. EGFRvIII semble être un excellent biomarqueur. VEGF-A a aussi été identifié dans les GBM par l'étude de Skog [204].

#### 4.2. Cargo d'ARN

Les microvésicules contiennent de l'ARN, qui permet le transfert intercellulaire de messages génétiques. Les types d'ARN initialement découverts sont l'ARN messager (ARNm) et le microARN (miARN). Actuellement, il y a un intérêt croissant pour l'analyse du transcriptome complet des microvésicules, avec les progrès rapides de la technique [205].

Concernant les microvésicules tumorales, des études ont focalisé sur le profil transcriptomique de ce type de microvésicules (Tableau 7).

Tableau 7. Différentes études sur le profil transcriptomique des TMVs (adapté de Choi, proteomic, 2013) [206]

Origine of TMV	Type of RNA	Reference
Colorectal cancer cell (SW480)	mRNA miRNA	Hong, 2009 Oshima, 2010
Breast cancer cell (MDA-MB-231)	mRNA	Lau, 2012
Pancreas cancer cell	mRNA	Nazarenko, 2010
liver cancer cell (HepG2)	miRNA	Wang, 2010
Lung cancer cell	miRNA	Wang, 2010
Glioblastome: U87	mRNA (EGFRvIII)	Skog, 2009
Serum of patient	RNA	Noerholm, 2010
U251	miRNA	Li, 2013

Dans le GBM, Skog et al. ont trouvé que les cellules de GBM en culture sécrètent des exosomes contenant des mARN, qui peut avoir un effet sur d'autres cellules [204].

Li et al. ont montré que les microvésicules de GBM (U251) sont majoritairement des exosomes et abritent des ARN codants et non codants dans des proportions différentes des cellules d'origine. Les TMV montrent un appauvrissement relatif en miARN par rapport à leurs cellules d'origine, mais sont enrichis de nouveaux miARN, dont la fonction est mal connue, comme miR-451[207].

Noerholm et al. ont montré des modifications du profil transcriptomique des microvésicules issues des sérum provenant des patients atteints de GBM par rapport à celles issues de sérum témoins. Dans l'ensemble, le taux en ARN dans les TMV de patients atteints de GBM était plus élevé que dans les contrôles sains, mais l'ARN supplémentaire était principalement de taille <500 nt. [208].

## 5. CONTACT DE MICROVESICULES AVEC DES CELLULES CIBLES

Ces microvésicules peuvent interagir avec d'autres cellules appelées cellules receptrices (Figure 30).

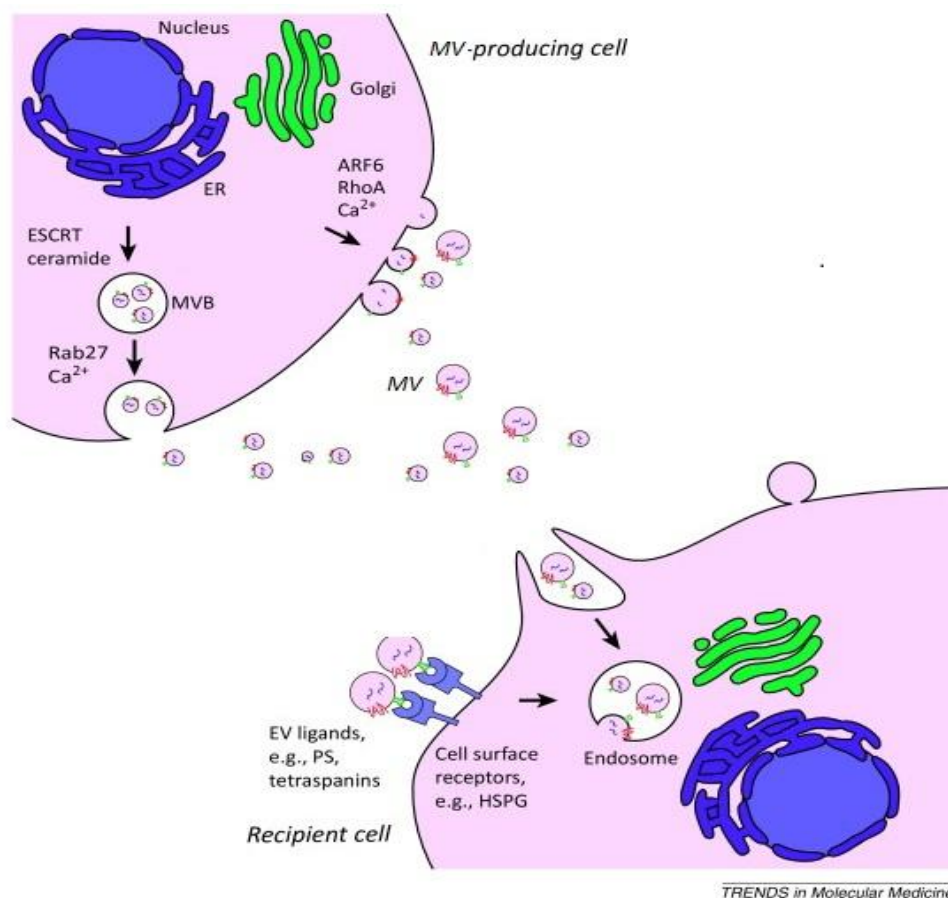


Figure 30. Processus de l'interaction intercellulaire par les exosomes. Les cellules libèrent des exosomes et des shedding vesicles qui peuvent être internalisées par les cellules cibles. L'internalisation comprennent 3 modalités : par interactions ligand/receptor, par fusion avec la membrane des cellules cibles, ou par endocytose. (Adapté de Vader, Trends in molecular medicine, 2014)[167]

Des mises en évidences directes ou indirectes proposent que les microvésicules peuvent soit être fixées sur la membrane cellulaire réceptrice [209], et induire l'activation en aval des voies de signalisation ; soit être internalisées ou incorporées par les cellules réceptrices par différents mécanismes possibles : endocytose ou fusion directe avec la membrane cellulaire. Ici, nous nous focalisons sur les mécanismes de l'internalisation. Une revue récente a bien résumé ces différentes procédures [210].

L'internalisation de microvésicules peut être extrêmement rapide dès 15 minutes après la mise en contact. Il a été montré que lorsque les cellules sont incubées à 4 °C, leur capacité d'internalisation est considérablement réduite, suggérant que c'est un processus nécessitant de l'énergie [211, 212], ceci est confirmé par l'observation que les microvésicules ne sont pas incorporées par les cellules fixées en paraformaldéhyde [213].

L'incorporation dans des cellules réceptrices peut être directement visualisée par cytométrie en flux ou microscopie confocale, les microvésicules pouvant être marquées avec un colorant fluorescent marquant les lipides membranaires, comme PKH67, DiI, DiO qui sont lipophiles et n'affectent pas l'internalisation de MV ; ou avec des composés chimiques comme CFSE ou CFDA [211].

### 5.1. Fusion directe des TMVs avec les cellules réceptrices

La fusion des bicouches lipidiques des TMV avec les cellules réceptrices est la rencontre de 2 membranes distinctes. Lorsque les bicouches lipidiques sont à proximité les feuillettes extérieurs sont en contact direct ce qui conduit à la formation d'une tige d'hemi-fusion avec 2 feuillettes extérieurs fusionnés. Ensuite, l'expansion de la tige d'hemi-fusion produit un diaphragme à partir duquel un pore de fusion s'ouvre. En conséquence, deux noyaux hydrophobes se mélangent en formant une structure cohérente [214] . Cette fusion est renforcée sous condition acide [215] et la composition du "raft lipidique " de la membrane est favorisante [216].

### 5.2. Endocytose

Le mode principal de l'incorporation des microvésicules avec les cellules réceptrices est l'endocytose. Il y a 3 types différents : l'endocytose médiée par la clathrin, la phagocytose et la macropinocytose (Figure 31).

-Les vésicules recouvertes de clathrin déforment lors de leur contact avec la cellule réceptrice, la membrane qui s'effondre alors en formant un bourgeon vésiculaire qui mûrit puis est libéré vers

l'intérieur cellulaire. Le clathrine est ensuite éliminé de la surface de la vésicule intracellulaire formée qui peut alors fusionner avec l'endosome pour y déverser son contenu [217].

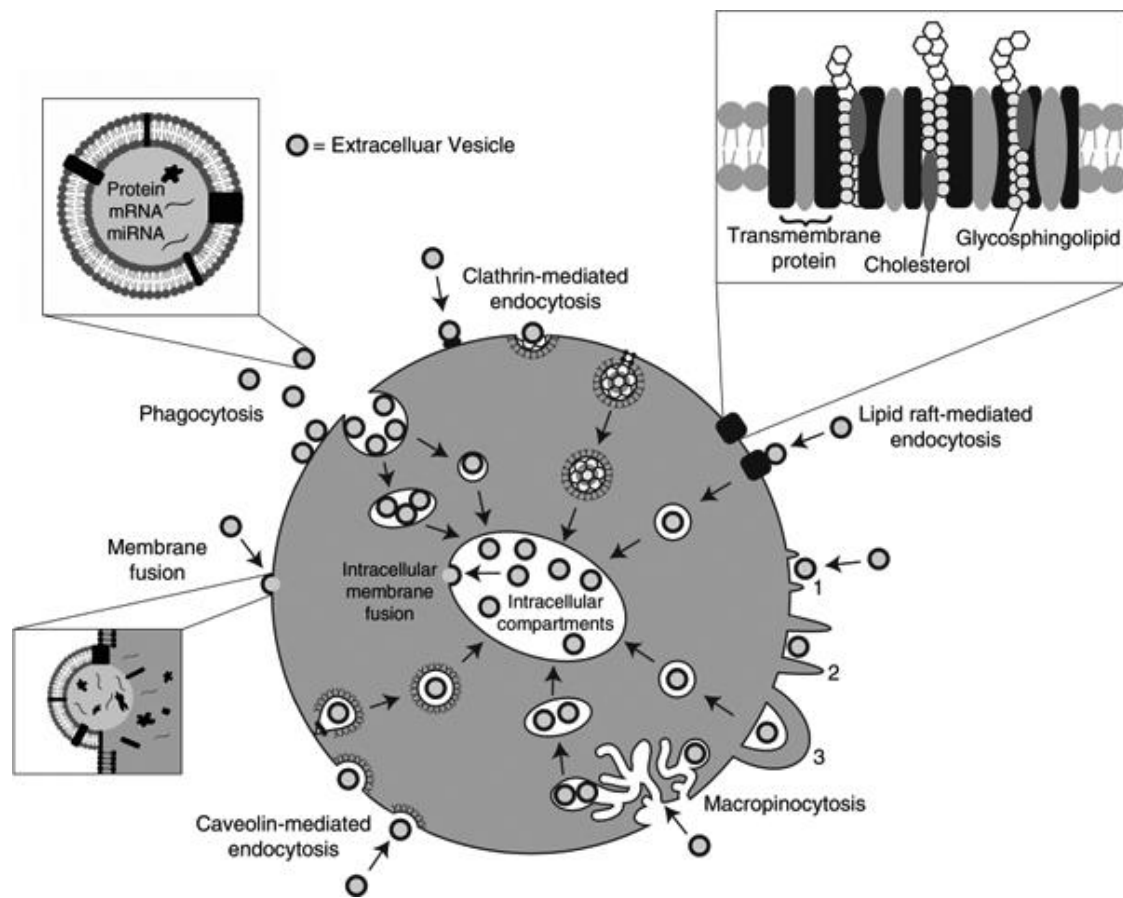


Figure 31. Principales voies d'internalisation des microvésicules dans les cellules réceptrices. (Extrait de Ann Mulcahy, Journal of Extracellular Vesicles, 2014) [210]

-La phagocytose a lieu via des récepteurs et implique la formation progressive d'invaginations autour de la microvésicule à l'internalisation, avec ou sans la participation d'extensions enveloppantes de la membrane plasmique (comme pour macropinocytose) [218].

-La macropinocytose implique la formation d'invaginations membranaires dans lesquelles pénètrent les microvésicules. Les vésicules qui en résultent sont libérées vers l'intérieur cellulaire et transportent également le liquide extracellulaire et les composants provenant de la région autour de la membrane [219].

Ces mécanismes peuvent être facilités ou inhibés.

Les microvésicules sont enrichies en phosphatidyl-sérine sur leur membrane externe. Ainsi, la phosphatidyl-sérine exposée peut se lier sur des cellules réceptrices à ses récepteurs, comme Tim1, Tim4 ou BAI1, ce qui facilite l'entrée des microvésicules dans les cellules. Il existe une



analogue concurrentiel soluble de la PS [220] et l'annexine-V (une protéine qui se lie PS) [164, 221] qui réduisent l'absorption des vésicules extracellulaires par les cellules réceptrices.

L'interaction de certaines protéines peut aussi jouer un rôle. Nazarenko et al. ont montré que les cellules sur-exprimant Tspan8 (une membre de la famille des ténaspanines) libèrent des MV portant un complexe Tspan8-CD49d, qui peut contribuer à l'absorption des MV par les cellules endothéliales aortiques [222].

Par ailleurs, l'endocytose est aussi dépende du type cellulaire. Le transfert des shedding vesicles aux monocytes est complètement dépend du calcium, alors qu'il ne l'est pas pour leur transfert aux cellules B. Un anticorps anti-annexin V peut significativement diminuer le transfert aux monocytes, alors qu'il n'a aucun effet sur le transfert aux lymphocytes B [223].

## 6. FONCTIONS DES MICROVESICULES TUMORALES

### Les microvésicules tumorales ont de nombreuses fonctions

#### 6.1. Progression tumorale

La libération de TMV peut affecter le phénotype et la fonction des cellules réceptrices sans un contact direct cellule-cellule [224].

Tableau 8. Protéines portées par les TMVs et leur fonction potentielle dans la progression tumorale (Extrait de Muralidharan-Chari, Journal of Cell Science, 2010) [193].

Protein type	Proteins of interest	Functional significance	References
Soluble	Proteases (MMP2, MMP9, uPA)	ECM degradation upon rupture of released microvesicles	(Angelucci et al., 2000; Ginestra et al., 1998; Baj-Krzyworzeka et al., 2006; Sidhu et al., 2004)
	VEGF	Promotes angiogenesis	(Baj-Krzyworzeka et al., 2006; Taraboletti et al., 2006; Kim et al., 2002)
Membrane associated	$\beta$ 1 integrin	ECM attachment	(Dolo et al., 1998; Muralidharan-Chari et al., 2009a)
	Proteases (MT1MMP, Cathepsin B)	ECM modification and MMP activation	(Hakulinen et al., 2008; Giusti et al., 2008; Taraboletti et al., 2006; Dolo et al., 1998)
	MHC-class I	Not defined. Antigen presentation?	(Dolo et al., 1998; Muralidharan-Chari et al., 2009a; Baj-Krzyworzeka et al., 2006)
	EGFR	Receptor tyrosine kinase signal transfer	(Al-Nedawi et al., 2008)
	VAMP3	v-SNARE	(Muralidharan-Chari et al., 2009a)
	ARF6	Regulation of microvesicle release	(Muralidharan-Chari et al., 2009a)
	HER2	Receptor signal transfer	(Sanderson et al., 2008)
	TNFL6 (FasL)	Immune evasion, promotes T-cell apoptosis	(Andreola et al., 2002; Huber et al., 2005; Kim et al., 2005)
	LMP-1	Immune evasion; inhibits leukocyte proliferation	(Flanagan et al., 2003)
	CD147/EMMPRIN	Proangiogenic activity and ECM degradation either directly or by activating proteases	(Millimaggi et al., 2007; Baj-Krzyworzeka et al., 2006; Sidhu et al., 2004)
Cytoskeleton associated	Tissue factor	Thrombus formation, activation of cancer stem cells	(Zwicker et al., 2009; Milsom et al., 2007)
	MUC1	Not defined. Facilitates thrombus formation by increasing plasma viscosity?	(Tesselaar et al., 2007)
	Actin	Not defined. Cortical microvesicle skeleton?	(Charras et al., 2005; Paluch et al., 2005; Muralidharan-Chari et al., 2009a)
	Myosin	Pinching of vesicle neck during release of microvesicles	(McConnell et al., 2009; Muralidharan-Chari et al., 2009a)

Les TMV facilitent le transfert de messages inter-cellulaires, comme des protéines solubles, des acides nucléiques, des protéines transmembranaires, des récepteurs de chimiokines, le facteur tissulaire, et des récepteurs de tyrosines kinases impliqués dans de nombreux aspects de la progression tumorale (Tableau 8 ; Figure 32).

### *6.1.1. Survie cellulaire*

#### **- Echappement à l'apoptose :**

Doormaal et al. ont conclu que les cellules se protègent de l'apoptose en libérant des TMV contenant la caspase-3 et on peut constater que les cellules dont les MV sont issues ne contiennent plus de caspase-3 [225]. Si la libération de MV est inhibée, les cellules accumulent la caspase-3 et entrent en apoptose [226].

#### **- Echappement au système immunitaire :**

Les TMV peuvent protéger les cellules tumorales du système immunitaire par différents mécanismes. Les exosomes tumorales contenant CD46, un inhibiteur membranaire du complément, peuvent inactiver les complexes du complément et ainsi permettre à la cellule émettrice d'échapper à la lyse cellulaire [227]. Les exosomes tumorales peuvent aussi fusionner avec les monocytes afin d'inhiber leur différenciation en cellules présentatrices d'antigène [228]. Sur les lymphocytes, en exprimant le ligand de Fas (FasL), les exosomes induisent l'apoptose des lymphocytes T activés [229], ou elles peuvent réduire la phosphorylation de ERK, STAT1, STAT3 dans les lymphocytes T et inhiber leur prolifération [230]. Sur les cellules NK (Natural Killer), les TMV régulent à la baisse l'activité cytolytique des NK en induisant la phosphorylation de Smad [231]. Les cellules cancéreuses peuvent également fusionner avec des microvésicules provenant de cellules non-cancéreuses, recevant ainsi des lipides et des protéines membranaires spécifiques aidant la cellule tumorale à échapper au système immunitaire [225]. Les TMV provenant des cellules de mélanome ou de cancer colorectal peuvent promouvoir la différenciation des monocytes en myeloid-derived suppressor cells (MDSC) et inhiber la prolifération des lymphocytes T et également leurs fonctions effectrices et donc empêcher la réponse immunitaire anti-tumorale [228].

### *6.1.2. Invasion*

#### **-La modulation de la Matrice Extracellulaire (ECM)**

Le remodelage de la matrice extracellulaire et des modifications dans l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire sont les premiers obstacles qui doivent être surmontés pour permettre à la cellule cancéreuse de migrer [193].

Dans les cellules du fibrosarcome et du mélanome, il a été montré que MT1-MMP est excrété dans les exosomes qui pourraient alors activer la pro-MMP-2 pour dégrader le collagène et la gélatine [227]. Les exosomes des cellules d'adénocarcinome pancréatique, sont enrichies en uPAR, MMP2, MMP3, MMP9, MMP14, and ADAM17, et peuvent efficacement dégrader les protéines de la matrice extra-cellulaire comme le collagène I, le collagène IV, la laminine 111, la laminine 332, et le fibronectine. Par conséquent, *in vitro*, avec 2 tests de migration (*transwell assay* et *wounding-healing assay*), les auteurs ont observé une augmentation de la migration des fibroblastes, des cellules stromales et des cellules endothéliales. *In vivo*, des résultats similaires ont été observés avec une fenêtre de Matrigel implantée en sous-cutané [232].

#### **- Prolifération et invasion de cellules tumorales**

Les TMVs sont généralement considérées comme pro-tumorigéniques [233]. Elles peuvent transférer des informations (les oncogènes inclus) vers des cellules tumorales autour pour changer leur phénotype. Les exosomes libérés par des cellules de cancer du sein peuvent significativement stimuler la capacité de l'invasion (25%) d'une autre lignée; les exosomes sériques des patients par rapport à ceux des individus témoins, ont aussi un effet pro-invasif (2 fois plus) pour les cellules du cancer du sein [234].

Dans les gliomes, Al-Nedawi et al. ont montré qu'un récepteur oncogène EGFRvIII, qui se trouve exclusivement dans les tumeurs de gliome plus invasifs, a été transféré aux cellules de gliome non-invasif par les exosomes tumorales. Par conséquent, les cellules réceptrices montrent une activation de deux des voies de signalisation MAPK et Akt, et les modifications de l'expression des gènes régulés par EGFRvIII (VEGF, Bcl-XL), conduisant à la transformation morphologique et une augmentation de la croissance [164].

Avec les cellules de GBM (A172), McCready et al ont trouvé que leurs exosomes portant le heat-shock protein 90 (HSP90) peuvent stimuler 2-3 fois la migration de cellules tumorales [235]. Les exosomes provenant de U87 stimulent la migration des U87 par renforcement de l'activation du neurotrophique tyrosine kinase receptor type 1 (TrkA), Paxillin, et proto-oncogène tyrosine-protéine kinase Src dans des cellules réceptrices [236].

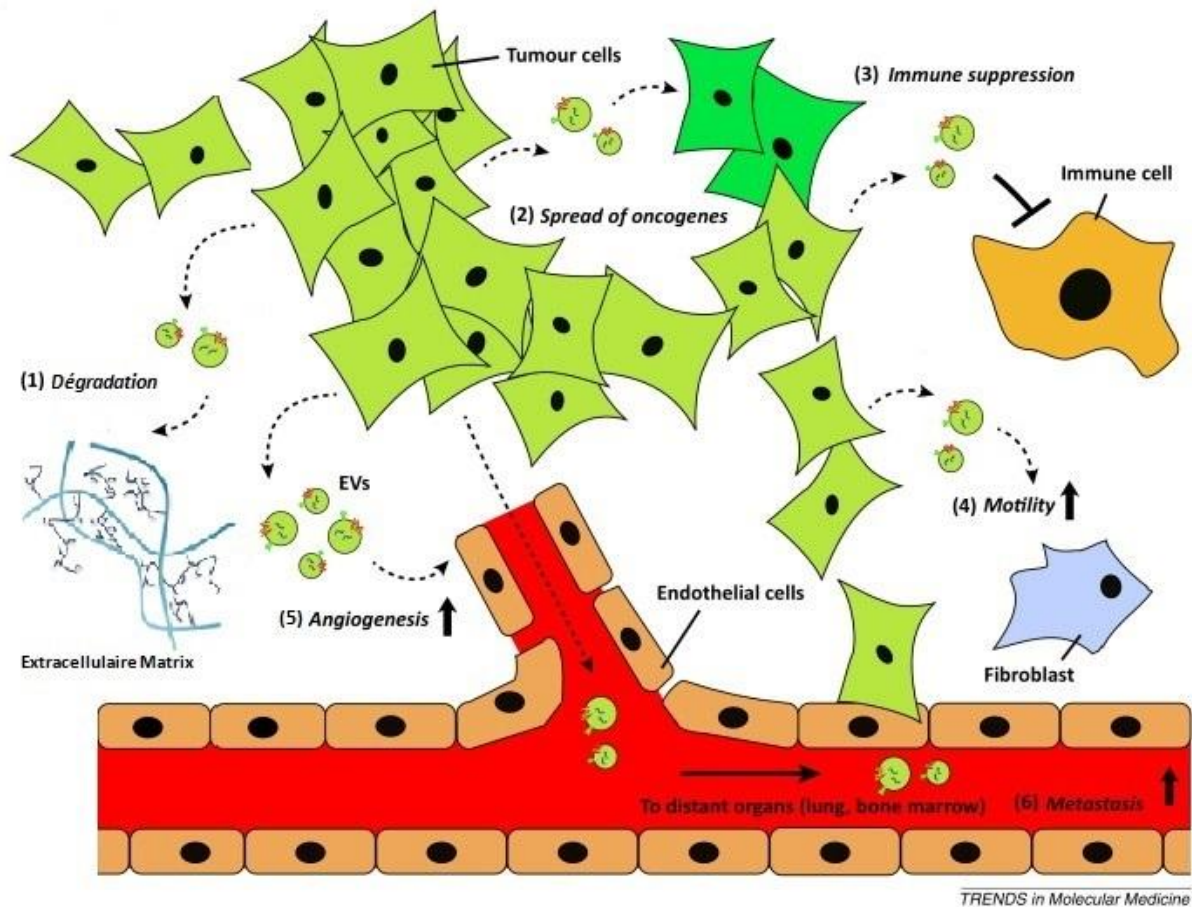


Figure 32. Représentation schématique des processus affectés par les TMV dans le cancer. Les cellules tumorales affecter la fonction des cellules stromales par la libération des TMV. TMV peuvent contribuer à la dégradation de la matrice extracellulaire (1), la propagation du phénotype transformé de (vert clair) des cellules transformées à environnantes (vert foncé) des cellules non transformées (2) et la capacité des tumeurs d'échapper à la surveillance immunitaire (3). En plus, les cellules stromales, telles que des cellules de fibroblastes peuvent être la cible de TMV (4). Les TMV stimulent la réponse angiogénique endothéliales (5) et peuvent entrer dans le système circulatoire et atteindre les organes éloignés, c'est-à-dire la métastatiques (6). (Adapté de Vader, Trends in molecular medicine, 2014) [167]

*In vivo* dans un modèle orthotopique du cancer du sein chez les souris nues, Suetsugu et al. ont observé que les cellules tumorales avec des exosomes marqués peuvent libérer ces exosomes dans leur environnement extracellulaire, et 4-5 semaines après, les cellules métastasent vers les poumons chez la souris nue [237].

### 6.1.3. Angiogenèse

Les TMV ont un effet important sur l'angiogenèse qui est un processus essentiel pour la tumorigenèse et la récurrence tumorale. Les TMVs peuvent entraîner un phénotype angiogénique

des HUVEC *in vitro*, et cet événement est strictement corrélé avec l'enrichissement relatif en CD147 / EMMPRIN (extracellulaire matrice métallopeptase inducteur) sur HUVEC [238].

Une étude a montré que les TMV isolées à partir du liquide d'ascite prélevée chez des patients atteints de cancer de l'ovaire pourraient favoriser la migration de cellules endothéliales et moduler leur capacité angiogénique. [239].

Wysoczynski et al. ont montré que les TMV libérées par les cellules du cancer du poumon augmentent significativement la vascularisation sur Matrigel implanté sous-cutané chez les souris immunodépressives [188]. Lorsque les cellules endothéliales ont été incubées avec des exosomes de mélanomes malins, la voie de signalisation PI3K/Akt est activée, et la motilité des cellules endothéliales est renforcée *in vitro*, et la longueur totale du tubule sur Matrigel était 1,37 fois plus élevée *in vivo* [240].

Les TMVs des cellules souches cancéreuses rénales (CD105 positives) contiennent des miRNAs impliqués dans la progression tumorale et stimuler la formation de vaisseaux sanguins de cellules endothéliales lors de l'implantation dans l'immunodéficience combinée (SCID) chez la souris sœur [241].

Les lipides dans les microvésicules peuvent influencer l'angiogenèse. La sphingomyéline, un composant essentiel identifié dans les microvésicules venant de cellules de fibrosarcome, avec EGFR, apporte la propriété de stimuler la migration et l'angiogenèse par les cellules endothéliales [242].

Dans le GBM, il a été montré que les TMVs provenant des cellules de GBM peuvent modifier l'expression des gènes dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines après exposition pendant 24h [207].

Des expériences *in vitro* sous hypoxie ont montré que les TMVs (exosomes) provenant des cellules de GBM et d'échantillons de patients ont montré un enrichissement en ARNm et en protéines régulées par l'hypoxie, telles que les MMP, IL-8, PDGF, cavoline-1 ; par conséquent, ces TMVs peuvent stimuler le bourgeonnement microvasculaire, et également la formation de tubules par les HUVEC, et *in vivo* chez des modèles xéno greffe, ces exosomes accélèrent la vascularisation tumorale [243].

En plus, les TMV de cellules de cancer du poumon stimulent la libération de certains facteurs comme IL-8, VEGF, LIF, OSM, and IL-11 et MMP-9 dans les fibroblastes qui peuvent potentiellement modifier l'angiogenèse tumorale [188].

Les cellules endothéliales traitées avec les exosomes provenant de cellules de GBM libèrent des facteurs comme IL-8, GM-CSF à des niveaux élevés, et stimulent 2-3 fois la migration et la prolifération des péricytes vasculaires centraux humains [243].

## 6.2. Résistance aux médicaments

Les TMV peuvent également contribuer à la survie cellulaire en empêchant l'accumulation intracellulaire de médicaments de chimiothérapie, ce qui rend les cellules résistantes à la chimiothérapie. Shedden et al. ont montré que les cellules tumorales résistantes à la doxorubicine libèrent des microvesicules contenant un niveau plus élevé de doxorubicine. Les "Shedding vésicles" des cellules du cancer du sein (MCF-7) ont été retrouvées à s'accumuler passivement et à conserver la doxorubicine. L'incubation de ces vésicules isolées avec différentes concentrations de doxorubicine permet une diffusion des médicaments dans ces vésicules [244]. Safaei et al. ont montré que, après l'exposition des cellules à la cisplatine, les exosomes libérés par les cellules de cancer de l'ovaire résistantes à la cisplatine contenaient 2,6 fois plus de platine que ceux libérés par les cellules sensibles [245]. Les exosomes de cellules de cancer du sein peuvent lier et séquestrer l'anticorps thérapeutique trastuzumab, ce qui entraîne une réduction de la liaison de ce médicament aux cellules tumorales et ensuite diminuent la cytotoxicité ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) induit par le trastuzumab [246]. Les cellules de cancer du sein sensibles à l'adriamycine au docetaxel pourraient acquérir le potentiel résistant des cellules résistantes par le transfert de miARN transporté par exosomes [247].

## 6.3. Intérêt de l'application clinique de TMVs

En clinique, une variété de TMVs peut être facilement isolée dans les liquides corporels des patients atteints de cancer, comme le cancer du poumon, du sein, de l'ovaire, du prostate, gastrique et colorectal [225]. Il est à rappeler que ces TMVs peuvent alors transporter des informations vers les cellules dans le microenvironnement tumoral et modifier leurs fonctions, afin de favoriser la progression tumorale, et même la métastase.

Pour pouvoir avoir accès au génotype des cellules tumorales, il faut faire une biopsie, mais dans certains cancers, comme celui du cerveau, la biopsie est difficile. Les TMV qui sont libérés dans la circulation ont un transcriptome qui représente celui de la cellule tumorale et cela permet de voir le génotype et indirectement le phénotype de tumeurs [239]. Le nombre de microvésicules circulantes augmente dans le sang périphérique du patient, et corrèle avec la

métastase élevée et le mauvais pronostic chez les patients atteints du cancer de l'estomac [248]. Donc les TMVs sont proposés comme des marqueurs de pronostic et prédictif pour la progression tumorale.

L'utilisation de TMVs comme un transporteur des molécules thérapeutiques est en cours. Par ex., Aspe et al. ont trouvé que les exosomes récupérés des cellules de mélanome contenant Survivin-T34A (molécule induisant apoptose), associé à de la Gemcitabine, peut induire une augmentation de l'apoptose cellulaire dans les cellules du cancer de pancréas par rapport à la Gemcitabine seule [249].

## 7. METHODES DE MISE EN EVIDENCE DES MICROVESICULES

### 7.1. Isolement des microvésicules

*In vitro*, il est possible d'obtenir et d'isoler les microvésicules puisque celles-ci sont libérées par les cellules dans le milieu de culture cellulaire. *In vivo*, ces microvésicules sont retrouvées dans les fluides biologiques. Les techniques pour détecter et/ou isoler les vésicules extracellulaires (exosomes et shedding vesicles) peuvent être classées en deux catégories principales: les techniques basées sur les propriétés physiques (taille, densité et diffusivité) et celles basées sur l'affinité biochimique [250]. Souvent les outils d'analyse utilisés combinent ces deux types de technique.

Pour obtenir des concentrés de shedding vesicles ou d'exosomes, à partir des milieux de culture, ou des fluides biologiques, deux centrifugations classiques sont réalisées pour éliminer dans le culot respectivement les cellules. Le surnageant épuré des cellules est ensuite soumis à de nouvelles centrifugations selon le type de microvésicules souhaité (Figure 33).

Compte tenu de la distribution de taille des "shedding vesicles", cette population vésiculaire peut être isolée à partir du surnageant épuré des cellules par centrifugation supplémentaire à 10,000-20,000 x g pendant au moins 1 h [251, 252]: les "shedding vesicles" sont récupérés dans le culot (Figure 33).

L'isolement des exosomes, avec leur taille plus petite, nécessite de soumettre le surnageant épuré des cellules à une étape de centrifugation à 10,000g de 30 min afin d'éliminer les débris cellulaires puis à deux étapes d'ultracentrifugation à 100,000 g ou plus pendant au moins 1 h. Parfois la centrifugation est combinée avec une filtration sur 0,1 à 0,22 µm, afin de séparer les éléments de taille nanométrique des éléments plus grands y compris les débris cellulaires qui sont à éliminer. Pour réduire la contamination protéique et pour la purification des exosomes,

des gradients de saccharose, ou l'iodixanol sont souvent utilisés pour séparer les différentes vésicules selon leurs différentes densités [253, 254].

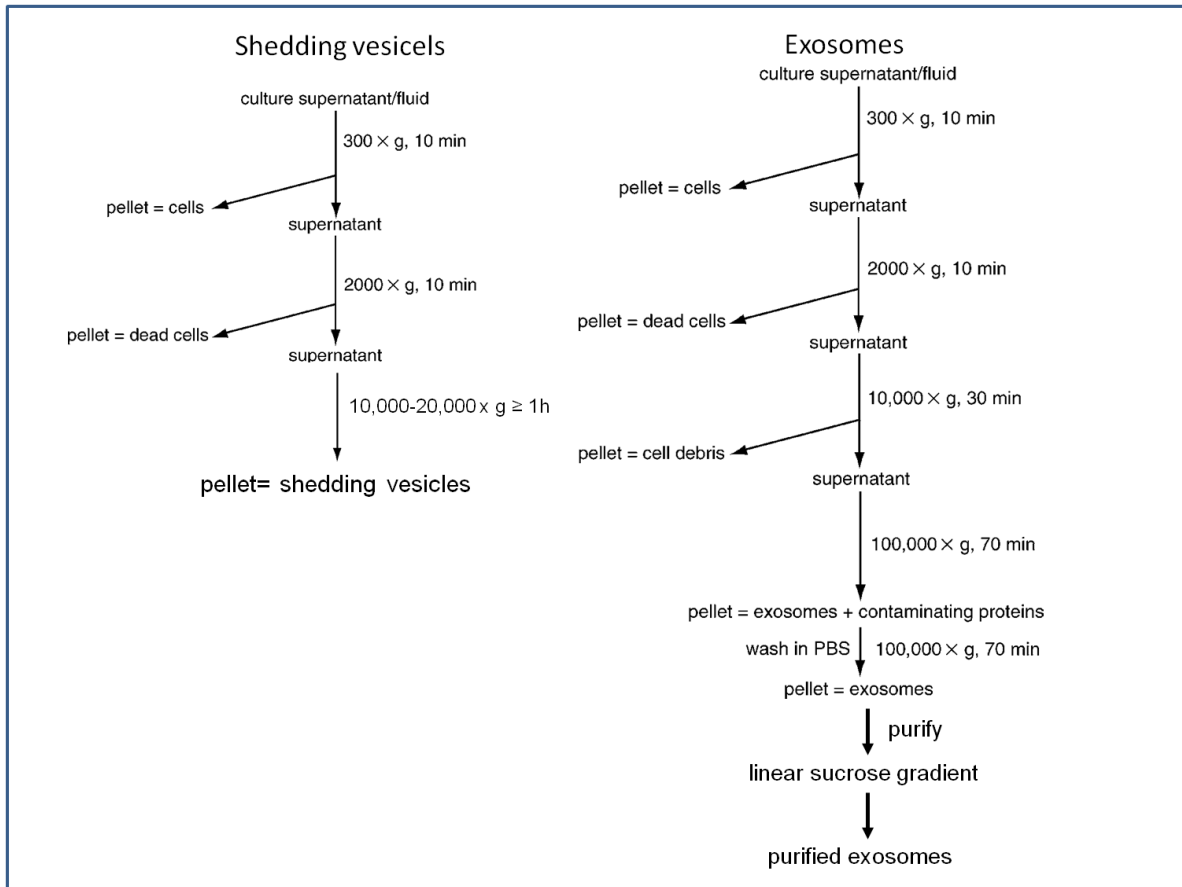


Figure 33. Protocoles pour la récupération de "shedding vesicles" et des exosomes (Adapté de Théry, Curr Protoc Cell Biol, 2006) [253]

Il est important de noter que le protocole d'extraction des microvésicules évolue avec le développement des techniques et souvent des études antérieures ont été menées sur des populations mal-purifiées en raison de la limite de la technique à l'époque. Par exemple, dans de nombreux travaux, ils ont utilisé la population vésiculaire obtenue après une seule centrifugation à 100,000 g: Les échantillons sont donc susceptibles de contenir un mélange de shedding vesicles et d'exosomes.

## 7.2. Détection de microvésicules

### 7.2.1. Observation des microvésicules

Le microscope électronique peut fournir une preuve directe de la présence de ces structures vésiculaires, elle est utile pour l'évaluation de la morphologie, de la taille et pour mettre en évidence la présence de marqueurs des microvésicules. Soit les suspensions concentrées de



microvésicules sont fixées, par exemple avec du paraformaldéhyde, puis observées directement sur les grilles par microscopie électronique à balayage, soit le culot d'exosomes est fixé puis des sections transversales ultrafines sont analysées par microscope électronique à transmission [168]. Cette technique est fréquemment associée à l'utilisation d'immunoglobulines couplées avec des particules d'or afin de détecter les caractéristiques spécifiques de chaque microvésicule. La technique est limitée pour les mesures de concentration des échantillons.

### *7.2.2. Analyse de la distribution selon la taille des microvésicules*

Une technique de Dynamic Light Scattering (DLS) ou diffusion dynamique de la lumière peut être utilisée pour déterminer la distribution de la taille des microvésicules. Cette méthode permet de mesurer les variations d'intensité de la lumière dispersée par les microvésicules afin de déterminer ensuite mathématiquement la distribution de leur taille. Il permet de détecter dans un même échantillon les particules d'une taille entre 1 nm et 6 µm [255], mais les performances sont meilleures dans un échantillon monodisperse comparé à un échantillon polydisperse.

Une nouvelle technologie : le Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), équipé d'un laser bleu et d'un appareil photo, permet de visualiser et de mesurer les nanoparticules entre 30 et 1000 nm dans un échantillon polydisperse. Cette technologie est applicable à l'analyse des microvésicules et permet en plus la détermination de la concentration en fonction des tailles, ce qui donne la possibilité de quantifier les microvésicules [256, 257].

Par ailleurs, d'autres techniques sont disponibles pour la détection de la taille des microvésicules, comme le Resistive pulse sensing qui peut détecter des vésicules de 70 à 200 nm ou le Small-angle X-ray scattering qui détecte des vésicules de 1 à 200 nm [258].

### *7.2.3. Quantification des microvésicules*

La CytoMérie en Flux (CMF) est capable de trier et de capter des microvésicules sur la base à la fois de la caractéristique physique (taille) et de l'affinité (utilisant des anticorps conjugués par fluorescence). L'analyse basée sur la taille est limitée aux microvésicules de taille > 200-300 nm de diamètre en raison des contraintes imposées par la longueur d'onde du laser [259]. Les instruments plus récents comme Gallios (Beckman Coulter), BD-Influx (Becton Dickinson) et Apogee (Apogee Flow Systems) permettent la discrimination de vésicules plus petites de 100 à 200 nm en diamètre [254]. La quantification des vésicules par cytomérie en flux est possible avec l'utilisation des billes « Megamix », qui permet de définir une fenêtre de détection des vésicules et du comptage des microvésicules de la taille inférieure à 1 µm et supérieure à la limite

de la détection de la machine [260]. L'utilisation d'anticorps spécifiques conjugués à un fluorophore, permet d'affiner la quantification de certaines populations de microvésicules.

Les exosomes sont généralement trop petits pour être analysés par CMF, néanmoins il est possible de les lier à des billes de latex micrométriques puis de les incuber avec des anticorps conjugués à un fluorophore afin que leur population soit détectable par CMF [253, 261].

La quantification des exosomes peut-être effectuée indirectement par quantification des protéines par analyses immuno-enzymatiques (ELISA) ou par immuno-blotting [164], ou directement avec des marqueurs spécifiques des exosomes comme le CD63. Une étude a ainsi quantifié par spectrométrie de fluorescence et à partir de cellules exprimant de façon stable le CD63 et marqués à la GFP, les exosomes libérés [262].

En outre, il est possible de trier les microvésicules selon leur origine cellulaire (plaquettes, monocytes) sur la base de leur affinité pour des ligands spécifiques, par exemple, le tri magnétophorétique [263]. Le système microfluidique a été utilisé pour détecter et quantifier des exosomes marqués par l'anticorps lié aux nanoparticules magnétiques spécifiques [192].

Toutes ces techniques fournissent différentes approches pour l'étude de microvésicules. En pratique, les exosomes sont plus souvent étudiés que les "shedding vesicles", car la caractérisation et la préparation de cette population sont mieux standardisées. Dans la littérature, il existe une confusion du terme microvésicules, soit il est utilisé pour définir les "shedding vesicles", soit, et c'est le plus fréquent, ce terme est utilisé pour signifier l'ensemble des vésicules extracellulaire composées des "shedding vesicles" et des exosomes.



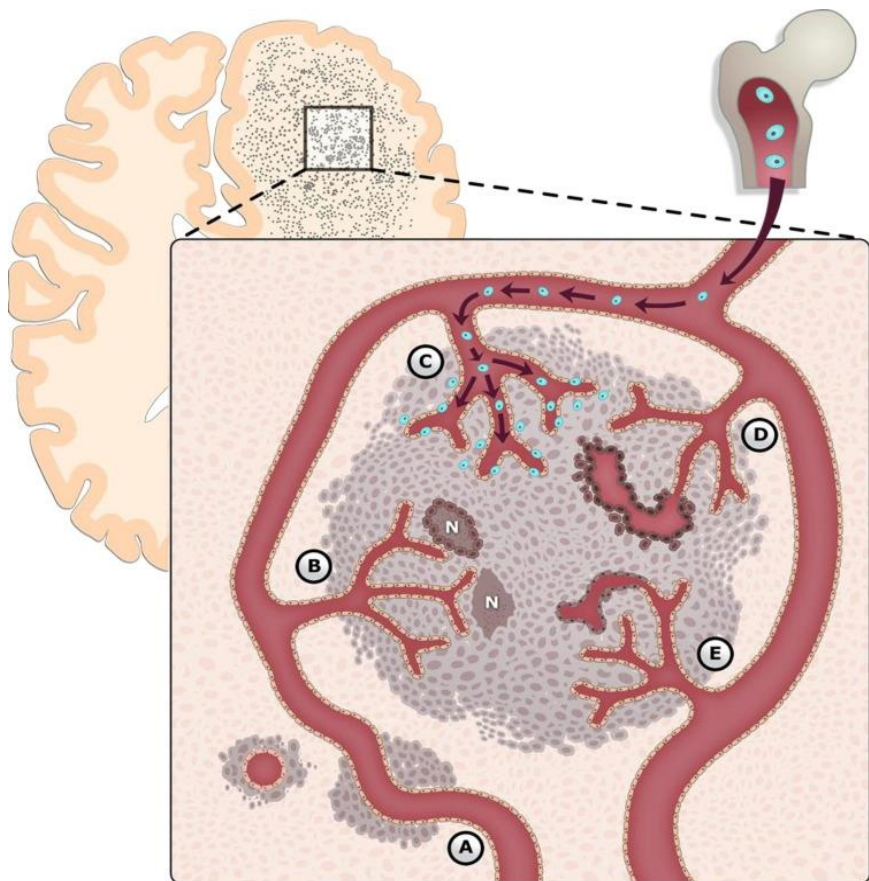
## PARTIE 4 : NEOVASCULARISATION DANS LES GLIOMES

En complément de ses capacités d'infiltration et de radio et chimio-résistances, le glioblastome présente une vascularisation abondante et aberrante. En effet, les gliomes de haut grade font partie des tumeurs solides les plus vasculaires, et la prolifération vasculaire est un critère d'agressivité des glioblastomes [73, 264].

En dessous de 1 à 2 mm, une tumeur est avasculaire. Les nutriments et les déchets circulent par diffusion passive, la tumeur est en phase de dormance, dans la mesure où sa croissance est limitée par cette diffusion. Cependant, afin de croître au-delà de ce volume, la formation de vaisseaux sanguins devient indispensable.

Plusieurs inducteurs de la néovascularisation sont déjà décrits dans la littérature, comme l'hypoxie (avec le facteur de transcription hypoxie-induced factor 1, HIF1). Sous condition hypoxique, HIF1 n'est pas dégradé, il reste actif et induit l'expression de plusieurs gènes HRE (Hypoxia Response Element) codant pour de multiples facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF. Ce facteur est le plus étudié car il peut stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales, événements clés dans le processus de l'angiogenèse [18, 265].

Figure 34. Principaux mécanismes de néovascularisation dans le gliome. A, cooption vasculaire; B, l'angiogenèse par bourgeonnement; C, la vasculogénèse; D, l'imitation ou mimétisme vasculaire; E, la transdifférenciation des cellules de glioblastome en cellules endothéliales (Extrait de Hardee, AJP, 2012) [73]

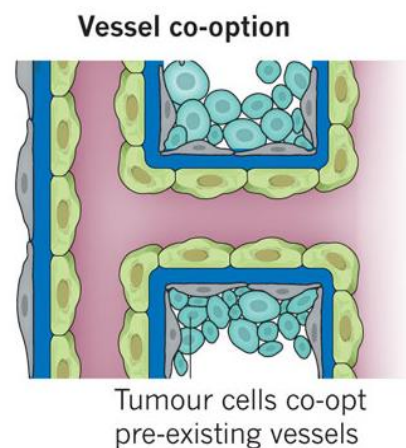


D'après la littérature, au moins 5 mécanismes par lesquels les gliomes réalisent une néovascularisation ont été décrites (Figure 34): la cooption vasculaire, l'angiogenèse par bourgeonnement, la vasculogenèse, l'imitation ou mimétisme vasculaire (*vascular mimicry*), et la transdifférenciation des astrocytes malins en cellules endothéliales. L'angiogenèse par intussusception, autre mécanisme de néovascularisation observé dans d'autres types de tumeur, n'a pas été observé dans le cas des gliomes [73].

