



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE**

BioSE



**ECOLE DOCTORALE BioSE**  
BIOLOGIE, SANTÉ et son ENVIRONNEMENT  
ED 266

## **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 **Maxime DURAND**

Capacités invasives des glioblastomes :  
intérêt des nanoparticules hybrides or/gadolinium,  
seules ou en association avec la radiothérapie.

**5 avril 2022**

<b>Directeur(s) de thèse :</b>	Mme Sophie Pinel	MCF HDR, CRAN UMR 7039 CNRS, Vandoeuvre-lès-Nancy, Directrice de thèse
	M. Pascal Chastagner	PU-PH, Service de pédiatrie Brabois, UMR 7039 CNRS, Vandoeuvre-lès-Nancy, Co-Directeur de thèse
<b>Présidente du Jury :</b>	Mme Monique Dontenwill	DR CNRS, INSB UMR 7021 CNRS, Strasbourg
<b>Rapporteurs :</b>	M. Samuel Valable	DR CNRS, GIP Cyceron, Caen
	Mme Myriam Polette	PU-PH, INSERM U1250, Reims
<b>Examineurs :</b>	Mme Ariane Boudier	Pr, EA 3452 CITHEFOR, Vandoeuvre-lès-Nancy
	M. Stéphane Roux	Pr, Institut UTINAM UMR 6213 CRNS, Besançon
	M. Jérôme Devy	MCF HDR, MEDyC UMR 7369 CNRS, Reims

---

**CRAN - UMR 7039 CNRS, Université de Lorraine**

**Département Biologie, Signaux et Systèmes en Cancérologie et Neurosciences**



## REMERCIEMENTS

Pour amorcer mes remerciements, je souhaite remercier mes rapporteurs, Myriam Polette et Samuel Valable, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux ainsi que les membres du jury, Stéphane Roux, Jérôme Devy, Ariane Boudier et Monique Dontenwill d'avoir accepté mon invitation. Je remercie plus spécifiquement Stéphane Roux, pour votre implication aux travaux et pour vos nanoparticules qui ont permis à ses travaux de thèse de voir le jour. Jérôme Devy, pour votre implication dans le projet, vos conseils toujours pertinent qui ont grandement contribués à certaines de mes réflexions. Ariane Boudier pour avoir accepté de suivre mes travaux pour mes comités de suivi de thèse et pour vos suggestions sur les nanoparticules et la bibliographie.

Je vais également adresser mes remerciements à mes directeurs de thèse.

- Pascal. Grâce à vous, j'ai pu mener ce travail de thèse et votre expérience en clinique m'a donné une perspective supplémentaire sur mes travaux.
- Sophie. Au cours de ma thèse et de la rédaction de mon manuscrit, vous m'avez dit que vous étiez parfois dure avec moi pour me pousser à me dépasser. Après ces quatre ans à travailler avec vous, je peux dire que je me suis dépassé. Au début de ma thèse, je n'étais pas même sûr de réussir à présenter des résultats expérimentaux et à rédiger un manuscrit de thèse. Et aujourd'hui, voilà qu'une deuxième publication est en instance de soumission et j'ai écrit plus de 300 pages de manuscrit. Vous avez très largement contribué à ça, je tiens à vous exprimer ma gratitude.
- Je voulais également vous remercier spécialement ici Muriel. Il y a un peu plus de quatre ans, vous m'aviez demandé si je voulais effectuer un stage de M2, voire une thèse dans votre laboratoire. A cette époque, j'étais décidé à partir de l'Université de Lorraine. Si je suis là aujourd'hui c'est parce que vous m'aviez ouvert les portes de votre laboratoire. Je vous remercie infiniment pour votre confiance !

Mes chers collègues de laboratoire ne vont pas échapper à la série de remerciements !

- Alicia, "Jack of all trade". Tu m'as formé sur un bon nombre d'expérimentations depuis mon arrivée au labo, tu as toujours répondu à mes questions. Je tenais à te remercier pour tout ce que tu as fait car sans toi, ce projet de thèse ne serait pas tel qu'il est là. Petite satisfaction personnelle, il m'a fallu quatre ans pour te faire un peu apprécier le thé !
- Hervé, mon ancien responsable de master 2 ! Tu m'as toujours proposé ton aide au cours de ma thèse et tu as toujours été à l'écoute pour moi. Je te remercie beaucoup (PS : Je veux que tu me fasses un chinois pour la fin de ma thèse !).
- Je voulais également remercier toutes les personnes qui m'ont enseignées toutes les techniques expérimentales au cours de ma thèse, leur savoir-faire dans d'autres champs disciplinaires et pour l'enseignement. Valérie, Hélène, Hélène, Magalie, Cédric, Noémie, Joël, Julien.

Petites attentions à mes chers collègues de bureau et doctorants (et j'ai connu deux déménagements de bureau !) :

- Manon. Pour une fois je vais faire ton éloge ! Tu as le cœur sur la main, même quand tu es en galère, tu m'as dépanné sur les grosses bourdes que j'ai pu faire (je me souviendrais toujours du « sauna à base d'auto-clave » ou de l'oubli de mes clés d'appartement au labo) ! Prends soin de toi, et bonne fin de thèse !



- Alex, dit « l'arrogant ». Traffic de thés et de thésièrès, jeux vidéos, des discussions d'expérimentations, de nombreux sujets de conversation ont été balayés en plus de deux ans ! Je suis content que tes recherches se passent bien, j'espère que cela continuera jusqu'au sésame : le prix Nobel !
- Justine, je t'avais dit que tu serais dans mes remerciements ! On a été recruté en même temps au laboratoire, même si je n'ai pas pu partir en même temps que toi pour boucler la boucle, je tenais à te remercier pour ton aide en *in vivo* et pour ta bienveillance ! Puisse tous tes projets se concrétiser dans ta vie pro et perso !
- Je tenais également à remercier mes autres collègues avec qui j'ai passé de belles soirées : Victor, Eddy, Sarah, Yann, Lucie.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner mes proches :

- Je remercie tous mes amis pour m'avoir soutenu, écouter plusieurs dizaines de minutes voire des heures ! Mes amis depuis ma licence : Morgane numéro 1, Dorian, Ben, Elodie, Morgane numéro 2, Bertrand, Florian. Oui je suis venu à bout de cette foutue thèse ! A quand la prochaine réunion ?
- Emilie, Christelle, Laura, Camille, je vais pouvoir prendre plus de nouvelles maintenant que je suis moins la tête en face d'un écran !
- Je dédie également mes remerciements à toi Jules qui partage ma vie depuis un peu plus d'un an !

Je tiens à remercier ma famille proche dans ses dernières lignes. Mon frère qui aura également du supporter mon absence ces cinq derniers mois. Mon beau-père, qui a toujours tant à m'offrir.

Et je voulais particulièrement remercier ma maman. Sans tout ce que tu as accompli dans ta vie, je n'aurais probablement pas pu aller à l'université. Merci maman !

## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	13
<b>1 Partie I : La prise en charge du glioblastome .....</b>	<b>14</b>
1.1 Principales données épidémiologiques .....	14
1.2 Les régions cérébrales de développement du glioblastome .....	14
1.3 Le diagnostic clinique de la maladie .....	15
1.4 La classification actuelle du glioblastome par l'organisation mondiale de la santé .....	16
1.4.1 Evolution de la classification de 2007 à 2016 .....	16
1.4.2 La nouvelle mise à jour de la classification OMS de 2021 .....	19
1.5 Prise en charge thérapeutique des glioblastomes .....	19
1.5.1 Le protocole Stupp comme standard thérapeutique .....	19
1.5.2 La chirurgie .....	20
1.5.3 La radiothérapie .....	21
1.5.4 La chimiothérapie .....	22
1.6 La récurrence du glioblastome .....	23
<b>2 Partie II : Le glioblastome, une tumeur cérébrale infiltrante .....</b>	<b>25</b>
2.1 Le cerveau : lieu de développement du glioblastome .....	25
2.1.1 Anatomie du parenchyme cérébral .....	25
2.1.2 La matrice extracellulaire cérébrale .....	28
2.2 Le glioblastome, une tumeur hétérogène .....	33
2.2.1 Les hypothèses de l'origine du glioblastome .....	33
2.2.2 Les étapes de la gliomagenèse .....	36
2.3 Les caractéristiques tissulaires du glioblastome .....	37
2.3.1 Les principales caractéristiques tissulaires du GBM .....	37
2.3.2 Le réseau vasculaire tumoral .....	38
2.3.3 L'établissement des vaisseaux sanguins tumoraux .....	38
2.3.4 La barrière hémato-encéphalique et le glioblastome .....	39
2.3.5 L'infiltration tissulaire du glioblastome .....	40
2.4 Hétérogénéité cellulaire du glioblastome .....	42
2.4.1 Principales caractéristiques de l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire au sein de la masse tumorale .....	42
2.4.2 Hétérogénéité cellulaire des glioblastomes au niveau péri-tumoral .....	47
2.5 Description des mécanismes de migration et d'invasion chez le GBM .....	48
2.5.1 L'architecture de la cellule : le cytosquelette .....	48
2.5.2 Les principales caractéristiques de la mise en place de la motilité .....	50
2.5.3 Le mode de déplacement des cellules de GBM .....	53
2.5.4 La phase d'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire environnante .....	58
2.5.5 L'invasion chez le glioblastome .....	61
2.5.6 L'implication de la MEC tumorale dans l'invasion du glioblastome .....	66
<b>3 Partie III : La radiothérapie dans le glioblastome .....</b>	<b>70</b>

3.1	Les caractéristiques de la radiothérapie.....	70
3.1.1	Interactions physiques des radiations ionisantes et des tissus biologiques.....	70
3.1.2	Les sources de radiations ionisantes utilisées .....	72
3.1.3	Les différents types de radiothérapie et leur innovation.....	74
3.2	Les mécanismes radiobiologiques .....	80
3.2.1	Les dégâts sur les molécules biologiques .....	80
3.2.2	Les dégâts sur les membranes biologiques .....	82
3.2.3	Les dégâts sur les organites.....	82
3.2.4	La mortalité cellulaire radio-induite.....	83
3.3	Les effets de la radiothérapie sur le caractère infiltrant des cellules de glioblastome .....	86
3.3.1	Influence de la radiothérapie sur la motilité des cellules .....	86
3.3.2	Impact de la radiothérapie sur les capacités invasives des cellules de glioblastome ...	89
4	Partie IV : Les nanoparticules d'or et leur potentiel anti-invasif sur les glioblastomes.....	91
4.1	Les nanoparticules : utilisation en cancérologie.....	91
4.1.1	Définition des nanoparticules .....	91
4.1.2	Développement des nanoparticules en cancérologie.....	91
4.1.3	Utilisation des nanoparticules inorganiques en cancérologie .....	93
4.2	Les effets radiopotentialisants des nanoparticules métalliques .....	95
4.2.1	Intérêt en clinique des nanoparticules métalliques pour la radiopotentialisation .....	95
4.2.2	Propriétés des nanoparticules métalliques utilisées pour la radiopotentialisation .....	95
4.3	Effets biologiques engendrés par les nanoparticules métalliques en association ou non à la radiatiothérapie .....	97
4.3.1	Génération de ROS et cytotoxicité par l'association des nanoparticules métalliques à la radiothérapie.....	97
4.3.2	Les effets propres des nanoparticules métalliques .....	98
4.4	Développement et utilisation de nanoparticules hybrides d'or et de gadolinium pour la radiopotentialisation : les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) .....	101
	OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	104
	MATERIELS & METHODES .....	107
1	Matériel.....	108
1.1	Liste des composés et appareillage utilisés .....	108
1.2	Nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) .....	111
1.2.1	Irradiateur .....	111
1.3	Les conditions de culture cellulaire.....	111
1.3.1	La lignée cancéreuse U251 MG .....	111
1.3.2	La lignée cancéreuse U87 MG .....	112
1.3.3	Les méthodes de culture cellulaire .....	112
1.3.4	Culture des cellules en monocouche.....	112
1.3.5	Culture des cellules en trois dimensions (3D) pour la formation de sphéroïdes.....	112