### 1. COOPTION VASCULAIRE

La cooption vasculaire est le premier mécanisme par lequel les gliomes se vascularisent (Figure 35). Ce processus implique l'organisation des cellules tumorales autour de microvaisseaux normaux. Il a été montré dans les modèles de gliomes implantés chez les souris, qu'une semaine après l'implantation, la cooption vasculaire était observée. Ce processus induit ensuite l'apoptose des cellules endothéliales qui apparaît dans la 3<sup>ème</sup> semaine qui suit l'implantation, entraînant une régression vasculaire et une nécrose [266]. Il s'en suit alors une réponse angiogénique robuste à la périphérie de la tumeur viable [267] dans la 4<sup>ème</sup> semaine qui suit l'implantation. Dans cet intervalle de temps, la majorité de la vascularisation de la tumeur provient de la cooption de la vascularisation cérébrale normale. Les vaisseaux cooptés ont été montrés comme sur-exprimant l'angiopoïétine-2 (Ang-2).

Figure 35. Cooption vasculaire des cellules tumorales autour des vaisseaux pré-existants (Extrait de Carmeliet, Nature, 2011)[268]



Les angiopoïétines constituent une famille de facteurs qui peuvent se lier sur le récepteur endothélial TIE-2 (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin and Epidermal growth factor homology domain 2*) de façon concurrentielle entre elles. L'Ang-2 fonctionne principalement comme un antagoniste de l'Ang-1, mais des fonctions à la fois pro et anti-angiogéniques ont été décrites pour ces deux angiopoïétines. La régulation de la voie ANG/TIE2 dépend de cette relation concurrentielle entre ANG-1 et ANG-2. Il est admis que l'ANG-1 agit principalement dans le recrutement des péricytes et le maintien de l'intégrité des vaisseaux ; alors que l'ANG-2,

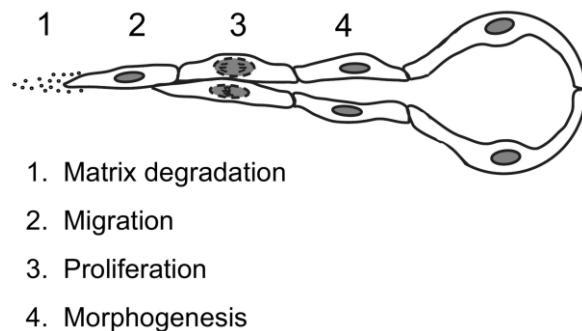
lors d'une hausse de son expression conduit à la déstabilisation des vaisseaux par inhibition de ce recrutement et détachement des péricytes de la paroi vasculaire.

Le détachement des péricytes, rend les cellules endothéliales sensibles au VEGF, ainsi à ce stade, en présence de VEGF, les cellules endothéliales sortent de leur quiescence et le bourgeonnement des vaisseaux se produit. Par contre, à ce stade, en l'absence de VEGF, l'Ang-2 induira l'apoptose des cellules endothéliales et ainsi la régression des vaisseaux [267, 269].

## 2. ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT

La co-option vasculaire est complétée par le développement de nouveaux vaisseaux provenant des vaisseaux préexistants selon un processus appelé angiogenèse. L'angiogenèse est la formation des néovaisseaux à partir du réseau vasculaire préexistant. L'angiogenèse nécessite un stimulus angiogénique qui va induire l'activation des cellules endothéliales, la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales sous forme d'un bourgeon capillaire et enfin la morphogenèse capillaire [268] (Figure 36)

Figure 36. Processus simplifié de l'angiogenèse (Extrait de Goodwin, Microvasc Res, 2007) [270]



### 2.1. Déclenchement de l'angiogenèse

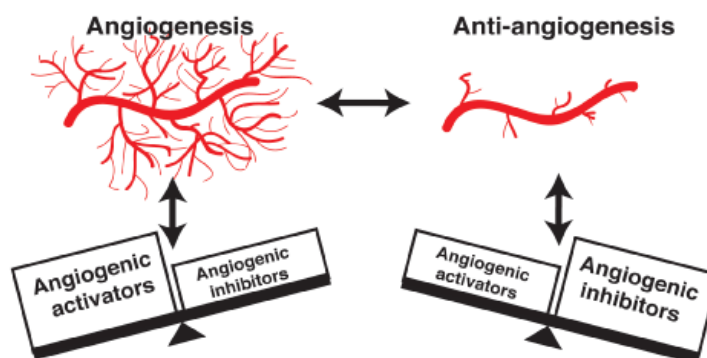


Figure 37. Balance angiogénique entre les activateurs et inhibiteurs angiogéniques (Extrait de Sudhakar, JBB, 2009) [271]

Le déclenchement de l'angiogenèse tumorale a lieu en réponse à un *switch* angiogénique, c'est-à-dire une rupture de l'équilibre entre les facteurs anti- et pro- angiogéniques, rupture en faveur d'une réponse pro-angiogénique (Figure 37).

Fischer et al.[272] ont résumé (tableaux 9 et 10 respectivement les facteurs pro- et anti-angiogéniques impliqués dans les gliomes.

Tableau 9. Facteurs pro-angiogéniques endogènes dans les gliomes [272, 273]

Facteurs	Récepteurs	Mécanismes d'action
<b>Ligands de récepteurs de tyrosine kinase</b>		
Angiopoietin-1,	Tie2	↑ la stabilisation des néovaisseaux, ↓ la perméabilité vasculaire
EGF	EGFR/HER1	↑ la synthèse de facteurs pro-angiogéniques, prolifération des CE
FGF-1, aFGF	FGFR-1/-2	↑ la prolifération et la migration des CE, ↑ l'activateur du plasminogène
FGF-2 (bFGF)	FGFR-1/-2	
HGF/SF	c-Met	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
PDGFAA	PDGFR $\alpha$	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
PDGFBB	PDGFR $\alpha/\beta$	
PLGF-2	VEGFR-1, NRP-1	↑ l'activateur du plasminogène
TGF $\alpha$	EGFR/HER1	↑ la synthèse de facteurs pro-angiogéniques, prolifération des CE
TGF $\beta$	TGFBR-1/-2	Stabilisation des vaisseaux
VEGF-A, -B	VEGFR-1/-2, NRP-1	↑ la perméabilité vasculaire, ↑ la prolifération et la migration des CE
<b>D'autres ligands des récepteurs</b>		
Adrenomedulline	CRLR/RAMP2/3	↑ la vasodilatation, la prolifération et la migration des CE
Endotheline-1	EDRNA/B	↑ la prolifération, la migration, l'invasion de CE, ↑ la morphogenèse
IGF-1, -2	IGF1R	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE, induction du VEGF, ↑ l'activateur du plasminogène, ↓ l'apoptose des CE
IGFBP-2, -3		Réguler l'activité de IGF-1 et IGF-2
Interleukin-6	IL6R	↑ la prolifération des CE, ↑ la morphogenèse
Interleukin-8	IL8RA/B	↑ la prolifération des CE
Pleiotrophin	RPTPzeta	↑ la prolifération et la différenciation des CE
SDF-1	CXCR4	↑ la prolifération des CE, ↑ la morphogenèse
PGE2	EPs	↑ la différenciation des CE

Tableau 10. Facteurs anti-angiogéniques endogènes dans les gliomes [272, 274, 275]

Facteurs	Récepteurs	Mécanismes d'action
<b>Protéines dérivées de la Matrice et du Plasma</b>		
Angiostatine	$\alpha\beta 3$ integrine	↓ la prolifération et la migration, ↑ l'apoptose des CE
Endostatine	$\alpha 5\beta 1$ integrine, HSPG	↓ la prolifération, ↑ l'apoptose des CE
TFPI-2	TF - FVIIa - FXa	↓ l'activité des MMP
TIMP-1	MMPs, VEGF	↓ l'activité des MMP
TIMP-3, -4	MMPs, VEGF	
TSP-1, -2, -3	CD36, MMPs	↓ la prolifération, ↑ l'apoptose des CE
<b>Facteurs et Récepteurs</b>		
Angiopoïétine-2	Tie2	↓ la maturation des vaisseaux, antagoniste de l'ang-1
Interféron- $\alpha$ , - $\beta$	IFNAR-1	↓ la prolifération, ↑ l'apoptose des CE
Interleukine-4	IL4RA	↓ la migration des CE
PEDF	TSP-1, VEGF	↓ la prolifération et la migration des CE
Facteur Plaquettaire-4	CXCR3, HSPG	↓ la prolifération, ↓ angiogenèse induite par le FGF-2 et l'IL-8
Somatostatine	somatostatine récepteur-2, -3	↓ la production de VEGF

## 2.2. Voies de signalisation principales impliquées dans l'angiogénèse

Plusieurs voies ont été identifiées dans le processus d'angiogénèse dans le cas du gliome:

### *Angiopoïétines 1 et 2/Tie2*

Classiquement, le récepteur Tie-2 est un récepteur à activité tyrosine kinase présent sur la cellule endothéliale et la liaison des ligands Ang-1 ou Ang-2 induit une cascade de phosphorylation ayant des conséquences sur les capacités de migration et de prolifération endothéliales, sur la perméabilité vasculaire par action sur les jonctions serrées endothéliales, sur la maturation des vaisseaux et également sur l'inflammation [276].

L'Ang-1 est stocké dans la matrice-extracellulaire grâce à sa forte affinité avec la fibronectine, le collagène et la vitronectine et avec une plus faible affinité avec la laminine et le fibrinogène. Il est libéré par la dégradation de la matrice extracellulaire et accessible aux cellules endothéliales au fur et à mesure de leur migration lors de la constitution du bourgeon vasculaire. L'Ang-2, antagoniste de l'Ang-1 est libéré par les cellules endothéliales et stimule la déstabilisation du vaisseau et/ou l'apoptose des cellules endothéliales [269].



### *VEGF/VEGFR-2*

Le Récepteur VEGFR2 endothélial est exprimé en réponse à l'hypoxie. L'activation de ce récepteur VEGFR-2 par fixation du VEGF-A conduit au recrutement et à l'activation de la protéine kinase Src et induit une cascade de phosphorylation activant des molécules effectrices en aval du signal. Différentes voies sont ainsi régulées et conduisent :

- à la migration des cellules endothéliales par activation des protéines tyrosine kinase situées aux contacts focaux et induit le réarrangement du cytosquelette (actine) permettant à la cellule de se mouvoir,
- à la prolifération cellulaire par activation de la protéine kinase C (PKC),
- à la survie par activation de la voie PI3K, laquelle permet la production de phosphatidyl inositol triphosphate (PIP3) permettant l'activation d'Akt et abouti à l'inhibition de l'apoptose et à la stimulation de la survie cellulaire [277].

### *DLL-4/Notch :*

Le récepteur Notch est décrit comme inhibant la prolifération des cellules endothéliales par la régulation de la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose. C'est pourquoi, dans l'endothélium en quiescence, les cellules endothéliales ne prolifèrent pas. Pour cela, après liaison avec son ligand DLL-4, le récepteur Notch subit plusieurs attaques par les enzymes TACE et  $\gamma$ -secrétase ce qui conduit à la libération, entre autre, du domaine intracellulaire de Notch (NICD). Ce domaine NICD est ensuite transloqué dans le noyau où il permet le recrutement des co-activateurs de la transcription pour induire l'expression des gènes cibles [278, 279].

Cependant Notch a également un rôle dans l'activité des récepteurs VEGFR. Il régule indirectement les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt en inhibant l'activité de VEGFR-1 et de VEGFR-2. Ce mécanisme permet d'expliquer l'état de prolifération actif retrouvé dans les cellules «stalk » contrairement aux cellules «tip » [280].

### *CXCR4/SDF-1 $\alpha$*

Le récepteur CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4) est exprimé à faibles niveaux par les cellules endothéliales au repos, mais est sur-exprimé en réponse au VEGF [281]. Le SDF-1 $\alpha$  (stromal-derived factor-1 $\alpha$ ) est un ligand de ce récepteur CXCR4.

Comme le VEGF, CXCR4 et SDF-1 sont régulés à la hausse par l'hypoxie, et jouent un rôle critique dans le processus angiogénique. SDF-1 $\alpha$  agit comme un chimio-attractant pour les cellules endothéliales. Il induit la prolifération des cellules endothéliales *in vitro*, et favorise le

bourgeoisement et la ramification des capillaires *in vivo*. L'expression de SDF-1 $\alpha$  par les gliomes et les cellules endothéliales vasculaires a été corrélée à la survie des cellules endothéliales [282], tandis que l'expression de CXCR4 a été montrée comme étant induit par des niveaux élevés de production de VEGF par les astrocytes dans les gliomes humains [283].

### *Ephrin B2*

Ephrin-B2 est un ligand transmembranaire pour les récepteurs de l'Eph. La voie de signalisation de l'Ephrine-B2 régule l'orientation de la cellule "tip" pour contrôler le bourgeoisement et la ramification dans l'angiogenèse physiologique et pathologique [284]. Ephrine-B2 contrôle l'internalisation et la signalisation du récepteur VEGFR-2. Fait important, l'internalisation de VEGFR2 est nécessaire pour l'activation et de la signalisation en aval de ces récepteurs et est nécessaire pour l'extension filopodiale VEGF-induit dans les "tip cells", en direction des gradients de VEGF.

En outre, la fonction de l'Ephrin-B2 dans la régulation de la voie de VEGFR semble inclure d'autres membres tels que VEGFR3 [284].

En plus de ces voies de signalisation, des études ont observé que les GSCs (gliome stem-like cells) libèrent le VEGF et le SDF-1 $\alpha$ , les 2 facteurs angiogéniques importants comme nous l'avons décrit ci-dessus, ce qui suggère que les GSCs peuvent jouer un rôle clé dans l'angiogenèse de gliomes [71, 285].

### **2.3. Processus angiogénique et tests d'étude**

L'activité angiogénique peut être évaluée en utilisant des tests *in vitro* et *in vivo*. Des essais *in vitro* permettent d'identifier des effets directs sur la fonction des cellules endothéliales et d'analyser des processus isolés qui contribuent à l'angiogenèse, tandis que les essais *in vivo* impliquent plusieurs types de cellules et l'ensemble de l'angiogenèse. Ici nous nous focalisons sur les essais *in vitro* impliqués dans les différentes étapes de l'angiogenèse.

Dans le cerveau sain, le système vasculaire est constitué de cellules endothéliales, des péricytes et des astrocytes, qui forment ensemble la barrière hémato-encéphalique (BHE). Un des mécanismes qui maintient la structure fonctionnelle de cette barrière est l'existence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales entretenue par une régulation ANG-1 sur Tie 2.

Pendant l'angiogenèse tumorale, les cellules endothéliales et les cellules tumorales expriment ANG-2, ce qui ne permet pas une stabilisation des jonctions entre les cellules endothéliales et

diminue le recrutement des péricytes autour. Ceci entraîne globalement la mise en place de vaisseaux sanguins non stabilisés [267, 269] qui ne permet pas une nutrition efficace et induit l'hypoxie dans la tumeur [286].

Les cellules en hypoxie gardent un facteur de transcription HIF (hypoxia-induced factor) actif, entraînant l'expression à la hausse du VEGF par les cellules tumorales et de son récepteur VEGFR2 par les cellules endothéliales [287]. La fixation du VEGF sur VEGFR-2 active les cellules endothéliales et le déclenchement de l'angiogenèse en promouvant la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales.

### *2.3.1. Dégradation de la matrice*

Cette hypoxie induit l'expression de MMP-2 et MMP-9 par les cellules tumorales et les cellules endothéliales, qui contribuent à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire de l'environnement proche, permettant de créer ainsi l'espace matriciel nécessaire à la migration des cellules endothéliales formant le bourgeon vasculaire.

La famille des MMPs (matrice métalloprotéinases) est très souvent étudiée. Les MMPs activées dégradent de manière enzymatique les composants de la matrice tels que le collagène, la fibrine, la laminine et la fibronectine [288].

L'activité des MMP peut être évaluée en utilisant des tests de zymogène ou des tests d'invasion de la matrice. Dans un test de zymogène, un substrat de MMP telles que le collagène ou la gélatine est co-polymérisé dans un gel SDS-PAGE. Les surnageants ou les lysats de cellules endothéliales sont soumis à une électrophorèse à travers un gel coloré avec un colorant tel que le bleu de Coomassie, la zone hydrolysée par MMPs apparaît transparente [289]. Une autre possibilité est d'incuber les cellules endothéliales sur un composant de la matrice lié à un colorant fluorescent, l'activité de MMPs est constatée par l'observation de zones non fluorescentes dans le substrat. Ainsi une stimulation ou une inhibition de l'activité des MMP peuvent être observées en utilisant cette technique [290].

### *2.3.2. Migration des cellules endothéliales*

À la suite de la dégradation de la matrice, les cellules endothéliales migrent vers le tissu environnant en réponse aux chemokines angiogéniques. La mobilité cellulaire a un intérêt particulier car la migration cellulaire est nécessaire à la fois pour l'invasion tumorale et l'angiogenèse tumorale [291]. 3 essais permettent la mesure de la motilité cellulaire en réponse aux facteurs.

-Dans le test de blessure (Wound-healing assay), les cellules endothéliales sont cultivées jusqu'à confluence et une blessure est réalisée au milieu de la monocouche. Le remplissage de l'espace par les cellules endothéliales est initié par la migration. Sa quantification implique la mesure de la distance parcourue par les cellules endothéliales, la zone recouverte par les cellules endothéliales, ou le temps nécessaire pour fermer la zone de la blessure.

-L'essai "transwell" est connu sous le nom de l'essai de la chambre Boyden. Les cellules endothéliales sont cultivées sur un côté d'une membrane poreuse, et une solution contenant le facteur potentiel migratoire est placée sur le côté opposé de la membrane. Après un période d'incubation de 3 à 18 h, les cellules ayant migré sont colorées et comptées.

-L'essai sous-agarose permet de mesurer la migration dirigée par un chemokine. Les gels d'agarose sont préparés dans des plaques de culture, puis deux puits sont percés dans les gels, laissant 2mm d'agarose entre eux. Les cellules endothéliales sont plaquées dans un puits, et le facteur potentiel migratoire est ajouté à l'autre puits. La migration est définie comme la distance parcourue par les cellules endothéliales dans la direction de la stimulation (chimiotaxie), par rapport à la distance parcourue par les cellules endothéliales de l'autre côté du puits (chimiokinèse) [270].

### *2.3.3. Prolifération des cellules endothéliales*

Cette migration des cellules est accompagnée de leur prolifération. Les effets des facteurs angiogéniques sur la prolifération peuvent être évalués par le comptage direct des cellules, la quantification de la synthèse de l'ADN ou l'évaluation de l'activité métabolique.

Les moyens les plus simples est de compter directement les cellules. Les cellules viables ne peuvent pas être teintées au bleu trypan et le comptage des cellules non-teintées donne le nombre de cellules vivantes, mais cette technique ne peut pas indiquer si des changements du nombre de cellules sont provoqués par des modifications de la prolifération, l'apoptose ou les deux.

La division cellulaire mitotique peut être évaluée par la mesure de réactifs marqués incorporés au cours de la synthèse de l'ADN. Dans le test d'incorporation de thymidine, les niveaux de thymidine tritiée incorporée dans l'ADN synthétisé est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation. Dans les essais de BrdU, bromodésoxyuridine, un analogue de la pyrimidine, est incorporé lors de la synthèse de l'ADN et évalué par immunohistochimie, il donne des résultats similaires [292].

Le test MTT mesure l'activité de la mitochondrie. La mitochondrie active convertit le substrat jaune MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide) en formazan violet. Ce changement colorimétrique peut être quantifié par spectrophotométrie et en corrélation avec le nombre de cellules. Cependant, comme quelques agents affectent ce processus sans affecter la viabilité des cellules endothéliales, ce test doit être confirmé avec une autre technique.

#### *2.3.4 .Survie cellulaire*

La prolifération des cellules endothéliales est combinée à l'augmentation de la survie, et permet aux cellules de former un nouveau vaisseau.

La mort cellulaire en réponse aux agents toxiques peut se produire par la nécrose, une réaction passive, ou par l'apoptose, la mort cellulaire programmée. 2 techniques sont couramment utilisées pour l'évaluation de l'apoptose des cellules endothéliales : le TUNEL et des essais à l'annexine V.

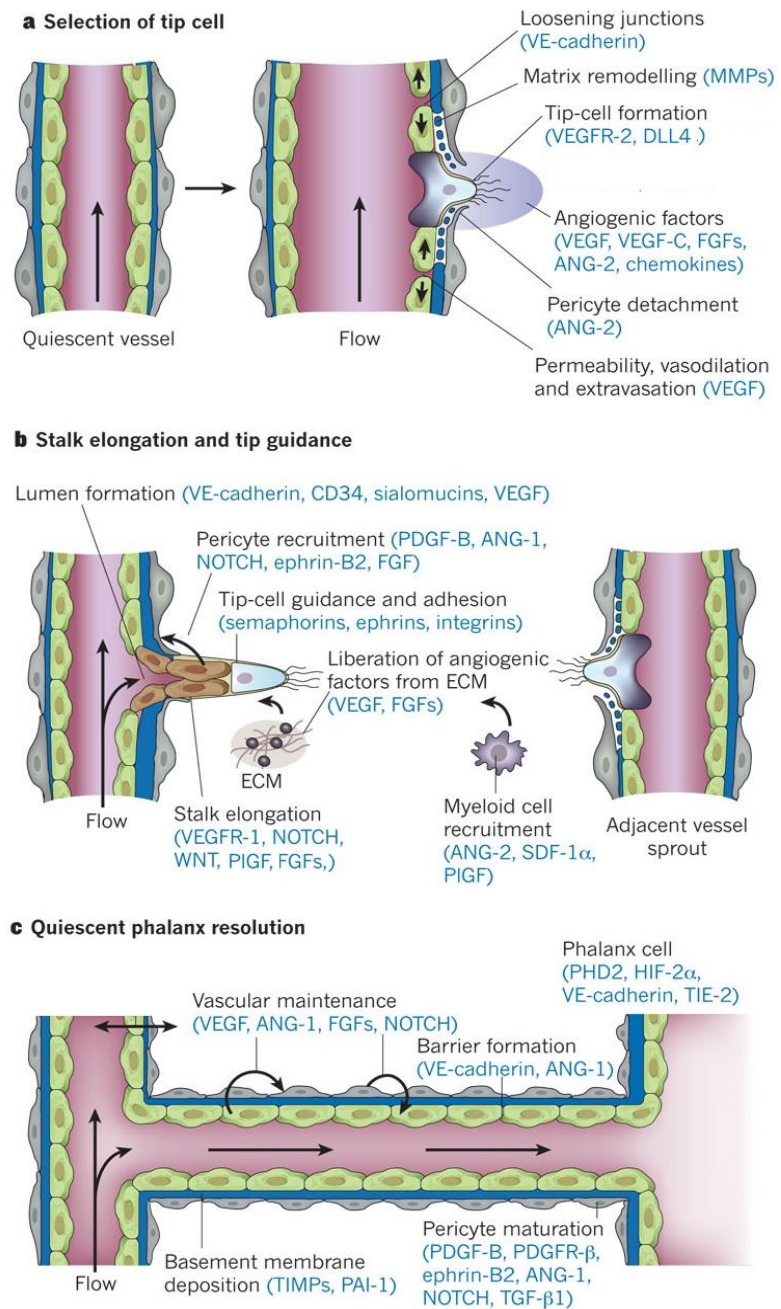
Le TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling) mesure la fragmentation de l'ADN. En TUNEL, cette enzyme se lie à la région 3'-OH de l'ADN fragmenté puis incorpore un colorant fluorescent. Les cellules marquées peuvent être identifiées par microscopie ou analyse par cytométrie de flux, mais cette technique ne permet pas de distinguer les cellules apoptotiques avec cellules nécrotiques.

Au cours de l'apoptose précoce, la phosphatidylsérine, un composant de la membrane cellulaire, est transportée de la surface intérieure vers la surface extérieure de la membrane. L'Annexine V est une protéine qui se lie à la phosphatidylsérine avec une forte affinité. L'annexine-V conjuguée à la fluorescence peut être utilisée pour identifier les cellules apoptotiques, par microscopie ou par cytométrie de flux. Ces 2 techniques peuvent être complétées par le marquage des cellules avec l'iodure de propidium, qui marque les cellules nécrotiques mais pas les cellules apoptotiques.

#### *2.3.5. Morphogenèse*

Les dernières étapes de l'angiogenèse impliquent la morphogenèse capillaire [293], largement médiée par les intégrines  $\alpha\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$ , ainsi que par CD44 [294]. Les cellules endothéliales activées sécrètent PDGF (platelet-derived growth factor), qui recrute des pericytes dans le vaisseau nouvellement formé aidés par la voie ANG / TIE. La réaction négative par des facteurs anti-angiogéniques endogènes, ainsi que l'accumulation de la matrice extracellulaire, peuvent moduler le processus de modification vasculaire [73].

Figure 38: Etapes de l'angiogenèse et molécules intervenant dans ce processus. **a.** Au début du processus d'angiogenèse, une cellule de type « *tip* » est sélectionnée, située à la tête du bourgeon. **b.** L'élongation du bourgeon en direction du gradient de VEGF permet la formation d'un néo-vaisseau. **c.** La dernière étape consiste en l'établissement d'un endothélium quiescent. Les acteurs clés de chaque étape sont cités entre parenthèses. (D'après Carmeliet, Nature, 2011) [268]



De manière concomitante, les cellules endothéliales se spécialisent en deux populations. Les « *tip cells* » guident les bourgeons en direction du gradient de VEGF grâce à leurs filopodes riches en VEGFR2. En réponse au VEGF, la voie de signalisation Delta-like 4 (DLL4)-Notch1 au niveau des cellules sous-jacentes appelées « *stalk cells* » ainsi que l'Ephrin B2 participent à ce processus angiogénique [280, 284]. La signalisation DLL4/Notch empêche les « *stalk cells* » de devenir « *tip cells* » et donc d'être sensibles au VEGF. Elle ne peut que proliférer et migrer afin de permettre l'élongation du bourgeon et la formation d'un tube de cellules endothéliales sous la « *tip cell* ». La lumière vasculaire est formée ensuite au niveau des « *stalk cells* ». [295, 296].

Les cellules appartenant au vaisseau initial et situées à la base du bourgeon sont appelées cellules « phalanx ». Ces cellules ne prolifèrent pas, deviennent quiescentes, s'alignent, expriment les jonctions serrées et entrent en contact avec les cellules murales [297] (Figure 38).

Le résultat final du processus angiogénique néoplasique est un réseau vasculaire anormal, avec des vaisseaux dilatés et tortueux et de ramifications anormales, qui peut également conduire à perfusion tissulaire anormale. Les GBM en particulier ont un réseau vasculaire immature, avec une perméabilité excessive. La couverture des péricytes, et la structure de la membrane basale sont anormales et peuvent contribuer à la rupture de la barrière hémato-encéphalique [286]. Ce phénomène est en partie dû au manque d'une lame basale continue due à une stimulation angiogénique persistante conduisant à la maturation et à la stabilisation incomplète du vaisseau [73].

L'angiogénèse nécessite l'assemblage de cellules endothéliales dans des tubes vasculaires. La formation du tube peut être modifiée *in vitro* par l'étalement des cellules endothéliales sur des composants de la matrice extracellulaire. Les cellules endothéliales peuvent être plaquées sur, dans ou entre ces substrats.

Le test le plus couramment utilisé pour la morphogénèse est le placage des cellules HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) sur Matrigel, une matrice extracellulaire isolée à partir de cellules de sarcome de la souris "Engelbreth-Holm-Swarm". Les HUVECensemencés sur Matrigel à faible densité forment un réseau de structures ramifiées dans une à deux dimensions qui est maintenu pendant 12 à 24 h [298]. Les puits sont photographiés et la morphogénèse est quantifiée par la mesure de la longueur ou de la zone de CLS (capillary-like structures) par unité de surface.

Une autre possibilité est de suspendre les HUVEC ou d'autres cellules endothéliales dans des gels contenant du collagène pour former des réseaux dans les 24h, et les structures sont maintenues pendant plusieurs jours [299]. Les tubes se forment selon trois dimensions.

La 3<sup>ème</sup> possibilité est l'essai de collagène en "sandwich". Un gel de collagène est d'abord plaqué puis les cellules endothéliales sont étalées sur le gel et sont recouvertes d'une seconde couche de collagène. Les CLS se forment en plusieurs jours [300], et sont maintenues pendant plusieurs jours. Ce test est particulièrement bien adapté pour la stimulation de l'angiogénèse, les facteurs de croissance exogènes sont nécessaires à la formation des réseaux capillaires.

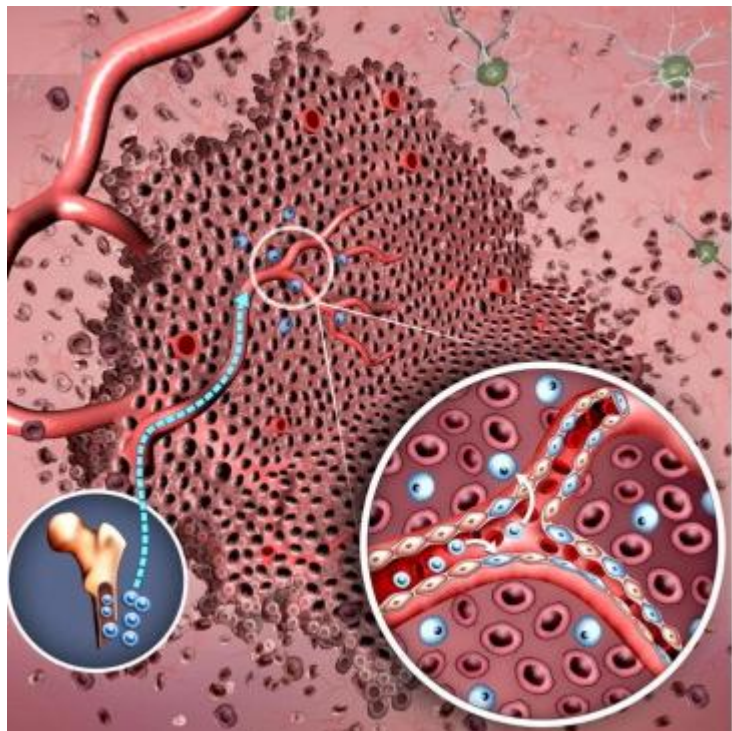
### 3. VASCULOGENESE

Le troisième mécanisme de la néovascularisation dans le gliome, la vasculogenèse, implique la différenciation des cellules BMDCs (Bone marrow-derived cells) circulantes, connus sous le nom de progéniteurs de cellules endothéliales (EPCs, endothelial progenitor cells). Les progéniteurs de cellules endothéliales dérivés de la moelle osseuse sont recrutés et incorporés au niveau des vaisseaux tumoraux (Figure 39).

Le VEGF, qui joue un rôle critique dans l'angiogenèse, contribue également à la migration et la prolifération des EPCs. L'injection des EPCs isolés dans un modèle de xélogreffe de gliome (U87) a montré que les EPCs représentent environ 18% de la surface totale des vaisseaux tumoraux, suggérant un rôle important pour les EPCs dans la néovascularisation tumorale [73].

Par ailleurs, en plus des EPCs, des cellules TAMs (bone marrow-derived tumor-associated macrophages), et des cellules TEMs (TIE-2 expressing monocytes), circulent dans le sang et se fixent à des sites de néovascularisations pathologiques où ils se différencient soit en macrophages soit en cellules endothéliales [301]. Les TEMs sont des moteurs importants de l'angiogenèse tumorale et ont été trouvés dans plusieurs modèles de tumeurs de souris, y compris les modèles de glioblastomes [302].

Figure 39. Vasculogenèse. La vasculogenèse implique la mobilisation, la différenciation, et le recrutement de BMDCs (bleu) (Extrait de Hardee, AJP, 2012) [73]





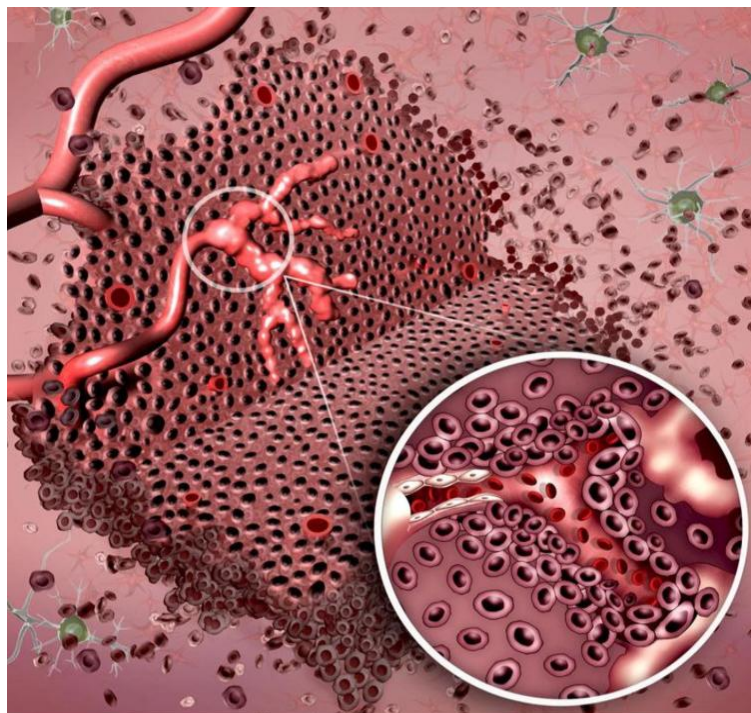
Il a été démontré que les EPCs et les TAMs expriment aussi CXCR4 et migrent en réponse à SDF-1 $\alpha$  [303]. SDF-1 $\alpha$  produit par le gliome murin a été montré pour contribuer à la vasculogénèse en incorporant EPCs dans l'endothélium tumoral [304]. En outre, Smadja et al ont trouvé une augmentation de la migration des EPCs médiée par SDF-1 $\alpha$  / CXCR4, alors que l'inhibition de la voie SDF-1 $\alpha$  / CXCR4 inhibe la migration et la différenciation des EPCs, ainsi la formation des tubules sur Matrigel [305].

La voie de l'ANG-2 /TIE-2 est elle aussi importante pour la vasculogénèse, l'ANG-2 a été lié au recrutement des EPC et TEM dans les tumeurs [301]. Cependant, le mécanisme exact de la contribution de EPCs et TEMs à la néovascularisation des tumeurs cérébrales n'a pas encore été complètement élucidé

#### 4. MIMÉTISME VASCULAIRE (VASCULAR MIMICRY):

Les tumeurs qui connaissent une réduction du flux sanguin et de nutriments associés peuvent s'adapter par une réorganisation du tissu tumoral afin de «réparer» les vaisseaux sanguins anormaux par des cellules tumorales (vaisseaux mosaïques). En outre, les tumeurs peuvent générer des réseaux de vaisseaux, qui se composent presque entièrement de cellules tumorales. Ces deux processus sont des modèles de mimétisme vasculaire de l'imitation vasculaire (Figure 40).

Figure 40. Mimétisme vasculaire. Les cellules tumorales sont capables de former des réseaux de vaisseaux fonctionnels et perfusés. Ces cellules tumorales qui bordent les canaux vasculaires maintiennent les caractéristiques morphologiques de gliome et des marqueurs de gliome typiques (insert) (Extrait de Hardee, AJP, 2012) [73]



La mise en évidence de l'imitation vasculaire dans les gliomes a été publiée. Yue et al ont démontré la présence de l'imitation vasculaire dans 2/45 échantillons des astrocytomes humains [306]. Chen et al ont étudié 48 échantillons de GBM et trouvé des vaisseaux sanguins composés des cellules non-endothéliales dans les régions viables de la tumeur dans la majorité des sections tumorales [307]. Les patients avec un mimétisme vasculaire ont tendance à avoir des gliomes de grade supérieur et plus agressif, avec une survie plus courte que ceux sans preuve de mimétisme vasculaire [63].

Une étude a suggéré le lien entre le mimétisme vasculaire dans le GBM et la résistance vasculaire. L'utilisation d'un système tridimensionnel de co-culture organotypique de cellules de gliome et de cellules endothéliales marquées, a montré que les cellules endothéliales forment d'abord des structures vasculaires, suivies par l'incorporation des cellules de gliome dans les 48 heures, formant ainsi un réseau vasculaire mosaïque. Dans des conditions angiogéniques, des cellules de gliome ont formé des réseaux vasculaires, et la caractérisation de ces cellules de gliome a révélé l'absence de marqueurs spécifiques endothéliaux, indiquant l'imitation vasculaire. Bien que ces cellules de gliome n'expriment pas les marqueurs des cellules endothéliales, elles expriment CD133, suggérant le rôle des GSCs (gliome stem-like cells) dans ce processus [308].

En utilisant des sections de tissus de GBM, Hallani et al ont trouvé dans les cultures de neurosphères CD133-positives, des tumeurs contenant des vaisseaux composés de cellules tumorales (GSC-A) et des tumeurs contenant seulement des vaisseaux composés des cellules endothéliales (GSC-B). Seules les cellules de la tumeur GSC-A ont développé un réseau vasculaire sur Matrigel dans les 2 jours; la caractérisation de ces cellules a montré une surexpression de plusieurs facteurs impliqués dans la vasculogénèse, alors que des marqueurs endothéliaux normaux manquaient [309].

Cependant, les détails moléculaires de la façon dont les cellules de glioblastome contribuent à l'imitation vasculaire ne sont pas bien clairs, et la contribution de ce mécanisme dans le processus de la néovascularisation sur l'ensemble de la tumeur reste inconnue [73, 287].

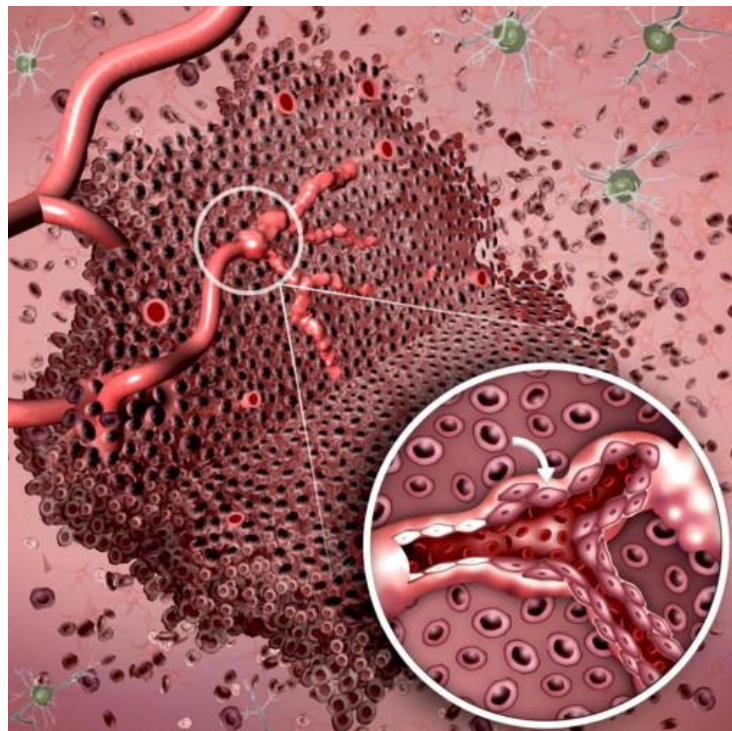
## **5. TRANS-DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES EN CELLULES ENDOTHELIALES**

Le concept le plus récent de la néovascularisation tumorale est la trans-différenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales, appelé TDECs (Tumor –derived endothelial cells) (Figure 41). Avec le modèle murin de glioblastome, des dosages d'immunofluorescence ont

révélés des vaisseaux sanguins dans la tumeur exprimant à la fois les antigènes endothéliaux et le marqueur de la tumeur GFP [310]. Dans des conditions pro-angiogéniques, des cellules de gliome n'ont pas acquis de marqueurs spécifiques endothéliaux, mais ont perdu l'expression de GFAP et gagné l'expression de CD133, indiquant une évolution vers un phénotype de cellules souches [308].

Des rapports similaires ont confirmé cette trans-différenciation dans les GBM humains. Ricci-Vitiani et al. ont trouvé un nombre important de cellules endothéliales (CD31 + / CD144 +) qui semblait provenir de la tumeur en raison de leurs aberrations chromosomiques communes avec la tumeur associée [311]. En même temps, Wang et al. ont également publié des preuves sur la génération des cellules endothéliales à partir de cellules tumorales CD133 + purifiées à partir de glioblastomes humains [312]. Les cellules endothéliales récupérées à partir de la tumeur ont partagé les mêmes aberrations chromosomiques comme les cellules tumorales, supportant l'idée que ces cellules endothéliales sont trans-différenciées à partir de cellules tumorales.

Figure 41. Trans-différenciation des cellules glioblastome-endothéliales. La trans-différenciation des cellules de gliome en cellules endothéliales qui tapissent les canaux vasculaires (insert), y compris à la fois une transformation phénotypique et l'expression de marqueurs spécifiques endothéliaux (Extrait de Hardee, AJP, 2012) [73]



L'expression de la nestine dans les TDECs de la souris de GBM et CD133 dans les TDECs humaines suggère que ces cellules se produisent généralement à partir de GSCs (gliome stem-like cells) [310]. Des preuves suggèrent la nécessité d'avoir VEGFR2 activé dans la trans-différenciation des GSCs [312, 313]. Comme les GSCs peuvent exprimer VEGFR2 [314], cette signalisation VEGFR2 renforcée peut jouer un rôle dans la trans-différenciation des GSCs.

Wang et al. ont trouvé que Notch-1 silencieux ou inhibé peut bloquer les premiers stades de la trans-différenciation cellulaire GBM. Toutefois, dans ce système, la voie de VEGFR2 est également nécessaire puisque le bevacizumab (anti-VEGF) peut bloquer les derniers stades de la transdifférenciation, mais n'a pas d'effet sur le stade précoce [312]. Ces résultats démontrent que les voies de Notch-1 et VEGFR2 peuvent médier des étapes distinctes dans la génération de TDECs.

L'hypoxie semble être un autre facteur important dans la régulation de la formation de TDECs. Dans des modèles murins de GBM, les TDECs sont observés plus fréquemment dans la zone la plus profonde et hypoxique de la tumeur par rapport à la surface [310, 311]. Étant donné que la voie de Notch-1 joue un rôle dans la différenciation GBM, il est proposé que l'hypoxie contribue à la trans-différenciation des cellules de glioblastome en cellules endothéliales par la voie de Notch [287].

Tous ces 5 mécanismes sont probablement intimement liés, des perturbations dans une seule voie modifient le phénotype vasculaire. Bien qu'il semble exister un cadre temporel par lequel les gliomes attendent la vascularisation, il est probable que plusieurs de ces processus peuvent se produire simultanément dans différents micro-domaines de la tumeur [73].

## 6. NEOVASCULARISATION DANS LES GLIOMES RECURRENTS

Comme vu précédemment, la récurrence de glioblastomes est quasiment inévitable après le traitement standard, y compris la radiothérapie. Comme des études soutiennent que l'irradiation est capable d'améliorer la formation des vaisseaux induite par la tumeur [151], ce qui est indispensable pour la croissance tumorale ; les mécanismes de la vascularisation après irradiation contribuant à la récurrence tumorale peuvent être intéressants à étudier. Kozin et al. ont proposé l'hypothèse qu'il existe un processus de récurrence tumorale lié à la neovascularisation dans les tumeurs après irradiation, en 4 stades [315]:

Stade I : **Réponse initiale**. Après irradiation, les cellules tumorales et les cellules endothéliales ne sont pas toutes détruites, la prolifération des cellules endothéliales est arrêtée, la diminution de la densité vasculaire observée peut être expliquée par un déficit de formation des nouveaux vaisseaux. Cependant, il existe un recrutement rapide des cellules BMDCs (Bone marrow-derived cells) [316].

Stade II : **Régression tumorale**. Les cellules endothéliales restantes ne garantissent pas l'intégrité de la vascularisation ou une perfusion sanguine suffisante. La diminution progressive

de la perfusion peut conduire à l'hypoxie et l'activation de HIF-1 $\alpha$ , à son tour, et à une vague de recrutement de BMDCs, 2 semaines après irradiation [317].

**Stade III : Récurrence précoce.** Les cellules endothéliales et les fragments de vaisseaux survivants peuvent être suffisants pour rétablir rapidement un système vasculaire tumoral fonctionnel et pour soutenir la nouvelle croissance rapide. Il est inconnu si la prolifération des cellules endothéliales est nécessaire à ce stade, mais les BMDCs recrutés semblent jouer un rôle en reformant et en maintenant les vaisseaux fonctionnels (Vasculogénèse).

**Stade IV : Récurrence tardive.** La formation de nouveaux vaisseaux ici devient nécessaire et le mécanisme dominant dans ce stade est l'angiogénèse, les BMDCs ne sont pas détectés dans les vaisseaux à ce stade [316, 317].

En plus, comme les GSCs (gliome stem-like cells) sont radio-résistantes, les GSCs survivantes peuvent contribuer à la formation des vaisseaux par trans-différentiation en cellules endothéliales.

L'angiogénèse, la vasculogénèse et la trans-différentiation des cellules tumorales peuvent être les mécanismes impliqués dans la néovascularisation des tumeurs récurrentes après irradiation, cependant il est nécessaire de plus d'études pour éclairer ces derniers mécanismes afin de confirmer cette hypothèse.

# OBJECTIFS



La radiothérapie est un outil thérapeutique essentiel dans la prise en charge des glioblastomes (GBM). Néanmoins, la récurrence post-irradiation, est quasiment inévitable et survient en général (90% des cas) à proximité de la cavité de résection ou dans le volume cible de la radiothérapie post-opératoire. Elle serait liée à l'émergence d'une sous-population de cellules cancéreuses particulièrement radio-résistantes qui présentent des capacités prolifératives, invasives et pro-angiogéniques augmentées. L'irradiation semble favoriser l'acquisition de ces propriétés d'agressivité accrue en initiant des échanges de signaux entre cellules irradiées et cellules non irradiées situées à proximité du champ d'irradiation. Ainsi, des études ont montré que les cellules tumorales irradiées peuvent affecter les propriétés phénotypiques des cellules tumorales non-irradiées ou renforcer l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* via la libération de facteurs solubles pro-angiogéniques. Outre les facteurs solubles libérés, il a été montré que les cellules tumorales, y compris les cellules de glioblastome, peuvent libérer des microvésicules (exosomes + "shedding vesicles"), c'est-à-dire, des petites fragments membranaires de 30 à 1000 nm, chargés d'ARNm, de microARN, d'ADN, et de protéines. Ces microvésicules tumorales (TMVs), lorsqu'elles sont « captées et incorporées » par des cellules receveuses voisines, sont capables d'en modifier le phénotype, ainsi que leurs propriétés d'adhésion, de prolifération, et de migration cellulaire et *in fine*, contribuer à la progression tumorale.

En nous appuyant sur toutes ces connaissances, nous avons émis l'hypothèse que les récurrences des GBM post-irradiation pouvaient être le résultat d'un microenvironnement tumoral et péri-tumoral rendu plus permissif, suite à la libération par les cellules tumorales irradiées, de modulateurs tels que les TMVs et/ou les facteurs solubles.

Pour vérifier cette hypothèse, nous devons déterminer comment la radiothérapie peut influencer la communication entre les cellules tumorales irradiées et les autres cellules situées à proximité (autres cellules tumorales, cellules endothéliales, fibroblastes associés aux cancers, cellules immunitaires) (Figure 42).



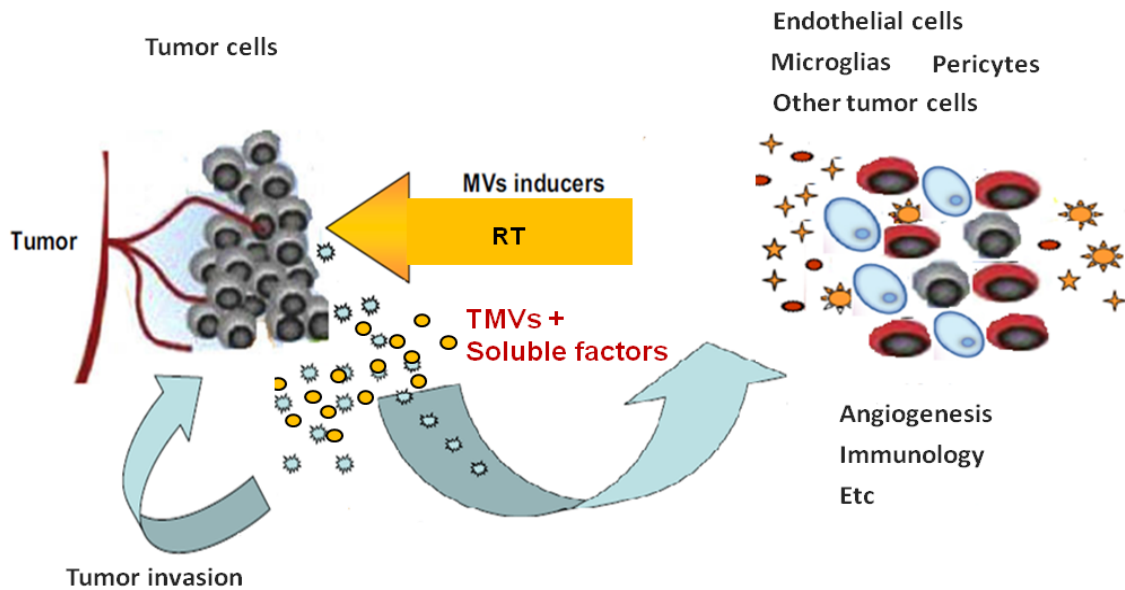


Figure 42. Schéma simplifié du contexte scientifique de la thèse

En particulier dans ce travail de thèse, nos investigations ont porté sur les relations entre les cellules tumorales irradiées et les cellules endothéliales, étant donné le rôle central des cellules endothéliales dans la progression tumorale (*i.e.* angiogénèse indispensable à la croissance tumorale et maintien du statut « souche » des cellules initiatrices de gliomes).

Pour ce faire, nous avons menés différentes expérimentations *in vitro* sur des cultures cellulaires pour :

1. documenter la réponse des cellules de glioblastome à l'irradiation ;
2. évaluer l'influence de l'irradiation sur la communication entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales à proximité ;
3. mettre en évidence les TMVs libérées par les cellules tumorales et évaluer l'influence de l'irradiation sur cette libération ;
4. étudier l'influence des TMVs et des facteurs solubles sur les capacités prolifératives et migratoires des cellules endothéliales et des cellules tumorales non-irradiées.

**MATERIEL**  
**ET**  
**METHODES**



## 1. CULTURE CELLULAIRE

Toutes les manipulations de culture cellulaire ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire (Poste de sécurité Microbiologique de type II) avec du matériel stérile et des milieux préchauffés à + 37 °C. La culture des cellules est effectuée par incubation des flasques dans un incubateur à CO<sub>2</sub> thermostaté à + 37 °C contenant un mélange de gaz (5% CO<sub>2</sub> et 95% d'air) et 85 % d'humidité.

### 1.1. Lignées cellulaires tumorales

Les cellules U87MG et T98G sont des cellules tumorales adhérentes issues de Glioblastome achetées à l'ATCC® (LGC Standard, France). Les cellules sont conservées congelées dans de l'azote liquide à - 196 °C. Les cellules en culture sont (culture continue) maintenues dans du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies*) complet (composition décrite dans le Tableau 11) et sans rouge de phénol, et entretenues par repiquages successifs à raison d'un repiquage par semaine.

#### 1.2.1. Décongélation des cellules

Les cellules sont rapidement décongelées et mélangées à 10mL de milieu de culture. Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes, le culot cellulaire est resuspendu dans 5mL de milieu de culture etensemencédans une flasque.

#### 1.2.2. Passage en subcultures

Les cellules à sub-confluence (80%) sont lavées 1 fois avec du PBS (Sigma-Aldrich) et sont ensuite détachées en laissant agir pendant 5 minutes à + 37 °C, 1mL de trypsine-EDTA 1X (0,05%) (Gibco®, Life Technologies). La digestion enzymatique est arrêtéepar addition de 5mL de milieu de culture. La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles, puis centrifugé à 300 g pendant 10 minutes. Les cellules sont remises en suspension dans 5mL de milieu de culture et dénombrées, puis sontensemencées pour la continuité de la culture et/ouensemencées selon le protocole utilisé

Les cellules U87MG ont été utilisées entre les passages 8 et 23 et les cellules T98G entre les passages 448 et 463.

## 1.2. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales ont été isolées selon la méthode de Jaffe modifiée [318, 319] à partir de cordons ombilicaux obtenus après consentement des femmes arrivées à terme auprès de la maternité régionale de Nancy, conformément à la réglementation en vigueur et selon les conditions définies dans la convention signée entre le laboratoire et la maternité régionale de Nancy.

### 1.2.1. Isolement et la culture des cellules endothéliales

#### Recueil des cordons

Les cordons ombilicaux, de 20 à 25 cm de longueur, sont recueillis dès l'expulsion placentaire, et sont mis dans du HBSS (Sigma-Aldrich) stérile, conservés à + 4 °C, utilisés le plus tôt possible et au maximum 6 heures après le prélèvement.

#### Recueil des HUVEC

L'extérieur du cordon est nettoyé avec de l'éthanol 70 % pour réduire les risques de contaminations microbiologiques. Après dilatation de l'extrémité de la veine à l'aide d'une pince, un robinet est inséré dans l'orifice de la veine. Après trois lavages avec du HBSS pour éliminer le sang, la deuxième extrémité du cordon est fermée avec une pince de chirurgien. Puis 15-20 mL de la solution de digestion trypsine-EDTA à 0,25 % (Life Technologies) est injectée. Le cordon est ensuite immergé dans du HBSS et réchauffé pendant 10 min à + 37 °C. Le cordon est alors massé doucement quelques secondes et la solution de digestion est recueillie dans un tube à centrifuger de 50 mL contenant 1 mL de sérum AB humain (provenant de donneurs volontaires sains, décomplémenté à + 56 °C pendant 30 minutes et stérilisé par passage sur un filtre de 0,22 µm de diamètre (Millipore)) pour arrêter l'action de la trypsine. La veine est lavée deux fois avec 20 mL de tampon HBSS. La suspension cellulaire est centrifugée à 400g pendant 6 minutes. Après un lavage des cellules avec 10 mL de milieu de culture, les cellules sontensemencées dans une flasque de culture de 25 cm<sup>2</sup>, puis placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> à + 37 °C.

### 1.2.2. Culture des HUVEC

Le milieu servant à la culture des HUVEC est un milieu synthétique commercial : EndoGRO<sup>TM</sup>-LS Complete Media Kit (Millipore, SCME001) composé de *EndoGRO<sup>TM</sup> Basal Medium*

complété avec un *EndoGRO™ –LS Supplement Kit* contenant plusieurs éléments à différentes concentrations (Tableau 11).

Tableau 11. Milieux de culture utilisés dans notre étude

	HUVEC	Cellules tumorales	
		Pour la culture	Pour expérience
Milieu de base	EndoGRO™ Basal Medium	DMEM	
SVF	2%	10%	5% SVFd
Supplément	0,2% EndoGRO-LS supplement (v/v)	0,4% de L-asparagine (Sigma)	
	5ng/mL de rhEGF	0,36% de L-serine (Sigma)	
	50µg/mL de Ascorbic Acid	1% de L-glutamine (Gibco)	
	10mM de L-Glutamine	1% de Acides aminés essentiels (Sigma)	
	1,0µg/mL de Hydrocortisone Hemisuccinate	0,5% de Acides aminés non essentiels(Sigma)	
	0,75U/mL de Heparin Sulfate	0,4% de Vitamines (Sigma)	
		1,25% de Pyruvate de sodium (Gibco)	
Antibiotique	100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine 2,5µg/mL de fungizone (GibcoBRL)	100U/mL de pénicilline et streptomycine (GibcoBRL)	

Dès le lendemain, le surnageant de culture est jeté pour éliminer les globules rouges restant. Après deux lavages avec du HBSS, les cellules sont remises dans 5mL de milieu de culture. L'examen au microscope inversé à contraste de phase montre que la plupart des cellules ont adhéré au fond de la boîte, cette culture correspond au passage zéro (P0).

Normalement, après 5-7 jours de culture, les cellules sont confluentes ; leur croissance s'arrête par inhibition de contact. Pendant la culture, le milieu est changé tous les 2-3 jours.

A confluence, les cellules sont lavées 1 fois avec du tampon PBS. Les cellules sont détachées en laissant agir pendant 30 secondes à + 37 °C 1mL de trypsine-EDTA 0,05 %. Puis la digestion est arrêtée par addition de 5mL de milieu de culture.

La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles, puis centrifugée à 400g pendant 6 minutes. Puis les cellules sont remises en culture, qui correspond au premier passage (P1).

Après leur deuxième passage (P2), les cellules peuvent être ensemencées aux densités cellulaires nécessaires à l'expérience et sont utilisées au maximum jusqu'au 4ème passage.

## 2. DETERMINATION DES EFFETS DE L'IRRADIATION SUR LES CELLULES TUMORALES

### 2.1. Irradiation des cellules

Les cellules tumorales U87 et T98G sontensemencées à  $5 \cdot 10^4$  cellules/mL dans des flasques de  $25 \text{ cm}^2$  (T25), ou à  $2 \cdot 10^4$  cellules/mL sur des lamelles en plastique (13 mm Thermalox®, NUNC, Thermo Fisher) placées au fond des puits de plaques 6 puits. Les boîtes de culture sont laissées à l'incubateur pendant 48 heures avant irradiation.

Après avoir changé le milieu de culture pour du milieu frais, les cellules sont irradiées avec un faisceau de photons de 6MV produits par un accélérateur linéaire Clinac iX (Varian Medical Systems) situé dans le service de radiothérapie du CHR Metz-Thionville, Hôpital de Mercy. Les cellules sont irradiées à 0, 2 et 10Gy (Figure 43) selon les modalités décrites ci-dessous.

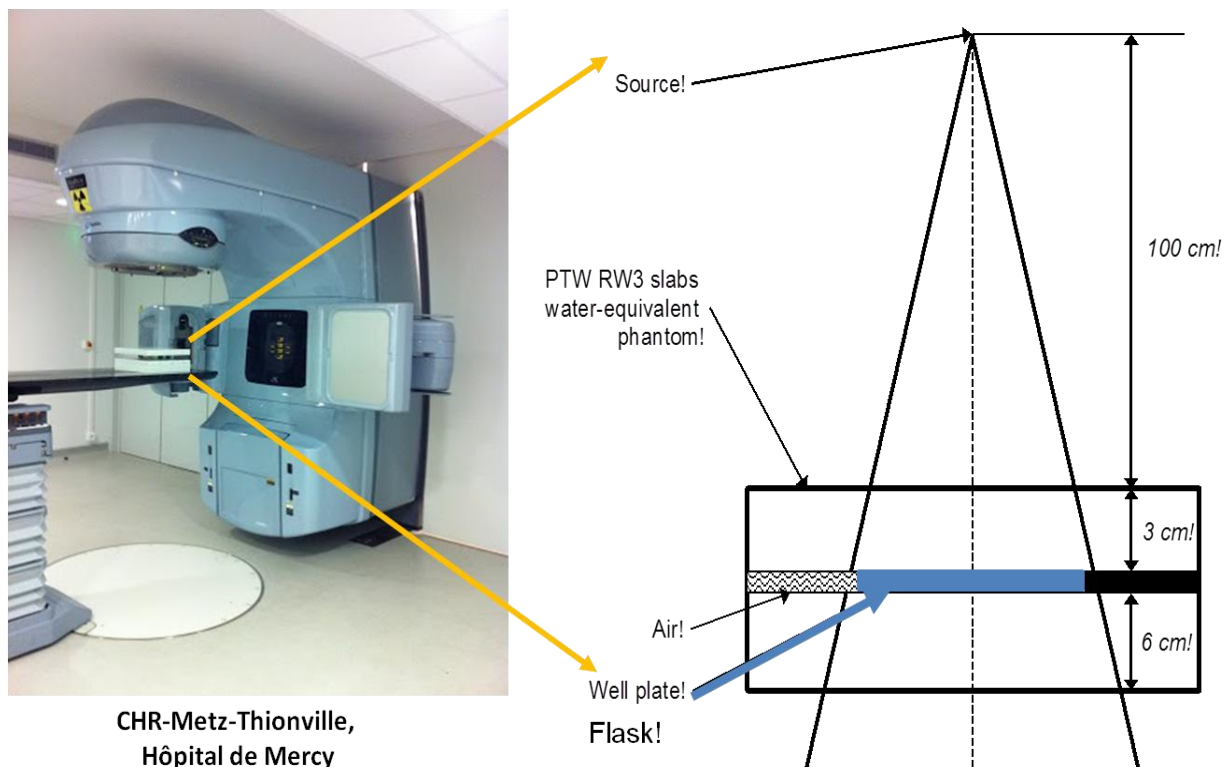


Figure 43. Schéma descriptif du protocole d'irradiation

Après irradiation, les boîtes de cultures sont replacées à l'incubateur pour une durée variable, en fonction des expérimentations prévues. Dans ce manuscrit, les durées post-irradiation sont de 2h, 24h ou 48h et seront mentionnées sous le format H2, H24 et H48, respectivement.

## 2.2. Numération cellulaire et viabilité par exclusion du bleu trypan

Après traitement, un comptage du nombre de cellules présentes et adhérentes au fond de la boîte est réalisé après avoir exposé les cellules au bleu trypan, (Sigma-Aldrich), un colorant exclu par les cellules viables mais pouvant rentrer dans les cellules mortes.

## 2.3. Analyse de la capacité clonogénique des cellules tumorales irradiées

Le but de cette technique est de prendre en compte la mort retardée (mitotique) des cellules irradiées en déterminant leur pouvoir clonogénique, c'est-à-dire leur capacité de former un clone de cellules, toutes issues de la même cellule mère.

Les essais clonogéniques sont réalisés dans les plaques de P6 en suivant le protocole standard dit «en double couche d'agar mou ». Le fond des puits est, au préalable, recouvert d'une première couche d'agar solidifiée. Cette couche inférieure, constituée de 0,5% d'agar (Sigma), diluée dans du milieu de culture, et est déposée à l'état liquide puis laissée pour gélification. Les cellules tumorales irradiées ou non-irradiées sont mises en suspension dans une solution à 0,3% d'agar (dans du milieu de culture) à une concentration de 10000 cellules/ml. Cette suspension cellulaire est déposée dans les puits au-dessus de la première couche solidifiée. Puis, chaque puits est recouvert avec 1ml de milieu de culture complet. Après 14 jours d'incubation, le milieu de culture est éliminé et les colonies cellulaires sont marquées par mise en contact avec du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5-diphényltétrazolium bromide, 1mg/ml, Sigma) pendant 3h. On ajoute *in fine* 1ml de formol (Prolabo) pour fixer les colonies. Les colonies formées sont comptées à l'aide du système Gel Count (Oxford Optronix) qui détermine le nombre de colonies grâce à une analyse d'image.

## 2.4. Etude de l'apoptose et de la nécrose par cytométrie en flux

### 2.4.1. Principe

Dans une cellule non-apoptique, les phosphatidylsérines (PS) membranaires ne sont situées que sur le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules. Dès qu'une cellule entre en apoptose (premières phases), elles se re-localisent et sont exprimées des deux côtés de la membrane. L'annexine V est une protéine ayant une forte affinité pour les phosphatidylsérines et donc s'y associent, dès lors que celles-ci sont accessibles. L'annexine V, lorsqu'elle est couplée à un marqueur fluorescent, va ainsi permettre d'identifier les cellules apoptotiques.



Il faut noter que les cellules nécrotiques dont la membrane est altérée sont aussi marquées par l'annexine V. Toutefois, il est possible de discriminer les cellules apoptotiques des cellules nécrotiques en exposant l'ensemble des cellules à de l'iodure de propidium. Celui-ci ne pénètre que dans les cellules où les membranes cellulaires sont altérées, c'est-à-dire dans les cellules nécrotiques et les cellules en phase tardive d'apoptose.

Une analyse par cytométrie en flux permet d'avoir une approche semi-quantitative de la proportion de cellules apoptotiques et nécrotiques après traitement.

#### 2.4.2. Application

L'alignement des lasers et la stabilité de l'appareil sont vérifiés en utilisant les billes fluorescentes calibrées (Flow-Check® Fluorospheres, Beckman Coulter, France) et les billes SPHERO® (Rainbow Calibration Particles, Spherotech, USA).

Les cellules irradiées et non-irradiées sont récupérées. Après centrifugation et comptage cellulaire,  $10^6$  cellules sont re-suspendues dans 1ml de tampon «*Binding Buffer IX*» (BD pharmigen, BD Biosciences). 5 $\mu$ L Annexin V-FITC (BD Biosciences) et 10 $\mu$ L d'Iodure de propidium (Sigma, 50 $\mu$ g/ml dans PBS) sont ajoutés dans 100 $\mu$ L de suspension cellulaire préparée. Après une incubation pendant 15 min à température ambiante à l'obscurité, les cellules sont diluées dans 400 $\mu$ L de tampon «*Binding Buffer IX*», et analysés par cytométrie en flux (CMF, Navios, Beckman Coulter, Plateforme "Nancytomique" CHRU Nancy).

Pour chaque échantillon, une analyse conditionnelle a été réalisée à l'aide d'un cytogramme FSC (Forward Scatter) versus SSC (Side Scatter), afin d'exclure les événements correspondants aux débris de petite taille et aux agrégats. L'analyse des échantillons est effectuée pendant 300 secondes. Au moins 10000 cellules sont passées pour l'acquisition. La lecture de l'annexine V-FITC est sur le canal FL1, alors que la lecture de l'iodure de propidium est sur le canal FL3 (Figure 44).

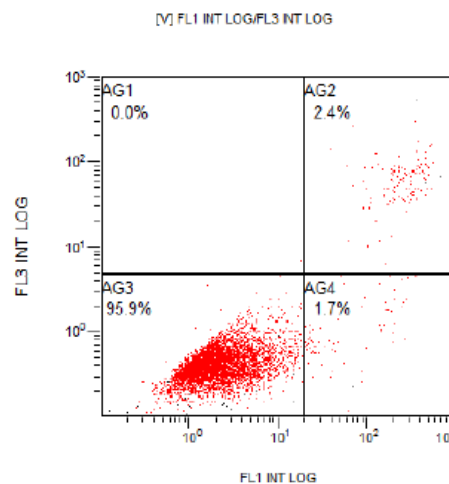


Figure 44. Exemple de l'analyse de l'apoptose en cytométrie en flux. Fenêtre AG1 : débris nucléaires ; AG2: cellules dans la phase tardive d'apoptose et/ou nécrose; AG3 : cellules viables; AG4 : cellules dans la phase précoce d'apoptose

Les résultats obtenus au cytomètre sont à analyser comme suit :

- Annexine V<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> : cellules vivantes (AG3)
- Annexine V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> : débris nucléaires (AG1)
- Annexine V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> : phase précoce d'apoptose (AG4)
- Annexine V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> : phase tardive d'apoptose et nécrose (AG2)

### 3. MISE EN EVIDENCE ET QUANTIFICATION DES TMVs

#### 3.1. Observation de TMVs à la surface cellulaire par Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Les cellules tumorales U87 et T98G sontensemencées à  $2.10^4$  cellules/mL sur des lamelles en plastique (13 mm Thermalox®, NUNC, Thermo Fisher) placées au fond des puits de plaques 6 puits pendant 48 heures, puis les cellules sont irradiées.

Après trois lavages avec du PBS, les cellules irradiées et non-irradiées sont préparées pour l'analyse en microscopie électronique à balayage : elles subissent une fixation pendant 2 heures dans du glutaraldéhyde à 2% dans un tampon cacodylate, suivie de plusieurs lavages à l'eau ultra pure, puis d'une déshydratation avec de l'éthanol. Pour finir, l'échantillon est métallisé (or / palladium) à l'aide d'une coucheuse par pulvérisation Polaron Range SC7640 ThermoVG Scientific appareil. La morphologie des cellules est analysée à l'aide d'un appareil de Cambridge Stereoscan S240 du «Service Commun de Microscopie» de l'Université de Lorraine. Des microphotographies sont prises sous une tension d'accélération de 20 kV. Ce travail a été réalisé avec l'aide du pr. b. foliguet et m. chevrier dans ce service.

#### 3.2. Les milieux conditionnés, les TMVs et les Filtrats :

##### 3.2.1. Principe

Les milieux conditionnés (CM) sont des milieux issus de la culture des cellules. Ils contiennent tous les facteurs libérés par les cellules pendant un temps de culture déterminé, mais sont appauvris en certaines substances (nutriments et facteurs de croissance) utilisés par les cellules pendant la culture comme certains facteurs de croissance.

Cette technique nous permet de récupérer les différentes substances libérées par les cellules tumorales exposées ou non à un traitement. La récupération des milieux conditionnés (ou des substances qu'ils contiennent par purification) et la mise en contact de ces derniers avec des cellules receveuses permet d'évaluer l'effet indirect de ces traitements.

### 3.2.2. Méthode de préparation

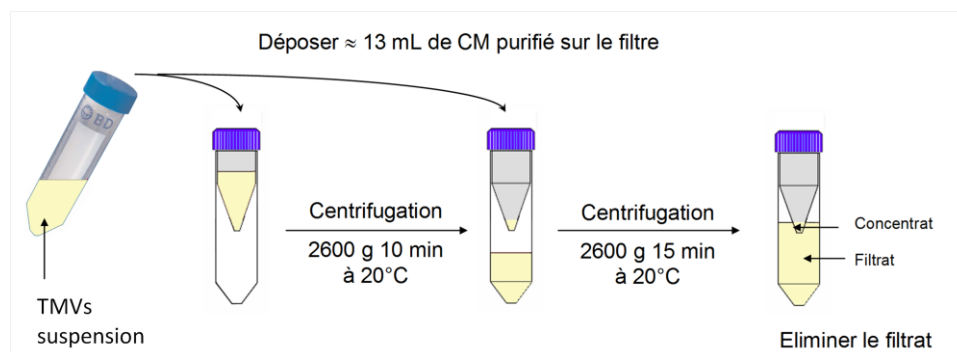
Le milieu DMEM/SVFD est un milieu DMEM complet contenant 10% de SVFD, c'est-à-dire du sérum de veau fœtal dépleté en microvésicules (l'élimination des microvésicules est obtenue par centrifugation 2 fois à 15000 g pendant 1 h 30 à + 20 °C). Ce milieu est préparé à l'avance, au début de chaque manipulation.

Les cellules tumorales sontensemencées à 50 000 cellules /cm<sup>2</sup> dans des flasques 25 cm<sup>2</sup> et sont cultivées pendant 48h dans du milieu DMEM complet contenant 10% de SVF. Pour éliminer le plus possible les microvésicules potentiellement présentes et libérées au cours de ces premières 48h, trois lavages avec du HBSS sont effectués. Puis, 5 mL de milieu DMEM/SVFD (Tableau x) sont ajoutés. Les cellules dans les flasques sont irradiées à 0, 2, 10Gy.

Après irradiation, les boîtes sont replacées à l'incubateur pour 2, 24 ou 48h.

- Pour obtenir le milieu conditionné (CM), les milieux de culture sont transférés dans des tubes coniques stériles et centrifugés à 2000 g pendant 10 minutes à + 20 °C pour ôter les débris cellulaires.
- Pour obtenir une suspension de TMVs, les milieux de culture collectés sont transférés dans des tubes coniques stériles (5 mL par tube) et sont centrifugés 2 fois à 2600 g pendant 15 minutes ; 3 ml de surnageant sont récupérés, correspondant aux suspensions de microvésicules, qui sont analysés immédiatement après leur récupération. Le protocole présent répond aux critères internationaux de préparation des microparticules plaquettaires approuvé par le comité international de standardisation scientifique ISTH [260].

Dans les suspensions de microvésicules, il y a non seulement des TMVs mais aussi différents facteurs solubles, et la séparation de ces deux types de composants se fait à l'aide d'un tube Pierce Concentrator 20ml/150K (ThermoFisher, Strasbourg). Après un lavage du filtre avec du PBS stérile (élimination du glycérol, conservateur de la membrane filtrante), la suspension de microvésicules à purifier est ajoutée sur le filtre et le tube est centrifugé à 2600g, le temps de centrifugation est fonction du volume de TMVs (par exemple, 10min pour 12mL).



Selon le tableau des correspondances et si les volumes ont été déposés avec précision, il doit rester entre 500 et 1000  $\mu\text{L}$  au-dessus du filtre (culot de TMVs).

#### A. Dead-stop Control

Controlling the dead-stop volume will prevent over-concentrating proteins with known stability problems. The final sample volume placed in the upper sample chamber plus buffer in the collection tube can control the dead-stop volume. Sample concentration will cease when the volume in the collection tube rises to the meniscus in the sample chamber. The dead-stop volumes for various sample sizes are indicated in Tables 1 and 2. For example, 16mL of sample with 6mL of buffer placed in the collection tube (22mL total volume) will result in a dead-stop volume of  $\sim 200\mu\text{L}$  after centrifugation in a swinging-bucket rotor.

**Table 1.** Dead-stop volumes for various sample sizes using the 20mL concentrators.

Total Volume (sample + buffer in collection tube)		
Swinging Bucket (mL)	35° Fixed Angle (mL)*	Dead Stop ( $\mu\text{L}$ )
20.6	21.3	100
22.0	22.4	200
24.7	24.4	500
27.2	26.2	1000
30.2	28.5	2000

\*Do not exceed the maximum recommend sample volume (13.5mL) for a fixed-angle rotor or sample loss may occur and rotor may become imbalanced.

Puis, le **Filtrat**, collecté au fond de tube, contient seulement des facteurs solubles : il est récupéré et conservé. Le culot de TMVs formé sur le filtre subit un lavage au PBS par centrifugation à 2600g pendant 10 minutes, puis est récupéré : on obtient ainsi les TMVs purifiés.

### 3.3. Analyse de la taille des microvésicules par granulométrie laser

#### 3.3.1. Principe

La granulométrie laser est une technique basée sur la diffusion dynamique de la lumière (DLS pour *Dynamic Light Scattering*) et permet la détermination de la taille de micro- ou nanoparticules en suspension dans un liquide (0,6 nm et jusqu'à 6  $\mu\text{m}$ ). L'appareil utilisé est le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) (Figure 45) : il utilise un laser néon-hélium 633 nm comme source lumineuse (N°1) pour éclairer l'échantillon présent dans la cuve (N°2).

Les molécules en suspension ne sont pas statiques mais sont animées par les mouvements browniens. Lorsque les particules sont éclairées par la lumière provenant d'un laser, elles diffusent la lumière et leur mouvement brownien produit des fluctuations d'intensité significative, qui peuvent être détectés à de nombreux angles différents (Figure 46). En conséquence, la taille des molécules peuvent être automatiquement calculées à l'aide de la relation de Stokes-Einstein, à condition que la viscosité et l'indice de réfraction de la solution soient connus.

Cette technique est simple d'utilisation, rapide et offre l'avantage de ne pas imposer d'étape préparative de l'échantillon.

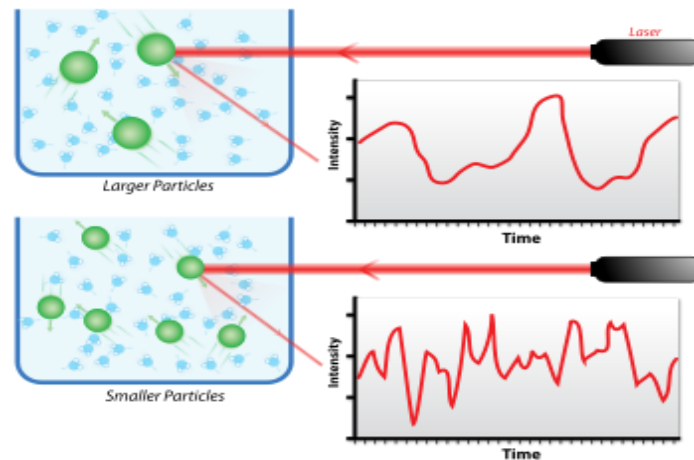


Figure 45. Principe de mesure de la taille des particules en suspension par DLS. (Extrait du site internet Wikipédia). L'amplitude des variations des intensités de la lumière diffusée par les petites particules pendant un temps très court est plus importante que celle de la lumière diffusée par les particules plus grosses, en raison de leur plus grande vitesse

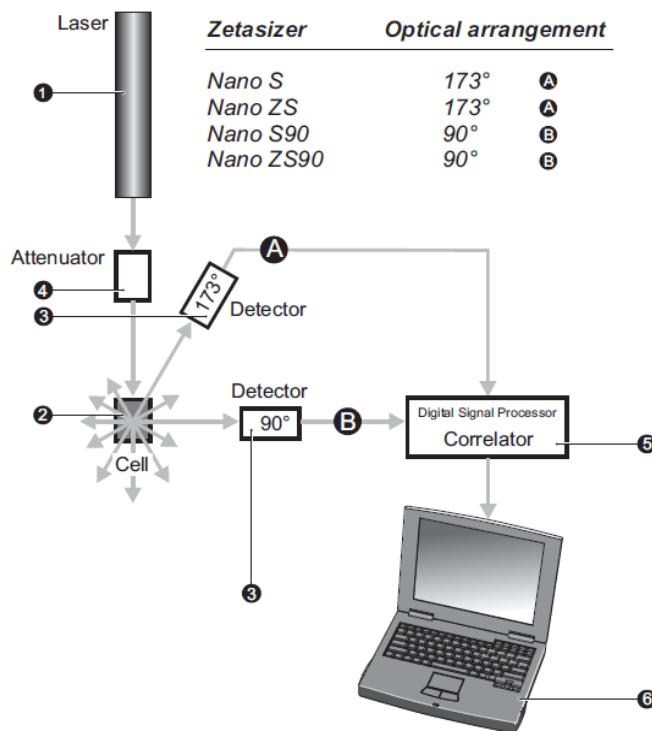


Figure 46. Schéma descriptif de l'appareil Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd)

### 3.3.2. Utilisation de l'appareil

500µL d'échantillon à analyser sont déposés dans une cuve en plastique de 1,5mL et plac é dans l'appareil. L'appareil est ensuite paramétré et l'analyse est lancée en appuyant sur START.

L'appareil règle lui-même le focus et l'intensité du laser en fonction de la concentration des échantillons avant d'effectuer les analyses. Après un temps d'équilibration de 30 secondes, il effectue au moins dix mesures de tailles en triplicat par échantillon, ce qui lui permet de déterminer le profil de distribution des tailles des particules.

L'indice de polydispersité (PdI) est calculé par le logiciel à partir de l'analyse cumulée des intensités mesurées. Un PdI de 1 indique que la distribution en taille des particules est large (suspension polydisperse) alors qu'une valeur proche de zéro indique qu'il n'y a pas de variation dans la taille de l'échantillon (suspension monodisperse).

### 3.4. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA, Nanosight)

#### 3.4.1. Principe

Le NTA est une méthode reconnue pour la visualisation et l'analyse directe de nanoparticules dans les liquides en temps réel et basée sur une technique de microscopie avec une source lumineuse laser. Le mouvement brownien des nanoparticules est analysé en temps réel par une caméra de haute sensibilité, chaque particule est visualisée simultanément mais séparément, et suivie par une image de cheminement analysée par un programme d'analyse de particules dédié. Le NTA permet d'étudier des mélanges de particules hétérogènes et d'en déduire le profil de distribution des tailles des particules et, plus important encore, de déterminer directement la concentration des particules (Figure 47).

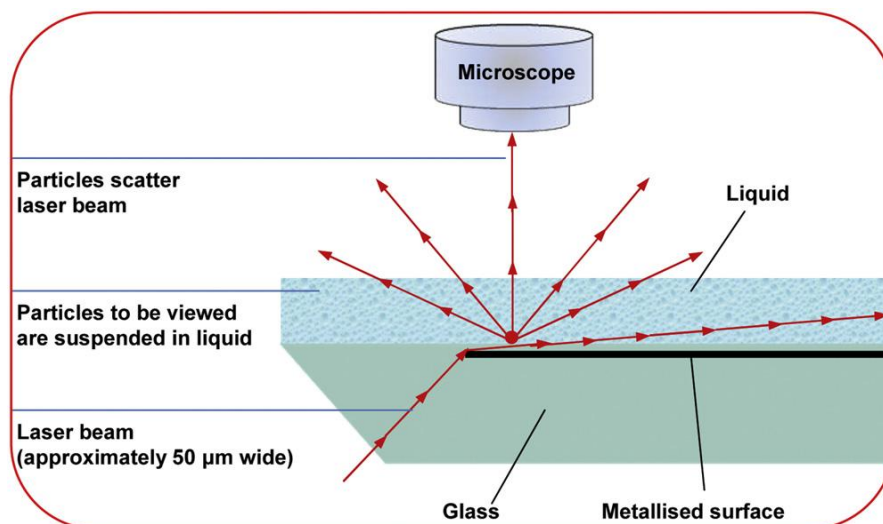


Figure 47. Configuration de NanoSight instrument (Extrait de Dragovic, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 2011)

Un faisceau laser passe à travers la chambre d'échantillonnage, et les particules en suspension dans le chemin de cette lumière provoquent la diffusion du faisceau et peuvent ainsi facilement être visualisées par l'intermédiaire d'une caméra montée sur un microscope avec grossissement de 20X. La caméra qui fonctionne à environ 30 images par seconde (fps) capture un fichier vidéo du mouvement des particules soumise au mouvement Brownien dans le champ de vue d'environ  $100\mu\text{m} \times 80\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$  (Figure 48A). Cette vidéo dure 90 secondes.

Le Programme NTA identifie simultanément et suit le centre de chaque particule sur une base « *image par image* » tout au long de la durée de la vidéo (typiquement 900 images ou de 30 secondes) (Figure 48B). La distance moyenne parcourue par chaque particule qui se déplace en x et y dans l'image est calculée automatiquement. Le mouvement Brownien de trois dimensions est suivi dans deux dimensions (x et y). Avec d'autres paramètres comme la température du solvant, le temps d'échantillonnage et la viscosité le système en appliquant l'équation de Stokes-Einstein, peut calculer la taille de chaque particule suivie (Figure 48C).

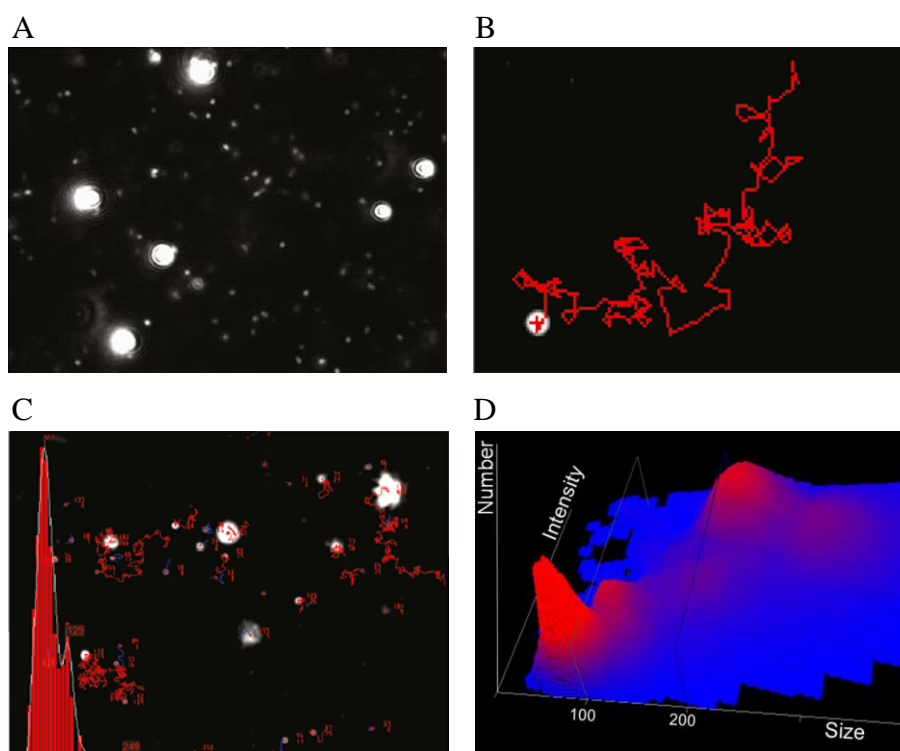


Figure 48. Schéma descriptif de la procédure de la détermination de la taille par NTA (NanoSight Ltd)

Par ailleurs, le NTA regroupe les mesures de taille particule par particule avec l'intensité 3D vs concentration vs taille (Figure 48D).

### 3.4.2. Application

Selon les recommandations du fabricant, pour permettre qu'un nombre suffisant de particules puisse être analysé dans un délai acceptable (par exemple <60 secondes), et générer un profil de distribution de tailles statistiquement significatif et reproductible, les échantillons devraient contenir entre  $10^7$  et  $10^9$  particules/ml. Ainsi, après centrifugations successives, les TMVs contenues dans des milieux conditionnés sont diluées 10 fois dans du milieu DMEM seul.

Les échantillons sont bien homogénéisés avant l'introduction dans la chambre de mesure et un enregistrement vidéo, typiquement de 90 secondes, est lancé avec le logiciel NTA 2.3 (NanoSight Ltd, Malvern Instrument). Une combinaison de la vitesse d'obturation élevée et du gain suivie d'une mise au point manuelle permet la visualisation optimale d'un nombre maximum de vésicules. Pour suivre avec précision les vésicules, elles doivent être vues chacune comme des points uniques de lumière. Chaque échantillon fait l'objet de 3 mesures répétées. Chaque vidéo est ensuite analysée pour donner la moyenne, le mode et la taille moyenne de la vésicule, avec une estimation de la concentration. Une feuille de calcul Excel (Microsoft, Redmond, Washington) est également générée automatiquement, montrant la concentration pour chaque taille de vésicules.

### 3.5. Quantification des TMVs par cytométrie en flux

#### 3.5.1. Principe

Parmi des paramètres de cytométrie en flux, la diffusion de la lumière aux petits angles (FSC, Forward Scatter Collection) est collectée dans l'axe du faisceau lumineux et permet la mesure des paramètres physiques, renseignant ainsi sur la taille de l'événement mesuré. La diffusion de la lumière aux grands angles (SSC, Side Scatter Collection) est collectée à  $90^\circ$  par rapport au faisceau lumineux et donne des indications sur la structure interne de la structure analysée (granulométrie). Le cytomètre Navios, (Beckman Coulter, Plateforme "Nancytomique" CHRU Nancy) est doté d'un système amélioré permettant de collecter la lumière diffusée par des particules submicroscopiques et est donc adapté à l'analyse des TMVs.

#### 3.5.2. Application

L'analyse des microvésicules nécessite l'utilisation de billes de différentes tailles afin de repérer les événements correspondant à ces particules, dont la taille est inférieure à  $1\mu\text{m}$ . Ceci est possible grâce à l'utilisation d'un réactif spécifique, le Mégamix® (Biocytex), constitué de billes fluorescentes de diamètres variés ( $0,5\mu\text{m}$ ,  $0,9\mu\text{m}$  et  $3\mu\text{m}$ ) (Figure 49A). Elles assurent la stabilité des réglages et permettent de compter les microparticules de façon reproductible. Le



canal FL1 est réglé de telle sorte à obtenir 50 % ( $50\% \pm 2\%$ ) pour chaque population de bille. Ces billes permettent de définir de façon standardisée la zone d'analyse des microparticules. Les billes de  $0,9\mu\text{m}$  placent la limite haute de détection des microvésicules. Une fenêtre est dessinée sur le scatogramme représentant SS en fonction de la taille (FS) d'après la position de billes de  $0,9\mu\text{m}$ , tous les événements dans cette fenêtre sont les microvésicules (figure B). Il est à noter que la limite de la détection de la machine est définie à  $300\text{nm}$  [256], par conséquent, le cytomètre en flux permette la quantification des microvésicules entre  $300\text{-}1000\text{nm}$ .

Lorsque l'on désire effectuer une analyse quantitative des microparticules, il est possible d'utiliser les billes *Particle Count Standard* (SureCount™, Bangs Laboratoires) : ce sont des billes fluorescentes en quantité connue dans un volume connu. Par ajout en quantité connue à un volume identique de suspension cellulaire, elles servent de calibrateur interne, permettant de calculer la concentration des microvésicules (Figure 49B).

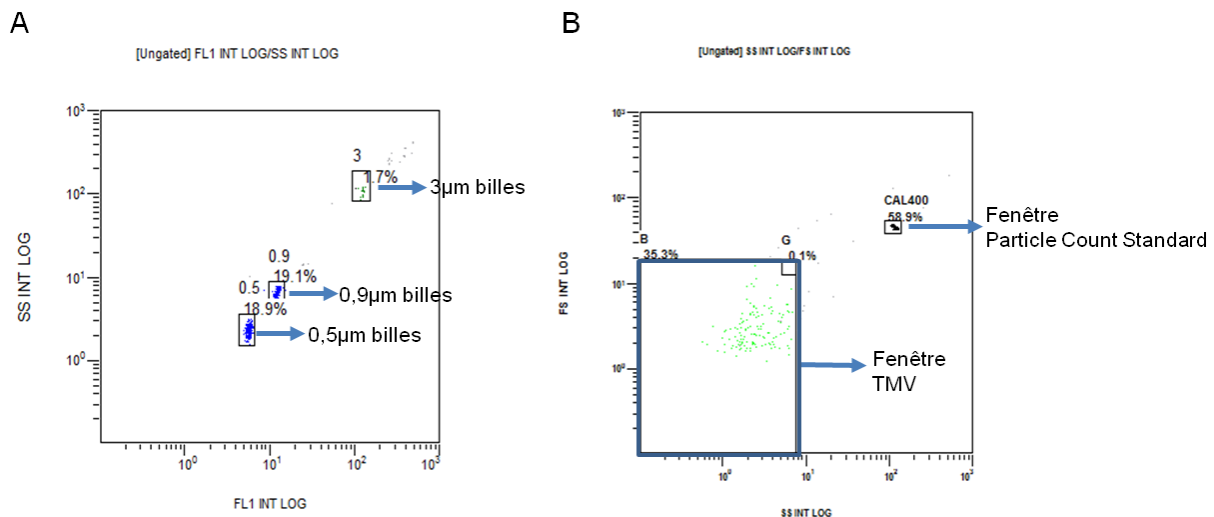


Figure 49. Méthode de sélection des événements permettant l'analyse par cytométrie en flux des microparticules. A. Une suspension commerciale de billes fluorescentes calibrées de taille égale à  $0,5$  ;  $0,9$  et  $3\mu\text{m}$  est utilisée pour effectuer les réglages de l'appareil permettant la sélection des événements dont la taille est en dessous de  $0,9\mu\text{m}$ . B. Les billes *Particle Count Standard* sont utilisées comme calibrateur interne pour déterminer la concentration de microvésicules

#### 4. EFFETS DES MILIEUX CONDITIONNES, DES TMVs ET DES FILTRATS SUR LES CELLULES RECEVEUSES

##### 4.1. Real Time Cell Analyzer (xCELLigence)

###### 4.1.1. Principe

Le Real Time Cell Analyzer (RTCA, ACEA Biosciences) est un système dédié au suivi temps réel du comportement des cellules adhérentes, basé sur la mesure d'impédance, permettant d'obtenir des informations quantitatives sur l'état biologique cellulaire (adhésion, prolifération,

viabilité morphologie) en continu, en temps réel et sans marquage. Ce système est composé d'une station à placer dans l'incubateur, supportant la plaque 96 puits (E-plate 96) dont le fond est recouvert de microélectrodes en or. Cette station est reliée au RTCA Analyzer qui enregistre et traite les signaux d'impédance, enregistrés au niveau de chaque puits, et analysés grâce à un logiciel d'exploitation spécifique. Quand la plaque E-plate est posée dans la station RTCA, un courant électrique traverse le puits, donnant lieu à un signal d'impédance de référence (proche de 0). En présence de cellules adhérentes au fond des puits, la résistance au passage du courant électrique augmente, donnant un signal **d'impédance cellulaire**. Le **Cell Index (CI)**, paramètre sans dimension enregistré en continu, est obtenu à partir des variations d'impédance électrique ; il est représentatif du **statut cellulaire global**. Plus le nombre de cellules est élevé plus les valeurs d'impédance sont importantes (Figure 50). Le Cell Index varie par ailleurs en fonction de la morphologie cellulaire, de la qualité des interactions cellulaires et des interactions entre cellules et support (l'adhésion cellulaire).