1.4	Les expérimentations mises en place pour la caractérisation de la radiosensibilité, de la cytotoxicité des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de l'expression de la GFP par nos modèles cellulaires .....	113
1.4.1	Comptage cellulaire et évaluation de la cytotoxicité directe par test d'exclusion au bleu Trypan .....	113
1.4.2	Essais clonogéniques .....	114
1.4.3	Test d'invasion à partir de sphéroïdes U251 et U87 .....	114
1.4.4	Transfection des cellules de la lignée U251 et U87 permettant l'expression de la protéine fluorescente GFP .....	115
1.5	Les expérimentations mises en place pour l'étude de l'impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les propriétés invasives des cellules de glioblastome .....	116
1.6	Les expérimentations mises en place pour l'évaluation de l'intérêt thérapeutique de l'association des nanoparticules à la radiothérapie sur les cellules de glioblastome .....	116
1.6.1	Suivi des tests de bourgeonnements des sphéroïdes U87 par vidéomicroscopie .....	117
1.6.2	Récupération des cellules échappées des sphéroïdes U87 .....	117
1.6.3	Evaluation des catastrophes mitotiques après traitement. ....	117
1.6.4	Immunofluorescence, marquage de la connexine 43 et de l'actine-F sur les cellules échappées des sphéroïdes .....	118
1.6.5	Prélèvement des surnagants des cellules échappées U87 et des sphéroïdes .....	118
1.6.6	Dosage protéique .....	119
1.6.7	Zymographie .....	119
1.6.8	Culture cellulaire neurosphère .....	119
1.7	Traitement et analyse des données .....	120
1.7.1	Capture et traitement des images des essais clonogéniques .....	120
1.7.2	Traitement des données obtenues pour le test d'invasion .....	120
1.7.3	Capture et traitement des images obtenues pour les catastrophes mitotiques .....	120
1.7.4	Traitement des données en zymographie .....	121
1.7.5	Analyse statistique .....	121
	<b>RESULTATS &amp; DISCUSSION.....</b>	<b>122</b>
1	<b>Partie I : Caractérisation des modèles cellulaires étudiés : les lignées U251 et U87 .....</b>	<b>123</b>
1.1	Morphologie, croissance et invasion. ....	123
1.2	Caractérisation de la radiosensibilité des deux modèles cellulaires. ....	125
1.3	Caractérisation des effets des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) .....	126
1.4	Mise en place des modèles cellulaires exprimant la GFP .....	128
1.4.1	Validation de l'expression de la GFP dans les lignées U87 et U251 .....	128
1.4.2	Caractérisation de l'expression de la GFP sur le comportement des cellules de glioblastome .....	129
1.5	Bilan des études préliminaires .....	131
2	<b>Partie II : Effets des Au@DTDTPA(Gd) sur les capacités migratoires et invasives des cellules U251 .....</b>	<b>132</b>
2.1	Publication n°1 : The detrimental invasiveness of glioma cells controlled by gadolinium chelate-coated gold nanoparticles (Durand et al. 2021) .....	132
2.1.1	Contexte scientifique de l'étude .....	132

2.1.2	Les principaux résultats obtenus .....	132
2.1.3	Perspectives liées au travail .....	143
3	Partie III : Intérêt thérapeutique de l'association des Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur les cellules U87 .....	146
3.1.1	Effets radiosensibilisants des Au@DTDTPA(Gd) sur la lignée U87 .....	146
3.1.2	Caractérisation morphologiques et fonctionnelles <i>in vitro</i> des effets de l'association de la radiothérapie aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les cellules échappées de GBM U87 154	
3.1.3	Evaluation de l'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur l'induction de catastrophes mitotiques chez les cellules échappées U87 .....	158
3.1.4	Evaluation de l'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur les capacités protéolytiques des cellules échappées.....	159
3.1.5	Impact de nos traitements sur les jonctions intercellulaires des cellules échappées .	162
3.1.6	Caractérisation du potentiel « souche » des cellules échappées post-traitement .....	167
	CONCLUSION & PERSPECTIVES .....	170
1	Conclusion .....	171
2	Perspectives faisant suite à nos travaux sur les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et la radiothérapie .....	173
2.1	Contexte scientifique .....	173
2.2	Questions scientifiques soulevées .....	173
	BIBLIOGRAPHIE .....	175
	ANNEXES.....	207

## LISTE DES ABREVIATIONS

3D-CRT : Radiothérapie Conformationnelle 3D  
Actine-F : Filaments d'actine  
ADAM : Disintegrin and metalloproteinase  
AFM : Microscopie de force atomique  
AH : Acide Hyaluronique  
AIC : 5-amino-imidazole-4-carboxamide  
ALA : Acide 5-aminolévulinique  
ANOCEF : Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française  
AQP : Aquaporine  
Arp2/3 : Actin Related Protein 2/3  
AuNP : Nanoparticules d'or  
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique  
BSA : Albumine bovine  
Cdc42 : Homologue de la protéine de contrôle de la division cellulaire 42  
cIMPACT-NOW : Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy  
Cryo-TEM : Cryo-microscopie électronique à transmission  
CS : Chondroïtine Sulfate  
CSC : Cellules souches cancéreuses  
CSN : Cellules souches neurales  
CTV : Volume clinique cible  
CTRL : Contrôle  
Cx43 : Connexine-43  
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium  
DSB : Cassures double brin  
DTDTPA : Dérivé dithiolé de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique  
EGF : Facteur de croissance épidermique  
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique  
EPC : Cellules endothéliales progénitrices  
EPR : Enhanced permeability and retention  
FADD : Fas-Associated protein with Death Domain  
FAK : Focal Adhesion Kinase  
FDA : Food and Drugs Administration  
FGF : Facteur de croissance fibroblastique  
FLIM : Time-correlated single photon counting fluorescence lifetime imaging microscopy  
GAP43 : Growth Associated Protein 43  
GBM : Glioblastome  
Gd : Gadolinium  
GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale

GFP : Green Fluorescent Protein  
 GTV : Volume tumoral cible  
 Gy : Gray  
 HBSS : Hank's Balanced Salt Solution  
 HE : Hématoxyline/éosine  
 HIF : Facteur induit par l'hypoxie  
 HS : Héparane Sulfate  
 IDH 1 : Isocitrate Déshydrogénase 1  
 IGF : Facteur de croissance analogue à l'insuline  
 IMRT : Radiothérapie avec modulation d'intensité  
 IR : Irradiation  
 IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
 KPS : Indice de Karnofsky  
 KS : Kératane Sulfate  
 LCR : Liquide Céphalo-Rachidien  
 LINAC : Accélérateur linéaire de particules  
 MEC : Matrice Extracellulaire  
 MECc : Matrice Extracellulaire cérébrale  
 MGMT : O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase  
 MMP : Métalloprotéase Matricielle  
 MRT : Radiothérapie par micro-faisceaux  
 MTIC : 5-(3-methyltriazene-1-yl) imidazole-4-carboxamide  
 MTOC : Centre organisateur des microtubules  
 MTT : Thiazolyl bleu tetrazolium bromide  
 NF-κB : Facteur nucléaire kappa B  
 NOS : Not Otherwise Specified  
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
 OPC : Cellules progénitrices des oligodendrocytes  
 PEG : Polyéthylène glycol  
 PBS : Phosphate buffered saline  
 PDGF : Facteur de croissance dérivé des plaquettes  
 PDX : Patient derived xenograft  
 PG : Protéoglycanes  
 PolyHEMA : Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)  
 PpIX : Protoporphyrine IX  
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog  
 PTV : Volume cible planifié  
 Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1  
 RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G  
 RGD : Arginine-Glycine-Acide aspartique

RhoA : Ras homolog family member A  
ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
RT : Radiothérapie  
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase  
SBS : Cassure simple brin  
SF : Fraction de survie  
SNC : Système Nerveux Central  
STORM : Microscopie de reconstruction optique stochastique  
SVF : Sérum veau foetal  
TAM : Macrophages associés aux tumeurs  
TCGA : Atlas du génome du cancer  
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse  
TEM (Microscopie) : microscopie électronique à transmission  
TERT : Telomérase Reverse Transcriptase  
TFM : Traction force microscopy  
TGF- $\beta$  : Facteur de croissance transformant- $\beta$   
TMZ : Témzolomide  
TNF : Tumor necrosis factor  
V600E BRAF : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B  
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire  
VMAT : Radiothérapie avec modulation d'intensité volumétrique



## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** Développement du GBM dans les lobes du cerveau et conséquences chez le patient
- Figure 2** Imageries IRM réalisées pour le diagnostic du glioblastome
- Figure 3** Classification OMS 2021 du GBM
- Figure 4** Description du protocole Stupp
- Figure 5** Délimitation des volumes cibles de radiothérapie par les protocoles RTOG/NRG
- Figure 6** Activation du TMZ dans le cerveau
- Figure 7** Anatomie du parenchyme cérébral
- Figure 8** Les cellules immunitaires présentes dans le cerveau et impliquées dans l'immunité tumorale
- Figure 9** Schématisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE)
- Figure 10** Le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le système glymphatique
- Figure 11** La rigidité du cerveau à l'échelle de l'organisme
- Figure 12** Corrélation entre le confinement mécanique des cellules et la viscoélasticité de la MEC
- Figure 13** Localisation des cellules souches dans le cerveau sain adulte
- Figure 14** Hypothèses du développement des GBM : les modèles stochastique, hiérarchique et de dédifférenciation.
- Figure 15** Principales étapes de la gliomagenèse menant à la mise en place des mécanismes de migration cellulaire
- Figure 16** Etablissement de la vascularisation dans le glioblastome
- Figure 17** Dynamique de l'infiltration tumorale chez le glioblastome
- Figure 18** Profils moléculaires de glioblastome
- Figure 19** Schématisation de l'hétérogénéité cellulaire intratumorale : les quatre principaux phénotypes cellulaires adoptés par les cellules de glioblastome
- Figure 20** Schématisation de l'organisation du cytosquelette
- Figure 21** Polymérisation des filaments d'actine
- Figure 22** Les principales étapes de l'établissement de la motilité cellulaire
- Figure 23** Polarisation des cellules au cours de la migration
- Figure 24** Les interactions entre l'actine-F, les filaments intermédiaires et les microtubules
- Figure 25** Organisation de l'actine-F dans la cellule
- Figure 26** Les différents types de migration individuelle et collective des cellules
- Figure 27** Infiltration des leaders cells et des cellules suiveuses
- Figure 28** Les différents types de migration individuelle
- Figure 29** Organisation des protéines impliquées dans l'établissement des adhérences cellulaires
- Figure 30** Désassemblage des adhérences focales et impact sur la migration
- Figure 31** La perte des adhésions focales implique l'endocytose des intégrines
- Figure 32** La transition épithélio-mésenchymateuse
- Figure 33** Schématisation des structures secondaires de Scherer

- Figure 34** La regulation hydrodynamique des cellules de gliome au cours du mouvement.
- Figure 35** Principaux systèmes protéolytiques mis en place par les cellules de glioblastome
- Figure 36** Les photons interagissent avec les atomes par le biais de mécanismes majeurs
- Figure 37** Schématisation du dépôt d'énergie de différences sources de radiations ionisantes
- Figure 38** Comparaison de la distribution de la dose en fonction de la profondeur (photons X, gamma et particules chargées).
- Figure 39** Schématisation de la génération des faisceaux de photons X à l'aide d'un accélérateur linéaire de particules (LINAC).
- Figure 40** La fenêtre thérapeutique en radiothérapie
- Figure 41** La radiothérapie conformationnelle 3D (3D-CRT), avec modulation d'intensité (IMRT) et volumétrique (VMAT)
- Figure 42** La radiothérapie stéréotaxique : exemple avec le Gammaknife®.
- Figure 43** Schématisation d'un réseau de microfaisceaux utilisés en radiothérapie
- Figure 44** Schématisation des dégâts à l'ADN par les radiations ionisantes : les dégâts directs et la radiolyse de l'eau
- Figure 45** Principaux dommages à l'ADN par les radiations ionisantes
- Figure 46** Exemples de réparation de l'ADN liés aux dégâts de la radiothérapie
- Figure 47** Principaux effets de la radiothérapie sur les organites
- Figure 48** Les différents types de mort cellulaire radio-induites
- Figure 49** Les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite dans les cellules de glioblastome
- Figure 50** Principales voies de signalisation inductrices de la motilité cellulaire post-irradiation
- Figure 51** Les différents nano-objets
- Figure 52** Importance du *design* des nanoparticules
- Figure 53** Principaux effets physiques générés par l'association des nanoparticules aux radiations ionisantes
- Figure 54** Réponses physiques de l'association des nanoparticules d'or à différentes énergies de radiations ionisantes
- Figure 55** Structure de la nanoparticule Au@DTDTPA(Gd)
- Figure 56** Schématisation de la cinétique de temps des expérimentations mises en place pour la caractérisation de la radiosensibilité et de la cytotoxicité des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les lignées U251 et U87
- Figure 57** Cartographie génétique du lentivirus pLV-EF1A-GFP-PGK-Puro
- Figure 58** Schématisation de la cinétique expérimentale pour l'évaluation de l'intérêt thérapeutique de l'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à la radiothérapie sur les cellules migratrices U87 et les sphéroïdes U87
- Figure 59** Obtention de la surface d'invasion à l'aide du logiciel Image J
- Figure 60** Obtention de la distance d'invasion à l'aide du logiciel ImageJ
- Figure 61** Observation des cellules U87 et U251 cultivées in vitro en monocouche
- Figure 62** Observation de l'invasion des sphéroïdes U251 et U87

- Figure 63** Impact de la radiothérapie sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U251 et U87
- Figure 64** Effets des nanoparticules sur la cytotoxicité directe des lignées U251 et U87
- Figure 65** Effets des nanoparticules sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U251 et U87
- Figure 66** Mise en évidence de l'expression de la protéine fluorescente GFP par les cellules U251 et U87 par microscopie de fluorescence
- Figure 67** Effets de la transduction sur la cytotoxicité directe et le nombre de cellules U251 et U87
- Figure 68** Influence de l'expression de la GFP sur la croissance des cellules U251 et U87
- Figure 69** Effets de l'expression de la GFP sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U251 et U87
- Figure 70** Localisation des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) dans les cellules U251
- Figure 71** Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur l'invasivité des cellules U251 selon un test d'invasion 3D.
- Figure 72** Analyse de l'activité et de l'expression des protéases matricielles sécrétées par les cellules de GBM traitées aux Au@DTDTPA(Gd).
- Figure 73** Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la migration collective et individuelle des cellules U251
- Figure 74** Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la biomécanique et la morphologie cellulaire des cellules U251
- Figure 75** Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les forces de traction et l'adhésion.
- Figure 76** Effets des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la survie des cellules U87 irradiées
- Figure 77** Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U87.
- Figure 78** Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et du fractionnement de la radiothérapie sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U87.
- Figure 79** Suivi de l'invasion des sphéroïdes U87 exposés aux nanoparticules et aux protocoles de radiothérapie par vidéomicroscopie de fluorescence
- Figure 80** Impact de l'association des Au@DTDTPA(Gd) et de l'irradiation à 10 Gy sur les capacités infiltrantes des cellules U87 en culture organotypique
- Figure 81** Suivi de l'infiltration des sphéroïdes U87 exposés aux nanoparticules et irradiés *in vivo*.
- Figure 82** Observation des cellules échappées des sphéroïdes exposés aux nanoparticules et irradiés
- Figure 83** Evaluation du nombre de cellules échappées et de la cytotoxicité directe des nanoparticules et de l'irradiation.
- Figure 84** Evaluation de l'induction de catastrophes mitotiques dans les cellules échappées issues de sphéroïdes U87 irradiés et exposés aux nanoparticules
- Figure 85** Impact des Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur l'activité de MMP2 dans les surnageants des sphéroïdes U87.

- Figure 86** Impact des Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur l'activité de MMP2 dans les surnageants des cellules échappées des sphéroïdes U87
- Figure 87** Impact des Au@DTDTPA(Gd) et de l'irradiation sur les prolongements cellulaires des cellules échappées.
- Figure 88** Observations des cellules initiatrices traitées et mise en culture en milieu neurosphère
- Figure 89** Quantification du nombre et du diamètre des cellules initiatrices traitées et mise en culture en milieu neurosphère

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Récapitulatif des effets des différents composants de la MECc saine et tumorale par le microenvironnement tumoral sur les cellules de GBM
- Tableau 2** Propriétés des radioisotopes étudiés dans les suivis de patients ou les études cliniques sur le glioblastome.
- Tableau 3** Récapitulatif des différences génomiques entre les cellules U87 et U251
- Tableau 4** Quantification de l'or dans les cellules U251 *par* analyse ICP-OES.
- Tableau 5** Récapitulatif des principales observations sur les cellules échappées post-traitement

# INTRODUCTION

# 1 PARTIE I : LA PRISE EN CHARGE DU GLIOBLASTOME

## 1.1 PRINCIPALES DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Le glioblastome (GBM) est le type histologique de tumeur cérébrale primaire le plus représenté parmi les gliomes diffus. Selon les derniers rapports épidémiologiques disponibles, l'incidence du glioblastome varie entre 0,59 et 5 cas pour 100000 personnes selon les pays (Grech et *al.* 2020). En France, l'incidence est de 3,3 cas pour 100000 personnes, avec un âge médian de 63 ans et une prédominance de survenue de la maladie chez l'homme avec un *sex ratio* d'environ 1,5 (Clavreul et *al.* 2019).

Il n'y a pas de données sur les glioblastomes au niveau du continent africain et asiatique. Leece et *al.* sont remontés uniquement jusqu'aux données sur les tumeurs malignes du système nerveux central. En 2007, l'incidence moyenne en Asie était de 2,8 pour 100000 et de 2,46 pour l'Afrique (Leece et *al.* 2017). L'incidence de l'ensemble des gliomes diffus de ces pays serait inférieure au seul GBM par rapport à l'Europe, aux Etats-Unis et au Canada (incidence comprise entre 3 et 5 pour 100000 selon les relevés de santé publique et les publications) (Miranda-Filho et *al.* 2017, Davis et *al.* 2016 et Clavreul et *al.* 2019).

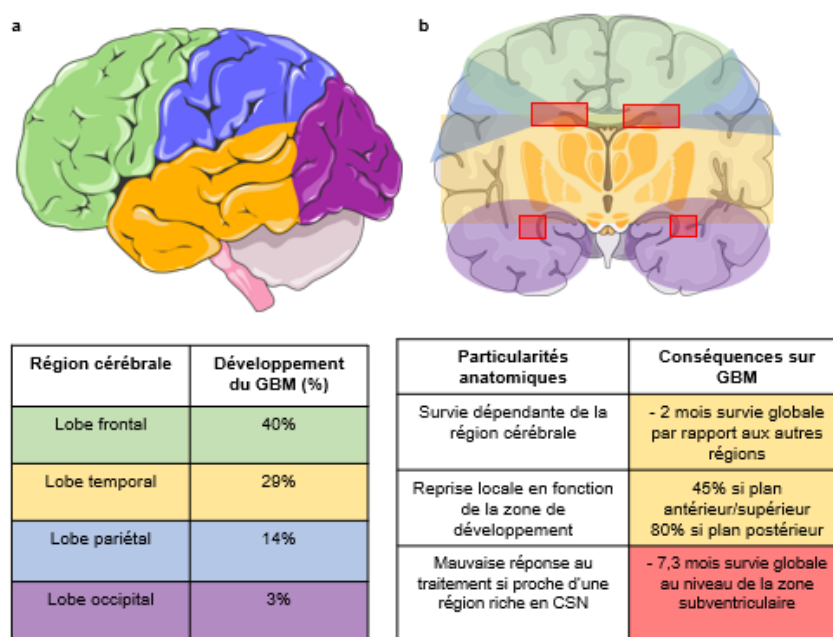
Cependant, il existe de nombreuses disparités internes à chaque pays qui complexifient la comparaison des incidences entre les pays. L'augmentation du nombre de diagnostics réalisés selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Louis et *al.* 2021) peut expliquer l'augmentation de l'incidence dans ces pays. Il a également été montré qu'il existe de fortes variations en fonction de l'ethnie notamment aux Etats-Unis (incidence doublée pour les personnes blanches non hispaniques par rapport aux population afro-américaines et asiatiques) (Ostrom et *al.* 2018). Le nombre de nouveaux cas de glioblastome augmente avec l'âge, en particulier pour les individus âgés de plus de 65 ans jusqu'à 84 ans avec une incidence comprise entre 13,2 et 14,6 cas pour 100000 personnes selon les données obtenues aux Etats-Unis analysées par Bauchet et *al.* en France (Bauchet et *al.* 2014). La survie médiane des patients est actuellement comprise entre 10 et 18 mois et la survie globale à 5 ans reste très faible à 6,8% (Woehrer et *al.* 2014 et Wen et *al.* 2020).