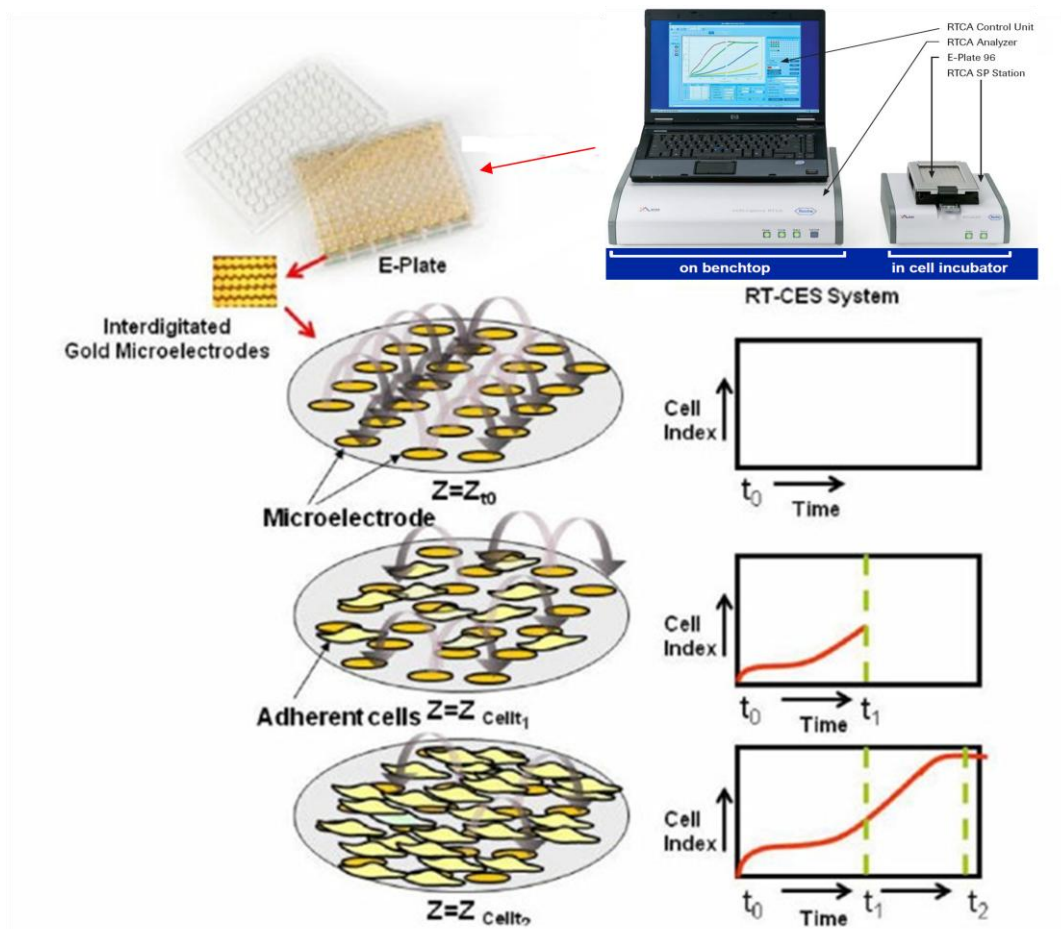


Figure 50. Représentation schématique de la surveillance en temps réel des cellules adhérentes par le système RTCA (xCELLigence, ACEA Biosciences)

#### 4.1.2. Application

150  $\mu\text{L}$  de suspension cellulaire, contenant 4 000 cellules HUVEC ou des cellules tumorales (U87MG, T98G), sont déposés dans chaque puits. 20 min après ensemencement, la mesure d'impédance à l'aide du système RTCA d'œute, à raison d'une mesure toutes les 15 minutes. 24 heures après l'ensemencement, le milieu de culture est éliminé et les tapis cellulaires au fond des puits sont rincés avec 200 $\mu\text{L}$  HBSS. Puis, on ajoute soit les CM soit les Filtrats soit les TMVs purifiées (remises en suspension dans du DMEM/SVFD) dans les puits correspondants. Le milieu DMEM/SVFD ou EndoGROTM-LS est ajouté dans des puits témoin. Puis, la plaque est remplacée sur sa station d'accueil dans l'incubateur : la mesure d'impédance reprend à raison d'une mesure toutes les 5 minutes pendant 24 heures puis à intervalles de 15 min jusqu'à la fin du suivi (environ 5 à 7 jours).

## 4.2. Test de blessure (Wound-healing assay)

### 4.2.1. Principe

La migration cellulaire collective pour laquelle les cellules maintiennent des contacts cellule-cellule, est un mécanisme fondamental au cours du développement embryonnaire, mais aussi chez l'adulte, lors des phénomènes de cicatrisation de plaies ou de développement de certaines tumeurs.

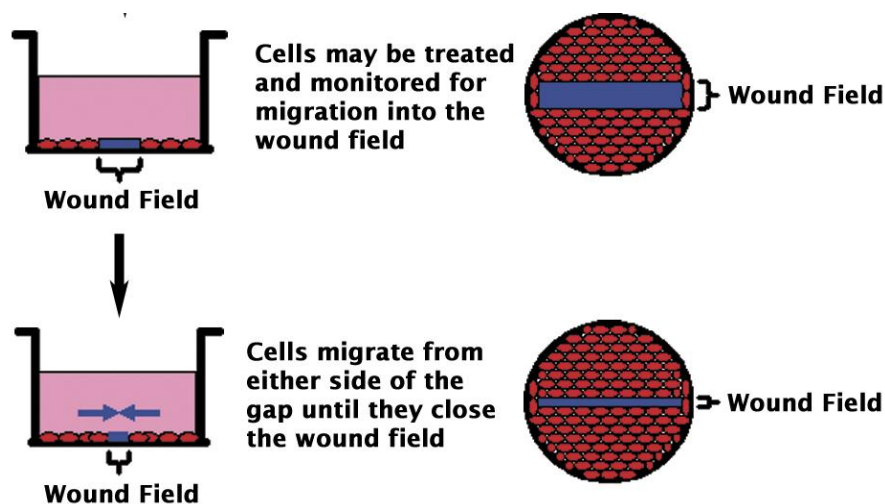


Figure 51. Représentation schématique du test de blessure [320]

Au laboratoire, ce phénomène de migration est couramment étudié à l'aide d'un test spécifique dit «test de blessure ». Au fond d'une boîte de culture, des cellules adhérentes forment un tapis cellulaire confluent. Une bande de cellules est arrachée avec une pointe de pipette pour créer une

« blessure » Les cellules migrent alors pour combler la blessure, et reconstituer la monocouche cellulaire confluite (Figure 51). L'ajout d'un facteur de croissance accélère le processus.

#### 4.2.2. Application

Des cellules HUVEC sontensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de  $2.10^5$  cellules/puits et sont laissées à l'incubateur pendant 24 heures pour qu'elles forment un tapis monocouche confluent. Ensuite, le milieu de culture est éliminé et une rayure (blessure) est créée dans le centre de la monocouche de cellules avec une pointe de pipette stérile de 1000µL. Immédiatement, la rayure est observée sous microscope inversé (Diaphot 300, Digital Sight DS-Fi1 camera, Nikon), photographiée pour en déterminer sa largeur initiale. Ensuite, les milieux conditionnés (CM) ou filtrat contenant des facteurs solubles ou TMVs dans DMEM/SVFD frais, ou DMEM/SVFD (comme témoin) sont ajoutés dans les puits. Après incubation pendant 18h, le surnageant est éliminé. Les cellules sont fixées avec du formol 4% et colorées avec du cristal violet à 0,05%. Enfin, les cellules sont observées et photographiées, pour déterminer la largeur finale de la blessure, en utilisant la même méthode que précédemment.

Pour déterminer la distance de migration, la distance entre les deux bords de la blessure est mesurée en utilisant le logiciel NIS Element Software (Nikon) (i) juste après la blessure (D1) et (ii) après 18h d'incubation (D2). La distance de migration est calculée comme suit:  $(D1-D2) / 2$ .

#### 4.3. Test d'invasion (Chambre de Boyden)

L'insert de culture cellulaire (BD Falcon) pour 24 puits est un système *in vitro* destiné à l'étude de la migration et l'invasion des cellules à travers la membrane basale. L'insert de culture cellulaire Falcon® contenant une membrane en PET avec une taille de pores de 8,0 µm. La membrane sert de barrière de distinguer entre les cellules migratrices et non migratrices. Les cellulesensemencées dans l'insert ayant la capacité migratoire peuvent traverser la membrane et arriver à l'autre côté de l'insert (Figure 52). Si le fond de l'insert est recouvert d'une couche uniforme de matrice afin d'empêcher la migration des cellules non invasives à travers la membrane, ce système peut être utilisé pour l'étude de l'invasion cellulaire.

Le BD Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Bioscience) est dilué dans du DMEM seul et déposé sur toute la surface de l'insert. Une fois le Matrigel polymérisé, le milieu est aspiré doucement et remplacé par 500 µL de DMEM avec  $2.10^5$  cellules. 700 µL de DMEM/SVFD (comme Ctrl) ou CM/Filtrat/TMV's resuspendu dans DMEM/SVFD sont rajoutés dans les puits correspondant aux inserts. Au bout de 24h, les cellules qui n'auraient pas migrées sont éliminées

par gratter la surface avec une coton tige. Les cellules ayant travers é le Matrigel et de l'insert est fix ées avec 4% PAF et color ées avec cristal violet 0,05%, puis les photos sont prises au Microscope invers é à contraste de phase (Nikon AZ100). La coloration est solubilis ée dans l'acide acétique 4%, l'absorbance est lu à 540 nm au spectrophotomètre (Thermo).

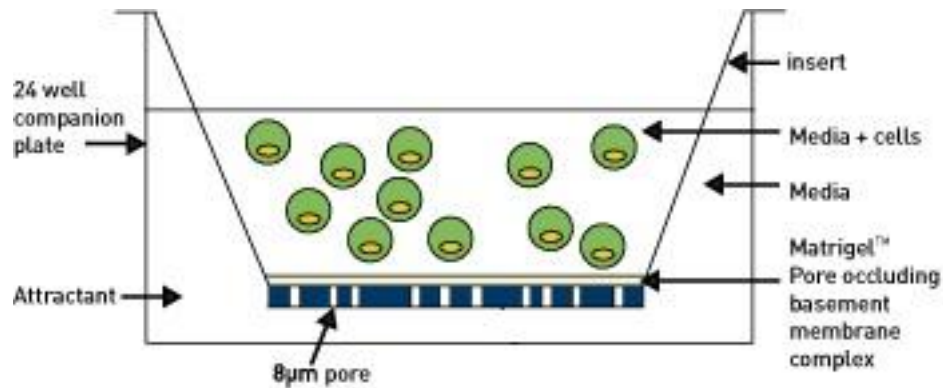


Figure 52. Système d'insert (la chambre de Boyden) pour le test d'invasion (adapté à Hart, Gas, 2006) [321]

#### 4.4. Etude de la formation des structures pseudo-capillaires *in vitro*

Cette technique permet d'évaluer *in vitro* la morphogenèse dans l'angiogenèse. Les cellules endothélialesensemencées sur Matrigel à faible densité forment un réseau de structures pseudo-capillaires dans une à deux dimensions. Les puits sont photographiés et la morphogenèse est quantifiée (densité du réseau, nombre de jonction, longueur du réseau) par la mesure de la longueur ou de la zone de structures pseudo-capillaires.

Le Matrigel® est une substance isolée à partir de souris portant le sarcome Engelbrech-Holm-Swarm (EHS), contenant différentes protéines de la matrice comme la laminine, le collagène de type IV, la fibrine et certains facteurs de croissance tels que EGF, TGF-β et PDGF. Il permet d'offrir un support aux cellules en mimant l'environnement naturel et l'initiation d'une réponse angiogénique.

Les HUVEC (90 000 cellules/cm<sup>2</sup>) sontensemencées dans les puits recouvert de Matrigel (BD Biosciences) et sont laissées pour adhérer. Puis le milieu de culture est remplacé par le CM/Filtrat/TMV resuspendu dans DMEM/SVFD. Après l'incubation pendant 24h, les cellules sont fixées avec le paraformaldéhyde (PAF) 4% (p/v). Les réseaux capillaires formés par les cellules endothéliales sont marqués par la Phalloïdine-sulforhodamine (Fluorobes®), une molécule fluorescente permettant la visualisation de l'actine (protéines du cytosquelette). Les réseaux capillaires sont ensuite photographiés à l'aide du microscope à fluorescence AZ100 (Nikon) équipé de la camera Digital Light DS-Qi1Mc (Nikon).

## 5. ANALYSES PROTEIQUES DES FILTRATS / TMVs ET DES CELLULES

### 5.1. Extraction et dosages des protéines totales contenues dans les filtrats et les TMVs

L'extraction des protéines des TMVs purifiés (retenues en culot sur le filtre du tube *Pierce Concentrator*) est effectuée à l'aide d'un tampon lyse (lysis buffer 17, R&D Systems) complété de 1,2% d'aprotinine, 0,4% de leupeptine et 0,2% de pepstatine. Le dosage du contenu total en protéines dans le Filtrat et dans le lysat de TMVs est réalisé sur le principe de la méthode de Lowry à l'aide du kit BCA et utilisé selon les recommandations fournies par le fabricant (BCA® Protein assay kit, Thermo Scientific). Les concentrations sont calculées en µg/mL à partir d'une gamme étalon de BSA (fournie dans le kit).

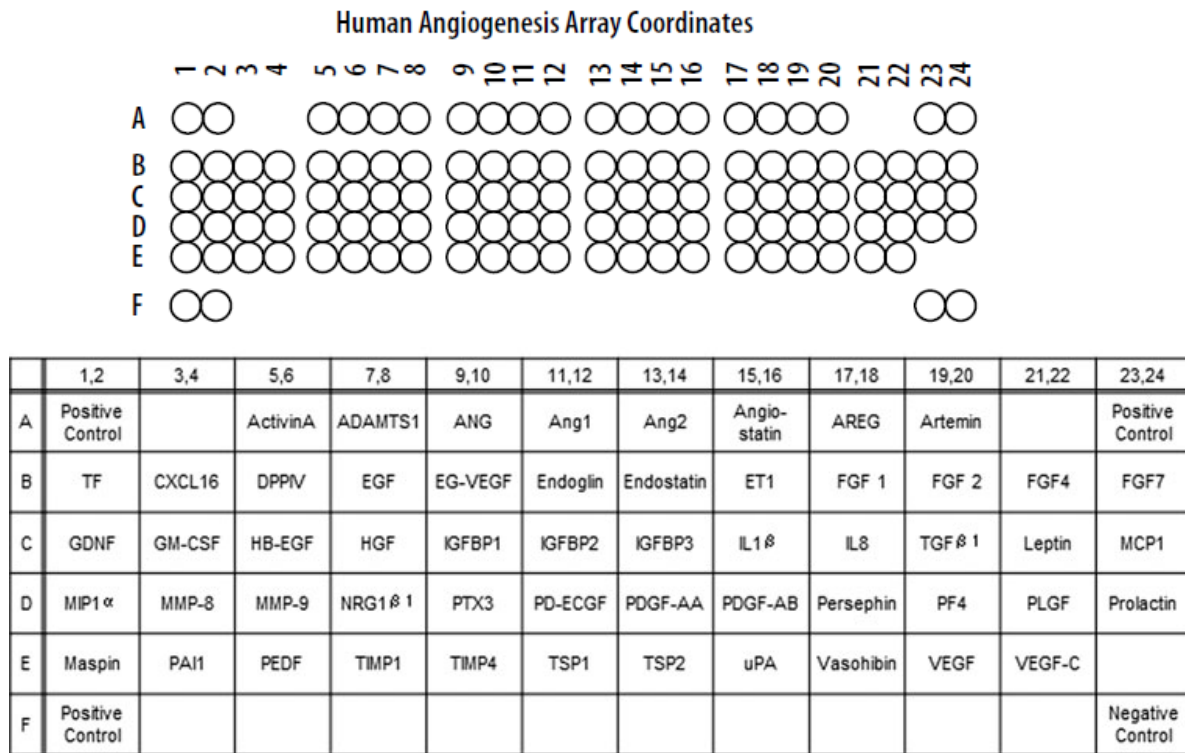
### 5.2. Analyse protéomique des filtrats et des TMVs par Proteome Profiler™ Array

#### 5.2.1. Principe

Le contenu protéique des filtrats et des TMVs est exploré grâce à une analyse protéomique par Proteome Profiler™ Array. Il s'agit d'une technique d'analyse rapide et semi-quantitative de l'expression des protéines reposant sur le principe de l'ELISA sur membrane et couplé à une technique de détection par chimiluminescence. Des anticorps spécifiques reconnaissant 55 protéines impliquées dans l'angiogenèse (Tableau 12) ont été fixés sur une membrane de nitrocellulose sous forme de spot, en duplicat par le fabricant. Parmi ces 55 facteurs, il y a des facteurs impliqués dans la prolifération de cellules endothéliales comme VEGF, IL-8, FGF, PDGF ; dans la migration cellulaire comme MMP-9, TIMP-1 ; dans l'angio-inhibition comme ADAMTS1 ; dans la réponse inflammatoire comme GM-CSF, IL-1 β [322].

Notre échantillon protéique est mélangé avec les anticorps de détection (anticorps biotinylés) et le tout est déposé sur la membrane. Après quelques lavages pour éliminer les protéines non liées, la streptavidine-HRP (*horseradish peroxidase*) et les réactifs de détection par chimiluminescence sont ajoutés. La lumière est émise par les spots où les protéines sont fixées et l'intensité lumineuse est proportionnelle au taux de protéines liées. Trois contrôles positifs et un contrôle négatif sont également répartis sur la membrane afin de tenir compte des liaisons non spécifiques.

Tableau 12 : Position des protéines sur la membrane détectées par le kit « Proteome Profiler™ Human Angiogenesis Array Kit » (ARY007, R&D System)



**5.2.2. Protocole**

Le kit « Proteome Profiler® Array » (ARY007, R&D Systems) a été utilisé conformément aux recommandations faites par le fabricant. Les sites de liaison non spécifique de la membrane de nitrocellulose ont été bloqués pendant 1 heure avec le tampon fourni par le kit. Dans le tampon de dilution, 1mg de protéines a été mélangé avec 15µL d’anticorps de détection biotinylés et laissé pendant 1 heure à température ambiante. Après élimination de la solution de blocage présente sur la membrane, le mélange échantillon/anticorps de détection est déposé sur la membrane et laissé en contact pendant une nuit à + 4 °C. Trois lavages sont réalisés avec le tampon de lavage fourni dans le kit. 2mL de streptavidine-HRP sont déposés pendant 30 minutes à température ambiante, suivi par trois lavages.

Pour la détection de la chimiluminescence, les membranes sont déposées sur le plateau de l’analyseur d’image luminescent (LAS3000, Fujifilm). 1mL de solution de révélation (0.5 mL de Chemi Reagent1 + 0.5mL de Chemi Reagent2) est déposé sur chaque membrane. Les spots sont révélés par une illumination de 5 minutes et le niveau de gris est déterminé pour chaque spot par le logiciel Multi Gauge V3.0 software (Science Lab, Fujifilm). Le niveau du bruit de

fond est soustrait pour chaque spot. Les protéines détectées sont identifiées à l'aide d'un film transparent représentant les coordonnées de chaque spot (figure x ci-dessous).

### 5.3. Analyse des récepteurs membranaires des cellules par Western-Blot

Le Western Blot est une méthode permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique. Les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodécylsulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) selon leurs tailles. Les protéines sont ensuite transférées du gel à une membrane de nitrocellulose puis incubées avec un anticorps spécifique de la protéine l'intérêt (anticorps primaire), l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore se fixe sur le 1<sup>er</sup> anticorps pour permettre la mise en évidence de la protéine par chimiluminescence.

Après l'extraction des protéines des cellules par tampon de lyse RIPA (Tableau 13), le dosage du contenu total en protéines dans le lysat est réalisé sur le principe de la méthode de Lowry à l'aide du kit *BCA<sup>®</sup> protein assay kit* (Thermo Scientific) et utilisé selon les recommandations fournies par le fabricant. Les concentrations sont calculées en µg/mL à partir d'une gamme étalon de BSA (fourni dans le kit).

Des gels de polyacrylamide sont préparés et montés sur le système d'électrophorèse (Mini-Protean<sup>®</sup>Tetra cell BioRad). Les échantillons sont mélangés avec du tampon de charge et dénaturés par chauffage à + 95 °C pendant 5 minutes. 25µg de protéines sont déposés dans chaque puits et 1 puits contenant du marqueur de taille (Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards dual color, Biorad), la migration est effectuée. Puis les gels sont déposés sur une membrane PVDF (0,45µm, Amersham) activée. L'ensemble est mis à transférer dans le système de transfert liquide (Transblot, BioRad). Après le blocage des liaisons non spécifiques des membranes par incubation dans le tampon de blocage, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires pendant 1 nuit à + 4 °C sous agitation. Après 3 lavages avec le tampon de lavage, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP pendant 1 heure à température ambiante sous agitation suivi de 3 lavages. La membrane est immergée dans la solution de substrat de révélation *SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate* (ThermoScientific) pendant 5 min. La révélation des bandes s'effectue par illumination des membranes pendant 5 minutes à l'aide de l'analyseur d'image luminescent (LAS3000, Fujifilm).



Tableau 13. Tampon de lyse pour l'extraction des protéines de cellules

Tampon de RIPA	+ Compléments
20 mM Tris-HCL pH 8 (Sigma)	Complete 1X: (Roche)
1 % TritonX-100(Sigma)	1% d'inhibiteurs de phosphatases (phosphatase inhibitor cocktail 1 et 2, Sigma-Aldrich)
200 mM NaCl(Sigma)	
1mM EDTA(Sigma)	PMSF (phenyl methane sulfonyl fluoride (Sigma)

Tableau 14. Liste des tampons utilisés pour le Western-blot

Tampon de charge 4X (laemmli)	8 % SDS, 10 % $\beta$ mercapto-éthanol, 30 % glycérol, 0,02 % bleu de bromophénol, Tris-HCl 0,25M
Tampon de migration	18,19 g Tris-Base, 3 g SDS, 86,95g Glycine, 3L eau pure
Tampon de transfert 10X	119,2 g Tris Base, 58,6 g glycine, 7,5 g SDS, 2L eau pure
Tampon de transfert 1X	100mL Tampon de transfert 10X, 200mL méthanol, 700mL ED 18M $\Omega$
Tampon de lavage 10X	36,3 g Tris-Base (500mM), 43,8 g NaCl, 500mL eau pure, Ajuster le pH à 7,5.
Tampon de lavage 1X	100mL tampon TBS 10X + 900mL eau pure
Tampon de blocage	1L de Tampon TBS 1mL de Tween20 (Sigma, France) 5 % lait écrémé (Régilait)

Tableau 15. Liste des anticorps avec leur dilution utilisés pour le western blot. Les anticorps sont dilués avec du tampon TBST + 5% de lait demi-écrémé

Anti-human VEGFR-2 (monoclonal)	Thermo Scientific	1/1000
Anti-human $\beta$ -tubulin (polyclonal)	Santa Cruz, TEBU,	1/1000
Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody	Santa Cruz, TEBU	1/1000

#### 5.4. Extraction et dosage des ARN totaux contenus dans les TMVs

L'isolation, la purification et le dosage des ARN totaux à partir des TMVs permet d'évaluer le changement de quantité des ARN entraîné par un traitement. Il s'agit de mettre au contact des TMVs avec un tampon de lyse qui permet de dissoudre les différents composants. Puis les protéines et les ADN sont éliminés, l'intégrité des ARN est tout maintenue.

L'extraction des ARN à partir des TMVs est réalisée par le RNeasy® Mini Kit (Qiagen). Ce kit a été utilisé aux recommandations faites par le fabricant, sauf que c'est adapté au protocole modifié [323] pour isoler tous les ARN (des ARN < 200 nucléotides compris). Les TMVs sont lysés et homogénéisés dans le tampon RLT plus contenant 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, l'homogénéat est transféré sur la colonne *gDNA eliminator spin column*, permettant d'éliminer l'ADN par centrifugation. Puis 3,5 volume d'éthanol 100% est ajouté et les échantillons sont transférés sur la colonne *RNeasy Minin spin column*. Après 2 lavages avec du tampon RPE (Qiagen), tous les ARN sont élués dans de l'eau Rnase Free. Le dosage des ARN est évalué avec le Nanodrop (Thermo Fischer Scientific).

#### 6. ANALYSES STATISTIQUES

La plupart des figures de résultats et les analyses statistiques sont réalisées par GraphPad Prism Software 5.0 (GraphPad Prism Inc). Pour l'ensemble des expérimentations, les résultats sont exprimés sous forme «moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM), à l'exception des expériences utilisant le système xCELLigence où la erreur standard à la moyenne n'est pas marqué.

Nos échantillons sont de petite taille :  $N \leq 20$ . De ce fait, nous avons utilisé des tests statistiques non-paramétriques. Pour l'ensemble de nos manipulations, nous avons travaillé sur des échantillons non appariés et nous avons utilisé le test U de Mann-Whitney pour comparer 2 groupes. Les valeurs de  $p < 0,05$  % ont été considérées comme statistiquement significatives.



**RESULTATS**

**ET**

**DISCUSSION**



## PARTIE 1 : EVALUATION DE LA REPOSE DES LIGNEES CELLULAIRES DE GLIOBLASTOME A L'IRRADIATION

Dans cette première partie, nous avons évalué l'effet de l'irradiation sur la prolifération et la mort des cellules de GBM. En radiobiologie, la mort cellulaire est définie comme la perte irréversible de sa capacité à se diviser. L'irradiation peut entraîner la mort des cellules selon 3 processus: l'apoptose, la sénescence ou la mort mitotique, qui contribuent de façon inégale à l'efficacité thérapeutique. Donc, dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de l'irradiation sur la capacité des cellules T98G, U87 et U373 à proliférer et à survivre après irradiation.

### 1. EFFET DE L'IRRADIATION SUR LA PROLIFERATION DES CELLULES DE GLIOBLASTOME

Nous avons commencé par observer la prolifération cellulaire après irradiation. Une analyse cinétique a été effectuée pour voir l'évolution de la prolifération cellulaire : 2h (H2), 8h (H8), 24h (H24) et 48h (H48) post-irradiation, le nombre de cellules vivantes dans la culture est déterminé par comptage cellulaire avec test d'exclusion au bleu trypan (Figure 53).

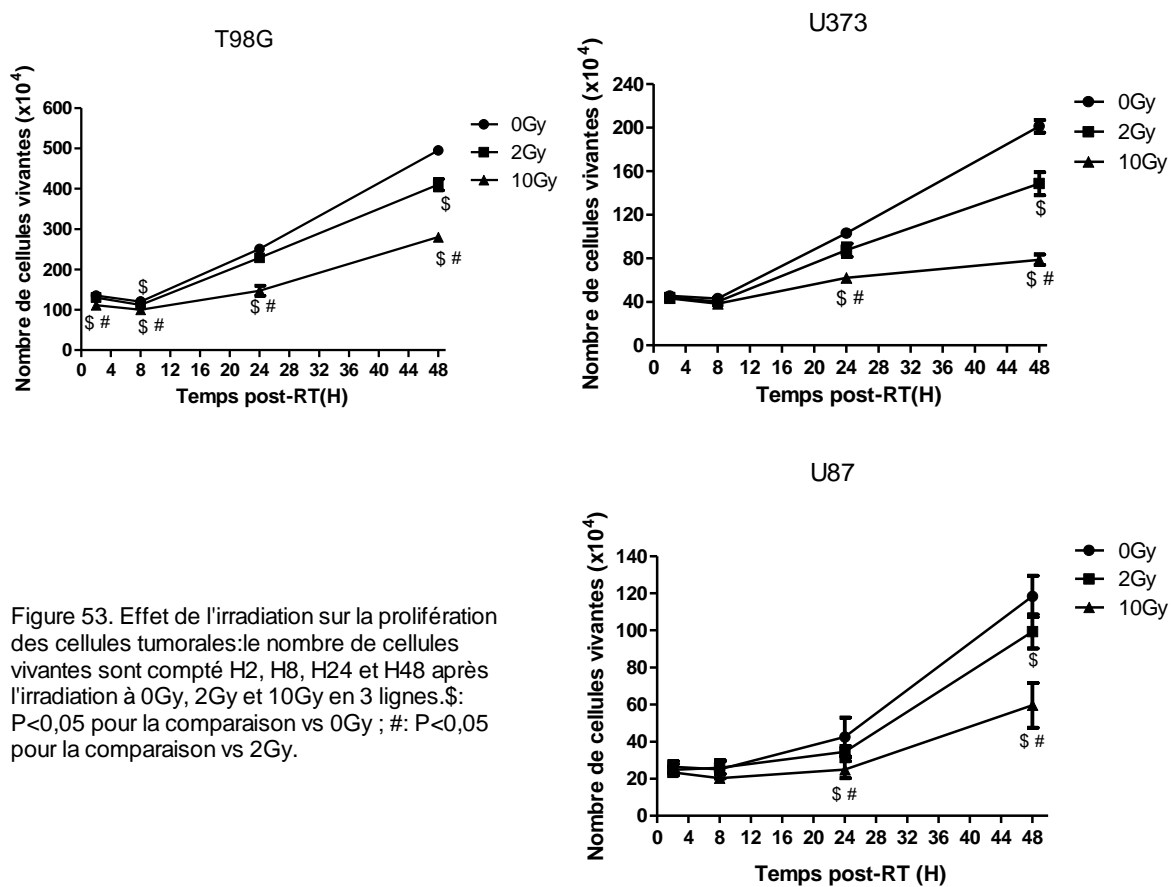


Figure 53. Effet de l'irradiation sur la prolifération des cellules tumorales: le nombre de cellules vivantes sont compté H2, H8, H24 et H48 après l'irradiation à 0Gy, 2Gy et 10Gy en 3 lignes. \$: P<0,05 pour la comparaison vs 0Gy ; #: P<0,05 pour la comparaison vs 2Gy.

Dans les 3 lignées, en l'absence d'irradiation (0Gy), on compte 2 à 2,5 fois plus de cellules vivantes à H24 par rapport à H2, pour atteindre presque 5 fois plus de cellules à H48, ce qui montre que les 3 lignées prolifèrent rapidement. Lorsque les cellules sont irradiées, quelles que soient la dose de rayonnement et la lignée, les cellules irradiées continuent à proliférer. Cependant, le taux de prolifération pour les 3 lignées est significativement réduit. En effet, 48 heures après irradiation à 2Gy, seulement 3 à 4 fois plus de cellules sont observées (par rapport à H2). Pour les cellules irradiées à 10Gy, le ralentissement de la prolifération est encore plus marqué puisque seulement 1,5 à 2 fois plus de cellules vivantes sont dénombrées à H48 par rapport à H2.

En normalisant les résultats obtenus après irradiation (2Gy ou 10Gy) par rapport au nombre de cellules vivantes comptées à 0 Gy (100%), on peut apprécier la proportion (en %) de perte cellulaire (Figure 54). Dès 2h post-radiothérapie (H2), une irradiation à 10 Gy entraîne une perte cellulaire de 20% pour la lignée T98G, alors qu'elle n'a pas d'effet significatif sur les cellules U87. Une réduction du nombre de cellules vivantes de 20% est observée après une irradiation à la dose de 10Gy dans 2 lignées à H8. A H24, une réduction de 20% à 2Gy et 40% à 10Gy sont observées dans les 2 lignées, et cette réduction est encore plus remarquable à H48 (à peu près 50%). Le *ratio* du nombre de cellules vivantes après irradiation par rapport aux cellules non irradiées diminue avec le temps.

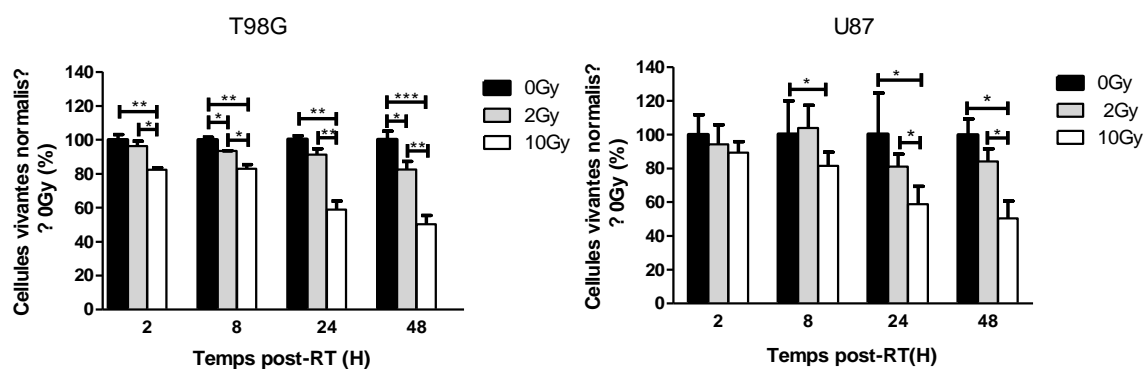


Figure 54. Pourcentage de cellules vivantes normalisé à 0Gy (correspondant à 100%) après irradiation. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ )

Nos résultats montrent que, pour les 3 lignées étudiées, l'irradiation peut significativement ralentir la prolifération cellulaire.

## 2. EFFET DE L'IRRADIATION SUR LA MORT CELLULAIRE RADIO-INDUITE

### 2.1. Evaluation de l'apoptose radio-induite

Pour compléter, nous avons évalué la mort cellulaire immédiate par apoptose après irradiation grâce à l'analyse par cytométrie en flux, des cellules marquées à l'Annexine V-FITC. Les cellules nécrotiques, quant à elles, sont marquées par l'Annexine V-FITC et l'Iodure de Propidium (PI).

Comme présenté sur la figure 55, on peut distinguer les cellules non marquées (Annexine V<sup>-</sup>/PI) qui sont des cellules vivantes, les cellules marquées Annexine V<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> considérées comme des débris nucléaires. Les cellules marquées Annexine V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> sont les cellules qui entrent dans la phase précoce de l'apoptose, et les cellules marquées Annexine V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> sont considérées comme des cellules entrant dans la phase tardive d'apoptose et/ou des cellules nécrotiques.

48 heures après irradiation, la viabilité cellulaire pour les 2 lignées de GBM étudiées est légèrement modifiée lorsque les cellules reçoivent 10 Gy (perte d'environ 3%). Le taux d'apoptose n'est pas modifié après 2 Gy. Il passe de 2,0% à 2,8% pour les cellules T98G et de 1,2% à 2,3% pour les cellules U87 après l'irradiation à 10 Gy. Cependant, ces modifications ne sont pas significatives.

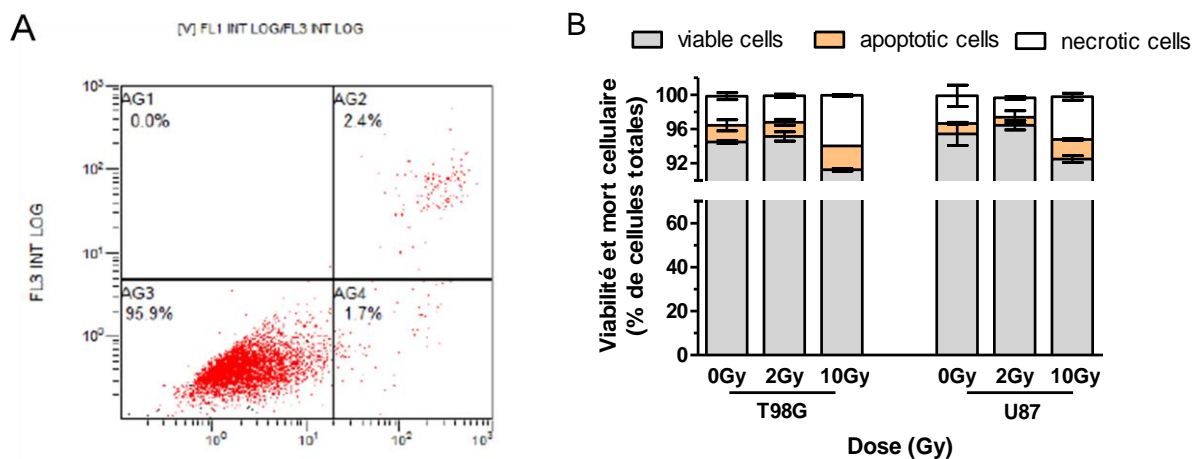


Figure 55. Evaluation de la mort cellulaire par apoptose après irradiation. A. Analyse par cytométrie en flux des cellules marquées à l'Annexine V et à l'iodure de propidium. Fenêtre AG1 : débris nucléaires ; AG2 : cellules dans la phase tardive de l'apoptose et/ou nécrose; AG3 : cellules viables; AG4 : cellules dans la phase précoce de l'apoptose. B. Les résultats sont exprimés en % moyen  $\pm$  SEM par rapport à la population totale

L'irradiation n'altère que très peu la viabilité cellulaire dans les premières heures après traitement, et dans les 2 lignées, l'apoptose radio-induite reste donc très faible.



## 2.2. Evaluation de la mort mitotique radio-induite

Parallèlement, nous avons analysé par essais clonogéniques en double couche d'agar, la capacité clonogénique des cellules de glioblastome après irradiation, permettant ainsi d'apprécier la mort mitotique radio-induite. Nos résultats montrent une inhibition (20%) de la formation de colonies lorsque les 2 lignées sont irradiées à 2Gy ( $p = 0.0071$ ), et cette inhibition atteint 65% après une dose de 6Gy dans les U87 et 90% dans les T98G avec la dose de 10Gy ( $p < 0.0001$ ) (Figure 56).

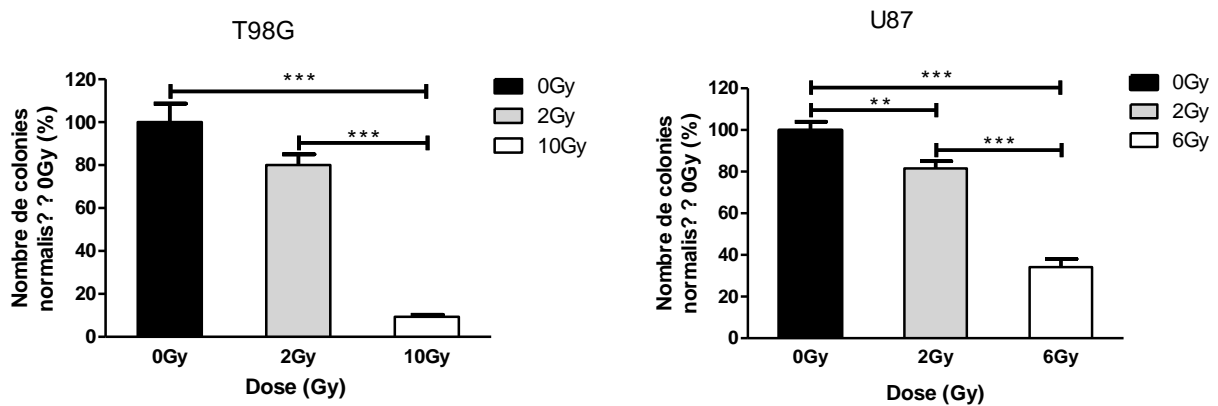


Figure 56. Evaluation de la mort mitotique des cellules de glioblastome induite par l'irradiation. Les cellules ont été irradiées à 0, 2 et 6Gy/10Gy, l'essai de la formation de colonies sur Soft Agar a été effectué en utilisant des plaques six puits. Les colonies ont été comptées et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ )

## 3. DISCUSSION

Les 2 lignées de GBM montrent une sensibilité similaire à l'irradiation. L'irradiation à 2 ou 10Gy a considérablement ralenti la prolifération des cellules de glioblastome pendant les premières 48 heures post-traitement. Nos résultats sont cohérents avec les résultats de Pezuk et al. [4]. Après la trypsination des cellules irradiées à 2Gy et la remise en culture pendant 7 jours, cette équipe a montré que l'irradiation induit une réduction de la prolifération des cellules T98G (10%) et U87 (50%) ; quand la dose est augmentée à 6Gy, une inhibition encore plus remarquable (60-70% dans les 2 lignées) est observée.

L'irradiation n'induit pas d'apoptose dans nos 2 lignées, ce qui est cohérent avec les résultats d'une autre étude qui utilise les mêmes lignées et analyse l'apoptose et la nécrose 24h, 48h et 72h après une irradiation à 10Gy [324].

L'irradiation des cellules T98G et U87 semble plutôt conduire à une mort mitotique, c'est-à-dire à une mort cellulaire après une ou plusieurs divisions cellulaires, mise en évidence à l'aide des essais clonogéniques. Les mêmes résultats ont été rapportés dans la littérature. Différentes études ont montré que l'irradiation induit une altération de la survie clonogénique des T98G

[324, 325] et des U87 [326] de façon dose-dépendante. Pezuk et al. ont montré que la capacité clonogénique des T98G était largement diminuée (80%) après une irradiation à 2Gy [4].

Globalement, nos résultats montrent que l'irradiation par rayons X provoque un ralentissement de la prolifération associé à une perte significative des capacités clonogéniques des cellules tumorales U87 et T98G [327].

## **PARTIE 2 : INFLUENCE DES MILIEUX CONDITIONNES OBTENUS APRES IRRADIATION SUR LE COMPORTEMENT CELLULAIRE.**

De la même manière que la croissance des cellules tumorales a été ralentie après l'irradiation, le traitement peut également modifier les capacités sécrétoires des cellules de glioblastome et donc modifier les substances libérées par les cellules irradiées dans leur milieu de culture, généralement désigné sous le nom de «milieu conditionné» (CM pour *Conditioned Media*). Le CM récupéré après irradiation des cellules pourrait interagir avec les cellules non irradiées avoisinantes [328]. C'est pourquoi, nous avons comparé l'impact des CM, avec ou sans irradiation, sur les cellules endothéliales environnantes : nous avons évalué l'influence des CM sur la survie / prolifération et la migration des cellules HUVEC.

### **1. SUIVI DE LA PROLIFERATION ET DE LA SURVIE DES HUVEC SOUMISES AUX MILIEUX CONDITIONNES DES CELLULES TUMORALES**

Pour étudier l'effet sur le comportement global des cellules HUVEC, nous avons utilisé une nouvelle technique : le système *Real-Time Cell Analyzer* (RTCA, xCELLigence SP system, ACEA Biosciences, USA), qui peut réaliser une analyse en temps réel de la croissance cellulaire sur la base de mesures d'impédance. En effet, ce système enregistre en continu des signaux d'impédance (résistance au passage d'un courant électrique provoquée par les cellules), appelé Cell Index (CI), et fournit des informations dynamiques relatives à la prolifération cellulaire et au nombre de cellules, mais aussi à la morphologie et à l'adhérence cellulaire.

#### **1.1. Optimisation de la technique RTCA pour les HUVEC**

##### ***1.1.1. Détermination de la concentration de cellules à ensemercer***

La première étape nécessaire est la détermination de la concentration de cellules à ensemercer pour permettre un suivi de la croissance cellulaire pendant une semaine. Les cellules HUVEC sont ensemençées dans des plaques 96 puits de type E-Plate 96 à différentes concentrations:  $2,5 \cdot 10^3/\text{ml}$  ;  $5 \cdot 10^3/\text{ml}$  ;  $7,5 \cdot 10^3/\text{ml}$  ;  $1 \cdot 10^4/\text{ml}$  et  $2 \cdot 10^4$  cellules/ml et l'acquisition de l'impédance est effectuée toutes les 15 minutes pendant 5 à 7 jours.

Pour les HUVEC (Figure 57), après une phase d'adhésion courte, les cellules entrent dans la phase de latence et le CI augmente doucement, puis le CI augmente rapidement car les cellules entrent dans la phase de croissance exponentielle. 72h après ensemençement, nous avons effectué un changement du milieu : la plaque E-Plate 96 est sortie de l'incubateur et le milieu est remplacé par du milieu frais. Après avoir remis la plaque à l'incubateur sur son support,

l'acquisition des données se poursuit. C'est pourquoi, nous avons observé une perte de CI à 72h. Les cellules continuent à proliférer et le CI augmente avec le temps. Quand les cellules arrivent à confluence, le profil atteint un plateau, puis le profil commence à descendre car les cellules commencent à mourir et à se détacher.

Au bout de 24h, le profil de prolifération des HUVEC à la concentration de  $2 \cdot 10^4$  cellules/ml entre dans la phase de croissance avec un CI de 0,5, puis le CI augmente jusqu'à atteindre un plateau vers 120h à 2,7 (soit 5 jours post-ensemencement). Pour les autres concentrations, l'entrée dans la phase de croissance est plus tardive et le CI au plateau reste inférieur à 1,5. Donc, la concentration de  $2 \cdot 10^4$  cellules/ml apparaît être la plus appropriée pour les HUVEC.

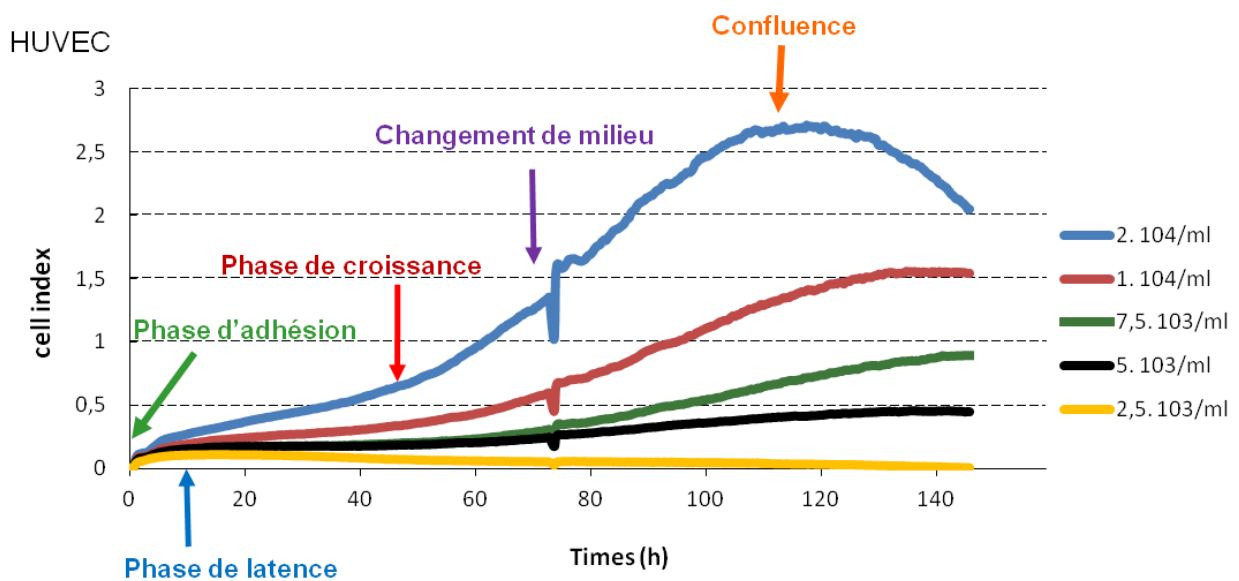


Figure 57. Détermination de la concentration de cellules HUVEC à ensemercer sur E-Plate 96. L'axe des abscisses représente le temps d'acquisition de l'impédance, l'axe vertical représente l'indice cellulaire (CI)

### 1.1.2. La normalisation des profils de croissance

Dans un essai préliminaire, nous avons mis en culture des cellules dans le système xCELLigence pendant 24h, puis nous avons sorti la plaque pour exposer les cellules à 2 traitements différents (Figure 58 *haut*, flèche violette), qui donnent ensuite 2 profils différents de croissance cellulaire : le profil 1 est au-dessus du profil 2, ce qui suggère que les cellules soumises à ce traitement prolifèrent plus vite que l'autre traitement. Cependant, il est à noter qu'au moment de la reprise de l'acquisition de l'impédance après l'introduction du traitement (Figure 58 *haut*, flèche verte), le signal CI n'est pas identique dans les 2 conditions, le CI du profil 1 se trouvant au-dessus de celui du profil 2. Donc une question a été posée : la différence entre les profils reflète-t-elle vraiment une différence d'effets entre les 2 traitements ? D'après

la littérature, la plupart des études ont réalisé une normalisation du CI au moment de l'introduction du traitement dans la culture [329–331] pour que tous les profils aient le même point de départ. Par conséquent, il est possible de comparer vraiment l'effet de différents traitements. Donc, au début de traitement (Figure 58 *bas*, flèche rouge), nous avons effectué une normalisation, et les 2 profils sont partis du même point de référence (CI égal à 1). Puis, toutes les autres valeurs de CI enregistrées sont normalisées automatiquement par rapport à ce point (*Normalized Cell Index*). Après normalisation, nous pouvons observer que les 2 profils sont superposés pendant 48h puis sont ensuite bien séparés. L'ordre des profils est aussi modifié le profil 2 est au-dessus de profil 1, contrairement au résultat sans normalisation.

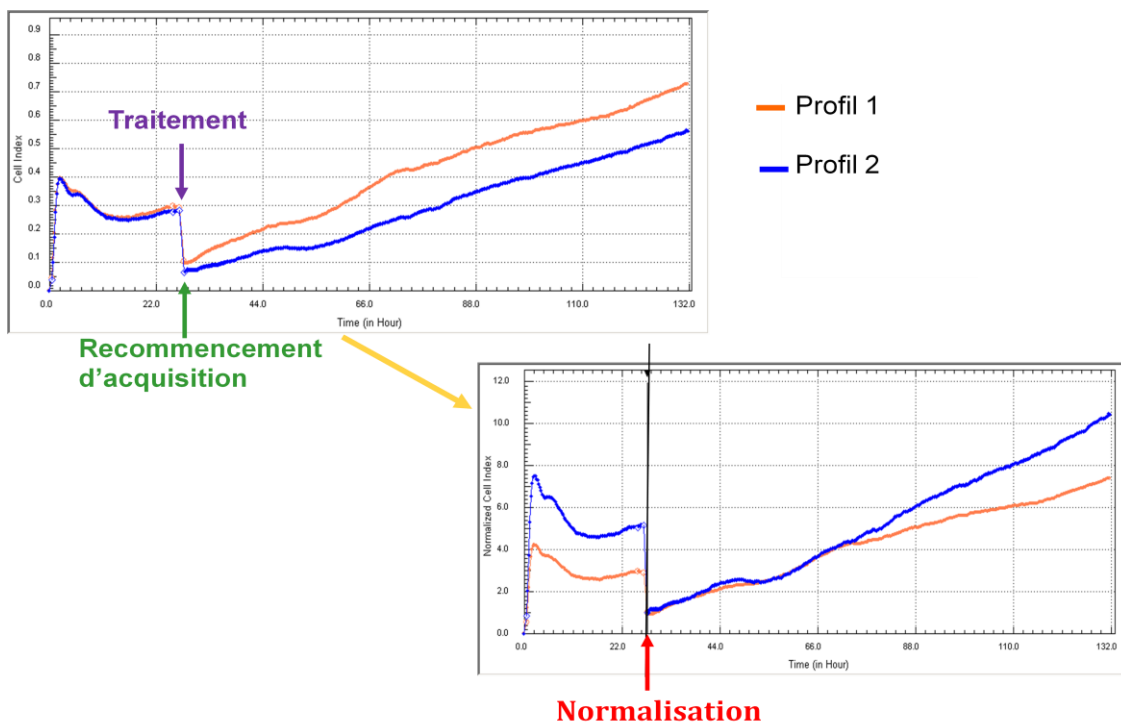


Figure 58. Normalisation des profils de croissance cellulaire. Haut, profils de croissance non-normalisés ; Bas, profils normalisés au moment de traitement

### 1.1.3. Le choix des conditions de culture de référence pour les HUVEC

Notre objectif est d'évaluer l'impact des milieux conditionnés récupérés à partir de cellules de GBM irradiées ou non irradiées. Ces milieux conditionnés seront donc composés de DMEM/SVFD enrichis en substances libérées par les cellules tumorales irradiées ou non. Comme «référence» dans notre étude, nous choisirons donc les cellules HUVEC cultivées dans du milieu DMEM/SVFD. Nous évaluons donc au préalable, l'impact d'un tel milieu sur la croissance des HUVEC dans des E-Plate 96, comparativement à la croissance des HUVEC cultivées en milieu commercial (EndoGRO™-LS Complete Media Kit) favorable (Figure 59).

Lorsque les HUVEC sont ensemencées dans un milieu de culture favorable (courbe verte), les cellules HUVEC prolifèrent rapidement, avec une CI normalisée atteignant 20. Le profil enregistré pour les HUVEC cultivés dans du DMEM/SVFD est évidemment différent. Le CI a légèrement augmenté au cours des 8 premières heures après l'addition de milieu DMEM/SVFD frais, puis, a diminué jusqu'à zéro. Ce profil traduit : (i) une première phase caractérisée par des changements morphologiques et des modifications des capacités d'adhésion des cellules ; (ii) une seconde phase de mort cellulaire progressive et de détachement (entre 10h et 120h).

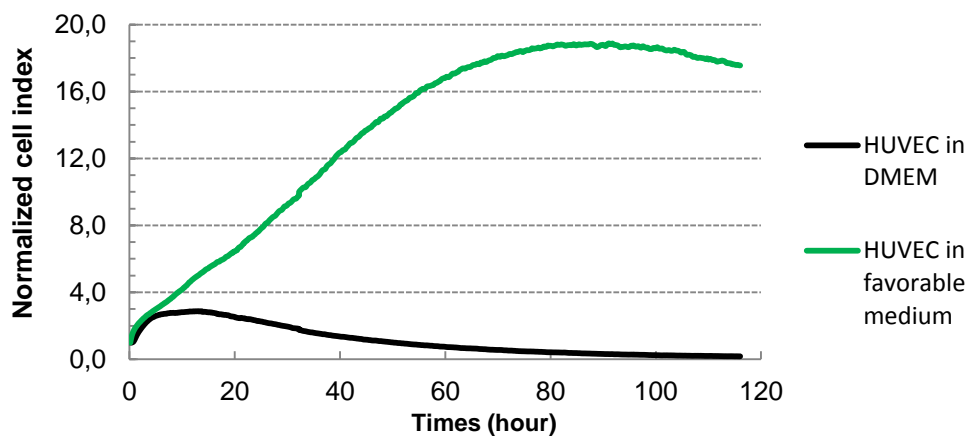


Figure 59. Courbes de croissance des HUVEC ensemencées dans deux milieux différents. Acquisition avec le système xCELLigence pendant 120h. Le point de départ est le moment de la normalisation à la valeur 1. Courbe verte : HUVEC ensemencées dans un milieu de culture favorable. Courbe noire : HUVEC cultivées dans du DMEM/SVFD

Ce comportement servira de référence pour la suite de nos expérimentations et sera désigné par "Ctrl HUVEC".

## 1.2. Effet des milieux conditionnés des cellules tumorales après irradiation sur le comportement des HUVEC

Les CM des 2 lignées tumorales ont été recueillis aux temps H2 (effet immédiat) et H48 (effets retardés) après une irradiation à 10Gy, puis ajoutés dans les puits contenant des cellules HUVEC.

La figure 60 présente les résultats obtenus avec les CM récupérés à H2.

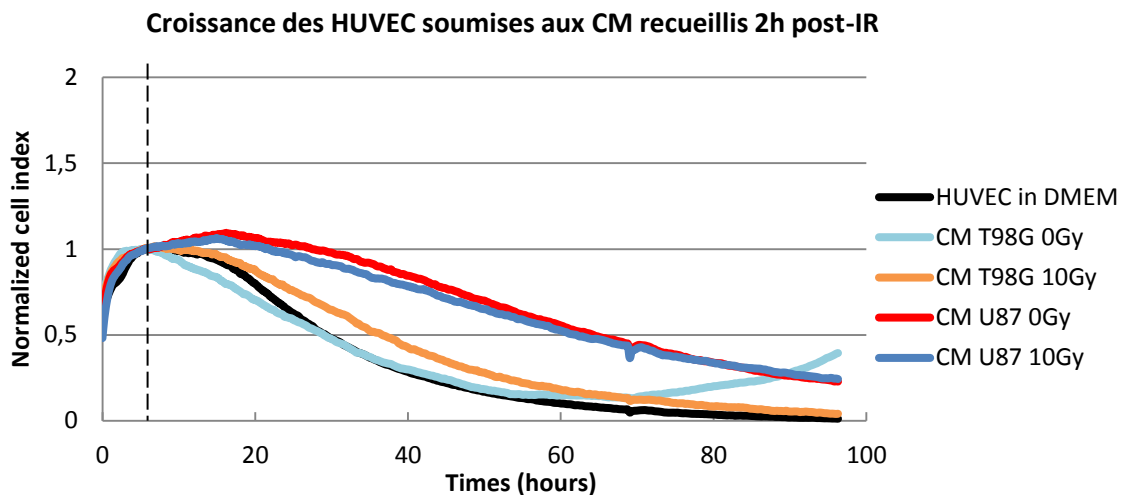


Figure 60. Effet des CM recueillis 2h post-irradiation provenant de la culture de cellules T98G ou U87 sur le comportement global (prolifération, adhésion, et prolifération/survie cellulaires) de cellules HUVEC. L'axe des abscisses représente le temps d'acquisition de l'impédance, l'axe vertical représente CI normalisé. Le point de départ est le moment de traitement, CI est normalisé à 1

Les courbes de CI obtenues avec les CM des T98G (non-irradiés ou irradiés à 10Gy) sont bien superposées aux courbes de «Ctrl HUVEC», indiquant que le CM des T98G non-irradiés ou irradiés n'a aucun effet sur le comportement global des HUVEC (Figure 60). Concernant le CM de U87, les courbes de CI sont légèrement différentes par rapport à celles du "Ctrl HUVEC", montrant une baisse légèrement plus lente. Cependant, ces résultats ne témoignent pas de modifications majeures du comportement des HUVEC.

Ces résultats signifient qu'à terme court (H2), l'irradiation des 2 lignées n'a pas permis de modifier de façon suffisante la composition des CM pour modifier en retour le comportement des HUVEC.

Nous avons répété la même manipulation en récupérant les CM des cellules T98G et U87 48h après irradiation (H48) (Figure 61). Lorsque les cellules HUVEC ont été exposés aux CM provenant des T98G non-irradiés ou irradiés à 10Gy, le CI a été maintenu aux alentours de 1, indiquant que ces CM sont capables d'empêcher la mort des cellules HUVEC et leur détachement. De plus, les CM récupérés à partir de U87 non irradiés ou de U87 irradiés à 10Gy ont conduit à une augmentation légère mais continue jusqu'à 120h du CI des HUVEC, celui-ci atteignant ~ 2 au final, avec un léger avantage pour les U87 irradiés. De tels profils sont concordants avec une légère stimulation de la prolifération des cellules HUVEC par les CM des cellules U87.

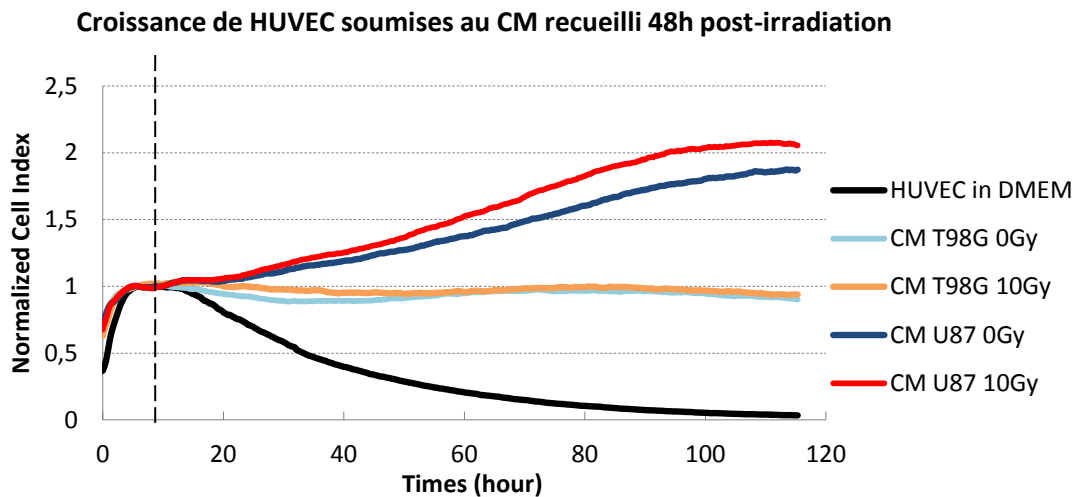


Figure 61. Suivi du comportement global des HUVEC exposées aux CM récupérés des T98G ou U87 à H48. Chaque point est la valeur moyenne de 8 valeurs issues de 2 expériences indépendantes. Les signaux d'impédance ont été enregistrés pendant 120h

L'ensemble de ces résultats montrent qu'au cours des 48h de culture post-irradiation (ou sham-irradiation), le milieu de culture des cellules tumorales s'est enrichi en substances capables d'empêcher la mort des cellules HUVEC, voire de stimuler légèrement leur croissance.

## 2. EFFET DES MILIEUX CONDITIONNES SUR LES CAPACITES DE MIGRATION DES HUVEC

D'un autre côté, nous avons étudié l'effet des CM sur les capacités de migration des cellules endothéliales grâce à la mise en œuvre d'un test de blessure (*Wound-Healing Assay*).

24 heures après leur mise en culture dans du milieu EndoGRO™-LS, les cellules HUVEC forment un tapis cellulaire que l'on « blesse » par grattage pour obtenir une zone acellulaire. Le milieu de culture EndoGRO™-LS des HUVEC est alors remplacé par du DMEM/SVFD comme référence (Ctrl HUVEC), ou par les CM récupérés des T98G et U87 non-irradiés et irradiés. Les cellules endothéliales ont tendance à recouvrir la zone acellulaire par migration centripète à partir des 2 bords de la blessure.

Les capacités de migration des HUVEC ont été évaluées par mesure de la distance moyenne ( $\mu\text{m}$ ) parcourue par les cellules endothéliales. Dans le Ctrl HUVEC, les cellules endothéliales qui se retrouvent au contact de DMEM/SVFD, recouvrent au bout de 18h environ 65% de la distance de la blessure.



Par rapport au Ctrl HUVEC, le CM récupéré à partir des cellules de glioblastome non irradiés (0 Gy) a montré un effet anti-migratoire important et significatif, car la distance de migration a été réduite d'environ 30%. Plus intéressant, lorsque les cellules HUVEC ont été exposées aux CM des T98G irradiés à 10Gy, la migration des HUVEC a été partiellement mais significativement restaurée ( $p = 0.0012$ ). Dans le cas des U87 irradiés, on retrouve un effet anti-migratoire significatif des CM, et l'irradiation n'apporte aucun changement (Figure 62).

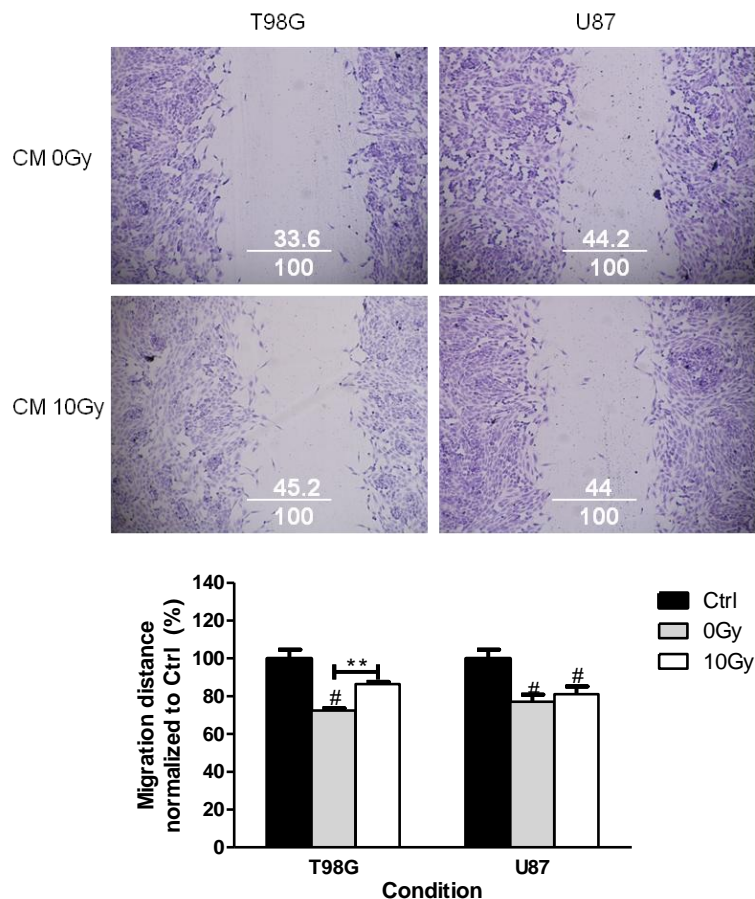
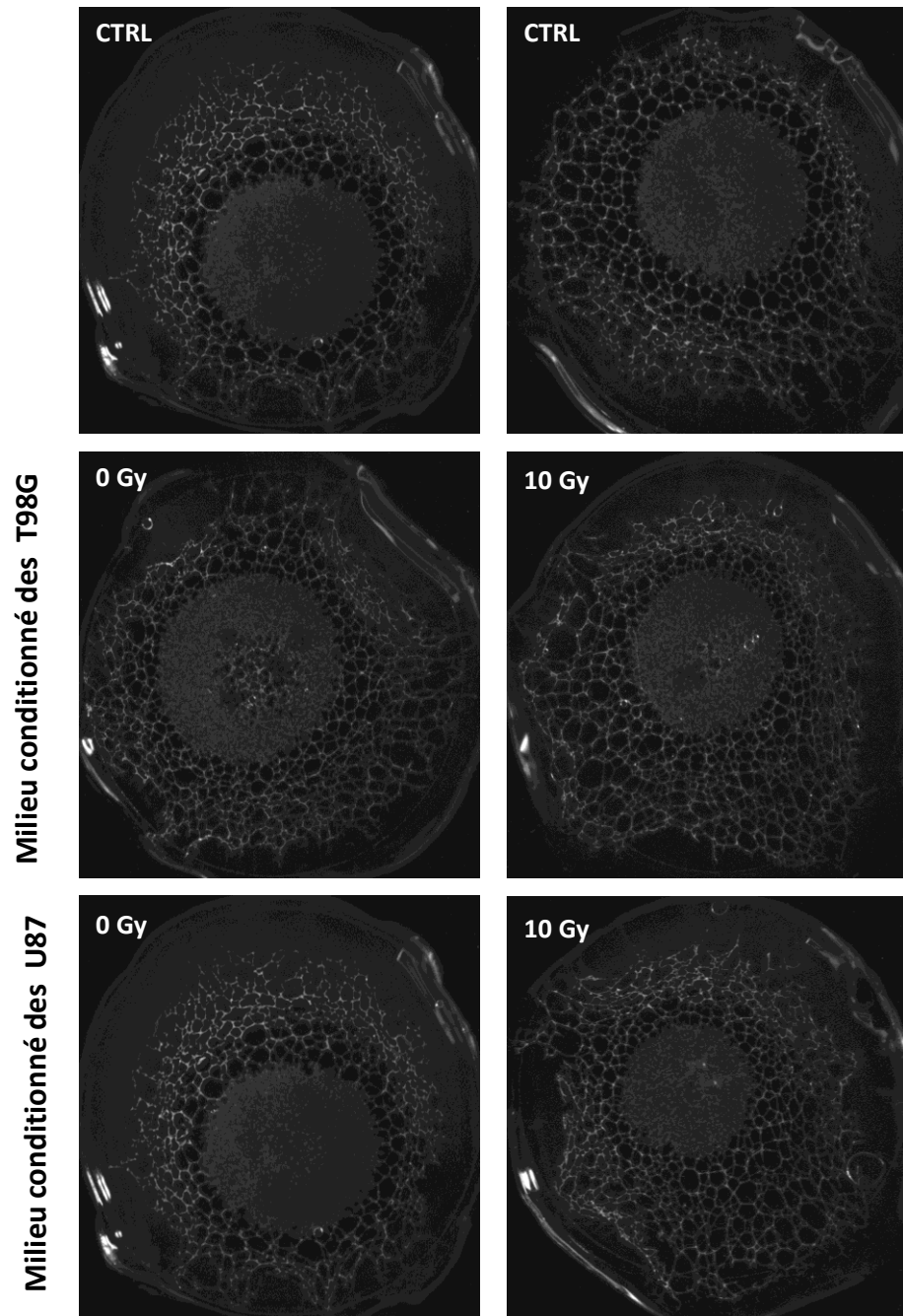


Figure 62. Evaluation de la capacité de migration des cellules endothéliales par le test de blessure. *Haut*, Images représentatives de tests de blessure où les résultats chiffrés correspondent au pourcentage de recouvrement de la blessure. *Bas*, Distance de migration normalisée par rapport au Ctrl HUVEC (100%). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ) (# :  $p \leq 0,05$  indique une différence significative par rapport au Ctrl HUVEC)

### 3. EFFET DES MILIEUX CONDITIONNES SUR LES CAPACITES DES HUVEC A S'ORGANISER EN TUBULES

Après avoir étudié l'effet des milieux conditionnés sur la prolifération/survie et la migration des HUVEC, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur une autre étape importante de l'angiogenèse: la morphogenèse, c'est-à-dire la capacité des HUVEC à s'organiser en microtubules. Pour permettre la formation d'un réseau de tubes pseudo-capillaires, les HUVEC sontensemencés sur une matrice (Matrigel), et exposés aux milieux conditionnés provenant des T98G et U87.

Figure 63. Effets des milieux conditionnés sur la formation des tubes pseudo-capillaires *in vitro*. Les cellules HUVEC ont été cultivées sur une matrice en présence de milieux contrôles ou de milieux conditionnés par les cellules tumorales irradiées ou non-irradiées. Les réseaux capillaires formés au bout de 24 heures sont mis en évidence par marquage avec la phalloïdine-sulforhodamine fixé sur les filaments d'actine cellulaire et observés en microscopie de fluorescence



Comme nous pouvons l'observer sur les images de microscopie de fluorescence (Figure 63), quelle que soit la condition expérimentale considérée, des réseaux de tubes pseudo-capillaires se forment de façon équivalente. Les milieux conditionnés issus des cellules irradiées ou non-irradiées n'ont pas modifié la capacité des HUVEC à s'organiser en tubules.

#### 4. DISCUSSION

Alors que la radiothérapie provoque un ralentissement de la prolifération cellulaire et la perte des capacités clonogéniques des cellules tumorales, les cellules irradiées survivantes peuvent dans les premières heures après l'irradiation, initier l'échange de signaux de cellules à cellules. Contrairement aux effets *bystander* radio-induits (c'est-à-dire les échanges de signaux entre les cellules tumorales irradiées et des cellules tumorales non irradiées) qui ont été largement étudiés [332], la communication entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales dans la tumeur après irradiation a été moins souvent rapportée.

Les cellules tumorales irradiées semblent pouvoir stimuler l'angiogénèse. *In vitro*, les effets pro- ou anti-angiogéniques ont été étudiés grâce à la mise en œuvre de différents tests complémentaires.

En effet, l'angiogénèse se décompose en plusieurs étapes, incluant la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales sous forme d'un bourgeon capillaire et enfin la morphogénèse capillaire [277]. Chacune de ces étapes peut être mise en évidence par différentes techniques *in vitro* et *in vivo* [270]. Nous avons réalisé différentes expérimentations en lien avec chacune de ces étapes *in vitro*.

Le Real Time Cell Analyzer (RTCA, xCELLigence system) est une technique récemment développée. Basée sur des mesures d'impédance cellulaire, elle donne des informations représentatives de la prolifération, la morphologie et l'adhésion cellulaire. L'avantage de cette technique est d'être non-invasive et de permettre une observation au long court de la prolifération cellulaire. Une augmentation constante de l'impédance (CI) sur une longue période reflète la prolifération cellulaire alors qu'une diminution au fil du temps peut être considérée comme un signe de cytotoxicité avec des cellules qui se détachent quand elles meurent [331, 333]. Ainsi, dans notre étude, le suivi temps réel du comportement des cellules HUVEC a confirmé que les milieux conditionnés des cellules de glioblastome irradiées et non irradiées (0 Gy) permettaient *a minima* de maintenir la survie des cellules HUVEC, et dans certains cas, peut-être même de favoriser légèrement la prolifération de ces cellules. Cependant, nos résultats suggèrent que l'irradiation n'a pas d'impact majeur sur la prolifération des HUVEC *via* les milieux conditionnés.

Contrairement à nos observations, une étude antérieure a montré que les CM issus de cellules de glioblastome sans traitement augmentait significativement (20-30%) la prolifération des deux lignées de cellules HUVEC et HTG06 CH14 [334]. Chen et al. ont montré que les CM des cellules du cancer de poumon irradiées à 5Gy stimulaient la prolifération des HUVEC (30%) par

rapport au CM des cellules non-irradiées [161]. Han et al. ont rapporté des résultats similaires avec les CM de cellules de cancer du sein irradiées à 6Gy [335].

Concernant la capacité des HUVEC à se structurer en réseau pseudo-capillaire, Maddirela et al. ont récemment montré une augmentation de la formation des microtubules *in vitro* en Matrigel et *in vivo* chez la souris, à partir de cellules endothéliales traitées avec des CM (récupéré à H12-H16) issus de cellules de gliomes irradiés à 8Gy [158]. Ces résultats corroborent des résultats antérieurs rapportant une stimulation (3 fois) de la formation des microtubules *in vitro* en utilisant le milieu conditionné provenant de cellules tumorales irradiées à 10Gy (récupéré à H24) [157]. Récemment, Kim et al. ont publié des résultats similaires en utilisant les lignées U87 et U373 irradiées à simple dose de 6Gy ou de façon fractionnée (2Gy x 3) [160]. Malgré les effets des CM observés dans notre étude sur la prolifération et la migration des HUVECs, nous n'avons pas observé d'impact sur la morphogénèse *in vitro*, indiquant que les contenus des milieux conditionnés ne sont pas suffisants pour favoriser la morphogénèse capillaire. La discordance de nos résultats avec les données de la littérature pourrait être liée à la chronologie expérimentale choisie, car nous avons récupéré les milieux conditionnés à H48, ce qui est plus long que le temps classiquement utilisé dans la littérature.

Plus intéressant, notre étude montre que seule la capacité de migration des cellules HUVEC a été affectée de façon significative par les CM obtenus après irradiation des cellules tumorales. Ces observations sont concordantes avec les travaux publiés par 2 équipes menés sur des cellules du cancer du sein irradiées. Yu et al. ont montré que le CM de cellules du cancer du sein entrées en sénescence après irradiation, a favorisé la migration et l'invasion des HUVEC [336]. Han et al. ont observé que la migration et l'invasion des HUVEC, sont renforcées quand les cellules tumorales sont irradiées [335]. Par ailleurs, Yu et al. ont montré en utilisant un modèle de membrane chorioallantoïde de poulet, que le CM des cellules tumorales irradiées favorisait l'angiogénèse [336].

Pour conclure sur cette partie du travail, nos observations confirment que l'irradiation, en plus de modifier la survie et la prolifération des cellules de GBM directement touchées par les radiations ionisantes, peut modifier le comportement global ou les capacités de migration de cellules endothéliales situées au voisinage, non soumises à l'irradiation. Il reste à déterminer la façon dont l'irradiation peut affecter les échanges de signaux entre ces deux populations cellulaires. D'après la littérature, outre des facteurs solubles, les GBM peuvent aussi sécréter des microvésicules tumorales, dont le rôle a déjà été démontré dans la communication intercellulaire

[204]. La suite de notre travail va consister à objectiver la libération de microvésicules tumorales dans nos conditions et à déterminer leur importance relative par rapport à celle des facteurs solubles sécrétés.

## **PARTIE 3 : INFLUENCE DE L'IRRADIATION SUR LA LIBERATION DE MICROVESICULES TUMORALES (TMVs) PAR LES CELLULES DE GLIOBLASTOME**

Alors qu'il est bien connu que les cellules soumises à un stress peuvent sécréter des facteurs solubles dans leur milieu conditionné, des travaux plus récents ont montré qu'elles pouvaient également libérer des microvésicules. Par conséquent, nous avons choisi d'analyser la libération de TMVs après irradiation dans notre étude.

### **1. MISE EN EVIDENCE DE LA PRESENCE DE MICROVESICULES TUMORALES DANS LES MILIEUX CONDITIONNES ISSUS DES CELLULES TUMORALES**

#### **1.1. Observation des microvésicules tumorales à la surface des cellules tumorales**

Des analyses en microscopie électronique à balayage ont été réalisées pour observer les TMVs adhérentes à la surface cellulaire. Comme on s'y attendait, les cellules U87 non-irradiées montrent une structure en étoile (Figure 64A) recouverte de vésicules arrondies de tailles différentes (Figure 64C). Les cellules T98G semblent plus aplaties, et des vésicules arrondies similaires ont été observées sur la membrane cellulaire (Figure 64B, D).

Après irradiation, plusieurs grappes de vésicules apparaissent à la surface de la membrane cellulaire (Fig. 64E, F), avec notamment une augmentation massive de leur nombre sur la surface des cellules T98G.

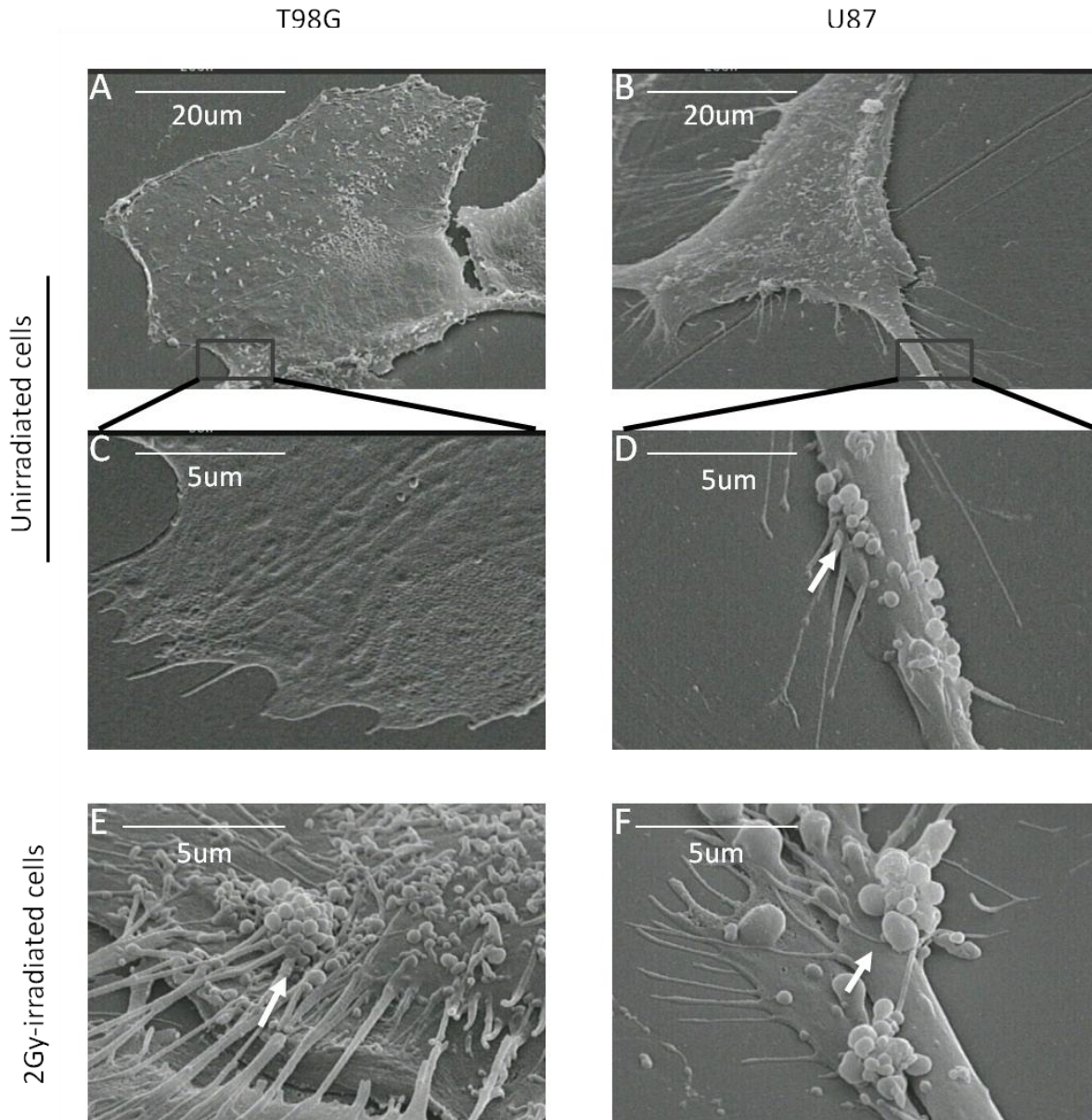


Figure 64. Observation par microscopie électronique à balayage de vésicules à la surface des cellules de glioblastome T98G (A, C, E) et U87 (B, D, F). Avant (A, C, et B, D) ou après (E, F) la radiothérapie, les cellules tumorales sont observées. Les images montrent la structure des cellules et de petites vésicules de différentes tailles dans une ramification du corps de la cellule

## 1.2. Mise en évidence des microvésicules tumorales dans les milieux conditionnés issus des cellules tumorales

### 1.2.1. Détermination par Dynamic Light Scattering de la taille des microvésicules tumorales

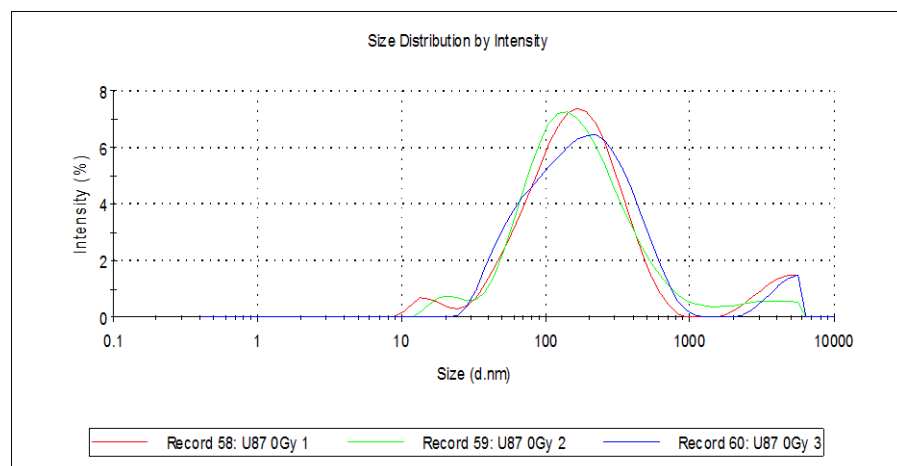
Pour objectiver la présence de microvésicules tumorales dans les CM issus des cellules de glioblastome, nous avons d'abord analysé à l'aide du *Zetasizer Nano ZS analyseur* (Malvern Instrument) les particules retrouvées dans le milieu conditionné de cellules U87 non-irradiées et essayé de déterminer la distribution de la taille de ces particules. Pour l'analyse, l'appareil

effectue dix mesures de tailles en triplicat par échantillon. Comme présent é dans la figure 65, les courbes correspondant aux 3 acquisitions étaient relativement superposées, permettant de distinguer 3 populations de particules de taille différente :

- Un groupe de particules dont la taille était  $< 30$  nm ( $\sim 3\%$ ) : ces particules ont une taille inférieure à la taille connue des exosomes ; ce sont des très petites particules non-identifiées;
- Un groupe de particules dont la taille était  $> 1\ 000$  nm ( $\sim 6\%$ ) : ces particules ont une taille supérieure à la taille des «*shedding vesicles*». Nous supposons que ce sont des débris cellulaires ou éventuellement des corps apoptotiques, leur proportion restant négligeable.
- Le groupe principal représentant environ 90% de la population, où les particules ont une taille comprise entre 30 à 1000 nm, taille conforme à celle des microvésicules (exosomes + "*shedding vesicles*"), telles que décrites dans la littérature [166].

Pour les CM issus des cellules U87 irradiés, les courbes des 3 acquisitions ne sont pas concordantes, présentant un plus grand nombre de sous-populations et rendant les résultats ininterprétables. La technique de diffusion dynamique de la lumière étant conçue pour étudier des échantillons monodisperses plutôt que des échantillons polydisperses [337], il est probable que nous soyons confrontés dans ces conditions aux limites de cette technique.

Figure 65. Distribution de la taille des TMVs présentes dans le milieu conditionné issu de cellules U87 non-irradiées. Analyse à l'aide du Zetasizer Nano ZS analyseur (Malvern Instrument)



Filipe et al. ont comparé les performances de la technique *Dynamic Light Scattering* (DLS) à celles de la technique *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA) [338] : ces 2 techniques sont basées sur le suivi du mouvement brownien des particules en suspension, mais les modalités de détection et d'analyse des particules sont distinctes. La DLS mesure des fluctuations d'intensité de la lumière diffusée par les particules en mouvement, alors que la NTA enregistre le mouvement de chaque particule en suspension. Filipe et al. ont comparé les 2 techniques en



mesurant un mélange de billes standard de tailles différentes. La DLS n'a pas permis de distinguer les 2 populations de billes de taille différente présentes dans le mélange, contrairement à la NTA. D'autres avantages de la NTA sont également listés par ces auteurs (Tableau 16). De fait, notre suspension contenant des TMVs de tailles très différentes (échantillon polydisperse), il est apparu nécessaire de compléter notre étude par l'utilisation de la NTA, qui nous a permis de visualiser les TMVs et de déterminer la distribution en taille des microvésicules en suspension.

Tableau 16. Comparaison des techniques NTA et DLS (Adapté de Filipe, Pharmaceutical Research, 2010) [338]

	DLS	NTA
<b>Characteristics</b>		
Size accuracy	Accurate for monodisperse samples, inaccurate for polydisperse samples	Accurate for both monodisperse and polydisperse samples
Peak resolution	Low (>3 fold difference in diameter)	High (<0.5 fold difference in diameter)
Size range	Ca. 1–1,000 nm	Ca. 30–1,000 nm
Concentration range (particles/ml)	Broad (about $10^8$ – $10^{12}$ )	Limited ( $10^7$ – $10^9$ )
Population ratio	Narrow range Large influence on size accuracy and distribution	Very broad range Very little influence on size accuracy and little influence on size distribution
Reproducibility	More reproducible	Less reproducible
Contaminations	Large particles can seriously compromise the results	Dust, microorganisms or aggregates easily detected, large particles have little influence
<b>Operational</b>		
Device handling	Very user-friendly Little sample handling Possibility of using disposable cuvettes	Requires several parameter adjustments Sample handling may affect size distribution Sample chamber must be cleaned after each sample Experienced operator required
Time consumption	Between 2 to 5 min per measurement	Between 5 min to 1 hour per measurement
Particular output	Approximate size distribution Intensity distribution Z-ave Pdl	Individual particle sizing Number distribution Approximate concentrations Individual particle intensity
Sample visualization	No	Yes

### 1.2.2. Analyse des microvésicules tumorales par Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

Pour confirmer la présence de microvésicules tumorales dans le CM des cellules tumorales, nous avons ensuite utilisé le système NanoSight (*Nanoparticle Tracking Analysis, Malvern Instrument*), une technique impliquée dans l'analyse de suivi de particules de taille nanométrique qui s'adaptent bien aux microvésicules tumorales. Le principe est basé sur l'enregistrement vidéo du mouvement des particules dans la suspension pendant 90s ; puis chaque vidéo est

analysée et la taille moyenne des vésicules est donnée, associé à une estimation de la concentration.

La figure 66 (*gauche*) présente un exemple de l'image provenant d'une vidéo enregistrée. Chaque spot brillant correspond à une particule qui est suivie et analysée par le système. Les analyses de ces vidéos montrent que les microvésicules en suspension constituent un échantillon polydisperse avec des tailles qui varient entre 30 nm à 1000 nm (Figure 66 *droite*). La plupart de la population correspond à des microvésicules de taille comprise entre 50 et 350 nm.

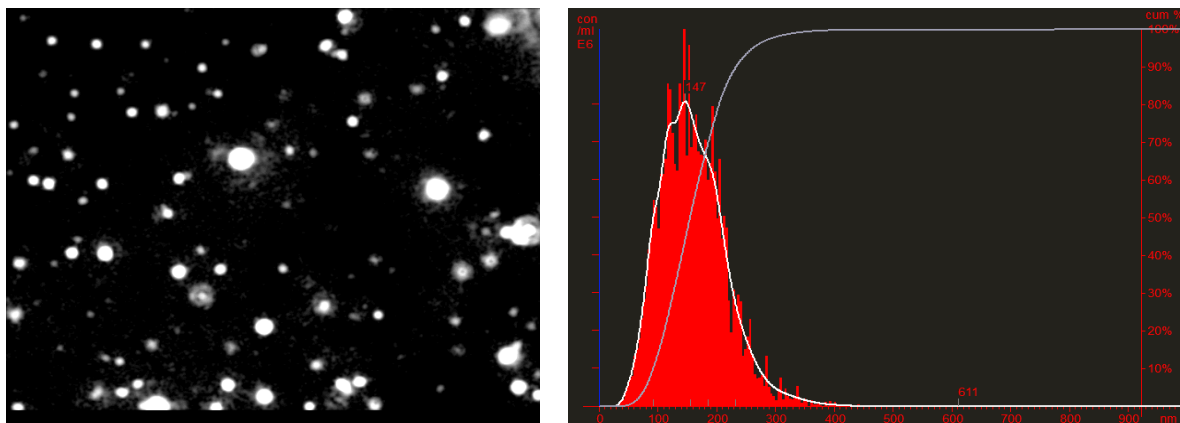


Figure 66. Exemple de mesure directe des vésicules obtenue par NTA. *Gauche*. Image représentant le *tracking* de microvésicules tumorales. Les spots brillants correspondent aux vésicules. *Droite*. Graphique présentant la distribution des particules en fonction de leur taille en surimpression sur l'image de la vidéo de l'échantillon

De plus, cette technique permet de déterminer la concentration de microvésicules de chaque taille (1 à 1000 nm) afin de réaliser la quantification des microvésicules (Figure 67).