## 1.2 LES REGIONS CEREBRALES DE DEVELOPPEMENT DU GLIOBLASTOME

Le cerveau est l'organe qui assure la régulation des nombreuses fonctions de l'organisme. Il est divisé par le milieu et de l'avant à l'arrière en deux moitiés appelées hémisphères cérébraux. Chaque hémisphère est divisé en quatre lobes : frontal, pariétal, occipital et temporal. Ces lobes vont assurer le fonctionnement de voies sensibles et/ou motrices bien particulières comme la vue pour le lobe occipital ou bien le langage et le contrôle du mouvement pour le lobe frontal (Jawabri et Sharma, 2021).

Le GBM peut se développer dans n'importe quel lobe du cerveau (**Figure 1a**). Cependant la probabilité de développement dans certains lobes est différente. En effet, il a été observé un développement du GBM plus fréquent dans les lobes frontaux (40%) puis dans les lobes temporaux (29%), les lobes pariétaux (14%) et le lobe occipital (3%) (Simpson et *al.* 1993 et Larjavaara et *al.* 2007). La zone de développement du GBM a suscité l'intérêt de plusieurs groupes de chercheurs sur la corrélation entre le pronostic du patient et la zone dans laquelle la tumeur se développe. En 2020, Mackintosh et *al.* ont

constaté que les patients développant des gliomes diffus au niveau du lobe temporal avaient une survie globale diminuée de deux mois par rapport aux autres localisations anatomiques. La zone de développement au sein même d'un lobe et de ses délimitations pourraient également constituer un facteur pronostique et de réponse au traitement. Par exemple, il a été observé que le pourcentage de reprise locale de la maladie dans le lobe temporal après traitement variait de 45% à 80% selon que la tumeur évolue dans le plan antérieur et supérieur du lobe temporal ou dans le plan postérieur (Jayamanne et al. 2018). Le contact de la tumeur avec la région subventriculaire, une niche pour les cellules souches neurales (CSN), pourrait aussi constituer un facteur de mauvais pronostic et de mauvaise réponse à la maladie avec une perte de 7,3 mois de survie globale des patients (Comas et al. 2021) (**Figure 1b**).



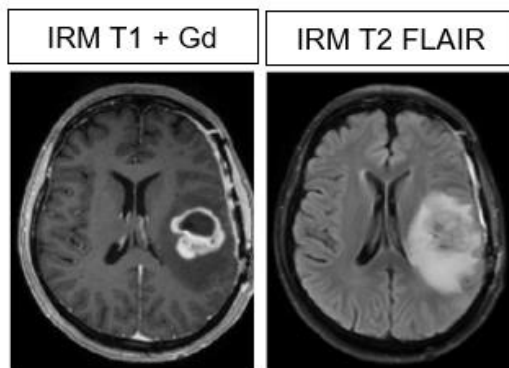
**Figure 1. Développement du GBM dans les lobes du cerveau et conséquences chez le patient. (a)** La probabilité de développement dans certains lobes est différente. En effet, il a été observé un développement du GBM plus fréquent dans les lobes frontaux (vert) (40%) puis dans les lobes temporaux (jaune) (29%), les lobes pariétaux (bleu) (14%) et le lobe occipital (violet) (3%). **(b)** Plusieurs études ont démontré que la survie des patients variaient selon la région de développement du GBM. La reprise dans la zone de développement est également dépendante de la région d'un même lobe. La nature de la région, comme la présence de cellules souches neurales (CSN) (rouge) affecte aussi la survie globale. (Images obtenues de Medical Servier Art, adapté de Mackintosh et al. 2020, Jayamanne et al. 2018 et Comas et al. 2021)

### 1.3 LE DIAGNOSTIC CLINIQUE DE LA MALADIE

La survenue et l'évolution rapide des GBM peuvent entraîner l'apparition de symptômes neurologiques variables en fonction de la zone de formation des GBM et des régions cérébrales environnantes comprimées par la poussée de la tumeur. Les crises de migraine chroniques, les crises d'épilepsie et des déficiences neurologiques centrales sont des exemples de signes cliniques qui doivent alerter. Le premier examen réalisé sera l'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour confirmer la présence d'une masse au niveau du cerveau. L'IRM est réalisée avant l'opération, 48 heures après l'exérèse chirurgicale et 10 jours maximum avant la radiothérapie.



L'IRM est une technique d'imagerie par résonance magnétique qui vise à obtenir des images anatomiques sur les plans axial, sagittal et coronal de l'encéphale. Elle est le premier examen réalisé pour détecter la présence de lésions tumorales et pour définir le plus précisément possible la localisation et les contours de la tumeur. L'IRM permet d'obtenir un bon contraste entre la substance grise, la substance blanche et le liquide céphalorachidien (**Figure 2**).



**Figure 2. Imageries IRM réalisées pour le diagnostic du glioblastome.** La pondération T1 permet d'obtenir des images claires des tissus mous et des images sombres de l'eau pour obtenir une information structurale brute. L'injection d'agent de contraste à forte affinité pour le cerveau, le chélate de gadolinium, permet d'augmenter artificiellement la résolution des imageries IRM. La pondération T2-FLAIR permet d'obtenir un signal hyperdense afin d'obtenir des informations sur la tumeur (présence d'œdème, progression, vascularisation) (Adapté d'après Kirton et *al.* 2002)

Ce sont les différences d'intensité entre les deux pondérations T1 et T2 FLAIR qui permettront d'émettre un diagnostic et de délimiter la masse tumorale. De plus, des séquences axiales sur les trois plans de l'espace doivent être réalisées pour avoir une information complète (si possibles coronales et des séquences multimodales en plus). L'imagerie IRM fonctionnelle peut aussi être déployée pour obtenir plus d'informations sur la localisation de la tumeur par stimulation des régions cérébrales proches de la tumeur. Le débit sanguin au niveau des régions stimulées augmente et sera visualisé sur les images IRM. La principale limite de l'IRM fonctionnelle est que le débit sanguin suite la stimulation de régions trop proches du foyer tumoral peut être masqué par la vascularisation de la tumeur (Kirton et *al.* 2003).

#### 1.4 LA CLASSIFICATION ACTUELLE DU GLIOBLASTOME PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

##### 1.4.1 Evolution de la classification de 2007 à 2016

La classification des gliomes élaborée par l'OMS existe depuis 1979 (**figure 3**). Le GBM est caractérisé par des critères histopathologiques définis par l'OMS dans un but diagnostique, pronostique et prédictif de la réponse aux traitements. A l'IRM, le GBM est décrit comme présentant l'aspect d'une lésion visible, irrégulière.

En 2007 (Louis et *al.* 2007), le GBM était diagnostiqué uniquement à partir de critères histopathologiques. Le GBM était classé parmi les tumeurs astrocytaires de grade 4 qui est le grade le plus élevé parmi les tumeurs cérébrales. Ils étaient définis ainsi en raison de la morphologie des cellules qui les composaient (majoritairement des cellules astrocytaires, bien qu'une certaine hétérogénéité cellulaire soit admise pouvant aller jusqu'à la présence d'une composante oligodendrogliale). Mais aussi, par leur agressivité par rapport aux autres tumeurs astrocytaires, qui se traduisait histologiquement par la présence de mitoses et d'atypies nucléaires, d'une prolifération endothélio-

capillaire et d'éventuels foyers de nécroses. Le GBM est une tumeur vascularisée dont le réseau vasculaire tumoral est dense mais peu fonctionnel. Il génère ainsi des zones hémorragiques et hypoxiques au sein de la tumeur. Le GBM est caractérisé par des zones nécrotiques centrales et des limites périphériques infiltrantes. La nécrose s'explique aussi par l'activité mitotique accrue des cellules de la masse tumorale et la mortalité cellulaire induite par l'hypoxie chronique qui s'installe.

Avec la classification 2007, le diagnostic des GBM restait sujet à une trop grande variabilité entre les anatomopathologistes. On constatait également une hétérogénéité dans l'évolution de la maladie rendant difficile l'évaluation de la réponse aux traitements. Avec l'avènement de la biologie moléculaire, de nombreuses connaissances sur l'impact des profils moléculaires des tumeurs cérébrales sur le pronostic clinique ont été acquises. La classification OMS 2016 des tumeurs cérébrales a donc ajouté aux critères histopathologiques de 2007 quelques critères moléculaires.

La première chose notable avec la classification 2016 est qu'elle ne classe plus le GBM pour leur seule composante astrocytaire mais dans une nouvelle catégorie « gliomes diffus », c'est-à-dire des gliomes à caractère infiltrant. Cette catégorie rassemble aussi bien des astrocytomes diffus de grade 2 que des gliomes diffus oligodendrocytaires de grade 3 par exemple. Cette classification distingue également différents sous-types de GBM en se basant sur la présence ou non de mutation du gène codant la protéine isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1 avec ou sans mutation R132H). Les GBM IDH non mutés sont classés en trois sous-types morphologiques (à cellules géantes, épithélioïde et gliosarcome) et représentent la majorité des GBM. La présence de la mutation IDH1 est retrouvée dans 10% des GBM et signe une évolution péjorative d'un astrocytome diffus de grade II ou III vers un grade IV. Au contraire, l'absence de mutation IDH1 est retrouvée dans la majorité des GBM et est de plus mauvais pronostic. Une dernière catégorie appelée NOS (Not Otherwise Specified) représente les GBM diagnostiqués dont le statut de la mutation IDH1 n'a pas été recherché ou n'a pas été possible lors de la biopsie. D'autres marqueurs sont systématiquement analysés lors du diagnostic moléculaire selon les recommandations du référentiel ANOCEF (Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française) 2018 :

- La mutation K27M dans les gènes codant les histones HIST1H3B et H3F3A dans le cas des gliomes de haut grade pédiatriques et dans de rares cas les gliomes de la ligne médiane chez l'adulte. Ces mutations sont de mauvais pronostic, marquées par un décès prématuré des patients (H3F3A : diminution de la survie globale et HIST1H3B : décès après traitement) (Guidi 2019).
- La mutation V600E BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B). Cette mutation est rare pour les GBM et ne concernerait que 1 à 2 % d'entre eux et survient quasiment systématiquement dans les cas de GBM IDH<sup>mut</sup> (une exception est le GBM épithélioïde, dont 50% d'entre eux présentent une mutation BRAF). Il semblerait que cette mutation entraîne une survie globale affaiblie, plus proches des patients IDH<sup>wr</sup> (Behling et Schittenhelm, 2019).

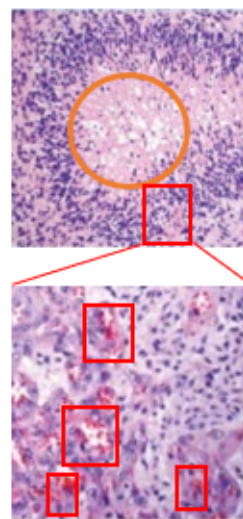
Gliomes diffus chez l'adulte		Grades définis par l'OMS
Astrocytome diffus, mutant IDH		2, 3, 4
Oligodendrogliome, mutant IDH et codéletion 1p/19q		2, 3
Astrocytome diffus, MYB négatif ou altération MYBL1		1
Glioblastome, mutant IDH		4

Critères histopathologiques pour le diagnostic du GBM	
Situation anatomique de la tumeur	
Types cellulaires concernés (astrocytome, composante oligodendrocytaire)	
Présence de foyers nécrotiques et de pseudopalissades	
Densité cellulaire, la vascularisation et l'activité mitotique associée	
Caractérisation du sous-type (GBM à cellules géantes, GBM épithélioïde, gliosarcome) : Morphologie cellulaire et degré de différenciation cellulaire associé	
Présence d'atypies cytonucléaires (noyau plurilobé, présence d'inclusions lipidiques, etc)	

Recherche systématique d'altérations moléculaires	Mutation IDH, amplification du promoteur TERT, nombre de copies des chromosomes 7(+)/10(-), amplification EGFR
Diagnostic moléculaire dans les recommandations ANOCEF 2018	mutation K27M (HIST1H3B et H3F3A ), mutation V600E BRAF, amplification MET
Recherche additionnelle de marqueurs moléculaires	Méthylation du promoteur MGMT



**Figure 3. Classification OMS 2021 du GBM.** La classification OMS classe le GBM dans la catégorie des gliomes diffus de grade 4. Elle récapitule un certain nombre de critères histopathologiques, notamment de foyers nécrotiques (cercle orange) à l'intérieur de la masse tumorale (cercle bleu) et d'une forte vascularisation (rectangles rouges). Elle récapitule également un certain nombre de critères moléculaires obligatoires à évaluer. Certains d'entre eux peuvent faire l'objet d'analyses supplémentaires selon les institutions (Images de Wippold et al. 2006. Adapté d'après Louis et al. 2007, 2016 et 2021).

La recherche d'autres types de mutations peut toutefois se rajouter selon le patient et pour affiner le diagnostic et le pronostic. (Louis et al. 2016) :

- L'amplification EGFR (récepteur du facteur de croissance épithélial) dans le cas des GBM IDH1<sup>wt</sup>. Sa surexpression est de mauvais pronostic et est détectée positive pour 35% des GBM IDH1<sup>wt</sup> et n'est quasiment pas détectée chez les GBM IDH<sup>mut</sup>. Un gliome diffus de grade III sera classé GBM moléculairement s'il y a une surexpression EGFR, un gain du chromosome 7 et une perte du chromosome 10.
- La méthylation du promoteur de la O<sup>6</sup>-methylguanine methyltransferase (MGMT). Il s'agit d'une enzyme capable de déméthylter la guanine et limite l'action des agents alkylants comme le TMZ (Butler et al. 2020). L'activité MGMT semble augmenter d'un facteur 2 à 5 chez les patients atteints de GBM récurrents en réponse au protocole Stupp par rapport aux GBM non traités ou irradiés seulement (Wiewrodt et al. 2007). Ceci peut limiter l'efficacité des traitements, c'est pourquoi le pyroséquençage pour l'analyse du statut du promoteur MGMT peut être préconisé.
- Les mutations sur le promoteur de TERT (Telomérase Reverse Transcriptase). TERT est la sous-unité protéique permettant de catalyser la réaction d'addition des télomères aux

extrémités des chromosomes pour empêcher les pertes chromosomiques à lors des divisions cellulaires répétées. Les mutations de son promoteur qui induisent l'augmentation de l'activité du promoteur de TERT sont de mauvais pronostic et sont détectées positives pour 72% des GBM IDH1<sup>wt</sup> contre 26% des GBM IDH1<sup>mut</sup>.

#### 1.4.2 La nouvelle mise à jour de la classification OMS de 2021

L'insertion de critères moléculaires supplémentaires dans la classification 2016 était pertinente mais risquait de rendre difficile l'application de leur mise en œuvre par les institutions à l'échelle internationale. C'est pourquoi, de 2016 à 2019, le consortium cIMPACT-NOW (Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy) a évalué ces nouveaux critères (Louis et *al.* 2019) avant de publier en juin 2021 une nouvelle mise à jour de la classification pour les futurs diagnostics (Louis et *al.* 2021) (**figure 3**).

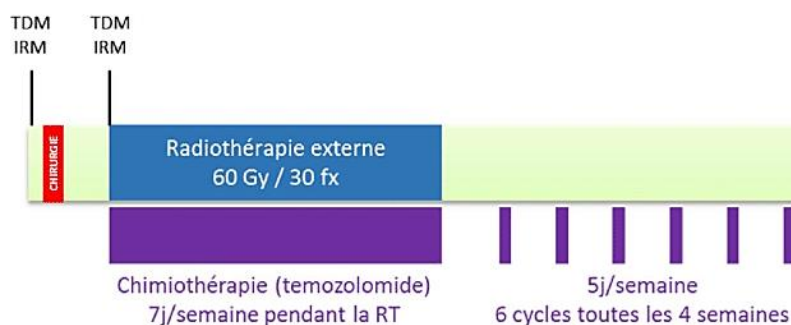
Cette nouvelle mise à jour de la classification se base sur les mêmes les critères histopathologiques et moléculaires précédemment énoncés dans les classifications 2007 et 2016. Toutefois, les tumeurs astrocytaires sont dichotomisées selon qu'elles soient diffuses et selon qu'elles surviennent chez l'adulte et chez l'enfant. Les GBM sont identifiés comme des gliomes diffus astrocytaires primaires. Le diagnostic du GBM prend en compte la cellularité (définition des sous-types : GBM à cellules géantes, GBM épithélioïde et gliosarcome) et la présence de foyers nécrotiques ou de l'augmentation de la microvascularité au sein de la tumeur. La signature moléculaire typique des GBM pour le diagnostic est désormais l'absence de mutation du gène IDH, associée à la présence d'une mutation du promoteur TERT ou d'une amplification du gène EGFR ou d'une modification du nombre de copies de chromosomes 7(+)/10(-). Les tumeurs astrocytaires présentant une mutation sur le gène IDH ne sont plus catégorisées comme GBM mais appartiennent aux astrocytomes diffus, sans donner de grade immédiat (grade 2 à 4 selon le diagnostic clinique).

### 1.5 PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES GLIOBLASTOMES

#### 1.5.1 Le protocole Stupp comme standard thérapeutique

Depuis 2005, les patients nouvellement diagnostiqués pour un GBM suivent le protocole Stupp (Stupp et *al.* 2005) (**figure 4**).

Ce traitement de première ligne est préconisé pour les patients adultes dont l'âge ne dépasse pas 70 ans. La qualité de vie des patients est également prise en compte dans la délivrance du traitement et est quantifié par l'indice de Karnofsky (KPS). Ces patients ont bien souvent un KPS situé entre 60 et 70, ce qui correspond à un patient autonome dont les symptômes entravent sa vie professionnelle voire sa qualité de vie personnelle (hobbys, besoin parfois d'une assistance, etc) (Ovidiu et *al.* 2011). La conduction du protocole Stupp permet à la majorité des patients de maintenir une autonomie acceptable au cours de leur espérance de vie. Les patients présentaient un KPS  $\geq$  70% pendant 73% de leur vie après traitement (Sacko et *al.* 2015).



**Figure 4. Description du protocole Stupp.** Après examen clinique (IRM/TDM), le protocole Stupp se décompose en trois phases. Une résection chirurgicale, la plus large possible, pour retirer au maximum la masse tumorale. Une radio-chimiothérapie concomitante, quatre à six semaines après la chirurgie, dont la dose cumulative de radiothérapie délivrée est de 60 Gray (Gy), répartie en trente fractions de 2 Gy (cinq jours par semaine, répétées sur six semaines) et est associée à chimiothérapie orale à base de témozolomide (TMZ, Temodal®). Une chimiothérapie à base de TMZ est délivrée sous forme orale. Une première dose de 75 mg/m<sup>2</sup> est administrée pendant la radiothérapie puis une dose de 150 à 200 mg/m<sup>2</sup> est utilisée en tant que traitement adjuvant (Adapté de Reuzé, 2018)

### 1.5.2 La chirurgie

Une exérèse chirurgicale est réalisée en première intention chez les patients atteints de GBM. Toutefois, elle dépend de l'âge du patient (plus il est âgé, plus l'intervention est risquée), de son état de santé général, des régions cérébrales où se développe le GBM, de ses antécédents médicaux et comorbidités. La résection doit être la plus large possible (Daigle et *al.* 2013) tout en respectant les fonctions neurologiques des patients afin d'augmenter l'efficacité des traitements et préserver la qualité de vie des patients (Marko et *al.* 2014).

La chirurgie doit être optimale, elle sera combinée à de nombreux outils afin d'améliorer la qualité de l'exérèse. Par exemple, une IRM fonctionnelle préopératoire peut être prescrite pour mieux préparer l'opération en identifiant les zones à haute activité cérébrale, donc les zones à ne pas endommager (Salama et *al.* 2017). L'IRM en tenseur de diffusion préopératoire, la neuronavigation, l'utilisation de loupes binoculaires, d'un bistouri à ultra-sons, d'un microscope opératoire sont d'autres options recommandées dans les référentiels de prise en charge du GBM comme le référentiel ANOCEF en France.

En outre, la visualisation peropératoire du GBM grâce à l'injection d'acide 5-aminolévulinique (GLIOLAN®) est une technique qui tend à se diffuser en France. Ce composé va s'accumuler dans les tumeurs qui va être métabolisé en porphyrines fluorescentes dont on peut visualiser l'accumulation par une fluorescence rouge sur fond bleu. Le but est d'obtenir une imagerie préopératoire de la tumeur pour la résection (Hadjipanayis et Stummer, 2019).