La majorité des TMVs (> 90%) ont une taille inférieure à 500 nm de diamètre et la population principale correspond à des TMVs d'environ 100 à 300 nm. Dans les 2 lignées, à H2, le pic de la population est à 100 nm, alors qu'à H48, le pic est décalé à 150 nm. La concentration des TMVs de très petite taille ( $\leq 50$  nm) est diminuée à H48 (par rapport à H2), mais celle de la population avec la taille entre 300 à 450 nm est visiblement augmentée. Quelle que soit la lignée tumorale considérée et le temps de récupération (H2 et H48), l'irradiation à 2 ou 10 Gy n'a pas entraîné de changement majeur en termes de distribution de taille des TMVs, comparativement à la condition 0 Gy.

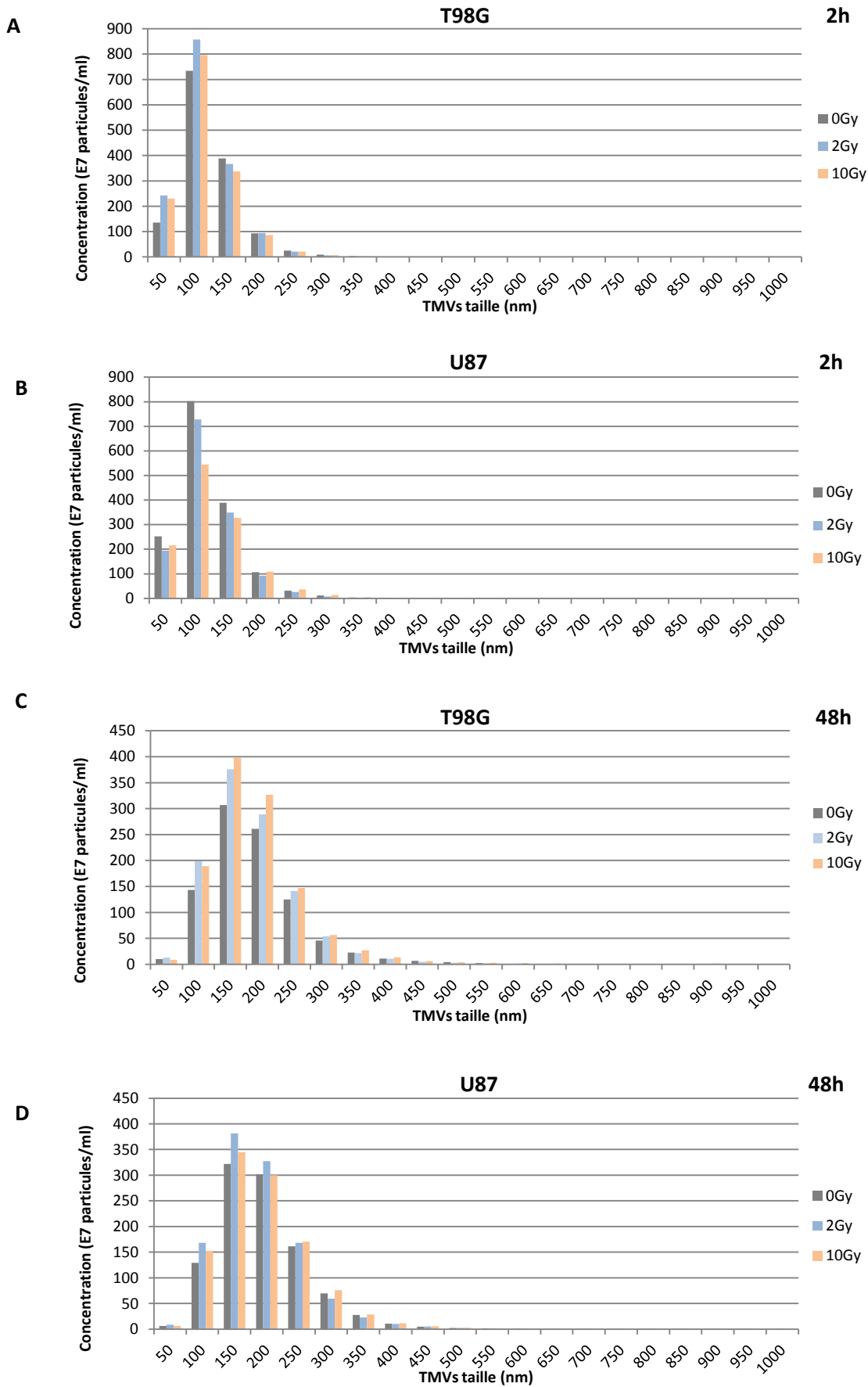


Figure 67. Analyse par NTA de la distribution en fonction de la taille des TMVs. Les TMVs provenant de cellules tumorales non-irradiées et irradiées pour les lignées T98G (A,C) et U87 (B, D) 2h et 48h post-irradiation

## 2. IMPACT DE L'IRRADIATION SUR LA QUANTITE DE TMVs LIBEREES PAR LES CELLULES TUMORALES

Afin de déterminer l'influence de l'irradiation sur la quantité de TMVs libérées par les cellules T98G et U87, nous avons utilisé deux approches complémentaires permettant la quantification des microvésicules, comme proposé par Dragovic et al. [256]: la NTA qui nous a permis d'apprécier la population totale des microvésicules tumorales, ainsi que les microvésicules de taille  $< 300$  nm, puis la cytométrie en flux permettant un focus sur les microvésicules de taille  $> 300$  nm, 10 à 100 fois moins nombreuses.

### 2.1. Quantification par NTA des TMVs sécrétés par les cellules de GBM avec ou sans irradiation

La quantification des TMVs par NTA a été effectuée pour des milieux récoltés à 2h et 48h post-irradiation.

Concernant la population totale de TMVs, la concentration mesurée par NTA s'élève à  $10^{10}$  TMVs/mL. Ce résultat est légèrement supérieur mais reste concordant avec les valeurs rapportées par Shao et al, qui ont montré une concentration de l'ordre de  $10^9$  TMVs/mL (exosomes) dans la lignée de GBM20/3 [192]. Quelles que soient la lignée et la dose d'irradiation, on détecte un plus grand nombre de TMVs à H2 par rapport à H48.

Pour les cellules U87, à H2, il y a une diminution significative de la concentration de TMVs, globales ou de taille inférieure à 300 nm, quand les cellules sont irradiées à 10Gy. A l'inverse, à H48, la concentration de TMVs n'a pas été changée par l'irradiation.

Pour les cellules T98G, nous avons constaté une augmentation significative d'environ 25% ( $p = 0.03$ ) de la libération de TMVs lorsque les cellules T98G étaient irradiées à 10 Gy à H2 et H48 (Figure 68).

Lorsque l'on s'intéresse plus spécifiquement aux TMVs de taille  $\leq 300$  nm, une augmentation significative d'environ 25% est retrouvée pour les cellules T98G irradiées à 10Gy à H2 et H48.

En revanche, avec cette technique, l'analyse des TMVs de taille  $> 300$ nm est rendue difficile du fait que cette population est très minoritaire (jusqu'à 100 fois moins concentrée). Pour cette population de vésicules, il nous a semblé intéressant d'utiliser une autre technique plus appropriée aux TMVs  $> 300$  nm.

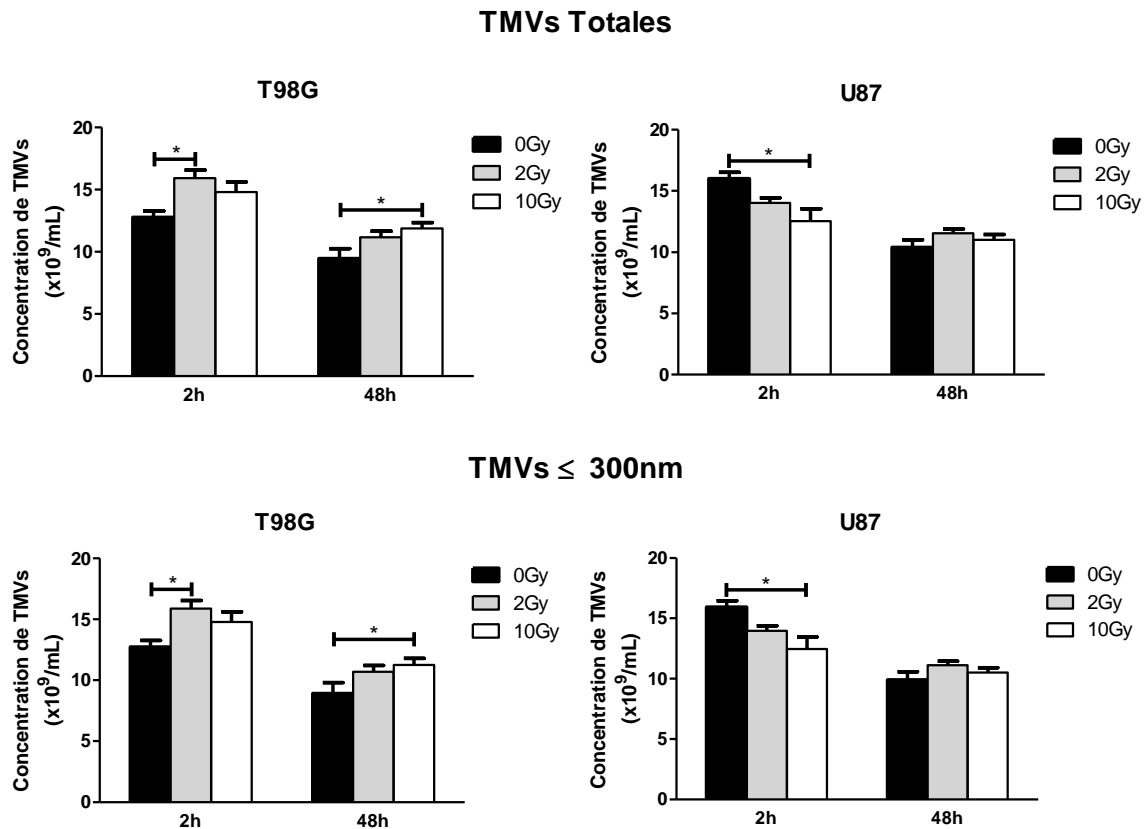


Figure 68. Quantification des TMVs libérées par les cellules T98G et U87 non-irradiées (0 Gy) ou irradiées à 2 ou 10 Gy H2 et H48 post-irradiation par NTA. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n $\geq$ 5)

## 2.2. Quantification par cytométrie en flux des TMVs sécrétées par les cellules de GBM avec ou sans irradiation

Afin d'étudier, pour les 2 lignées de glioblastome, l'effet de l'irradiation sur la libération de TMVs  $> 300$ nm plus spécifiquement, nous avons utilisé une approche de quantification par cytométrie en flux à l'aide de billes Megamix pour définir la fenêtre de comptage et de billes Surecount pour calibrer le comptage. La quantification des TMVs ( $> 300$ nm) a été effectuée pour des milieux récoltés à différents temps post-irradiation : H2, H24 et H48.

A l'état basal (0Gy), et quel que soit le temps d'analyse (H2, H24 et H48), le nombre total de TMVs  $> 300$ nm retrouvés dans les milieux de culture des cellules T98G et U87 reste à peu près constant, aux alentours de  $2 \cdot 10^5$  vésicules/mL (Figure 69).

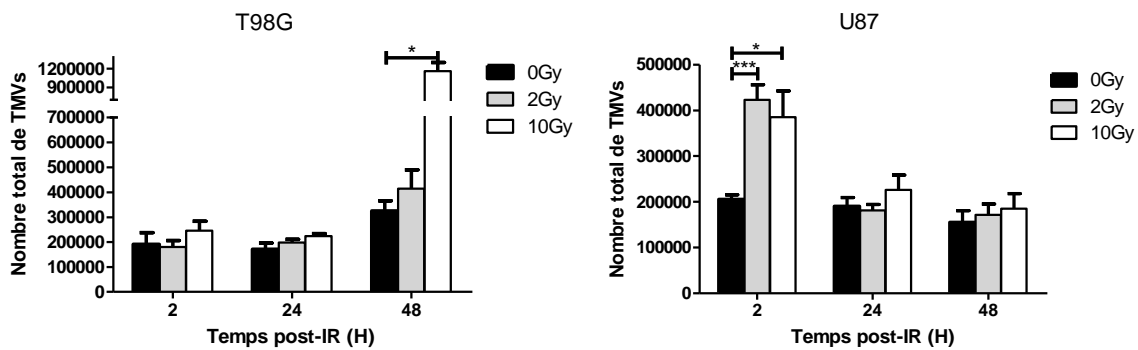


Figure 69. Effet de l'irradiation sur la libération des TMVs de taille supérieure à 300nm à H2, H24 et H48 post-radiothérapie. **A.** TMVs libérées par les cellules T98G. **B.** TMVs libérées par les cellules U87. Les résultats ont été présentés sous forme moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ )

Après irradiation, on constate une stimulation de la libération des TMVs  $> 300$ nm pour les deux lignées, mais à des temps différents. En effet, c'est 48h après traitement (RT 10 Gy) que l'on retrouve le plus de TMVs  $> 300$  nm dans le milieu des T98G irradiés, avec un taux multiplié par 4 ( $1,2 \cdot 10^6$  à 10 Gy *versus*  $0,3 \cdot 10^6$  vésicules à 0 Gy).

En revanche, le pic de libération des TMVs  $> 300$  nm pour les U87 est observé 2h après l'irradiation (2 ou 10 Gy) et le facteur multiplicateur est d'environ 2.

De façon surprenante, les TMVs  $> 300$ nm libérés 2h après radiothérapie ne sont pas retrouvés à H24 et H48, suggérant leur disparition. Deux hypothèses peuvent être formulées à ce stade :

- (i) soit les TMVs initialement libérés sont dégradés, mais ce phénomène n'a jamais été décrit jusqu'à présent;
- (ii) soit les TMVs initialement libérés sont ré-absorbés par les cellules. Cette dernière hypothèse semble la plus probable car plusieurs équipes ont démontré l'absorption de microvésicules par des cellules. Par exemple, Kawamoto et al. ont montré que des TMVs étaient incorporés par endocytose par des cellules endothéliales [240]. De même, l'absorption de microvésicules fluorescentes marquées par les cellules de la *granulosa* a été démontrée *in vitro* et *in vivo* par l'équipe de Silveira et al [339]. Une étude récente utilisant la microscopie confocale de fluorescence a montré que les exosomes libérés par les U87 peuvent être internalisés par d'autres U87 [340]. Par conséquent, les mesures à H48 pourraient refléter l'équilibre entre libération et réabsorption des TMVs.

### 2.3. Synthèse des données quantitatives concernant la libération des TMVs par les cellules de GBM avec ou sans irradiation

Nous avons résumé dans le tableau 17 ci-dessous, les effets de l’irradiation sur la libération des TMVs observés avec nos différentes approches.

Tableau 17. Synthèse de la modification de la libération des TMVs par les cellules de GBM après irradiation

	T98G	U87
2h		
TMVs totales	↗ +25%	↘ -22%
TMVs ≤ 300nm	↗ +25%	↘ -22%
TMVs > 300nm	=	↗↗ x 2
48h		
TMVs totales	↗ +26%	=
TMVs ≤ 300nm	↗ +26%	=
TMVs > 300nm	↗↗ x 4	=

De façon globale, l’irradiation peut modifier les quantités de TMVs libérées par les cellules de glioblastome. Mais cette stimulation ne se produit pas dans les mêmes conditions en fonction de la ligne considérée.

Les modifications induites par la radiothérapie sur la libération des TMVs de taille < 300 nm, sont de l’ordre de 20 à 25% mais avec des tendances inverses pour les deux lignées (stimulation pour les T98G et réduction pour les U87).

Par ailleurs, on constate, après irradiation, une augmentation de la libération des TMVs > 300 nm, mais dans des délais différents. Pour les cellules T98G, la libération est fortement augmentée au bout de 48h, alors que le pic de libération survient dès 2h pour les cellules U87. Ces observations pourraient suggérer que la libération des TMVs > 300 viendrait en réponse à des événements radio-induits différents, correspondant à une réponse immédiate pour les cellules U87 et à une réponse plus tardive pour les T98G.

### 3. DISCUSSION

Grâce à l’utilisation de différentes techniques qualitatives et quantitatives utilisées, nous avons pu confirmer que l’irradiation à 10Gy peut stimuler la libération par les cellules de GBM des exosomes et des «shedding vesicles», mais cette stimulation semble être lignée et temps-dépendante. Des observations similaires ont été rapportées par différentes équipes pour différentes lignées cellulaires. Par exemple, Wysoczynski et al. ont montré dans des lignées de cancer du poumon (A549, LL-2), que les cellules irradiées à 10Gy libéraient 2 fois plus de

«*shedding vesicles* » à H24, H36, H48 [188]. Plus intéressant, Lehmann et al. ont mis en parallèle le processus de mort cellulaire et la libération de vésicules. Ils ont montré que la sénescence initiée par des lésions de l'ADN radio-induites à 4Gy, s'accompagnait d'une augmentation de la biogénèse des exosomes dans les cellules du cancer de la prostate (augmentation de 1,5 fois à H48, et 3 fois plus à H96) [191].

Dans les GBM, la libération d'exosomes après radiothérapie a été rapportée par Arscott et al. Ils montraient pour les cellules U87, une stimulation de la libération dose- et temps-dépendante, avec une multiplication par 3 du nombre d'exosomes libérés dans le milieu 24h après une irradiation de 8 Gy. Cette équipe a surtout constaté que les lignées de GBM U251 et LN18 de statut p53 muté semblaient avoir une plus grande propension à libérer des exosomes après irradiation que la lignée U87, de statut p53 sauvage [236]. Même si nos résultats quantitatifs sur les cellules U87 ne corroborent pas parfaitement ceux de Arscott et al., nous arrivons à des observations similaires quant au statut p53. En effet, nous avons montré une stimulation radio-induite plus importante dans les cellules T98G, de statut p53 muté que pour les cellules U87. Compte tenu que nous étudions, dans notre travail à la fois les exosomes et les «*shedding vesicles* », et que parallèlement, la biogénèse de ces deux populations semble différente, il serait intéressant de chercher à comprendre comment le statut p53 peut influencer sur les deux processus simultanément. Contrairement au travail de Lehman et al., il ne semble pas qu'il y ait un lien avec la sénescence, puisque les cellules U87 sont considérées comme plus susceptibles d'entrer en sénescence accélérée après irradiation que les cellules T98G [127].



## PARTIE 4 : REPONSE DES CELLULES CIBLES RECEVEUSES EXPOSEES AUX TMVs OU AUX FACTEURS SOLUBLES CONTENUS DANS LES MILIEUX CONDITIONNES

Après avoir mis en évidence la libération de TMVs par les cellules de GBM irradiées ou non, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur le comportement de cellules cibles potentielles, telles que les cellules endothéliales ou les autres cellules tumorales, qui pourraient se trouver au voisinage des cellules irradiées dans un contexte tumoral.

Dans ce but, nous avons comparé la survie et la prolifération, ainsi que la migration de cellules endothéliales (HUVEC) et tumorales (cellules T98G ou U87), lorsque ces dernières sont exposées soit aux TMVs, soit aux facteurs solubles contenus dans le Filtrat. Pour ce faire, les CM des cellules U87 et T98G ont été recueillis, et les TMVs et le filtrat contenant les facteurs solubles ont été séparés. Nous avons réalisé comme précédemment décrit, des analyses cellulaires en temps réel avec le système xCELLigence, et des tests de blessure (HUVEC) ou d'invasion en chambre de Boyden (U87 et T98G).

### 1. REPONSE DES HUVEC EXPOSEES AUX TMVs OU AUX FACTEURS SOLUBLES

#### 1.1. Analyse temps réel du comportement global des HUVEC

Compte tenu que nos résultats montrent des modifications de la libération des TMVs dès 2h après irradiation, nous avons récupéré les TMVs à ce temps pour étudier leurs effets. Les TMVs sont ajoutées dans les puits contenant les cellules HUVEC, pour l'acquisition des signaux d'impédance grâce au système xCELLigence.

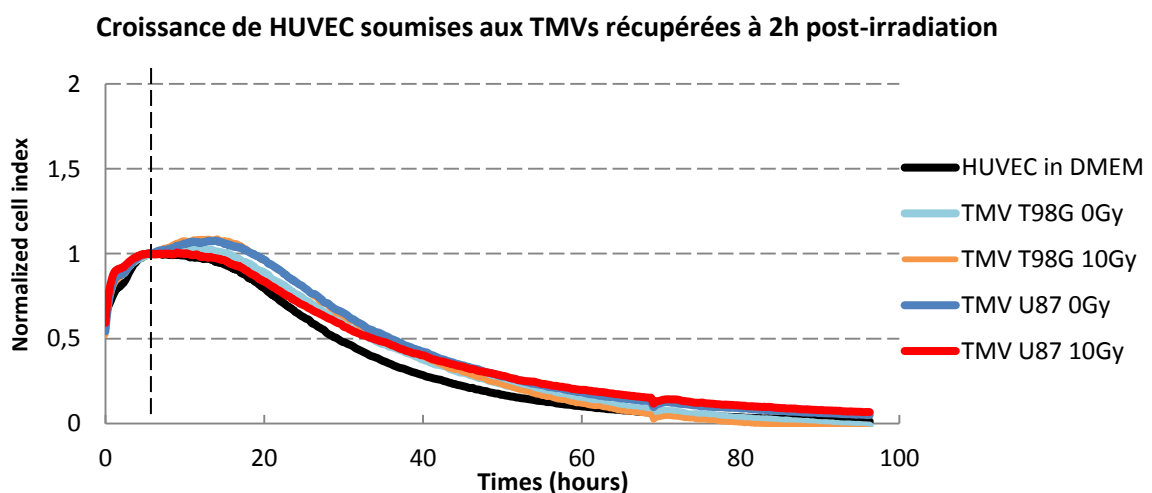


Figure 70. Effet des TMVs recueillies à H2 sur le comportement global (survie et prolifération, adhésion et morphologie cellulaires) des cellules HUVEC. Le CI redescend à 0 dès le 4<sup>ème</sup> jour

La figure 70 présente les profils de croissance obtenus quand les TMVs sont récupérées à partir de cellules irradiées ou non-irradiées 2 heures après traitement (H2).

Quelle que soit la lignée cellulaire considérée, les courbes des CI enregistrées présentent des profils très proches, quasiment superposables. Pour toutes les courbes, le CI descend jusqu'à atteindre 0 au bout de 4 jours, ce qui témoigne du décollement de l'ensemble des cellules HUVEC. Ces résultats révèlent que les TMVs ne modifient pas le comportement des cellules HUVEC (Figure 70). Ainsi, alors que nous savions que le milieu DMEM/SVFD frais ne permettait pas la survie à long terme des cellules HUVEC, nous constatons que les TMVs re-suspendues dans ce même milieu, ne permettent pas de contrecarrer cet effet délétère du milieu de culture. Ces observations sont cohérentes avec celles faites pour les milieux conditionnés. Il semble qu'à court terme (H2), la réponse immédiate à l'irradiation, même si elle se traduit par une libération modifiée des TMVs pour les cellules de glioblastome, ne conduit pas à modifier le comportement des HUVECs.

La figure 71 présente les profils de croissance obtenus quand les TMVs et les filtrats sont récupérés à partir de cellules irradiées ou non-irradiées 48 heures après traitement (H48).

Concernant la lignée U87, nous observons des comportements distincts quand les cellules HUVEC sont exposées aux TMVs ou aux filtrats. En effet, lorsque les cellules HUVEC sont sous l'influence des TMVs, que celles-ci soient issues de cellules tumorales irradiées ou non, on observe un signal de CI en cloche, avec une augmentation durant les 40 premières heures, puis un retour vers 0, indiquant la mort des cellules *in fine*. Ce profil en cloche pourrait être le reflet d'un changement de morphologie des cellules HUVEC au contact des TMVs. A l'inverse, lorsque les cellules HUVEC sont exposées au Filtrat des U87 non-irradiées, le CI a été stabilisé au-dessus de 1 (compris entre 1,0 et 1,5) tout au long de la surveillance de la culture cellulaire, ce qui suggère que les cellules endothéliales ont été maintenues en vie et adhérentes. De plus, nos résultats ont montré que le Filtrat récupéré à partir de cellules U87 irradiées à 10Gy était plus favorable que le Filtrat récupéré de cellules non-irradiées puisqu'il stimule légèrement la croissance des HUVEC.

Considérant la lignée T98G, tous les profils de CI enregistrés présentent une diminution progressive du signal, reflétant la mort progressive des cellules, même si la mort cellulaire et les processus de détachement sont clairement ralentis ou retardés par rapport à la référence (courbe noire). Notamment, quand on considère les HUVEC exposées aux filtrats des T98G, toutes les

cellules ne sont pas d'écollées à la fin du suivi et pour les HUVEC exposées aux TMVs issues des cellules T98G irradiées, on retrouve un profil en cloche.

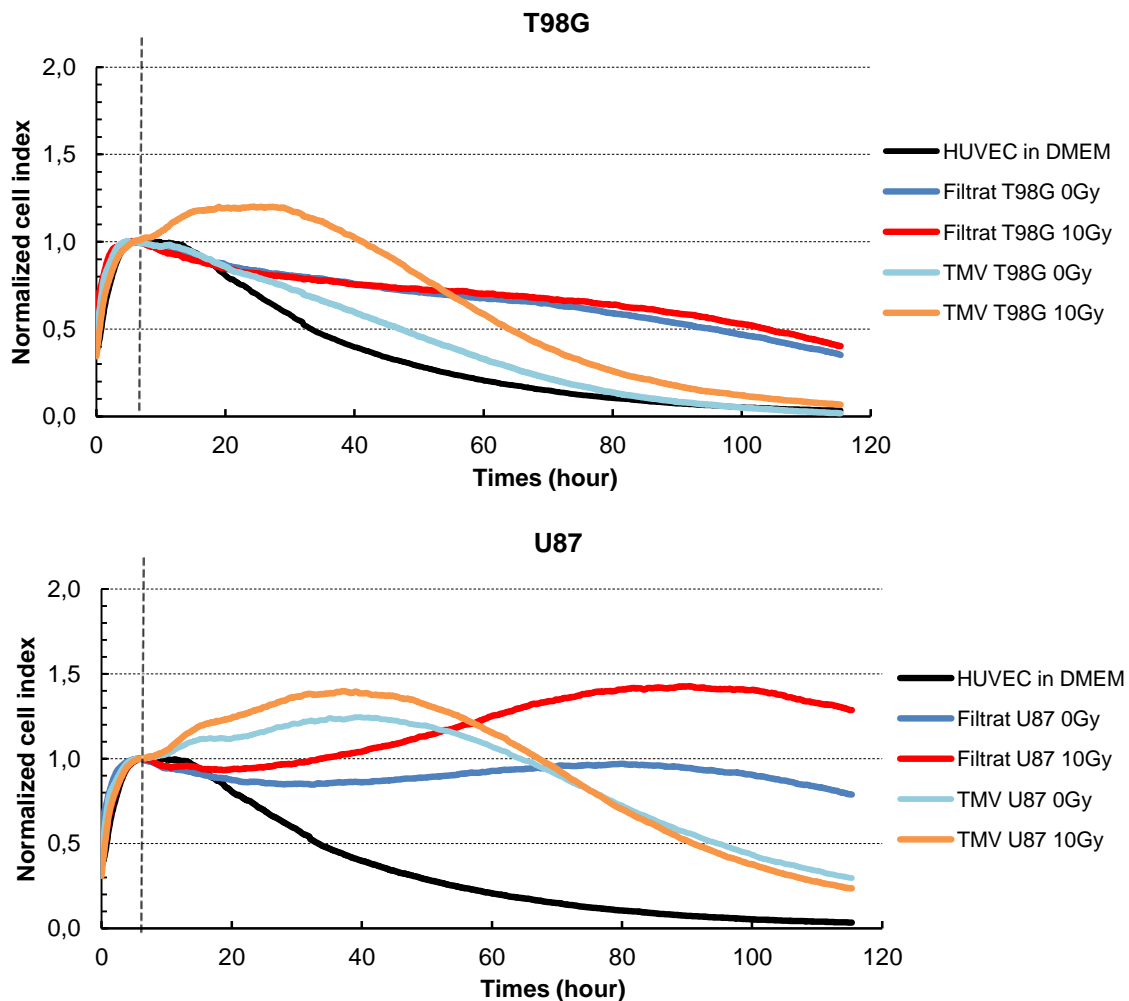


Figure 71. Suivi en temps réel du comportement global (survie et prolifération, adhésion et morphologie cellulaires) des cellules HUVEC exposées aux filtrats ou aux TMVs, récupérés à H48 à partir de T98G (haut) ou U87 (bas) irradiées ou non

## 1.2. Influence des TMVs et des facteurs solubles sur les capacités migratoires des HUVEC

Différents auteurs ont rapporté que, *in vitro*, la migration des cellules endothéliales était stimulée par les exosomes [240] et les « *shedding vesicles* » [188] libérées par différentes cellules tumorales.

Nous avons donc étudié l'impact des TMVs et des facteurs solubles contenus dans les Filtrats sur la capacité migratoire des HUVEC en réalisant des tests de blessure. Ici, après réalisation de la blessure sur le tapis cellulaire d'HUVEC, les HUVEC sont mises en contact avec le Filtrat ou les TMVs récupérés à H48 de cellules T98G ou U87 non-irradiées (0 Gy) ou irradiées (10 Gy) (Figure 72).

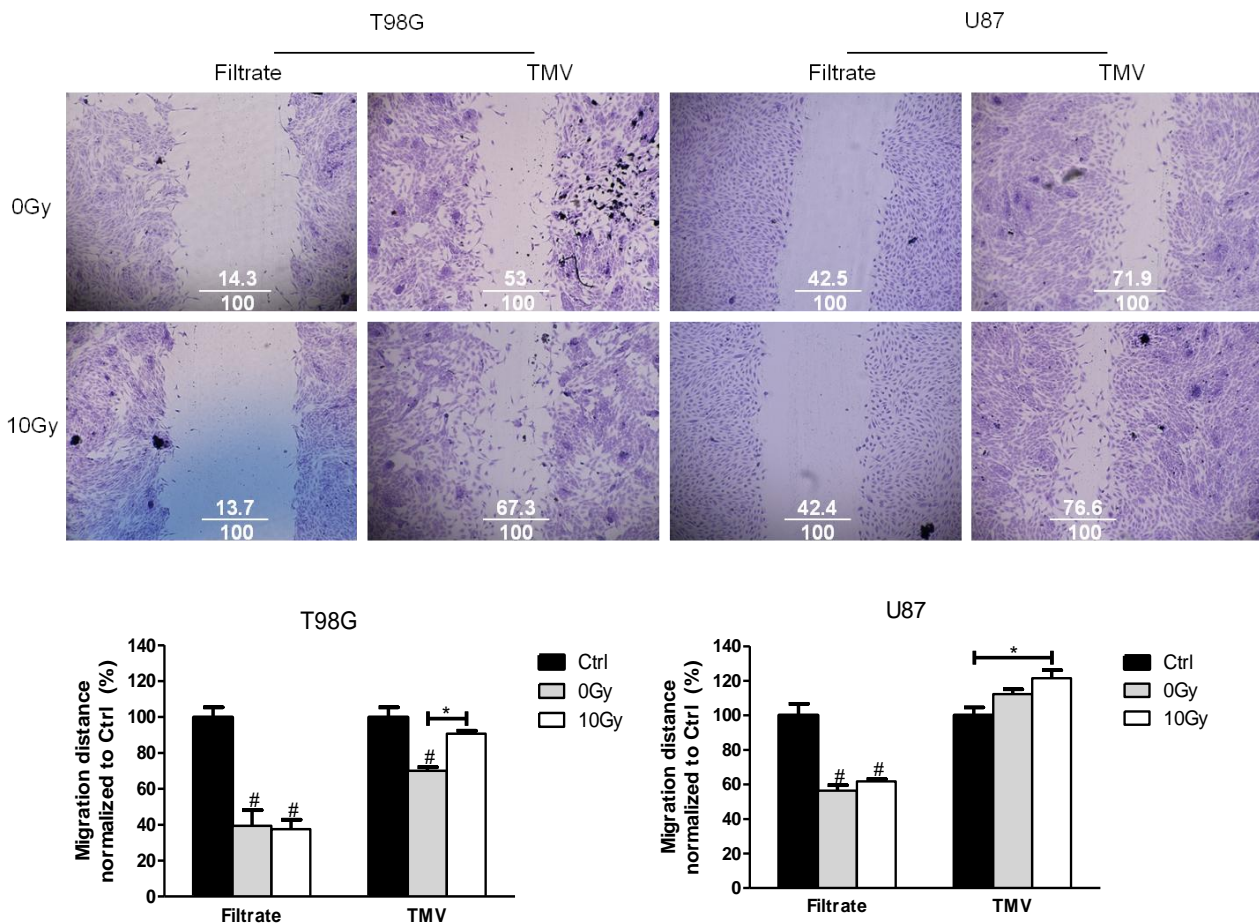


Figure 72. Détermination de la capacité migratoire des HUVEC par test de blessure. Après réalisation de la blessure sur le tapis cellulaire d’HUVEC, les cellules endothéliales sont mises au contact pendant 18h des Filtrats ou des TMVs issus de cellules tumorales irradiées ou non. *Haut*, Images représentatives de tests de blessure où les résultats chiffrés correspondent au pourcentage de recouvrement de la blessure. *Bas*, Distance de migration normalisée par rapport au Ctrl HUVEC (100%). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ) (# :  $p \leq 0,05$  indique une différence significative par rapport au Ctrl HUVEC)

Pour rappel, dans le Ctrl HUVEC, les cellules endothéliales qui se retrouvent au contact de milieu DMEM/SVFD frais, recouvrent au bout de 18h environ 65% de la blessure.

Nos résultats montrent que la distance de migration des cellules endothéliales a été significativement réduite lorsque les cellules HUVEC ont été exposées aux Filtrats contenant uniquement des facteurs solubles, quelle que soit l’origine du Filtrat (T98G ou U87 sans ou avec irradiation). En fait, les cellules HUVEC exposées aux différents filtrats parviennent à couvrir moins de 45% de la blessure au bout de 18h (*versus* 65% pour le milieu de référence DMEM/SVFD). Nos résultats montrent que les facteurs solubles sécrétés par les cellules de glioblastome, même après irradiation, ne permettent pas de maintenir les capacités migratoires des cellules endothéliales.

Lorsque les HUVEC sont exposés aux TMVs issues de cellules tumorales non-irradiées (0 Gy), la capacité migratoire des cellules endothéliales est légèrement dégradée pour les TMVs sécrétées par les T98G, avec une réduction d'~30%, ou reste équivalente pour celles libérées par les U87.

Plus intéressant, on note que la capacité migratoire des cellules HUVEC soumises à des TMVs issues de cellules de GBM irradiées à 10Gy est significativement augmentée. En effet, on note que pour les T98G irradiées à 10Gy, les TMVs restaurent significativement la capacité migratoire des cellules HUVEC, passant de 70% à 90%. Concernant U87, les TMVs obtenues à partir de cellules irradiées à 10Gy stimulent d'environ 20% la migration des HUVEC ( $p = 0.02$ ). Nos résultats suggèrent donc que l'irradiation de cellules tumorales peut stimuler la migration des cellules endothéliales *via* la libération de TMVs.

## 2. REPOSE DES CELLULES TUMORALES SOUMISES AUX TMVs ET AUX FACTEURS SOLUBLES

### 2.1. Migration des cellules tumorales

Compte tenu des résultats précédents, mettant l'accent sur le pouvoir pro-migratoire des TMVs libérées après irradiation, nous avons cherché à savoir si ce même type de communication pouvait être impliqué entre cellules tumorales irradiées et cellules tumorales voisines non-irradiées. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests d'invasion en chambre de Boyden avec Matrigel. Les résultats sont présentés sur la figure 73.

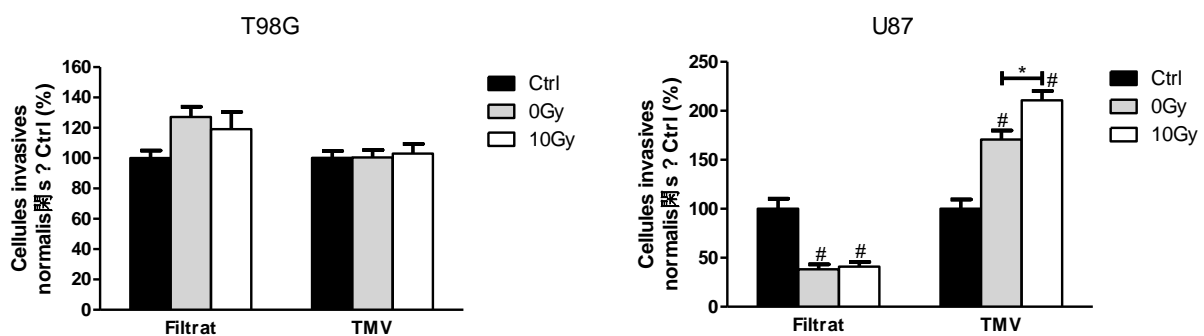


Figure 73. Evaluation de la capacité d'invasion des cellules tumorales par le test d'invasion utilisant la chambre de Boyden recouverte de Matrigel. Les résultats ont été présentés après normalisation par rapport au témoin non traité sous la forme moyenne  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ). (# :  $p \leq 0,05$  indique une différence significative par rapport à Ctrl)

Pour les cellules T98G irradiées (10 Gy) ou non-irradiées (0 Gy), les TMVs et les facteurs solubles libérés n'exercent aucune influence sur les capacités invasives d'autres cellules T98G non irradiées.

A l'inverse, des cellules U87 mises en contact avec soit du Filtrat, soit des TMVs issus d'autres cellules U87 voient leurs capacités invasives très perturbées. Dans le cas des filtrats, il se produit une forte inhibition de ces capacités invasives, avec une perte de 60%. Fait très intéressant, les TMVs issues des U87 non-irradiées stimulent significativement l'invasion des U87 (75%), et cette influence «pro-invasive» est massivement amplifiée par l'irradiation. En effet, quand les cellules U87 sont irradiées, les TMVs qu'elles libèrent multiplient par 2 le nombre de cellules invasives, par rapport au Ctrl.

L'effet pro-migratoire des TMVs radio-induites sur les cellules tumorales voisines a déjà été rapporté dans les GBM. En effet, Arscott et al. avaient fourni la preuve que les exosomes de cellules de glioblastome irradiées à 4Gy amélioraient la migration des cellules de glioblastome non irradiées, au moins en partie en raison de l'activation accrue de la voie de signalisation FAK [236].

## 2.2. Prolifération/survie des cellules tumorales

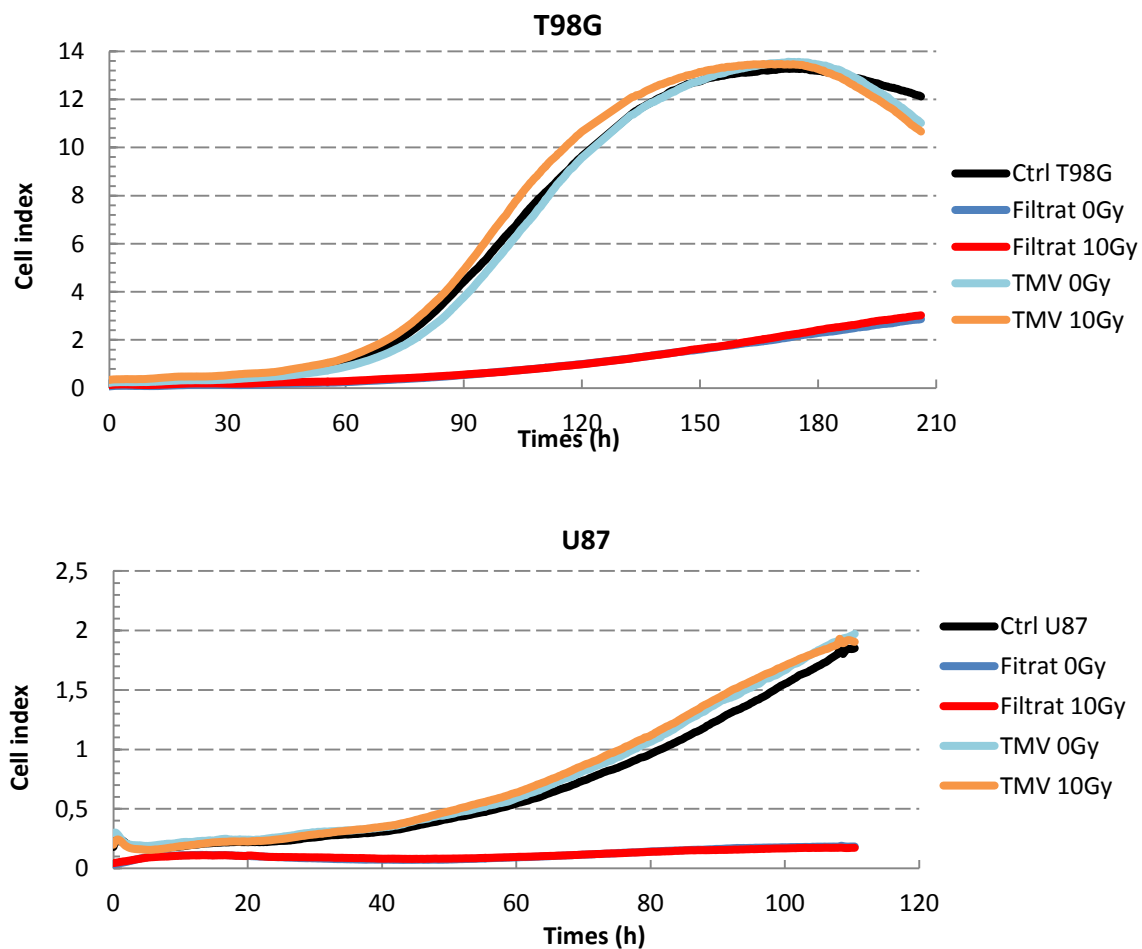


Figure 74. Suivi en temps réel du comportement global (survie et prolifération, adhésion et morphologie cellulaires) des cellules tumorales exposées aux filtrats ou aux TMVs, récupérés à H48 à partir de T98G (haut) ou U87 (bas) irradiées ou non

Nous avons également cherché à savoir si les TMVs ou Filtrat avaient un effet sur la prolifération/survie des cellules tumorales. Comme présenté dans la figure 74, les profils de cellules tumorales soumises aux Filtratx issus de 2 lignées sont au-dessous de celui de la référence (courbe noire = milieu DMEM/SVFD) mais ne descendent pas jusqu'à 0, indiquant que le Filtrat peut maintenir la survie cellulaire mais ne permet pas favoriser la prolifération des cellules tumorales. Concernant les cellules tumorales exposées aux TMVs, leurs profils de croissance sont superposés aux profils de référence (courbe noire) : ceci s'explique par le fait que les TMVs sont re-suspendues dans le milieu DMEM/SVFD. Ainsi, on peut dire qu'aucun effet des TMVs sur la prolifération des cellules tumorales n'est observé. De même, l'irradiation à 10Gy n'a pas d'influence sur la survie/prolifération des cellules tumorales *via* la libération de TMVs ou de facteurs solubles dans le Filtrat.

### 3. ANALYSES PROTEIQUES DES FILTRATS/TMVs ET DES CELLULES

#### 3.1 Contenu des Filtrats/TMVs en lien avec la migration et l'angiogénèse

Les données de la littérature [139] rapportent de plus en plus largement, qu'en plus des variations du nombre de TMVs libérées, il peut également y avoir une modification profonde de la composition de ces TMVs. Ceci semble se vérifier dans nos expérimentations puisque, si l'on s'intéresse plus particulièrement aux cellules U87, on constate que le nombre de TMVs libérées est plus élevé 2 heures après radiothérapie que 48 heures après, alors que les TMVs recueillies à H48 ont un impact plus marqué que celles recueillies à H2.

C'est pourquoi, nous avons commencé à caractériser le contenu protéique des TMVs, par comparaison au contenu en protéines des Filtrats, grâce à une analyse protéomique par Proteome Profiler Array en lien avec la migration et l'angiogénèse. Pour ce faire, les protéines libérées par les cellules de glioblastome non-irradiées ou irradiées à 10Gy, sous forme soluble dans le Filtrat ou *via* les TMVs, ont été extraites puis analysées sur membrane (Figure. 75). Par cette approche, 55 facteurs liés à l'angiogénèse ou à la migration pouvaient être détectés.