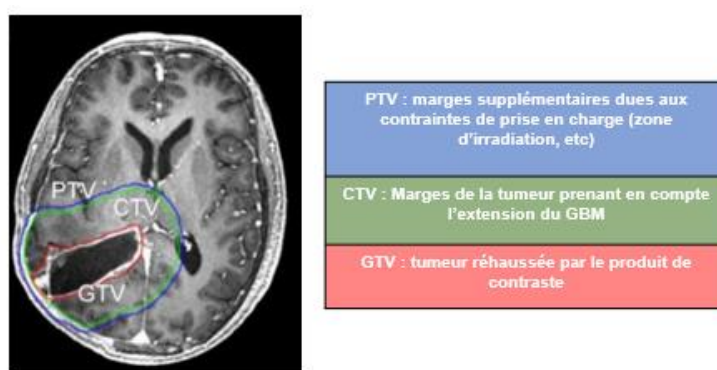
La chirurgie éveillée est également une option envisageable pour guider le chirurgien lorsque le GBM se développe dans des zones cérébrales fonctionnelles. Le chirurgien va stimuler au fur et à mesure de l'opération les zones autour de la masse tumorale ce qui lui permet d'identifier les zones à préserver et donc à limiter le risque de lésions neurologiques (Osorio et Aghi, 2013).

La présence de résidu après chirurgie est systématiquement évaluée par une IRM précoce, 48 heures après le geste opératoire, et une nouvelle fois dans un délai maximum de 10 jours entre cette IRM et le

début de la radiothérapie. L'évaluation de ce volume résiduel est un facteur pronostique important dans la réponse au traitement. En effet, Chaichana et *al.* ont constaté que le volume résiduel était corrélé à la survie globale des patients, avec une perte de 4 mois lorsque le volume résiduel était supérieur à 5 cm<sup>3</sup> (Chaichana et *al.* 2014).

### 1.5.3 La radiothérapie

Le principe de la radiothérapie, les systèmes de délivrance des radiations ainsi que les effets à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire seront traités dans la **partie III**. Dans cette partie, seules les implications de la radiothérapie en clinique seront traitées. La radiothérapie est débutée 4 à 6 semaines après la chirurgie dont la délivrance des radiations ionisantes nécessite un contourage des zones à irradier (**Figure 5**).



**Figure 5. Délimitation des volumes cibles de radiothérapie par les protocoles RTOG/NRG.** La délivrance des radiations ionisantes nécessite un contourage des zones à irradier pour anticiper l'extension de la tumeur et l'imprécision du dépôt de doses. On distingue la masse tumorale (GTV, rouge), les marges de la tumeur (CTV, vert) et les marges supplémentaires dû à l'imprécision du dépôt de doses (PTV, bleu). (Adapté de Cao et al. 2021)

La masse tumorale apparaît grâce au produit de contraste et est dénommé volume tumoral cible (GTV). La délimitation des zones à irradier, appelées le volume clinique cible (CTV), est régie par les protocoles RTOG/NRG est rend compte de l'extension de la maladie post-radiothérapie. Selon les patients, les praticiens peuvent irradier avec une marge de 2 cm autour du GTV. La seule irradiation du CTV ne suffit pas, une précision insuffisante du dépôt de dose est possible en raison de la prise en charge du patient, notamment de la façon dont le patient est positionné lors de l'irradiation (PTV). Une prise de contraste résiduelle sur les IRM sera également réalisée pour le suivi des marges pré et post-irradiation (IRM séquence T2-FLAIR) (Kruser et *al.* 2019). Un suivi IRM est réalisé trois mois après la radiothérapie afin d'évaluer l'évolution de la maladie ou d'éventuelles lésions du tissu cérébral (Fernandes et *al.* 2017).

L'une des difficultés à laquelle les praticiens peuvent faire face est l'apparition d'une pseudoprogression trois mois après la radiothérapie. Il s'agit d'un phénomène observé dans les imageries IRM dans lesquelles la tumeur semble avoir progression mais sans qu'il n'y ait de conséquences cliniques. Il disparaît au cours des semaines suivantes. En cas de mauvaise prise en charge de la pseudoprogression (arrêt de traitement, modifications de la posologie, etc), il peut y avoir une dégradation de la maladie. Certains critères sont étudiés pour pouvoir la discriminer d'une progression liée à un échec thérapeutique. En effet, il semblerait que la pseudoprogression apparaîtrait lors du traitement concomitant de chimiothérapie à base de témozolomide (TMZ) et pour des tumeurs

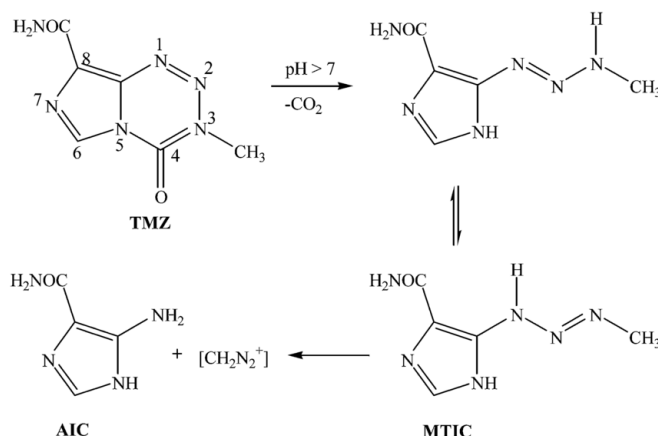


présentant une méthylation du promoteur du gène MGMT (3,5 fois plus de chance d'apparaître par rapport à un vrai rebond de la progression) (Balana et al. 2017).

Une radionécrose, observée dans les imageries IRM, peut également apparaître entre trois mois à douze mois post-radiothérapie. Il s'agit d'une dégradation sévère et locale des sites touchés par les radiations délivrées. La gravité des dommages engendrés est très hétérogène car elle peut concerner tous les tissus présents dans l'encéphale. Par exemple, lorsque les neurones et leurs connexions sont détruites par les radiations, il peut y avoir des pertes entières de fonctions. Ces pertes dépendraient des doses d'irradiation délivrées, avec une plus forte tolérance des régions contenant les corps cellulaires neuronaux (Zaer et al. 2020). Lorsque le réseau vasculaire est sévèrement touché, la perméabilisation des vaisseaux sanguins augmente et la paroi des vaisseaux se rigidifient ce qui peut engendrer un œdème voire la formation de caillot sanguin (Yoshii et al. 2011).

#### 1.5.4 La chimiothérapie

Pendant toute la durée de la radiothérapie, les patients suivent une chimiothérapie à base de TMZ (**figure 6**) (75 mg/m<sup>2</sup>/jour pendant 6 semaines au maximum) puis, suivent une chimiothérapie adjuvante sur 6 cycles de TMZ (150-200 mg/m<sup>2</sup> pendant les cinq premiers jours de 28 jours).



**Figure 6. Activation du TMZ dans le cerveau.** Le TMZ (3-méthyl-4-oxoimidazo[5,1-d] [1,2,3,5] tetrazine-8-carboxamide) est un imidazotetrazine lipophile délivré sous forme orale. Il s'agit d'une prodrogue capable de traverser la BHE capable de s'activer à pH physiologique sanguin pour former le 5-(3-méthyltriazén-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC). Le site de conversion du TMZ en MTIC est soumis à controverse et pourrait se dérouler dans le sang et dans le tissu cérébral. Le MTIC est ensuite spontanément hydrolysé dans le compartiment extra et intracellulaire en 5-amino-imidazole-4-carboxamide (AIC) et en méthylhydrazine (métabolite inactif) (Adapté d'après Martinho et al. 2015 et Strobel et al. 2019).

Ce composé alkylant chargé positivement est capable d'interagir et d'ajouter des groupements méthyls à l'azote N<sup>7</sup>, l'oxygène O<sup>6</sup> de la guanine et à l'oxygène O<sup>3</sup> de l'adénine de l'ADN. Ces adduits vont être à l'origine de mésappariements de base et de cassures simple- ou double-brin par insertion de thymine à la place de la cytosine. Ceci perturbe la réplication de l'ADN et induit la mort cellulaire comme l'apoptose ou l'autophagie (Lee, 2016 et Singh et al. 2020) voire la formation de populations cellulaires sénescents (He et Kaina, 2019).

Stupp et al. avaient démontré une première fois une survie globale des patients augmentée de 2,5 mois par rapport aux patients ayant uniquement suivi la radiothérapie (Stupp et al. 2005). L'étude randomisée de phase III EORTC-NCIC de 2009 a démontré que ce protocole triplait voire quadruplait la survie

globale de 2 à 5 ans par rapport aux patients ayant uniquement irradiés (Stupp et *al.* 2009). Une compilation de données plus récentes a confirmé le bénéfice sur la survie médiane par rapport à l'irradiation seule (Feng et *al.* 2017).

Malgré ce bénéfice, plusieurs recherches soulignent certaines limites thérapeutiques du TMZ. L'hétérogénéité de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (BHE) au niveau de la tumeur limite l'accumulation du TMZ dans la masse tumorale (Sarkaria et *al.* 2018). Ceci se traduirait par une concentration dans la tumeur à hauteur de 20% par rapport à sa concentration plasmatique (Park et *al.* 2020).

La métabolisation du TMZ en MTIC peut également être entravée à la fois dans le compartiment intracellulaire et dans le comportement extracellulaire des cellules tumorales à cause de l'acidose générée par l'hypoxie (compensation de l'anaérobiose par augmentation des influx en sucre et production d'acide lactique, relargage de protons H<sup>+</sup> (effet Warburg) (Stéphanou et Ballesta, 2019). La régulation du passage de certaines molécules dont les agents alkylants est assurée par les transporteurs ABC. Ils provoquent l'efflux de ces molécules ce qui peut limiter leur action au sein de la cellule. Dans le système nerveux central, les transporteurs ABC, notamment ABCG1, sont situés à la surface de la barrière hémato-encéphalique mais peuvent aussi être surexprimés à la surface des cellules de GBM (Chen et *al.* 2016).

De plus, l'efficacité du TMZ semblerait également tributaire des enzymes responsables des modulations de la méthylation de responsables de la réparation de l'ADN. En effet, l'activité MGMT semble augmenter d'un facteur 2 à 5 chez les patients atteints de GBM récurrents en réponse au protocole Stupp par rapport aux GBM irradiés seulement (Wiewrodt et *al.* 2008). Bien qu'il existe de nombreuses contradictions dans la littérature notamment avec l'essai clinique de phase III EORTC 26981 (Gilbert et *al.* 2013), il semblerait que l'absence de méthylation du promoteur de MGMT soit un facteur prédictif de réponse au TMZ (Fosmark et *al.* 2017).

## 1.6 LA RECIDIVE DU GLIOBLASTOME

Le GBM est une maladie marquée par une récurrence quasiment systématique, c'est-à-dire une reprise de la croissance tumorale et de l'infiltration des cellules cancéreuses qui n'ont pas été éliminées par le protocole Stupp. Depuis les années 90, la reprise tumorale chez le GBM a majoritairement été décrite locale et au niveau des marges de la tumeur (Loeffler et *al.* 1990). A ce jour, il n'existe pas de protocole standardisé pour la prise en charge des cas de récurrences.

La réussite et la pertinence de la ré-opération chirurgicale dépend de l'âge du patient, de la taille de la tumeur, de la zone de développement de la masse tumorale initiale (Weller et *al.* 2013). Bien qu'une nouvelle intervention chirurgicale pour traiter une récurrence soit possible, elle comporte plus de difficultés et de risques que lors d'une première intervention. En effet, les imageries IRM de GBM récurrents montrent que les marges de la tumeur sont moins bien définies du fait de l'infiltration post-traitement ce qui compliquent la résection du GBM (Barbagallo et *al.* 2008). En 2017, Dejaegher et De Vleeshouwer ont compilé des suivis cliniques de patients atteints de GBM récurrents qui visaient à déterminer les risques de mortalité et de dégâts sur le tissu sain cérébral après ré-opération. Dans ces études, le taux



de complications variait de 1,4% à 25,8% avec une dégradation de l'état de santé des patients de 25 à 40%. En plus de la chirurgie, l'insertion d'implants de carmustine (GLIADEL®) peut être réalisée en complément de la chimioradiothérapie afin d'augmenter les bénéfices d'une résection (2 mois sans progression et 2,4 mois de survie médiane supplémentaires) (Pallud et *al.* 2015).

La ré-irradiation est également une possibilité mais elle tient compte des doses déjà délivrées aux patients afin de ne pas générer de dégâts sévères ou plus de dégâts le cas échéant. En effet, le fractionnement conventionnel en radiothérapie (2 Gy/fractions) ne permet pas un dépôt de dose cumulée de plus de 72 à 90 Gy dans les régions cérébrales saines avant l'apparition d'une radionécrose (Minniti et *al.* 2021). En ne dépassant pas les seuils limites, il semblerait que la ré-irradiation du GBM récurrent n'entraîne que peu de détériorations des fonctions cérébrales et ne soit donc pas contre-indiqué pour la qualité de vie du patient (Wick et *al.* 2019). Le design des protocoles de radiothérapie, la source utilisée et les systèmes de délivrance des radiations sont des paramètres influenceront sur la réussite de la ré-irradiation et le bénéfice sur la survie sans progression et la survie globale (Kazmi et *al.* 2019).

La chimiothérapie de deuxième ligne peut inclure d'autres molécules que la reprise du témozolomide afin d'éviter son exposition répétée. Le référentiel ANOCEF de 2018 répertorie un certain nombre d'agents de chimiothérapie : la carmustine, la bélustine, la fotémustine (agents nitroso-urés alkylant), la lomustine, la carboplatine seule ou en association à l'étoposide (apparenté aux autres agents alkylants et inhibiteur de la topo-isomérase II).

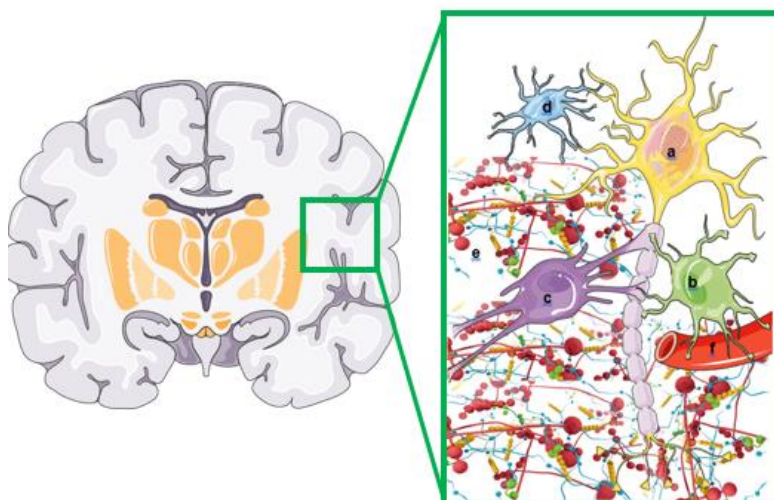
D'autres molécules, autres que les molécules de chimiothérapie, existent pour le traitement du GBM récurrent comme les anticorps monoclonaux. Le Bevacizumab (AVASTIN) est un anticorps monoclonal utilisé en thérapie ciblée contre le récepteur au VEGF. En effet, le GBM étant une tumeur très vascularisée, l'hypothèse de travail est que le blocage de l'angiogenèse médiée par le VEGF pourrait limiter la progression tumorale. Il est utilisé en combinaison à la chimiothérapie voire la radiochimiothérapie. En 2018, Kim et *al.* ont compilé les dernières études de phases II et III sur les GBM récurrents traités selon le et en association au Bevacizumab. Ils ont constaté une amélioration modeste de la survie sans progression (3,5 mois pour le Bevacizumab seul, 1,2 mois pour un agent de chimiothérapie seul et 4,3 mois pour l'association Bevacizumab/chimiothérapie) et de la survie globale (8,2 mois pour le Bevacizumab seul et 9,2 mois pour l'association) (Kim et *al.* 2018). Cependant, il est important de souligner que les résultats sont très contrastés suivants les études cliniques incorporées notamment pour la survie globale dans l'étude clinique de phase EORTC 26101 (Wick et *al.* 2017). Le bevacizumab peut également être prescrit au cours de la re-irradiation des GBM récurrents. La combinaison de ces traitements augmenterait la survie des patients bien que la séquence thérapeutique ne soit pas encore maîtrisée (bevacizumab en premier ou bien radiothérapie en premier). En effet, dans un essai clinique pour des patients traités entre 2006 et 2013, les auteurs ont constaté une augmentation de la survie globale médiane de 3,6 mois par rapport au bevacizumab délivré en premier (Palmer et *al.* 2018).

## 2 PARTIE II : LE GLIOBLASTOME, UNE TUMEUR CERVEbraLE INFILTRANTE

### 2.1 LE CERVEAU : LIEU DE DEVELOPPEMENT DU GLIOBLASTOME

#### 2.1.1 Anatomie du parenchyme cérébral

##### 2.1.1.1 La composante cellulaire du parenchyme cérébral



**Figure 7. Anatomie du parenchyme cérébral.** Le cerveau est composé de deux structures fonctionnelles. La substance grise, représentée par le cortex (gris) et les noyaux gris centraux (orange) qui permettra le traitement et l'envoi des messages nerveux. La substance blanche (blanc) contient les prolongements myélinisés des neurones permettant la conduction des messages nerveux. Au sein du cerveau, le terme parenchyme cérébral (encadré vert) englobe l'ensemble des cellules fonctionnelles cérébrales. Le parenchyme cérébral est constitué des neurones et de leur prolongement axonique myélinisé (a), des cellules gliales [astrocytes (b), oligodendrocytes (c), microglie (d)]. Ces cellules sont entourées de stroma : la Matrice Extracellulaire Cérébrale MECc (e). Les vaisseaux sanguins cérébraux (f) sont séparés du parenchyme cérébral par les pieds astrocytaires (Réalisé à partir de Servier Medical Art et Arends et Lieleg, 2016)

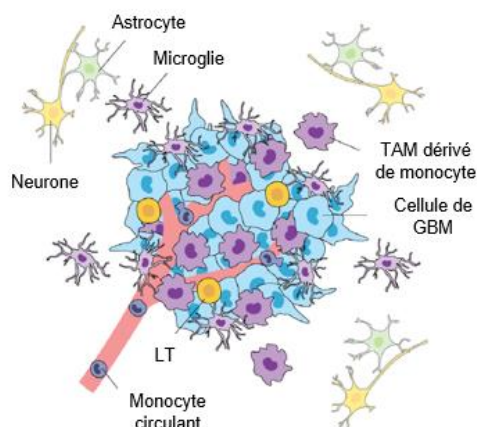
L'ensemble des structures du cerveau sont constitués d'un tissu fonctionnel appelé le parenchyme cérébral (**figure 7**), qui comprend lui-même deux composantes tissulaires. La substance grise (10% du tissu cérébral) constitue le cortex cérébral et contient les noyaux gris centraux et la majorité des corps cellulaires des neurones. Ces neurones vont envoyer les messages nerveux du système nerveux central aux différents organes de l'organisme (neurones efférents). Ils vont également assurer la transmission des messages nerveux des organes sensoriels au système nerveux central (neurones afférents) pour la communication entre les structures du cerveau (Mercadante et Tadi, 2021).

La substance blanche (90% du parenchyme cérébral) est majoritairement constituée des prolongements de l'ensemble des neurones, les axones et dendrites, qui vont assurer la conduction de l'influx nerveux interneuronal et vers les organes cibles (Suarez-Sola et al. 2009). Elle contient également les cellules gliales de soutien à savoir les astrocytes, les cellules de la microglie, les oligodendrocytes et les progéniteurs NG2 :

- Les astrocytes composent la grande majorité des cellules gliales. Ce sont des cellules qui, en plus de la contribution à l'étanchéité de la BHE, vont contrôler la synaptogénèse, l'homéostasie ionique, la régulation des sécrétions en neurotransmetteurs. Compte tenu de la diversité des fonctions des astrocytes, certaines équipes de recherche ont démontré que les astrocytes

présentaient des caractéristiques phénotypiques variées (morphologies protoplasmiques et fibreuses ainsi que l'existence de nombreuses sous-populations, encore aujourd'hui difficiles à dénombrer chez les mammifères). Elles dépendent de leur localisation dans les régions du cerveau, avec une hétérogénéité locale marquée, de leurs fonctions, de l'environnement cellulaire (interactions avec les neurones, les oligodendrocytes) et de la physiopathologie (Khakh et Deneen, 2019).

- Les cellules immunitaires résidentes dans le parenchyme cérébral comprennent les cellules de la microglie (10 à 20% des cellules gliales) ainsi qu'une proportion réduite de lymphocytes T mémoire, entre autres responsables de l'immunoprotection contre les pathogènes (Smolders et *al.* 2018). Les cellules de la microglie orchestrent les réactions inflammatoires liées aux lésions cérébrales et peuvent moduler l'activité cérébrale (modification directe de l'activité synaptique, sécrétion de médiateurs reconnus par les neurones) (Audinat et Arnoux, 2014). Elles présentent une forte plasticité cellulaire et sont capables de modifier leur activité en réaction à leur environnement. Elles peuvent se polariser et présenter un phénotype anti-inflammatoire/cytoprotecteur M2 ou un phénotype pro-inflammatoire M1 selon les conditions physiopathologiques (Giering et *al.* 2017). Le sous-type M1 pro-inflammatoire participe à la réponse immunitaire initiée par la détection d'antigènes, principalement par la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'interleukine IL-1 $\beta$  et l'IL-12) et la phagocytose mais aussi par l'expression des molécules de surface cellulaire nécessaires à la présentation des antigènes (le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) et les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86). Le sous-type M2 anti-inflammatoire ne sécrète pas de cytokines pro-inflammatoires et exercerait plutôt une immunomodulation par la sécrétion de cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et réduirait l'expression des molécules de surface cellulaire nécessaires à la présentation des antigènes (Hambardzumyan et *al.* 2016).