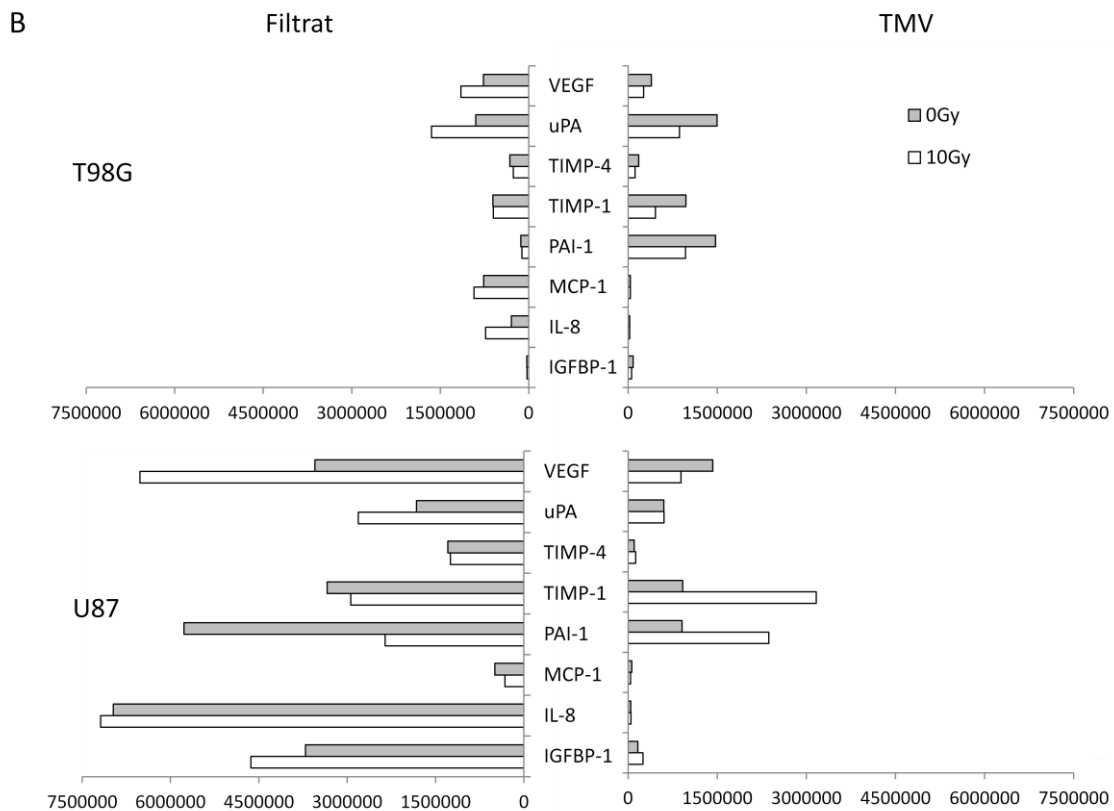
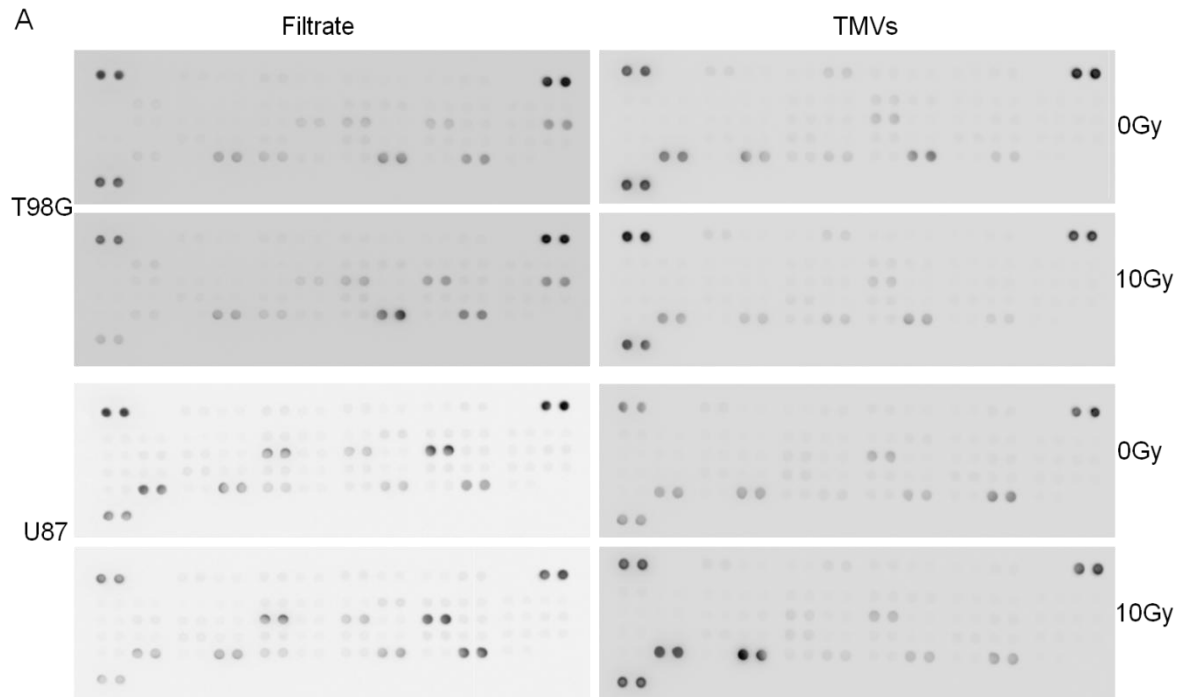


Figure 75. Protéines liées à l'angiogenèse exprimées dans le Filtrat et TMVs. A. L'expression des 55 facteurs lié à l'angiogenèse détecté par proteome array dans les 2 lignées avec ou sans irradiation. B. Les niveaux d'expression relative de plusieurs facteurs angiogéniques dans T98G et U87. Les valeurs sont calculées en soustrayant le niveau de fond (témoin négatif) à partir de niveau de signal de l'échantillon



Parmi tous les spots détectables, nous nous sommes focalisés sur les huit protéines dont le niveau d'expression a été sensiblement modifié par la radiothérapie. Il s'agit de: *insulin-like growth factor-binding protein 1* (IGFBP-1), *interleukin-8* (IL-8), *monocyte chemo-attractant protein 1* (MCP-1), *plasminogen activator inhibitor type-1* (PAI-1), *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMP-1 and TIMP-4), *urokinase plasminogen activator* (uPA), et VEGF. Globalement, la majorité de ces 8 protéines ont été exprimées en quantités supérieures dans le Filtrat et les TMVs obtenus à partir des U87 que dans ceux issus des T98G. De plus, la plupart de ces protéines ont un niveau plus élevé dans le Filtrat que dans les TMVs.

Selon la protéine considérée, les variations induites par les radiations ionisantes sont plus ou moins marquées. En particulier, les analyses de densité optique ont montré qu'une irradiation à 10 Gy, par rapport à 0 Gy, induit principalement une augmentation du niveau de VEGF (50 à 80% de plus) et de uPA (50% de plus) dans le filtrat, quelle que soit la lignée considérée. Nos résultats sont en accord avec ceux de Jadhav et al. qui ont rapporté une augmentation du niveau d'uPA et de VEGF dans le milieu conditionné de cellules de neuroblastome après irradiation [157].

L'induction radio-induite du VEGF, tant au niveau transcriptionnel que traductionnel, a été rapportée par plusieurs études pour des lignées de GBM [150, 341]. Différentes équipes ont montré que la libération accrue de VEGF par les cellules tumorales après radiothérapie s'accompagnait d'une stimulation de la prolifération des cellules endothéliales [145, 161].

Alors que la plupart des études rapportant un effet pro-migratoire des milieux conditionnés issus des cellules tumorales irradiées montraient une forte présence de métalloprotéases [70, 159], nous n'avons pas détecté de stimulation radio-induite de ces protéines dans nos milieux. Ici, on note en revanche l'augmentation de l'expression d'uPA, protéine connue pour contribuer activement au remodelage de la matrice extracellulaire [25, 26].

Contrairement aux données de la littérature [342, 343], le niveau de certains facteurs pro-angiogéniques tels que le TGF- $\beta$ , IL-8 n'a pas été modifié dans le Filtrat après irradiation.

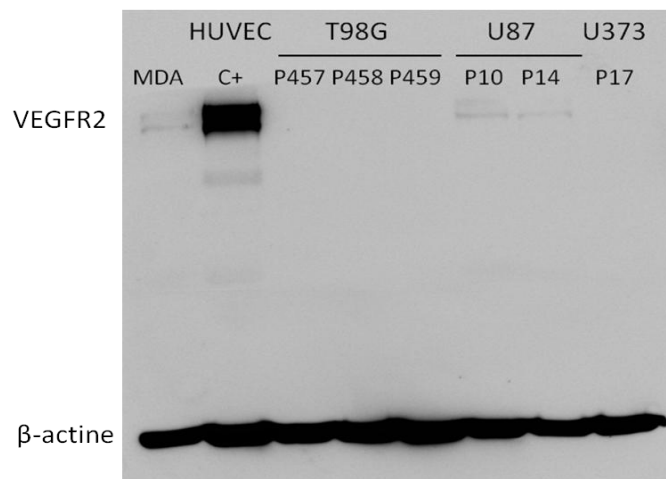
En outre, si nous comparons les variations de profils d'expression protéiques induites par les rayonnements, il semble que ces variations, pour les cellules U87, soient inversées entre Filtrat et TMVs. Par exemple, le VEGF a augmenté dans le Filtrat tandis qu'il a diminué dans les TMVs; TIMP-1 et PAI-1 ont diminué dans le Filtrat alors qu'ils ont augmenté dans les TMVs.

### 3.2 Expression des récepteurs membranaires des cellules par Western-blot

Pour tenter d'expliquer les effets des Filtrats (facteurs solubles) sur les cellules tumorales et HUVEC, nous avons choisi d'analyser l'expression des récepteurs membranaires dans les cellules. Comme le niveau de VEGF a bien augmenté dans le Filtrat, nous avons d'abord évaluée l'expression de VEGFR2, le récepteur principal de VEGF, dans les cellules par la technique de western-blot (Figure 76).

Les résultats montrent que les HUVEC expriment fortement le VEGFR2, qui sont utilisés comme le Control positif. Concernant les lignées tumorales, T98G n'expriment pas de VEGFR2, alors que U87 expriment légèrement le VEGFR2.

Figure 76. Expression des récepteurs membranaires dans les HUVEC et les cellules de glioblastome. A. Expression de VEGFR2 dans les HUVEC et 3 lignées de glioblastome



Le VEGF semble être l'élément central des effets observés. En effet, à l'état basal, le filtrat des cellules U87 appara  t plus riche en VEGF [344, 345] que le filtrat des cellules T98G, et cette quantité plus importante de VEGF pourrait expliquer l'influence du milieu conditionné ou du filtrat récupérés à partir des U87, favorable à la survie des HUVEC, pour lesquelles une expression forte du VEGFR2, récepteur membranaire du VEGF, a été observée par Western-Blot.

## 4. DISCUSSION

Aux vues des résultats obtenus dans notre travail, les facteurs solubles contenus dans les différents filtrats sembleraient être principalement impliqués dans le maintien de la survie des cellules endoth iales, alors que les TMVs seraient plus susceptibles d'altérer les capacités de migration des cellules endoth iales et tumorales.

Chalmin et al. ont rapporté que les exosomes et les facteurs solubles sécrétés par les cellules tumorales (cancers colorectaux notamment) peuvent réguler de façon différentielle les fonctions

des cellules immunitaires. Dans ces travaux, les facteurs solubles induisaient l'expansion des cellules myéloïdes suppressives, tandis que les TMVs induisaient leur activation, contribuant ensemble au développement tumoral [346]. De façon similaire, nous avons pu constater des différences évidentes dans les fonctions des cellules endothéliales affectées par les facteurs solubles ou par les TMVs, confirmant que chacun peut jouer un rôle spécifique dans la stimulation de l'angiogénèse.

De façon originale, nos résultats montrent que l'irradiation peut modifier le comportement des cellules endothéliales ou tumorales, même si celles-ci ne sont pas directement irradiées, et ce, en provoquant la libération par les cellules tumorales irradiées de TMVs ou de facteurs solubles dans le Filtrat.

Nous avons tenté de résumer dans le tableau 18 ci-dessous, les effets de l'irradiation sur les fonctions des cellules endothéliales et tumorales non-irradiées *via* la libération des TMVs ou de facteurs solubles dans les filtrats.

Tableau 18. Synthèse de l'effet de l'irradiation sur les cellules HUVEC et les cellules tumorales *via* Filtrat et TMVs issus de cellules tumorales

		TMVs		Filtrat	
		T98G	U87	T98G	U87
HUVEC	Prolifération/ Survie	→	→	→	↗
	Migration	↗	↗	→	→
Cellules tumorales	Prolifération/ Survie	→	→	→	→
	Invasion	→	↗↗	→	→

L'observation la plus marquante concerne la stimulation par la radiothérapie des capacités pro-migratoires des HUVECs et des capacités pro-invasives des TMVs libérés par les cellules de glioblastome. Pour confirmer ces résultats, des études complémentaires *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires. *In vitro*, pour vérifier la spécificité de l'effet pro-migratoire des TMVs observé dans notre étude, des essais peuvent être réalisés visant à perturber l'incorporation de TMVs par des cellules cibles. D'après certains auteurs, l'incorporation des microvésicules par les cellules de glioblastome peut être inhibé par l'héparine [211], alors que Methyl-β-cyclodextrin, inhibiteur de cholestérol peut inhiber l'incorporation des microvésicules par les cellules de glioblastome et les cellules endothéliales [340]. D'autres molécules ont été utilisées sur d'autres cellules cibles,

comme l'anticorps anti-ICAM ou l'inhibiteur des intégrines sur les cellules dendritiques [220]. Il faudra également valider nos résultats *in vivo*. Des auteurs ont utilisé un modèle de souris porteuse de fenêtres dorsales, dans laquelle ils introduisaient du Matrigel mélangé avec des TMVs, pour observer l'effet de TMVs sur la vascularisation *in vivo* [188]. De même, l'effet pro-invasif des cellules tumorales peut être étudié *in vivo*, sur des modèles de greffes orthotopiques, en mesurant la distance de migration des cellules tumorales sur coupe histologique. Il serait intéressant de mettre en place ce type d'expérimentations pour valider nos résultats obtenus *in vitro*.

Les TMVs sont généralement considérées comme des réservoirs de facteurs pro-angiogéniques [164, 193]. Ici, les modifications après irradiation des contenus protéiques des TMVs ont concerné uPA, TIMP-1, et PAI-1 qui sont impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire [347–350], mais une augmentation du niveau de ces protéines après irradiation ne peut pas être directement liée à l'effet pro-migratoire des TMVs. En revanche, d'autres groupes ont rapporté que les exosomes pouvaient induire des changements dans la fonction cellulaire de cellules réceptrices par transfert d'ARN [139]. Ces aspects sont en cours d'investigation. Des résultats préliminaires suggèrent que la quantité totale d'ARN contenu dans les TMVs issues des U87 irradiés à 10Gy pourrait être multiplié par 2. Il est nécessaire à présent de pouvoir qualifier ces ARN.



**CONCLUSION**  
**ET**  
**PERSPECTIVES**



Le but de cette thèse était de déterminer comment les cellules de glioblastome survivantes après irradiation pouvaient affecter les fonctions des cellules tumorales voisines et les cellules endothéliales non irradiées, *via* l'échange des signaux intercellulaires, à savoir, les facteurs solubles et les microvésicules tumorales (TMVs).

Dans la première partie, nous avons confirmé que les cellules de glioblastome U87 et T98G étudiées sont résistantes à l'apoptose radio-induite : la mort mitotique semble être le mode de mort cellulaire privilégié après irradiation pour ces cellules, se traduisant par une prolifération ralentie des cellules survivantes après irradiation. Parallèlement, l'irradiation peut modifier les profils sécrétoires des cellules de glioblastome, c'est-à-dire modifier les substances libérées par les cellules dans leur milieu de culture. Ces substances peuvent favoriser la prolifération/survie et la migration des cellules HUVEC, 2 étapes importantes dans l'angiogenèse. Cependant, elles ne sont pas suffisantes pour modifier la capacité des cellules endothéliales à former des microtubules vasculaires.

Outre certains facteurs solubles connus (VEGF, uPA), on retrouve, parmi les substances sécrétées, des microvésicules tumorales (TMVs). Nous avons pu objectiver, en utilisant la microscopie électronique à balayage et le *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), la libération de TMVs, dont la taille était globalement inférieure à 500 nm. Par NTA et cytométrie en flux, nous avons montré que cette libération de TMVs (exosome + "*shedding vesicles*"), peut être significativement stimulée par l'irradiation dans les 2 lignées, mais de façon temps-dépendant. La libération des exosomes post-irradiation pourrait, d'après des données récentes de la littérature, dépendre, du statut p53 des cellules qui diffère dans les deux lignées étudiées. Des investigations complémentaires pourraient permettre d'éclaircir ce point.

Concernant les effets respectifs des facteurs solubles et des TMVs sur les cellules tumorales et les cellules HUVEC, nos travaux montrent que les facteurs solubles contenus dans les différents Filtrats seraient principalement impliqués dans le maintien de la survie et la prolifération des cellules endothéliales. En particulier, le VEGF pourrait être un facteur essentiel dans ce processus. En effet, conformément aux données de la littérature, nous avons observé que l'irradiation favorisait la sécrétion accrue de VEGF dans le Filtrat et son récepteur VEGFR2 était bien exprimé à la surface des HUVEC. A l'inverse, les TMVs semblent altérer préférentiellement les capacités de migration des cellules endothéliales et tumorales. Malheureusement, les résultats des analyses du contenu protéique des TMVs ne permettent pas d'expliquer l'effet pro-migratoire des TMVs. Plusieurs auteurs ont rapporté la possibilité que les TMVs transfèrent des acides nucléiques (ADN, ARNm, microARN) d'une cellule donneuse à



une cellule receveuse [204]. C'est pourquoi, nous avons débuté des investigations pour analyser le contenu en acide nucléique des TMVs.

Ainsi, la présente étude montre pour la première fois que des cellules de glioblastome survivantes après irradiation aux rayons X sont capables de stimuler la migration des cellules endothéliales *in vitro*, grâce à la libération de TMVs. Ce même moyen de communication intercellulaire est observé lorsque les TMVs sont mises en contact avec des cellules tumorales voisines non-irradiées pour stimuler leur invasion. La migration des cellules tumorales et les cellules endothéliales, de manière concomitante, suite à l'irradiation, pourrait être un premier pas vers la diffusion et la récurrence après radiothérapie. Pour conforter nos résultats et confirmer l'effet pro-migratoire des TMVs libérées post-irradiation, des essais pourraient être réalisés visant à réduire l'incorporation des TMVs par les cellules cibles. En effet, d'après la littérature, l'incorporation des microvésicules par les cellules de glioblastome peut être inhibé par l'héparine [211], alors que Methyl- $\beta$ -cyclodextrin, inhibiteur de cholestérol peut inhiber l'incorporation des microvésicules par les cellules de glioblastome et les cellules endothéliales [340].

La migration concomitante des cellules tumorales et des cellules endothéliales après irradiation pourrait constituer un élément clé facilitant la diffusion et la récurrence de glioblastome après radiothérapie. Pour compléter et confirmer ces résultats *in vitro*, des études *in vivo* sont nécessaires. Pour ce faire, nous pourrions utiliser des modèles de fenêtres dorsales implantées chez des souris immunodéprimées développées au laboratoire pour observer l'effet des TMVs à la fois sur la vascularisation *in vivo* et sur les capacités invasives des cellules tumorales [188].

Les données récentes de la littérature montrent l'implication, dans les récurrences de GBM d'une sous-population cellulaire particulière, les GSCs (*glioma stem-like cells*), connue pour leur radiorésistance accrue. Les GSC sont en contact direct avec des cellules endothéliales et il existe une communication intercellulaire bidirectionnelle entre ces deux populations. Compte tenu de nos résultats *in vitro*, il semble indispensable de s'intéresser maintenant plus particulièrement à l'effet des TMVs libérées post-irradiation sur cette sous-population de GSC.

Dans le microenvironnement tumoral et péri-tumoral, outre les cellules tumorales et les cellules endothéliales, co-existent aussi d'autres types cellulaires, comme des astrocytes normaux, les cellules de la microglie, les péricytes constitutifs de la barrière hémato-encéphalique, *etc...* Il sera très intéressant de savoir si les TMVs exercent aussi également un pouvoir pro-migratoire sur ces différentes populations cellulaires, et d'apprécier les éventuelles répercussions sur la

réponse immunitaire ou sur la rupture de la barrière hémato-encéphalique, qui restent à ce jour inconnues.



# BIBLIOGRAPHIE



1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: **The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System**. *Acta Neuropathol (Berl)* 2007, **114**:97–109.
2. Figarella-Branger D, Chappe C, Padovani L, Mercurio S, Colin C, Forest F, Bouvier C: **Glial and glioneuronal tumors in adults and children: main genetic alterations and towards a histomolecular classification**. *Bull Cancer (Paris)* 2013, **100**:715–726.
3. Wen PY, Kesari S: **Malignant Gliomas in Adults**. *N Engl J Med* 2008, **359**:492–507.
4. Pezuk JA, Brassesco MS, Morales AG, de Oliveira JC, de Oliveira HF, Scrideli CA, Tone LG: **Inhibition of Polo-Like Kinase 1 Induces Cell Cycle Arrest and Sensitizes Glioblastoma Cells to Ionizing Radiation**. *Cancer Biother Radiopharm* 2013, **28**:516–522.
5. Ellor SV, Pagano-Young TA, Avgeropoulos NG: **Glioblastoma: Background, Standard Treatment Paradigms, and Supportive Care Considerations**. *J Law Med Ethics* 2014, **42**:171–182.
6. Graner M, Redzic J, Ung T: **Glioblastoma extracellular vesicles: reservoirs of potential biomarkers**. *Pharmacogenomics Pers Med* 2014:65.
7. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, et al.: **Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1**. *Cancer Cell* 2010, **17**:98–110.
8. Brennan CW, Verhaak RGW, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu C-J, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, et al.: **The Somatic Genomic Landscape of Glioblastoma**. *Cell* 2013, **155**:462–477.
9. **Nervous System: Glioma: an overview** [<http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/44543?show=full>]
10. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF: **Cancer Stem Cells: Models and Concepts**. *Annu Rev Med* 2007, **58**:267–284.
11. Persano L, Rampazzo E, Basso G, Viola G: **Glioblastoma cancer stem cells: Role of the microenvironment and therapeutic targeting**. *Biochem Pharmacol* 2013, **85**:612–622. [*Dysfunctional Cell Signaling Dynamics in Oncology: Diagnostic, Prognostic and Treatment Opportunities*]
12. Visvader JE, Lindeman GJ: **Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions**. *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:755–768.
13. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL: **Stem cells, cancer, and cancer stem cells**. *Nature* 2001, **414**:105–111.
14. Garvalov: **Cancer stem cells: a new framework for the design of tumor therapies** - Springer. 2010.
15. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA: **Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro**. *Glia* 2002, **39**:193–206.

16. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: **Identification of human brain tumour initiating cells.** *Nature* 2004, **432**:396–401.
17. Smith GY, Roth J, Friedman G, Smith T: **Oncolytic viral therapy: targeting cancer stem cells.** *Oncolytic Virotherapy* 2014:21.
18. Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN: **The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype.** *Cell Cycle* 2009, **8**:3274–3284.
19. Bar EE: **Glioblastoma, Cancer Stem Cells and Hypoxia.** *Brain Pathol* 2011, **21**:119–129.
20. Stupp R, Tonn J-C, Brada M, Pentheroudakis G: **High-grade malignant glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Ann Oncol* 2010, **21**(suppl 5):v190–v193.
21. Wang Y, Jiang T: **Understanding high grade glioma: Molecular mechanism, therapy and comprehensive management.** *Cancer Lett* 2013, **331**:139–146.
22. Miletic H, Niclou SP, Johansson M, Bjerkvig R: **Anti-VEGF therapies for malignant glioma: treatment effects and escape mechanisms.** *Expert Opin Ther Targets* 2009, **13**:455–468.
23. Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P: **Interstitial guidance of cancer invasion.** *J Pathol* 2012, **226**:185–199.
24. Payne LS, Huang PH: **The Pathobiology of Collagens in Glioma.** *Mol Cancer Res* 2013, **11**:1129–1140.
25. Mentlein R, Hattermann K, Held-Feindt J: **Lost in disruption: Role of proteases in glioma invasion and progression.** *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 2012, **1825**:178–185.
26. Kwiatkowska A, Symons M: **Signaling determinants of glioma cell invasion.** *Adv Exp Med Biol* 2013, **986**:121–141.
27. Raudino G, Caffo M, Caruso G, Alafaci C, Raudino F, Marventano V, Romano A, Montemagno F, Belvedere M, Maria F, Tomasello F, Schillaci A: **From Gliomagenesis to Multimodal Therapeutic Approaches into High-Grade Glioma Treatment.** In *Evol Mol Biol Brain Tumors Ther Implic.* Edited by Lichtor T. InTech; 2013.
28. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM: **Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier.** *Nat Med* 2013, **19**:1584–1596.
29. Cuddapah VA, Robel S, Watkins S, Sontheimer H: **A neurocentric perspective on glioma invasion.** *Nat Rev Neurosci* 2014, **15**:455–465.
30. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJB, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO: **Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma.** *N Engl J Med* 2005, **352**:987–996.
31. Wilson D, Karajannis M, Wilson T: **Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics.** *Surg Neurol Int* 2014, **5**:64.
32. Tse V, Babu H: **Recurrent Malignant Primary Brain Tumor: the Pathophysiology and Management.** *Mol Targets CNS Tumors InTech* 2011.

33. Wang S-C, Yu C-F, Hong J-H, Tsai C-S, Chiang C-S: **Radiation Therapy-Induced Tumor Invasiveness Is Associated with SDF-1-Regulated Macrophage Mobilization and Vasculogenesis.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e69182.
34. Stummer W, Bent MJ van den, Westphal M: **Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion.** *Acta Neurochir (Wien)* 2011, **153**:1211–1218.
35. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen H-J: **Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial.** *Lancet Oncol* 2006, **7**:392–401.
36. Juratli TA, Schackert G, Krex D: **Current status of local therapy in malignant gliomas — A clinical review of three selected approaches.** *Pharmacol Ther* 2013, **139**:341–358.
37. Walker MD, Alexander E, Hunt WE, Leventhal CM, Mahaley MS, Mealey J, Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA: **Evaluation of mithramycin in the treatment of anaplastic gliomas.** *J Neurosurg* 1976, **44**:655–667.
38. Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Owens G, Ransohoff J, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR, Wilson CB, Strike TA: **Randomized Comparisons of Radiotherapy and Nitrosoureas for the Treatment of Malignant Glioma after Surgery.** *N Engl J Med* 1980, **303**:1323–1329.
39. Walker MD, Strike TA, Sheline GE: **An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas.** *Int J Radiat Oncol* 1979, **5**:1725–1731.
40. Chang JE, Khuntia D, Robins HI, Mehta MP: **Radiotherapy and radiosensitizers in the treatment of glioblastoma multiforme.** *Clin Adv Hematol Oncol HO* 2007, **5**:894–902, 907–915.
41. Castro MG, Cowen R, Williamson IK, David A, Jimenez-Dalmaroni MJ, Yuan X, Bigliari A, Williams JC, Hu J, Lowenstein PR: **Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors.** *Pharmacol Ther* 2003, **98**:71–108.
42. Frappaz: **Standards, Options et Recommandations 2002 pour la prise en charge des patients atteints de gliomes intracrâniens de l'adulte (rapport abrégé).** *Bull Cancer (Paris)* 2003, **90**:873–886.
43. Ataman F, Poortmans P, Stupp R, Fisher B, Mirimanoff R-O: **Quality assurance of the EORTC 26981/22981; NCIC CE3 intergroup trial on radiotherapy with or without temozolomide for newly-diagnosed glioblastoma multiforme: the individual case review.** *Eur J Cancer* 2004, **40**:1724–1730.
44. Regine WF, Patchell RA, Strottmann JM, Meigooni A, Sanders M, Young B: **Combined stereotactic split-course fractionated gamma knife radiosurgery and conventional radiation therapy for unfavorable gliomas: a phase I study.** *J Neurosurg* 2000, **93**(supplement 3):37–41.
45. **Stereotactic Radiosurgery in the Management of Intracranial Gliomas (p. 117-126)** [<http://www.tcrt.org/c3015/c4107/Stereotactic-Radiosurgery-in-the-Management-of-Intracranial-Gliomas-p-117-126-p11650.html>]
46. Burdett S, Stewart L: **Chemotherapy for High-Grade Glioma.** *Neuroepidemiology* 2003, **22**:366–366.
47. Baker SD, Wirth M, Statkevich P, Reidenberg P, Alton K, Sartorius SE, Dugan M, Cutler D, Batra V, Grochow LB, Donehower RC, Rowinsky EK: **Absorption, Metabolism, and Excretion of 14C-**



**Temozolomide following Oral Administration to Patients with Advanced Cancer.** *Clin Cancer Res* 1999, **5**:309–317.

48. Zhu W: **Temozolomide for treatment of brain metastases: A review of 21 clinical trials.** *World J Clin Oncol* 2013, **5**:19.

49. Johansson F, Ekman S, Blomquist E, Henriksson R, Bergström S, Bergqvist M: **A review of dose-dense temozolomide alone and in combination with bevacizumab in patients with first relapse of glioblastoma.** *Anticancer Res* 2012, **32**:4001–4006.

50. Yung WKA, Prados MD, Yaya-Tur R, Rosenfeld SS, Brada M, Friedman HS, Albright R, Olson J, Chang SM, O'Neill AM, Friedman AH, Bruner J, Yue N, Dugan M, Zaknoen S, Levin VA: **Multicenter Phase II Trial of Temozolomide in Patients With Anaplastic Astrocytoma or Anaplastic Oligoastrocytoma at First Relapse.** *J Clin Oncol* 1999, **17**:2762–2762.

51. Yung WKA, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA: **A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse.** *Br J Cancer* 2000, **83**:588–593.

52. Neidle S, Thurston DE: **Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies.** *Nat Rev Cancer* 2005, **5**:285–296.

53. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff R-O: **Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial.** *Lancet Oncol* 2009, **10**:459–466.

54. Bastien JIL, McNeill KA, Fine HA: **Molecular characterizations of glioblastoma, targeted therapy, and clinical results to date.** *Cancer* 2014:n/a–n/a.

55. Keunen O, Johansson M, Oudin A, Sanzey M, Rahim SAA, Fack F, Thorsen F, Taxt T, Bartos M, Jirik R, Miletic H, Wang J, Stieber D, Stuhr L, Moen I, Rygh CB, Bjerkvig R, Niclou SP: **Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma.** *Proc Natl Acad Sci* 2011, **108**:3749–3754.

56. Gilbert MR, Kuhn J, Lamborn KR, Lieberman F, Wen PY, Mehta M, Cloughesy T, Lassman AB, DeAngelis LM, Chang S, Prados M: **Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03-02, a phase II trial with measures of treatment delivery.** *J Neurooncol* 2012, **106**:147–153.

57. Wick W, Cloughesy TF, Nishikawa R, Mason W, Saran F, Henriksson R, Hilton M, Kerloeguen Y, Chinot OL: **Tumor response based on adapted Macdonald criteria and assessment of pseudoprogression (PsPD) in the phase III AVAglio trial of bevacizumab (Bv) plus temozolomide (T) plus radiotherapy (RT) in newly diagnosed glioblastoma (GBM).** *J Clin Oncol* 2013, **31**(suppl; abstr 2002^).

58. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T: **Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma.** *N Engl J Med* 2014, **370**:709–722.

59. Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, Pope WB, Solis OE, Selch M, Filka E, Yong WH, Mischel PS, Liau LM, Phuphanich S, Black K, Peak S, Green RM, Spier CE, Kolevska T, Polikoff J, Fehrenbacher L, Elashoff R,

Cloughesy T: **Phase II Study of Bevacizumab Plus Temozolomide During and After Radiation Therapy for Patients With Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme.** *J Clin Oncol* 2011, **29**:142–148.

60. Garden AS, Maor MH, Yung WK, Bruner JM, Woo SY, Moser RP, Lee YY: **Outcome and patterns of failure following limited-volume irradiation for malignant astrocytomas.** *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 1991, **20**:99–110.

61. Massey V, Wallner KE: **Patterns of second recurrence of malignant astrocytomas.** *Int J Radiat Oncol* 1990, **18**:395–398.

62. Hou LC, Veeravagu A, Hsu AR, Tse VC: **Recurrent glioblastoma multiforme: a review of natural history and management options.** *Neurosurg Focus* 2006, **20**:E3.

63. Liu H-L, Yang H-W, Hua M-Y, Wei K-C: **Enhanced therapeutic agent delivery through magnetic resonance imaging-monitored focused ultrasound blood-brain barrier disruption for brain tumor treatment: an overview of the current preclinical status.** *Neurosurg Focus* 2011, **32**:E4.

64. Pardridge WM: **Drug and Gene Delivery to the Brain: The Vascular Route.** *Neuron* 2002, **36**:555–558.

65. Bhujbal SV, de Vos P, Niclou SP: **Drug and cell encapsulation: Alternative delivery options for the treatment of malignant brain tumors.** *Adv Drug Deliv Rev* 2014, **67–68**:142–153. [Cell Encapsulation and Drug Delivery]

66. Chahal M, Xu Y, Lesniak D, Graham K, Famulski K, Christensen JG, Aghi M, Jacques A, Murray D, Sabri S, Abdulkarim B: **MGMT modulates glioblastoma angiogenesis and response to the tyrosine kinase inhibitor sunitinib.** *Neuro-Oncol* 2010, **12**:822–833.

67. Chinot OL, Barrié M, Fuentes S, Eudes N, Lancelot S, Metellus P, Muracciole X, Braguer D, Ouafik L, Martin P-M, Dufour H, Figarella-Branger D: **Correlation Between O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase and Survival in Inoperable Newly Diagnosed Glioblastoma Patients Treated With Neoadjuvant Temozolomide.** *J Clin Oncol* 2007, **25**:1470–1475.

68. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR: **Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation With Clinical Outcomes in Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:4189–4199.

69. Benouaich-Amiel A, Simon J-M, Delattre J-Y: **Chimioradiothérapie concomitante des glioblastomes.** *Bull Cancer (Paris)* 2005, **92**:1065–1072.

70. Kargiotis O, Geka A, Rao JS, Kyritsis AP: **Effects of irradiation on tumor cell survival, invasion and angiogenesis.** *J Neurooncol* 2010, **100**:323–338.

71. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN: **Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response.** *Nature* 2006, **444**:756–760.

72. Koshkin PA, Chistiakov DA, Chekhonin VP: **Role of microRNAs in mechanisms of glioblastoma resistance to radio- and chemotherapy.** *Biochem Mosc* 2013, **78**:325–334.

73. Hardee ME, Zagzag D: **Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization.** *Am J Pathol* 2012, **181**:1126–1141.

74. **Recurrent Malignant Primary Brain Tumor: the Pathophysiology and Management** | InTechOpen [<http://www.intechopen.com/books/molecular-targets-of-cns-tumors/recurrent-malignant-primary-brain-tumor-the-pathophysiology-and-management>]
75. Combs SE, Debus J, Schulz-Ertner D: **Radiotherapeutic alternatives for previously irradiated recurrent gliomas**. *BMC Cancer* 2007, **7**:167.
76. Rostomily RC, Spence AM, Duong D, McCormick K, Bland M, Berger MS: **Multimodality management of recurrent adult malignant gliomas: results of a phase II multiagent chemotherapy study and analysis of cytoreductive surgery**. *Neurosurgery* 1994, **35**:378–388; discussion 388.
77. Barbagallo GMV, Jenkinson MD, Brodbelt AR: **“Recurrent” glioblastoma multiforme, when should we reoperate?**. *Br J Neurosurg* 2008, **22**:452–455.
78. Gorlia T, Stupp R, Brandes AA, Rampling RR, Fumoleau P, Ditttrich C, Campone MM, Twelves CC, Raymond E, Hegi ME, Lacombe D, van den Bent MJ: **New prognostic factors and calculators for outcome prediction in patients with recurrent glioblastoma: A pooled analysis of EORTC Brain Tumour Group phase I and II clinical trials**. *Eur J Cancer* 2012, **48**:1176–1184.
79. Hong B, Wiese B, Bremer M, Heissler HE, Heidenreich F, Krauss JK, Nakamura M: **Multiple microsurgical resections for repeated recurrence of glioblastoma multiforme**. *Am J Clin Oncol* 2013, **36**:261–268.
80. Mrugala MM: **Advances and Challenges in the Treatment of Glioblastoma: A Clinician’s Perspective**. *Discov Med* 2013, **15**:221–230.
81. Skeie BS, Enger PØ, Brøgger J, Ganz JC, Thorsen F, Heggdal JI, Pedersen P-H: **Gamma Knife Surgery versus Reoperation for Recurrent Glioblastoma Multiforme**. *World Neurosurg* 2012, **78**:658–669.
82. Torok JA, Wegner RE, Mintz AH, Heron DE, Burton SA: **Re-irradiation with Radiosurgery for Recurrent Glioblastoma Multiforme**. *Technol Cancer Res Treat* 2011, **10**:253–258.
83. Vordermark D, Kölbl O, Ruprecht K, Vince GH, Bratengeier K, Flentje M: **Hypofractionated stereotactic re-irradiation: treatment option in recurrent malignant glioma**. *BMC Cancer* 2005, **5**:55.
84. Salzman M: **The value of cytoreductive surgery**. *Clin Neurosurg* 1994, **41**:464–488.
85. Addeo R, Perri F, Parlato C, Della Vittoria G: **ASCO 2013: bevacizumab and glioblastoma - a marriage dissolution?**. *Curr Med Res Opin* 2014, **30**:1871–1873.
86. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS: **Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme**. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2007, **25**:4722–4729.
87. Reardon DA, Desjardins A, Peters KB, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Sampson JH, McLendon RE, Herndon JE, Coan A, Threath S, Friedman AH, Friedman HS: **Phase 2 study of carboplatin, irinotecan, and bevacizumab for recurrent glioblastoma after progression on bevacizumab therapy**. *Cancer* 2011, **117**:5351–5358.
88. Francesconi AB, Dupre S, Matos M, Martin D, Hughes BG, Wyld DK, Lickliter JD: **Carboplatin and etoposide combined with bevacizumab for the treatment of recurrent glioblastoma multiforme**. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas* 2010, **17**:970–974.

89. Jakobsen JN, Hasselbalch B, Stockhausen M-T, Lassen U, Poulsen HS: **Irinotecan and bevacizumab in recurrent glioblastoma multiforme**. *Expert Opin Pharmacother* 2011, **12**:825–833.
90. Goodhead DT: **The initial physical damage produced by ionizing radiations**. *Int J Radiat Biol* 1989, **56**:623–634.
91. Azzam EI, Jay-Gerin J-P, Pain D: **Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury**. *Cancer Lett* 2012, **327**:48–60. [Special Issue: Oxidative Stress-Based Cancer Biomarkers]
92. Finkel T, Holbrook NJ: **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing**. *Nature* 2000, **408**:239–247.
93. Morgan WF, Sowa MB: **Effects of ionizing radiation in nonirradiated cells**. *Proc Natl Acad Sci* 2005, **102**:14127–14128.
94. Moustacchi E: **DNA damage and repair: consequences on dose-responses**. *Mutat Res* 2000, **464**:35–40.
95. Deinzer CKW, Danova D, Kleb B, Klose KJ, Heverhagen JT: **Influence of different iodinated contrast media on the induction of DNA double-strand breaks after in vitro X-ray irradiation**. *Contrast Media Mol Imaging* 2014, **9**:259–267.
96. **Repair of Radiation-induced DNA Double-strand Breaks in Human Cells: History, Progress and Controversies (pp. 273-294)** [[https://www.novapublishers.com/catalog/product\\_info.php?products\\_id=43821](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=43821)]
97. Kesari S, Advani SJ, Lawson JD, Kahle KT, Ng K, Carter B, Chen CC: **DNA damage response and repair: insights into strategies for radiation sensitization of gliomas**. *Future Oncol* 2011, **7**:1335–1346.
98. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Wang Y, Murray D: **Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status**. *Int J Mol Sci* 2013, **14**:22409–22435.
99. Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D: **New Insights into p53 Signaling and Cancer Cell Response to DNA Damage: Implications for Cancer Therapy**. *BioMed Res Int* 2012, **2012**:e170325.
100. Langerak P, Mejia-Ramirez E, Limbo O, Russell P: **Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks**. *PLoS Genet* 2011, **7**:e1002271.
101. Kass EM, Helgadottir HR, Chen C-C, Barbera M, Wang R, Westermarck UK, Ludwig T, Moynahan ME, Jasin M: **Double-strand break repair by homologous recombination in primary mouse somatic cells requires BRCA1 but not the ATM kinase**. *Proc Natl Acad Sci* 2013, **110**:5564–5569.
102. Burma S, Chen BPC, Chen DJ: **Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity**. *DNA Repair* 2006, **5**:1042–1048. [Mechanisms of Chromosomal Translocation]
103. Rass E, Grabarz A, Bertrand P, Lopez B-S: **Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre: la ligature d'extrémités non homologues alternative**. *Cancer/Radiothérapie* 2012, **16**:1–10. [Dossier "Radiobiologie" (2e Partie), Coordonné Par Eric Deutsch]
104. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J: **Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair**. *Nature* 2001, **412**:607–614.

105. Puck TT, Morkovin D, Marcus PI, Cieciora SJ: **ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS.** *J Exp Med* 1957, **106**:485–500.
106. D'Amico AV, McKenna WG: **Apoptosis and a re-investigation of the biologic basis for cancer therapy.** *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol* 1994, **33**:3–10.
107. Mahmood Z, Shukla Y: **Death receptors: Targets for cancer therapy.** *Exp Cell Res* 2010, **316**:887–899.
108. Marchetti P: **L'apoptose : bases fondamentales et applications médicales.** *Gynécologie Obstétrique Fertil* 2005, **33**:632–641.
109. Kumariya R: **p53-Cells' Inbuilt Mechanism to Inhibit Cancer through Apoptosis.** *J Cancer Sci Ther* 2012, **04**.
110. Liu B, Bhatt D, Oltvai ZN, Greenberger JS, Bahar I: **Significance of p53 dynamics in regulating apoptosis in response to ionizing radiation, and polypharmacological strategies.** *Sci Rep* 2014, **4**:6245.
111. Green DR, Kroemer G: **Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53.** *Nature* 2009, **458**:1127–1130.
112. Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM: **p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis.** *Cell* 2012, **149**:1536–1548.
113. Godoy PRDV, Mello SS, Magalhães DAR, Donaires FS, Nicolucci P, Donadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET: **Ionizing radiation-induced gene expression changes in TP53 proficient and deficient glioblastoma cell lines.** *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 2013, **756**:46–55.
114. Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P: **Cell death in the nervous system.** *Nature* 2006, **443**:796–802.
115. Normando EM, Turner LA, Cordeiro MF: **The potential of annexin-labelling for the diagnosis and follow-up of glaucoma.** *Cell Tissue Res* 2013, **353**:279–285.
116. Chu P-M, Chiou S-H, Su T-L, Lee Y-J, Chen L-H, Chen Y-W, Yen S-H, Chen M-T, Chen M-H, Shih Y-H, Tu P-H, Ma H-I: **Enhancement of radiosensitivity in human glioblastoma cells by the DNA N-mustard alkylating agent BO-1051 through augmented and sustained DNA damage response.** *Radiat Oncol* 2011, **6**:7.
117. Buchanan IM, Scott T, Tandle AT, Burgan WE, Burgess TL, Tofilon PJ, Camphausen K: **Radiosensitization of glioma cells by modulation of Met signalling with the hepatocyte growth factor neutralizing antibody, AMG102.** *J Cell Mol Med* 2011, **15**:1999–2006.
118. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B: **Death through a tragedy: mitotic catastrophe.** *Cell Death Differ* 2008, **15**:1153–1162.
119. Imreh G, Norberg HV, Imreh S, Zhivotovsky B: **Chromosomal breaks during mitotic catastrophe trigger  $\gamma$ H2AX-ATM-p53-mediated apoptosis.** *J Cell Sci* 2011, **124**:2951–2963.
120. Castedo M, Perfettini J-L, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G: **Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition.** *Oncogene* 2004, **23**:2825–2837.
121. **Conséquence sur la cellule - Moyens de lutte contre le cancer du poumon** [<http://tpe-cancer-poumon-traitements-pss-1ere-s.e-monsite.com/pages/radiotherapie/consequence-sur-la-cellule.html>]

122. Riesterer O, Matsumoto F, Wang L, Pickett J, Molkentine D, Giri U, Milas L, Raju U: **A novel Chk inhibitor, XL-844, increases human cancer cell radiosensitivity through promotion of mitotic catastrophe.** *Invest New Drugs* 2011, **29**:514–522.
123. Oike T, Komachi M, Ogiwara H, Amornwichee N, Saitoh Y, Torikai K, Kubo N, Nakano T, Kohno T: **C646, a selective small molecule inhibitor of histone acetyltransferase p300, radiosensitizes lung cancer cells by enhancing mitotic catastrophe.** *Radiother Oncol* 2014, **111**:222–227.
124. Lv P, Wang Y, Ma J, Wang Z, Li J-L, Hong CS, Zhuang Z, Zeng Y-X: **Inhibition of protein phosphatase 2A with a small molecule LB100 radiosensitizes nasopharyngeal carcinoma xenografts by inducing mitotic catastrophe and blocking DNA damage repair.** *Oncotarget* 2014, **5**:7512–7524.
125. Chu S-H, Karri S, Ma Y-B, Feng D-F, Li Z-Q: **In vitro and in vivo radiosensitization induced by hydroxyapatite nanoparticles.** *Neuro-Oncol* 2013, **15**:880–890.
126. Milanović D, Firat E, Grosu AL, Niedermann G: **Increased radiosensitivity and radiothermosensitivity of human pancreatic MIA PaCa-2 and U251 glioblastoma cell lines treated with the novel Hsp90 inhibitor NVP-HSP990.** *Radiat Oncol* 2013, **8**:42.
127. Quick QA, Gewirtz DA: **An accelerated senescence response to radiation in wild-type p53 glioblastoma multiforme cells.** *J Neurosurg* 2006, **105**:111–118.
128. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS: **The essence of senescence.** *Genes Dev* 2010, **24**:2463–2479.
129. Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP: **Pro-senescence therapy for cancer treatment.** *Nat Rev Cancer* 2011, **11**:503–511.
130. Sabin RJ, Anderson RM: **Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation.** *Genome Integr* 2011, **2**:7.
131. Roninson IB: **Tumor cell senescence in cancer treatment.** *Cancer Res* 2003, **63**:2705–2715.
132. Lee J-J, Kim BC, Park M-J, Lee Y-S, Kim Y-N, Lee BL, Lee J-S: **PTEN status switches cell fate between premature senescence and apoptosis in glioma exposed to ionizing radiation.** *Cell Death Differ* 2011, **18**:666–677.
133. Nagasawa H, Little JB: **Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of  $\alpha$ -particles.** *Cancer Res* 1992, **52**:6394–6396.
134. Zhou H, Randers-Pehrson G, Waldren CA, Vannais D, Hall EJ, Hei TK: **Induction of a bystander mutagenic effect of alpha particles in mammalian cells.** *Proc Natl Acad Sci* 2000, **97**:2099–2104.
135. Rzeszowska-Wolny J, Herok R, Widel M, Hancock R: **X-irradiation and bystander effects induce similar changes of transcript profiles in most functional pathways in human melanoma cells.** *DNA Repair* 2009, **8**:732–738.
136. Przybyszewski WM, Widel M, Szurko A, Lubecka B, Matulewicz L, Maniakowski Z, Polaniak R, Birkner E, Rzeszowska-Wolny J: **Multiple bystander effect of irradiated megacolonies of melanoma cells on non-irradiated neighbours.** *Cancer Lett* 2004, **214**:91–102.
137. Sedelnikova OA, Nakamura A, Kovalchuk O, Koturbash I, Mitchell SA, Marino SA, Brenner DJ, Bonner WM: **DNA Double-Strand Breaks Form in Bystander Cells after Microbeam Irradiation of Three-dimensional Human Tissue Models.** *Cancer Res* 2007, **67**:4295–4302.

138. Kandouz M: **Hopes and Disillusions in Therapeutic Targeting of Intercellular Communication in Cancer.** In *Gene Ther - Dev Future Perspect*. Edited by Kang C. InTech; 2011.
139. Al-Mayah AHJ, Irons SL, Pink RC, Carter DRF, Kadhim MA: **Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation.** *Radiat Res* 2012, **177**:539–545.
140. Azzam EI, Toledo SM de, Little JB: **Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from  $\alpha$ -particle irradiated to nonirradiated cells.** *Proc Natl Acad Sci* 2001, **98**:473–478.
141. Hickman AW, Jaramillo RJ, Lechner JF, Johnson NF: **Alpha-particle-induced p53 protein expression in a rat lung epithelial cell strain.** *Cancer Res* 1994, **54**:5797–5800.
142. Iyer R, Lehnert BE, Svensson R: **Factors underlying the cell growth-related bystander responses to alpha particles.** *Cancer Res* 2000, **60**:1290–1298.
143. Herok R, Konopacka M, Polanska J, Swierniak A: **Bystander Effects Induced by Medium From Irradiated Cells: Similar Transcriptome Responses in Irradiated and Bystander K562 Cells.** *Int J Radiat Oncol* 2010, **77**:244–252.
144. Wild-Bode C, Weller M, Rimner A, Dichgans J, Wick W: **Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells Implications for radiotherapy of human glioblastoma.** *Cancer Res* 2001, **61**:2744–2750.
145. Abdollahi A, Griggs DW, Zieher H, Roth A, Lipson KE, Saffrich R, Gröne H-J, Hallahan DE, Reisfeld RA, Debus J, Niethammer AG, Huber PE: **Inhibition of  $\alpha\beta 3$  Integrin Survival Signaling Enhances Antiangiogenic and Antitumor Effects of Radiotherapy.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:6270–6279.
146. Chung Y-L, Jian JJ-M, Cheng SH, Tsai SYC, Chuang VP, Soong T, Lin Y-M, Horng C-F: **Sublethal Irradiation Induces Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Growth of Hepatoma Cells: Implications for Radiotherapy of Hepatocellular Carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:2706–2715.
147. Rofstad EK, Mathiesen B, Galappathi K: **Increased metastatic dissemination in human melanoma xenografts after subcurative radiation treatment: radiation-induced increase in fraction of hypoxic cells and hypoxia-induced up-regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor.** *Cancer Res* 2004, **64**:13–18.
148. Cordes N, Hansmeier B, Beinke C, Meineke V, van Beuningen D: **Irradiation differentially affects substratum-dependent survival, adhesion, and invasion of glioblastoma cell lines.** *Br J Cancer* 2003, **89**:2122–2132.
149. Park C-M, Park M-J, Kwak H-J, Lee H-C, Kim M-S, Lee S-H, Park I-C, Rhee CH, Hong S-I: **Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways.** *Cancer Res* 2006, **66**:8511–8519.
150. Kil W, Tofilon PJ, Camphausen K: **Post-radiation increase in VEGF enhances glioma cell motility in vitro.** *Radiat Oncol* 2012, **7**:25.
151. Kargiotis O, Rao JS, Kyritsis AP: **Mechanisms of angiogenesis in gliomas.** *J Neurooncol* 2006, **78**:281–293.

152. Geng L, Donnelly E, McMahon G, Lin PC, Sierra-Rivera E, Oshinka H, Hallahan DE: **Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy.** *Cancer Res* 2001, **61**:2413–2419.
153. Vincenti S, Brillante N, Lanza V, Bozzoni I, Presutti C, Chiani F, Etna MP, Negri R: **HUVEC respond to radiation by inducing the expression of pro-angiogenic microRNAs.** *Radiat Res* 2011, **175**:535–546.
154. Sofia Vala I, Martins LR, Imaizumi N, Nunes RJ, Rino J, Kuonen F, Carvalho LM, Rüegg C, Grillo IM, Barata JT, Mareel M, Santos SCR: **Low Doses of Ionizing Radiation Promote Tumor Growth and Metastasis by Enhancing Angiogenesis.** *PLoS ONE* 2010, **5**:e11222.
155. Kleibeuker EA, Griffioen AW, Verheul HM, Slotman BJ, Thijssen VL: **Combining angiogenesis inhibition and radiotherapy: A double-edged sword.** *Drug Resist Updat* 2012, **15**:173–182.
156. Madani I, De Neve W, Mareel M: **Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis?.** *Bull Cancer (Paris)* 2008, **95**:292–300.
157. Jadhav U, Mohanam S: **Response of neuroblastoma cells to ionizing radiation: Modulation of in vitro invasiveness and angiogenesis of human microvascular endothelial cells.** *Int J Oncol* 2006.
158. Maddirela J: **MMP-2 suppression abrogates irradiation-induced microtubule formation in endothelial cells by inhibiting  $\alpha\beta 3$ -mediated SDF-1/CXCR4 signaling.** *Int J Oncol* 2013.
159. Parthymou A, Kardamakis D, Pavlopoulos I, Papadimitriou E: **Irradiated C6 glioma cells induce angiogenesis in vivo and activate endothelial cells in vitro.** *Int J Cancer J Int Cancer* 2004, **110**:807–814.
160. Kim Y-H, Yoo K-C, Cui Y-H, Uddin N, Lim E-J, Kim M-J, Nam S-Y, Kim I-G, Suh Y, Lee S-J: **Radiation promotes malignant progression of glioma cells through HIF-1 $\alpha$  stabilization.** *Cancer Lett* 2014.
161. Chen Y-H, Pan S-L, Wang J-C, Kuo S-H, Cheng JC-H, Teng C-M: **Radiation-induced VEGF-C expression and endothelial cell proliferation in lung cancer.** *Strahlenther Onkol* 2014:1–9.
162. Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD: **New insights on cell death from radiation exposure.** *Lancet Oncol* 2005, **6**:520–528.
163. Pucci F, Pittet MJ: **Molecular pathways: tumor-derived microvesicles and their interactions with immune cells in vivo.** *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2013, **19**:2598–2604.
164. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J: **Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:619–624.
165. Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F: **Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages.** *Am J Physiol - Cell Physiol* 2014, **306**:C621–C633.
166. Raposo G, Stoorvogel W: **Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends.** *J Cell Biol* 2013, **200**:373–383.
167. Vader P, Breakefield XO, Wood MJA: **Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy.** *Trends Mol Med* 2014, **20**:385–393.



168. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger É, Pap E, Kittel Á, Nagy G, Falus A, Buzás EI: **Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles.** *Cell Mol Life Sci* 2011, **68**:2667–2688.
169. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC: **Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro.** *Blood* 2004, **104**:2761–2766.
170. Van der Heyde HC, Gramaglia I, Combes V, George TC, Grau GE: **Flow cytometric analysis of microparticles.** *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2011, **699**:337–354.
171. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S: **Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles.** *J Immunol Baltim Md 1950* 2001, **166**:7309–7318.
172. Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C: **Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses.** *Traffic* 2011, **12**:1659–1668.
173. Piper RC, Katzmann DJ: **Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007, **23**:519–547.
174. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC: **Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies.** *J Neurooncol* 2013, **113**:1–11.
175. Schmidt O, Teis D: **The ESCRT machinery.** *Curr Biol* 2012, **22**:R116–R120.
176. Gulbins E, Kolesnick R: **Raft ceramide in molecular medicine.** *Oncogene* 2003, **22**:7070–7077.
177. Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J: **A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function.** *Nature* 1998, **392**:193–197.
178. Chevallier J, Chamoun Z, Jiang G, Prestwich G, Sakai N, Matile S, Parton RG, Gruenberg J: **Lysobisphosphatidic Acid Controls Endosomal Cholesterol Levels.** *J Biol Chem* 2008, **283**:27871–27880.
179. Falguières T, Luyet P-P, Bissig C, Scott CC, Velluz M-C, Gruenberg J: **In Vitro Budding of Intraluminal Vesicles into Late Endosomes Is Regulated by Alix and Tsg101.** *Mol Biol Cell* 2008, **19**:4942–4955.
180. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G: **Cells release prions in association with exosomes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:9683–9688.
181. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM: **Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes.** *J Cell Biol* 1985, **101**:942–948.
182. Clark MJ, Homer N, O'Connor BD, Chen Z, Eskin A, Lee H, Merriman B, Nelson SF: **U87MG Decoded: The Genomic Sequence of a Cytogenetically Aberrant Human Cancer Cell Line.** *PLoS Genet* 2010, **6**:e1000832.
183. Freyssinet J-M: **Cellular microparticles: what are they bad or good for?.** *J Thromb Haemost JTH* 2003, **1**:1655–1662.
184. Pap E, Pállinger é., Pásztói M, Falus A: **Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer.** *Inflamm Res* 2009, **58**:1–8.

185. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C: **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression.** *J Cell Sci* 2010, **123**:1603–1611.
186. Hoffman EA, Perkumas KM, Highstrom LM, Stamer WD: **Regulation of Myocilin-Associated Exosome Release from Human Trabecular Meshwork Cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009, **50**:1313–1318.
187. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R: **Microparticles in cardiovascular diseases.** *Cardiovasc Res* 2003, **59**:277–287.
188. Wysoczynski M, Ratajczak MZ: **Lung cancer secreted microvesicles: Underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors.** *Int J Cancer* 2009, **125**:1595–1603.
189. King HW, Michael MZ, Gleadle JM: **Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells.** *BMC Cancer* 2012, **12**:421.
190. Yu X: **The Regulation of Exosome Secretion: a Novel Function of the p53 Protein.** *Cancer Res* 2006, **66**:4795–4801.
191. Lehmann BD, Paine MS, Brooks AM, McCubrey JA, Renegar RH, Wang R, Terrian DM: **Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells.** *Cancer Res* 2008, **68**:7864–7871.
192. Shao H, Chung J, Balaj L, Charest A, Bigner DD, Carter BS, Hochberg FH, Breakefield XO, Weissleder R, Lee H: **Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy.** *Nat Med* 2012, **18**:1835–1840.
193. Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C: **Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression.** *J Cell Sci* 2010, **123**:1603–1611.
194. Théry C, Ostrowski M, Segura E: **Membrane vesicles as conveyors of immune responses.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:581–593.
195. Natasha G, Gundogan B, Tan A, Farhatnia Y, Wu W, Rajadas J, Seifalian AM: **Exosomes as Immunotheranostic Nanoparticles.** *Clin Ther* 2014, **36**:820–829.
196. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J: **Shedding microvesicles: artefacts no more.** *Trends Cell Biol* 2009, **19**:43–51.
197. Sun Y, Liu J: **Potential of Cancer Cell-Derived Exosomes in Clinical Application: A Review of Recent Research Advances.** *Clin Ther* 2014, **36**:863–872.
198. Wieckowski E, Whiteside TL: **Human tumor-derived vs dendritic cell-derived exosomes have distinct biologic roles and molecular profiles.** *Immunol Res* 2006, **36**:247–254.
199. Whiteside TL: **Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes).** *Biochem Soc Trans* 2013, **41**:245–251.
200. Choi D-S, Park JO, Jang SC, Yoon YJ, Jung JW, Choi D-Y, Kim J-W, Kang JS, Park J, Hwang D, Lee K-H, Park S-H, Kim Y-K, Desiderio DM, Kim KP, Gho YS: **Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites.** *PROTEOMICS* 2011, **11**:2745–2751.
201. Sandvig K, Llorente A: **Proteomic Analysis of Microvesicles Released by the Human Prostate Cancer Cell Line PC-3.** *Mol Cell Proteomics* 2012, **11**:M111.012914.

202. Park JO, Choi D-Y, Choi D-S, Kim HJ, Kang JW, Jung JH, Lee JH, Kim J, Freeman MR, Lee KY, Gho YS, Kim KP: **Identification and characterization of proteins isolated from microvesicles derived from human lung cancer pleural effusions.** *PROTEOMICS* 2013, **13**:2125–2134.
203. Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD: **Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes.** *FASEB J* 2009, **23**:1541–1557.
204. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO: **Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers.** *Nat Cell Biol* 2008, **10**:1470–1476.
205. Hill AF, Michiel Pegtel D, Lambertz U, Leonardi T, O’Driscoll L, Pluchino S, Ter-Ovanesyan D, Nolte-t Hoen ENM: **ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics.** *J Extracell Vesicles* 2013, **2**.
206. Choi D-S, Kim D-K, Kim Y-K, Gho YS: **Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes.** *PROTEOMICS* 2013, **13**:1554–1571.
207. Li CCY, Eaton SA, Young PE, Lee M, Shuttleworth R, Humphreys DT, Grau GE, Combes V, Bebawy M, Gong J, Brammah S, Buckland ME, Suter CM: **Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and noncoding RNAs which alter gene expression in recipient cells.** *RNA Biol* 2013, **10**:1333–1344.
208. Noerholm M, Balaj L, Limperg T, Salehi A, Zhu LD, Hochberg FH, Breakefield XO, Carter BS, Skog J: **RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls.** *BMC Cancer* 2012, **12**:22.
209. Gasser O, Schifferli JA: **Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis.** *Blood* 2004, **104**:2543–2548.
210. Ann Mulcahy L, Charles Pink R, Raul Francisco Carter D: **Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake.** *J Extracell Vesicles* 2014, **3**.
211. Christianson HC, Svensson KJ, Kuppevelt TH van, Li J-P, Belting M: **Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity.** *Proc Natl Acad Sci* 2013, **110**:17380–17385.
212. Tian T, Zhu Y-L, Hu F-H, Wang Y-Y, Huang N-P, Xiao Z-D: **Dynamics of exosome internalization and trafficking.** *J Cell Physiol* 2013, **228**:1487–1495.
213. Fitzner D, Schnaars M, Rossum D van, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, Regen T, Hanisch U-K, Simons M: **Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis.** *J Cell Sci* 2011, **124**:447–458.
214. Chernomordik LV, Kozlov MM: **Mechanics of membrane fusion.** *Nat Struct Mol Biol* 2008, **15**:675–683.
215. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Beer Stolz D, Sullivan MLG, Karlsson JM, Baty CJ, Gibson GA, Erdos G, Wang Z, Milosevic J, Tkacheva OA, Divito SJ, Jordan R, Lyons-Weiler J, Watkins SC, Morelli AE: **Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes.** *Blood* 2012, **119**:756–766.
216. Valapala M, Vishwanatha JK: **Lipid Raft Endocytosis and Exosomal Transport Facilitate Extracellular Trafficking of Annexin A2.** *J Biol Chem* 2011, **286**:30911–30925.

217. Kirchhausen T: **Clathrin**. *Annu Rev Biochem* 2000, **69**:699–727.
218. Swanson JA: **Shaping cups into phagosomes and macropinosomes**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:639–649.
219. Doherty GJ, McMahon HT: **Mechanisms of Endocytosis**. *Annu Rev Biochem* 2009, **78**:857–902.
220. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan MLG, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, Louis D, Falo J, Thomson AW: **Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells**. *Blood* 2004, **104**:3257–3266.
221. Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, Igarashi Y: **Sphingolipid-modulated Exosome Secretion Promotes Clearance of Amyloid- $\beta$  by Microglia**. *J Biol Chem* 2012, **287**:10977–10989.
222. Nazarenko I, Rana S, Baumann A, McAlear J, Hellwig A, Trendelenburg M, Lochnit G, Preissner KT, Zoller M: **Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation**. *Cancer Res* 2010, **70**:1668–1678.
223. Köppler B, Cohen C, Schlöndorff D, Mack M: **Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles**. *Eur J Immunol* 2006, **36**:648–660.
224. Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Szatanek R, Mytar B, Siedlar M, Zembala M: **Interactions of human monocytes with TMVs (tumour-derived microvesicles)**. *Biochem Soc Trans* 2013, **41**:268–272.
225. Van Doormaal FF, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller HR, Nieuwland R: **Cell-derived microvesicles and cancer**. *Neth J Med* 2009, **67**:266–73.
226. Abid Hussein MN, Böing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R: **Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment**. *Thromb Haemost* 2007.
227. Hakulinen J, Sankkila L, Sugiyama N, Lehti K, Keski-Oja J: **Secretion of active membrane type 1 matrix metalloproteinase (MMP-14) into extracellular space in microvesicular exosomes**. *J Cell Biochem* 2008, **105**:1211–1218.
228. Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Pilla L, Sovena G, Villa A, Corbelli A, Fais S, Parmiani G, Rivoltini L: **Human Tumor-Released Microvesicles Promote the Differentiation of Myeloid Cells with Transforming Growth Factor- $\beta$ -Mediated Suppressive Activity on T Lymphocytes**. *Cancer Res* 2006, **66**:9290–9298.
229. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, Seregini E, Valenti R, Ballabio G, Belli F, Leo E, Parmiani G, Rivoltini L: **Human Colorectal Cancer Cells Induce T-Cell Death Through Release of Proapoptotic Microvesicles: Role in Immune Escape**. *Gastroenterology* 2005, **128**:1796–1804.
230. Ye S, Li Z-L, Luo D, Huang B, Chen Y-S, Zhang X, Cui J, Zeng Y, Li J: **Tumor-derived exosomes promote tumor progression and T-cell dysfunction through the regulation of enriched exosomal microRNAs in human nasopharyngeal carcinoma**. *Oncotarget* 2014, **5**:5439–5452.
231. Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Whiteside TL, Boyiadzis M: **Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- $\beta$ 1**. *Haematologica* 2011, **96**:1302–1309.
232. Mu W, Rana S, Zöller M: **Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness**. *Neoplasia N Y N* 2013, **15**:875–887.

233. Hannafon BN, Ding W-Q: **Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer.** *Int J Mol Sci* 2013, **14**:14240–14269.
234. O'Brien K, Rani S, Corcoran C, Wallace R, Hughes L, Friel AM, McDonnell S, Crown J, Radomski MW, O'Driscoll L: **Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells.** *Eur J Cancer* 2013, **49**:1845–1859.
235. McCreedy J, Sims JD, Chan D, Jay DG: **Secretion of extracellular hsp90 $\alpha$  via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation.** *BMC Cancer* 2010, **10**:294.
236. Arscott WT, Tandle AT, Zhao S, Shabason JE, Gordon IK, Schlaff CD, Zhang G, Tofilon PJ, Camphausen KA: **Ionizing Radiation and Glioblastoma Exosomes: Implications in Tumor Biology and Cell Migration.** *Transl Oncol* 2013, **6**:638–IN6.
237. Suetsugu A, Honma K, Saji S, Moriwaki H, Ochiya T, Hoffman RM: **Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models.** *Adv Drug Deliv Rev* 2013, **65**:383–390. [*Exosomes; a Key to Delivering Genetic Materials*]
238. Castellana D, Kunzelmann C, Freyssinet JM: **Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression.** *Hamostaseologie* 2009, **29**:51–7.
239. Leroyer AS, Lacroix R, Dignat-George F: **Microparticules et cancers.** *VEGF Act* 2011, **23**:7–9.
240. Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hirata N, Kitahara S, Maishi N, Osawa T, Yamamoto K, Kondoh M, Shindoh M, Hida Y, Hida K: **Tumor-Derived Microvesicles Induce Proangiogenic Phenotype in Endothelial Cells via Endocytosis.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e34045.
241. Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G: **Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche.** *Cancer Res* 2011, **71**:5346–5356.
242. Kim CW, Lee HM, Lee TH, Kang C, Kleinman HK, Gho YS: **Extracellular Membrane Vesicles from Tumor Cells Promote Angiogenesis via Sphingomyelin.** *Cancer Res* 2002, **62**:6312–6317.
243. Kucharzewska P, Belting M: **Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress.** *J Extracell Vesicles* 2013, **2**.
244. Shedden K, Xie XT, Chandaroy P, Chang YT, Rosania GR: **Expulsion of Small Molecules in Vesicles Shed by Cancer Cells Association with Gene Expression and Chemosensitivity Profiles.** *Cancer Res* 2003, **63**:4331–4337.
245. Safaei R, Larson BJ, Cheng TC, Gibson MA, Otani S, Naerdemann W, Howell SB: **Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells.** *Mol Cancer Ther* 2005, **4**:1595–1604.
246. Battke C, Ruiss R, Welsch U, Wimberger P, Lang S, Jochum S, Zeidler R: **Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC.** *Cancer Immunol Immunother* 2011, **60**:639–648.
247. Chen W, Cai Y, Lv M, Chen L, Zhong S, Ma T, Zhao J, Tang J: **Exosomes from docetaxel-resistant breast cancer cells alter chemosensitivity by delivering microRNAs.** *Tumor Biol* 2014:1–11.

248. Kim HK, Song KS, Park YS, Kang YH, Lee YJ, Lee KR, Kim HK, Ryu KW, Bae JM, Kim S: **Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor.** *Eur J Cancer* 2003, **39**:184–191.
249. Aspe JR, Diaz Osterman CJ, Jutzy JMS, Deshields S, Whang S, Wall NR: **Enhancement of Gemcitabine sensitivity in pancreatic adenocarcinoma by novel exosome-mediated delivery of the Survivin-T34A mutant.** *J Extracell Vesicles* 2014, **3**.
250. Radisic M, Iyer RK, Murthy SK: **Micro- and nanotechnology in cell separation.** *Int J Nanomedicine* 2006, **1**:3.
251. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, D'Souza-Schorey C: **ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived Plasma Membrane Microvesicles.** *Curr Biol* 2009, **19**:1875–1885.
252. D'Souza-Schorey C, Clancy JW: **Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers.** *Genes Dev* 2012, **26**:1287–1299.
253. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A: **Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids.** *Curr Protoc Cell Biol Editor Board Juan Bonifacino AI* 2006, **Chapter 3**:Unit 3.22.
254. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-’t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F: **Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research.** *J Extracell Vesicles* 2013, **2**.
255. Dieckmann Y, Cölfen H, Hofmann H, Petri-Fink A: **Particle Size Distribution Measurements of Manganese-Doped ZnS Nanoparticles.** *Anal Chem* 2009, **81**:3889–3895.
256. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, Carr B, Redman CWG, Harris AL, Dobson PJ, Harrison P, Sargent IL: **Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis.** *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2011, **7**:780–788.
257. Webber J, Clayton A: **How pure are your vesicles?.** *J Extracell Vesicles* 2013, **2**.
258. Varga Z, Yuana Y, Grootemaat AE, van der Pol E, Gollwitzer C, Krumrey M, Nieuwland R: **Towards traceable size determination of extracellular vesicles.** *J Extracell Vesicles* 2014, **3**.
259. Van Der POL E, Van GEMERT MJC, Sturk A, Nieuwland R, Van LEEUWEN TG: **Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry: Detection of microparticles and exosomes.** *J Thromb Haemost* 2012, **10**:919–930.
260. Lacroix R, Robert S, Poncelet P, Kasthuri RS, Key NS, Dignat-George F, ON BEHALF OF THE ISTH SSC WORKSHOP: **Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop: Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry.** *J Thromb Haemost* 2010, **8**:2571–2574.
261. Rana S, Yue S, Stadel D, Zöller M: **Toward tailored exosomes: The exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection.** *Int J Biochem Cell Biol* 2012, **44**:1574–1584.
262. Koumangoye RB, Sakwe AM, Goodwin JS, Patel T, Ochieng J: **Detachment of Breast Tumor Cells Induces Rapid Secretion of Exosomes Which Subsequently Mediate Cellular Adhesion and Spreading.** *PLoS ONE* 2011, **6**:e24234.

263. Zhou Y, Wang Y, Lin Q: **A Microfluidic Device for Continuous-Flow Magnetically Controlled Capture and Isolation of Microparticles.** *J Microelectromechanical Syst* 2010, **19**:743–751.
264. Brem S, Cotran R, Folkman J: **Tumor Angiogenesis: A Quantitative Method for Histologic Grading.** *J Natl Cancer Inst* 1972, **48**:347–356.
265. Semenza GL: **Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics.** *Oncogene* 2009, **29**:625–634.
266. Zagzag D, Amirnovin R, Greco MA, Yee H, Holash J, Wiegand SJ, Zabski S, Yancopoulos GD, Grumet M: **Vascular apoptosis and involution in gliomas precede neovascularization: a novel concept for glioma growth and angiogenesis.** *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2000, **80**:837–849.
267. Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ: **Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and VEGF.** *Science* 1999, **284**:1994–1998.
268. Carmeliet P, Jain RK: **Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.** *Nature* 2011, **473**:298–307.
269. Reiss Y, Machein MR, Plate KH: **The Role of Angiopoietins During Angiogenesis in Gliomas.** *Brain Pathol* 2005, **15**:311–317.
270. Goodwin AM: **In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents.** *Microvasc Res* 2007, **74**:172–183.
271. Sudhakar A: **The Matrix Reloaded: New Insights from Type IV Collagen Derived Endogenous Angiogenesis Inhibitors and their Mechanism of Action.** *J Bioequivalence Bioavailab* 2009, **01**:052–062.
272. Fischer I, Gagner J-P, Law M, Newcomb EW, Zagzag D: **Angiogenesis in Gliomas: Biology and Molecular Pathophysiology.** *Brain Pathol* 2005, **15**:297–310.
273. Mentlein R, Held-Feindt J: **Angiogenesis factors in gliomas: a new key to tumour therapy?.** *Naturwissenschaften* 2003, **90**:385–394.
274. Mentlein R, Eichler O, Forstreuter F, Held-Feindt J: **Somatostatin inhibits the production of vascular endothelial growth factor in human glioma cells.** *Int J Cancer* 2001, **92**:545–550.
275. Nyberg P, Xie L, Kalluri R: **Endogenous Inhibitors of Angiogenesis.** *Cancer Res* 2005, **65**:3967–3979.
276. Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG, Benjamin LE: **Angiopoietin-2: An Attractive Target for Improved Antiangiogenic Tumor Therapy.** *Cancer Res* 2013, **73**:1649–1657.
277. Carmeliet P, Jain RK: **Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.** *Nature* 2011, **473**:298–307.
278. Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang W-C, Chanthery Y, Kowalski J, Watts RJ, Callahan C, Kasman I, Singh M, Chien M, Tan C, Hongo J-AS, de Sauvage F, Plowman G, Yan M: **Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis.** *Nature* 2006, **444**:1083–1087.
279. Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, Chieh Lin H, Yancopoulos GD, Thurston G: **Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis.** *Nature* 2006, **444**:1032–1037.

280. Hellström M, Phng L-K, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson A-K, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalén M, Gerhardt H, Betsholtz C: **Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis.** *Nature* 2007, **445**:776–780.
281. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW: **Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion.** *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2006, **86**:1221–1232.
282. Salmaggi A, Gelati M, Pollo B, Frigerio S, Eoli M, Silvani A, Broggi G, Ciusani E, Croci D, Boiardi A, De Rossi M: **CXCL12 in malignant glial tumors: a possible role in angiogenesis and cross-talk between endothelial and tumoral cells.** *J Neurooncol* 2004, **67**:305–317.
283. Yang S, Chen J, Jiang X, Wang Q, Chen Z, Zhao W, Feng Y, Xin R, Shi J, Bian X: **Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **335**:523–528.
284. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T, Acker-Palmer A: **Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis.** *Nature* 2010, **465**:487–491.
285. Folkins C, Shaked Y, Man S, Tang T, Lee CR, Zhu Z, Hoffman RM, Kerbel RS: **Glioma Tumor Stem-Like Cells Promote Tumor Angiogenesis and Vasculogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor and Stromal-Derived Factor 1.** *Cancer Res* 2009, **69**:7243–7251.
286. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT: **Angiogenesis in brain tumours.** *Nat Rev Neurosci* 2007, **8**:610–622.
287. Soda Y, Myskiw C, Rommel A, Verma IM: **Mechanisms of neovascularization and resistance to anti-angiogenic therapies in glioblastoma multiforme.** *J Mol Med* 2013, **91**:439–448.
288. Hinsbergh VWM van, Engelse MA, Quax PHA: **Pericellular Proteases in Angiogenesis and Vasculogenesis.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, **26**:716–728.
289. Lombard C, Saulnier J, Wallach J: **Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review.** *Biochimie* 2005, **87**:265–272. [*Matrix Metalloproteinases and Cancer*]
290. Galvez BG, Matías-Román S, Albar JP, Sánchez-Madrid F, Arroyo AG: **Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase Is Activated during Migration of Human Endothelial Cells and Modulates Endothelial Motility and Matrix Remodeling.** *J Biol Chem* 2001, **276**:37491–37500.
291. Eccles SA: **Parallels in invasion and angiogenesis provide pivotal points for therapeutic intervention.** *Int J Dev Biol* 2004, **48**:583–598.
292. Messele T, Roos MTL, Hamann D, Koot M, Fontanet AL, Miedema F, Schellekens PTA, Wit TFR de: **Nonradioactive Techniques for Measurement of In Vitro T-Cell Proliferation: Alternatives to the [3H]Thymidine Incorporation Assay.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2000, **7**:687–692.
293. Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M: **Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way.** *Nat Rev Clin Oncol* 2009, **6**:315–326.
294. Wang D, Anderson JC, Gladson CL: **The Role of the Extracellular Matrix in Angiogenesis in Malignant Glioma Tumors.** *Brain Pathol* 2005, **15**:318–326.



295. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C: **VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia.** *J Cell Biol* 2003, **161**:1163–1177.
296. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P: **Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis.** *Cell* 2011, **146**:873–887.
297. Phng L-K, Gerhardt H: **Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch.** *Dev Cell* 2009, **16**:196–208.
298. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ: **Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures.** *J Cell Biol* 1988, **107**:1589–1598.
299. Kamei M, Brian Saunders W, Bayless KJ, Dye L, Davis GE, Weinstein BM: **Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo.** *Nature* 2006, **442**:453–456.
300. Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K: **Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells comparison of the effects of heparin and modified heparins.** *J Biol Chem* 2005, **280**:31508–31515.
301. Lewis CE, De Palma M, Naldini L: **Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2.** *Cancer Res* 2007, **67**:8429–8432.
302. De Palma M, Murdoch C, Venneri MA, Naldini L, Lewis CE: **Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications.** *Trends Immunol* 2007, **28**:519–524.
303. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passegué E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G: **HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion.** *Cancer Cell* 2008, **13**:206–220.
304. Aghi M, Cohen KS, Klein RJ, Scadden DT, Chiocca EA: **Tumor stromal-derived factor-1 recruits vascular progenitors to mitotic neovasculature, where microenvironment influences their differentiated phenotypes.** *Cancer Res* 2006, **66**:9054–9064.
305. Smadja DM, Bièche I, Uzan G, Bompais H, Muller L, Boisson-Vidal C, Vidaud M, Aiach M, Gaussem P: **PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**:2321–2327.
306. Yue W-Y, Chen Z-P: **Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma?.** *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 2005, **53**:997–1002.
307. Chen Y, Jing Z, Luo C, Zhuang M, Xia J, Chen Z, Wang Y: **Vasculogenic mimicry-potential target for glioblastoma therapy: an in vitro and in vivo study.** *Med Oncol Northwood Lond Engl* 2012, **29**:324–331.
308. Shaifer CA, Huang J, Lin PC: **Glioblastoma cells incorporate into tumor vasculature and contribute to vascular radioresistance.** *Int J Cancer* 2010, **127**:2063–2075.
309. Hallani SE, Boisselier B, Peglion F, Rousseau A, Colin C, Idbaih A, Marie Y, Mokhtari K, Thomas J-L, Eichmann A, Delattre J-Y, Maniotis AJ, Sanson M: **A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry.** *Brain* 2010, **133**:973–982.

310. Soda Y, Marumoto T, Friedmann-Morvinski D, Soda M, Liu F, Michiue H, Pastorino S, Yang M, Hoffman RM, Kesari S, Verma IM: **Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci* 2011, **108**:4274–4280.
311. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R: **Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells.** *Nature* 2010, **468**:824–828.
312. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V: **Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium.** *Nature* 2010, **468**:829–833.
313. Scully S, Francescone R, Faibish M, Bentley B, Taylor SL, Oh D, Schapiro R, Moral L, Yan W, Shao R: **Transdifferentiation of Glioblastoma Stem-Like Cells into Mural Cells Drives Vasculogenic Mimicry in Glioblastomas.** *J Neurosci* 2012, **32**:12950–12960.
314. Hamerlik P, Lathia JD, Rasmussen R, Wu Q, Bartkova J, Lee M, Moudry P, Bartek J, Fischer W, Lukas J, Rich JN, Bartek J: **Autocrine VEGF–VEGFR2–Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth.** *J Exp Med* 2012, **209**:507–520.
315. Kozin SV, Duda DG, Munn LL, Jain RK: **Neovascularization After Irradiation: What is the Source of Newly Formed Vessels in Recurring Tumors?.** *JNCI J Natl Cancer Inst* 2012, **104**:899–905.
316. Kozin SV, Kamoun WS, Huang Y, Dawson MR, Jain RK, Duda DG: **Recruitment of Myeloid but not Endothelial Precursor Cells Facilitates Tumor Regrowth after Local Irradiation.** *Cancer Res* 2010, **70**:5679–5685.
317. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM: **Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice.** *J Clin Invest* 2010, **120**:694–705.
318. Jouan-Hureau V, Boura C, Merlin J-L, Faivre B: **Modulation of endothelial cell network formation in vitro by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab.** *Microvasc Res* 2012, **83**:131–137.
319. Perspicace E, Jouan-Hureau V, Ragno R, Ballante F, Sartini S, La Motta C, Da Settimo F, Chen B, Kirsch G, Schneider S, Faivre B, Hesse S: **Design, synthesis and biological evaluation of new classes of thieno[3,2-d]pyrimidinone and thieno[1,2,3]triazine as inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2).** *Eur J Med Chem* 2013, **63**:765–781.
320. **Wound Healing Assay Kit - Cell Migration Assay | Cell Biolabs, Inc.** [<http://www.cellbiolabs.com/wound-healing-assays>]
321. Hart CA, Clarke NW, Brown MD: **Analysis of Prostate Tumour Cell Invasion Using BD FluoroBlok™ and FLUOstar OPTIMA.** *Gas* 2006, **413**:101.
322. Roubelakis MG, Tsaknakis G, Pappa KI, Anagnou NP, Watt SM: **Spindle Shaped Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells from Amniotic Fluid Promote Neovascularization.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e54747.
323. Eldh M, Lötval J, Malmhäll C, Ekström K: **Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods.** *Mol Immunol* 2012, **50**:278–286.

324. Rübél A, Handrick R, Lindner LH, Steiger M, Eibl H, Budach W, Belka C, Jendrossek V: **The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro.** *Radiat Oncol* 2006, **1**:6.
325. Honda N, Yagi K, Ding G-R, Miyakoshi J: **Radiosensitization by overexpression of the nonphosphorylation form of IkappaB-alpha in human glioma cells.** *J Radiat Res (Tokyo)* 2002, **43**:283–292.
326. Combs SE, Zipp L, Rieken S, Habermehl D, Brons S, Winter M, Haberer T, Debus J, Weber K-J: **In vitro evaluation of photon and carbon ion radiotherapy in combination with chemotherapy in glioblastoma cells.** *Radiat Oncol* 2012, **7**:9.
327. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C: **Clonogenic assay of cells in vitro.** *Nat Protoc* 2006, **1**:2315–2319.
328. Desai S, Kumar A, Laskar S, Pandey BN: **Cytokine profile of conditioned medium from human tumor cell lines after acute and fractionated doses of gamma radiation and its effect on survival of bystander tumor cells.** *Cytokine* 2013, **61**:54–62.
329. Abassi YA, Xi B, Zhang W, Ye P, Kirstein SL, Gaylord MR, Feinstein SC, Wang X, Xu X: **Kinetic Cell-Based Morphological Screening: Prediction of Mechanism of Compound Action and Off-Target Effects.** *Chem Biol* 2009, **16**:712–723.
330. Moodley K, Angel CE, Glass M, Graham ES: **Real-time profiling of NK cell killing of human astrocytes using xCELLigence technology.** *J Neurosci Methods* 2011, **200**:173–180.
331. Kustermann S, Boess F, Bunes A, Schmitz M, Watzele M, Weiser T, Singer T, Suter L, Roth A: **A label-free, impedance-based real time assay to identify drug-induced toxicities and differentiate cytostatic from cytotoxic effects.** *Toxicol In Vitro* 2013, **27**:1589–1595.
332. Rzeszowska-Wolny J, Przybyszewski WM, Widel M: **Ionizing radiation-induced bystander effects, potential targets for modulation of radiotherapy.** *Eur J Pharmacol* 2009, **625**:156–164.
333. Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX: **Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts.** *Dent Mater* 2010, **26**:51–58.
334. Mathieu V, Nève ND, Mercier ML, Dewelle J, Gaussin J-F, Dehoux M, Kiss R, Lefranc F: **Combining Bevacizumab with Temozolomide Increases the Antitumor Efficacy of Temozolomide in a Human Glioblastoma Orthotopic Xenograft Model.** *Neoplasia N Y N* 2008, **10**:1383.
335. Han N-K, Kim BC, Lee HC, Lee Y-J, Park M-J, Chi S-G, Ko Y-G, Lee J-S: **Secretome analysis of ionizing radiation-induced senescent cancer cells reveals that secreted RKIP plays a critical role in neighboring cell migration.** *PROTEOMICS* 2012, **12**:2822–2832.
336. Yu Y-C, Yang P-M, Chuah Q-Y, Huang Y-H, Peng C-W, Lee Y-J, Chiu S-J: **Radiation-induced senescence in securin-deficient cancer cells promotes cell invasion involving the IL-6/STAT3 and PDGF-BB/PDGFR pathways.** *Sci Rep* 2013, **3**.
337. Anderson W, Kozak D, Coleman VA, Jämting ÅK, Trau M: **A comparative study of submicron particle sizing platforms: Accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions.** *J Colloid Interface Sci* 2013, **405**:322–330.

338. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W: **Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates.** *Pharm Res* 2010, **27**:796–810.
339. Silveira JC da, Veeramachaneni DNR, Winger QA, Carnevale EM, Bouma GJ: **Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle.** *Biol Reprod* 2012, **86**:71.
340. Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A, Bourseau-Guilmain E, Lindqvist E, Svensson LM, Mörgelin M, Belting M: **Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1.** *J Biol Chem* 2013, **288**:17713–17724.
341. Hovinga KE, Stalpers LJA, Bree C, Donker M, Verhoeff JJC, Rodermond HM, Bosch DA, Furth WR: **Radiation-Enhanced Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Secretion in Glioblastoma Multiforme Cell Lines – A Clue to Radioresistance?.** *J Neurooncol* 2005, **74**:99–103.
342. Facchetti A, Pasi F, Nano R: **Some Considerations for the Study of TGF $\beta$  in Medium of Irradiated T98G Cells: Activation, Release and Consumption.** *Anticancer Res* 2010, **30**:3341–3344.
343. Dwyer J, Hebda JK, Le Guelte A, Galan-Moya E-M, Smith SS, Azzi S, Bidere N, Gavard J: **Glioblastoma Cell-Secreted Interleukin-8 Induces Brain Endothelial Cell Permeability via CXCR2.** *PLoS ONE* 2012, **7**:e45562.
344. Sakurai T, Kudo M: **Signaling Pathways Governing Tumor Angiogenesis.** *Oncology* 2011, **81**:24–29.
345. Weroha SJ, Haluska P: **The Insulin-Like Growth Factor System in Cancer.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012, **41**:335–350.
346. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin J-P, Boireau W, Rouleau A, Simon B, Lanneau D, De Thonel A, Multhoff G, Hamman A, Martin F, Chauffert B, Solary E, Zitvogel L, Garrido C, Ryffel B, Borg C, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F: **Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells.** *J Clin Invest* 2010.
347. Zhao Y, Lyons CE, Xiao A, Templeton DJ, Sang QA, Brew K, Hussaini IM: **Urokinase directly activates matrix metalloproteinases-9: A potential role in glioblastoma invasion.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **369**:1215–1220.
348. Czekay R-P, Wilkins-Port CE, Higgins SP, Freytag J, Overstreet JM, Klein RM, Higgins CE, Samarakoon R, Higgins PJ: **PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration.** *Int J Cell Biol* 2011, **2011**:1–9.
349. McMahon B, Kwaan HC: **The Plasminogen Activator System and Cancer.** *Pathophysiol Haemost Thromb* 2007, **36**:184–194.
350. Stetler-Stevenson WG: **Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Cell Signaling: Metalloproteinase-Independent Biological Activities.** *Sci Signal* 2008, **1**:re6.



## Résumé / Abstract

Dans le glioblastome (GBM), la radiothérapie est un outil thérapeutique essentiel. Néanmoins, la récurrence post-irradiation est quasiment inévitable, en raison de l'émergence d'une sous-population de cellules cancéreuses particulièrement radio-résistantes présentant une meilleure capacité proliférative, invasive et pro-angiogénique.

Notre étude *in vitro* a cherché à déterminer comment les cellules cancéreuses survivantes à l'irradiation pouvaient affecter la fonction des cellules tumorales voisines et les cellules endothéliales non irradiées, en focalisant notre attention sur l'échange des signaux intercellulaires, à savoir, les facteurs solubles et les microvésicules tumorales (TMVs).

La radiothérapie induit principalement un ralentissement de la prolifération des cellules de glioblastome (T98G et U87) et une mort cellulaire retardée (clonogénique) de 50-60%, sans engendrer d'apoptose. Grâce au suivi de la croissance cellulaire à long terme (*via* le système xCELLigence) et un test de blessure, nous avons confirmé que les cellules de glioblastome survivantes après irradiation libèrent des signaux qui peuvent modifier les fonctions de cellules endothéliales HUVEC et de cellules tumorales non-irradiées. Outre la sécrétion de certains facteurs solubles connus (VEGF, uPA), nous avons pu objectiver, en utilisant la microscopie électronique à balayage, le *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), la libération de microvésicules tumorales (TMVs), dont la taille était globalement inférieure à 500 nm. Par NTA et cytométrie en flux, nous avons montré que cette libération de TMVs (exosome + "shedding vesicles"), peut être significativement stimulée par l'irradiation dans les 2 lignées, de façon temps-dépendante. D'après nos analyses protéomiques, les facteurs solubles tels que le VEGF ou l'IL-8, connus pour être des facteurs pro-angiogéniques, contribueraient plutôt à favoriser la survie, voire la prolifération, des cellules HUVEC, tandis que les TMVs libérés après irradiation, ont significativement modifié la capacité de migration des HUVEC et des cellules tumorales non-irradiées. Les propriétés pro-migratoires des TMVs pourraient en ce sens, contribuer aux processus de récurrence dans les glioblastomes après irradiation.

**Mots-clés:** Glioblastome, Irradiation, Microvésicules tumorales, Cellules endothéliales, Facteurs pro-angiogéniques

Radiation therapy is a major therapeutic tool for glioblastoma (GBM). However, the post-radiation recurrence is almost inevitable, due to the emergence of a subpopulation of radioresistant cancer cells with greater proliferative, invasive, and proangiogenic capacities.

The objective of this study was to investigate *in vitro* how irradiated cancer cells affect the function of untreated neighboring tumor cells and endothelial cells, focusing on signals exchange initiated by irradiation, such as soluble factors and tumor microvesicles (TMVs).

Radiotherapy has slowed down the proliferation of GBM cells (T98G, U87) and induced mitotic death of 50-60%, without significant apoptosis. Through long-term monitoring of cell growth (xCELLigence) and wound-healing assay, we have confirmed that surviving GBM cells after irradiation release signals that can change the functions of endothelial cells HUVEC and non-irradiated tumor cells. In addition to the secretion of known soluble factors (VEGF, uPA), we were able to show using scanning electron microscopy and the Nanoparticle Tracking Analysis (NTA), the release of tumor microvesicles (TMVs), whose size was generally less than 500 nm. By NTA and flow cytometry, we have shown that the release of TMVs (exosome + "shedding vesicles") can be significantly stimulated by irradiation in two lines, in a time-dependent manner. According to the proteomics analysis, soluble factors such as VEGF or IL-8, well known as pro-angiogenic factors, rather contribute to promote the survival or proliferation of HUVEC, while the released TMVs after irradiation, significantly altered the migration abilities of non-irradiated HUVEC and tumor cells. The pro-migratory properties of TMVs could thus contribute to glioblastoma recurrence after irradiation.

Keywords: Irradiation, Tumor microvesicles, Endothelial cells, Glioblastoma, Pro-angiogenic factor