**Figure 8. Les cellules immunitaires présentes dans le cerveau et impliquées dans l'immunité tumorale.** L'immunité cérébrale est composée des cellules immunitaires résidentes dans le cerveau (microglie (TAM), lymphocyte T régulateur) et provenant de la circulation cérébrale (monocyte et TAM dérivé des monocytes, lymphocyte T cytotoxique, helper et Th17). Les macrophages sont la population cellulaire la plus abondante lors du développement tumoral. La majorité d'entre elles sont dérivés des monocytes circulants dans le sang. Ils sont localisés principalement dans les zones périvasculaires et néoplasiques. Les TAMs microgliaux sont plus abondants dans les régions péri-tumorales (D'après Akins et *al.* 2020).

Les cellules de la microglie et les lymphocytes T mémoires sont tous les deux capables de générer un chimiotactisme en réponse à une altération de leur environnement afin d'attirer localement des cellules immunitaires circulantes (LCR et région périvasculaire). Les lymphocytes T cytotoxiques seront capables de détruire les cellules reconnues comme du non-soi, les lymphocytes T helper activeront les lymphocytes T cytotoxiques. Les lymphocytes T régulateurs orchestreront les réponses immunitaires. Les monocytes et les macrophages circulants entrent également en jeu dans l'activité immunitaire cérébrale (Paladugu et *al.* 2013, Hambardzumyan et *al.* 2016 et Ito et *al.* 2019) (**figure 8**).

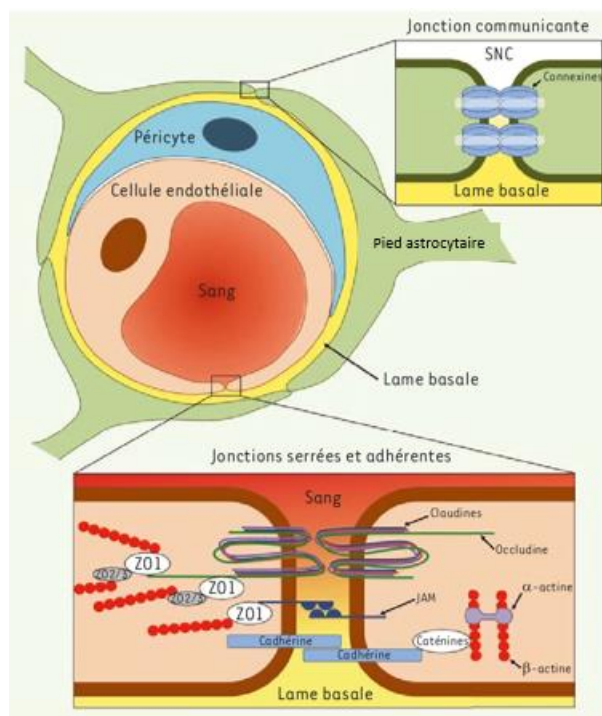
- Les oligodendrocytes composent à 5 à 8% de la totalité des cellules gliales. Ce sont les principales cellules génératrices de la myéline qui est le nom donné à l'extension de la membrane plasmique d'un oligodendrocyte. La myéline se projette tout autour des axones des neurones pour faciliter la transmission des potentiels d'actions axonaux et fournir un soutien métabolique aux axones qu'elle enveloppe (Kuhn et *al.* 2019). Outre la myélinisation, les oligodendrocytes sont en communication avec les autres cellules gliales. Dans les maladies infectieuses et inflammatoires du cerveau, les oligodendrocytes produisent des cytokines et chimiokines modulatrices de l'activité immunitaire. Les oligodendrocytes peuvent également être connectés aux astrocytes *via* des jonctions communicantes permettant les échanges d'ions et de métabolites. Ce contact physique est souvent perturbé dans certaines pathologies menant à la démyélinisation telles que la sclérose en plaque ou la gliose causée par une ischémie. (Nutma et *al.* 2020).
- Les progéniteurs gliaux NG2 font partie de la lignée des oligodendrocytes et permettent de générer un pool d'oligodendrocytes matures et myélinisants. Selon les auteurs, ils sont parfois considérés comme une population gliale à part entière, en raison de ses caractéristiques supplémentaires. Il s'agit du seul type cellulaire à haut potentiel prolifératif dans le parenchyme cérébral ce qui leur confère des caractéristiques analogues à celles des cellules souches. De plus, contrairement aux oligodendrocytes, les NG2 sont capables de recevoir des signaux neuronaux par la formation de synapses fonctionnelles avec les neurones (Jäkel et Dimou, 2017).

#### 2.1.1.2 La barrière hémato-encéphalique

A l'échelle de l'organisme, le cerveau est un organe dont le réseau vasculaire est hautement régulé et possède un réseau lymphatique irrégulier. Sur le plan anatomique, il existe une barrière physique entre le sang et le cerveau appelée la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui limite le trafic des macromolécules, le passage du plasma et de la circulation sanguine vers le tissu cérébral (**figure 9**). Cette barrière est formée par une seule couche de cellules endothéliales, entourées d'une lame basale. L'étanchéité des vaisseaux sanguins au niveau de la barrière est assurée par :

- Les jonctions serrées liant les cellules endothéliales et l'absence de canaux transendothéliaux.
- La présence de péricytes dans l'espace périvasculaire, enchâssés dans la lame basale.

- Les prolongements cellulaires jointifs appelés pieds astrocytaires projetés par les astrocytes sur les péricytes (Berthelot et Laplaud, 2008).



**Figure 9. Schématisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE).** La BHE est une barrière qui permet de prévenir la pénétration de la plupart des molécules et des cellules qui circulent du sang vers le système nerveux central. Cette barrière se forme grâce aux jonctions serrées et adhérentes des cellules endothéliales et de leur lame basale ainsi que par les pieds astrocytaires et des péricytes. Les cellules endothéliales forment des jonctions serrées et adhérentes qui sont étanches. La majorité de la surface des vaisseaux sanguins est recouverte par les pieds des astrocytes, permettant de réguler la structure et la perméabilité de la BHE (D'après Renaud et al. 2015)

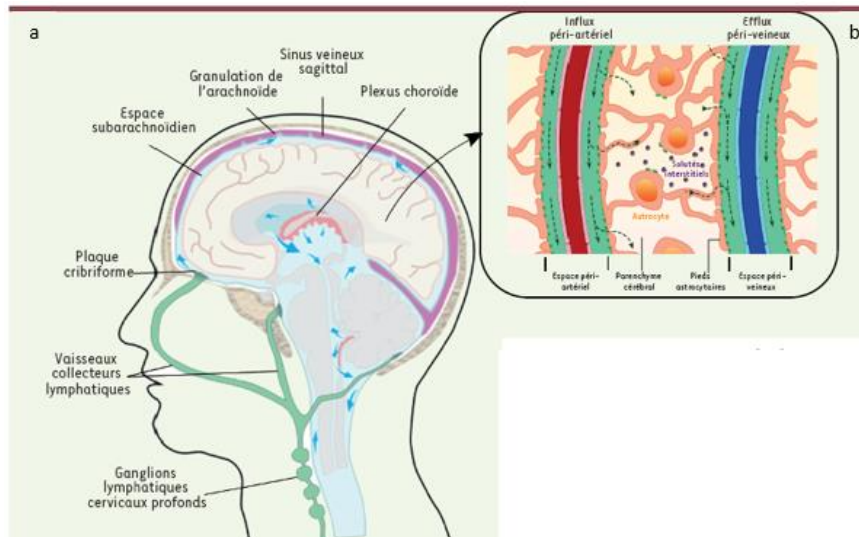
#### 2.1.1.3 La circulation du liquide céphalo-rachidien et le drainage lymphatique cérébral

La régulation de l'eau, des solutés, la collecte des déchets et la remise en circulation de l'immunité passe par le liquide céphalo-rachidien (LCR) à la surface externe du cortex cérébral, plus spécifiquement entre la pie-mère et la membrane arachnoïdienne. Le LCR est en majorité généré par les épendymocytes des ventricules cérébraux et provient en minorité des liquides interstitiels sécrétés par le tissu cérébral et les capillaires cérébraux. Le drainage lymphatique du LCR existe dans le cerveau au niveau périvasculaire (entre la lame basale des vaisseaux et leur paroi externe) mais aussi au niveau paravasculaire (système « glymphatique », entre les astrocytes et les capillaires cérébraux) et des méninges (liés aux LCR et aux ganglions cervicaux). L'eau et les différentes molécules hydrophiles et lipophiles vont transiter des pieds des astrocytes vers les espaces périvasculaires grâce à la pression du LCR (Sun et al. 2018 et Thomas et al. 2019) (**Figure 10**).

#### 2.1.2 La matrice extracellulaire cérébrale

Les différentes MEC composant l'organisme possèdent une constitution unique en macromolécules qui est dépendante de la localisation anatomique et de la fonction. La MEC cérébrale (MECc) ne constitue que 20 % du volume du tissu cérébral total. La MECc peut être divisée en deux groupes généraux. La MEC du parenchyme cérébral est composée principalement de glycosaminoglycanes de type acide





**Figure 10. Le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le système glymphatique.** a. La régulation et la filtration des compartiments liquidiens sont permises grâce à la circulation du LCR. Ce liquide (en bleu) provient des ventricules cérébraux (latéraux et quatrième ventricule). Il circule au niveau de l'espace sous-arachnoïdien. La réabsorption du LCR est complexe, et peut passer par le sinus veines sagittal supérieur, à travers certaines portions du système glymphatique notamment au niveau des méninges et le long des nerfs crâniens. b. La circulation des liquides cérébraux à travers le système glymphatique passe par d'autres structures que pour le LCR. Les flux périvasculaires peuvent transiter du le parenchyme cérébral *via* les pieds des astrocytes vers les espaces périveineux. Le liquide interstitiel passe ensuite des espaces péri-veineux vers l'espace sous-arachnoïdien (D'après Thomas et *al.* 2019)

hyaluronique (AH, également appelée hyaluronane ou hyaluronate), de protéoglycanes de type chondroïtine sulfate, héparane sulfate, de la famille des lecticans (neurocan et brevican), des tenascines. Elle ne comporte pas de collagène et très peu de molécules fibreuses comme la fibronectine. La MEC des membranes basales autour des vaisseaux sanguins et à la surface piale est principalement constituée de collagène de type IV, de laminine (glycoprotéine), de perlecan (glycoprotéine à base d'héparane sulfate) et d'entactine (glycoprotéine) (Ferrer et *al.* 2018).

Structurellement, la MECc est une barrière physique qui réduit la diffusion des molécules solubles et régule le déplacement des cellules gliales (Barros et *al.* 2011). Elle impacte aussi de nombreux processus en conditions physiologiques et pathologiques du cerveau adulte notamment la croissance des prolongements neuronaux, la synaptogenèse, la stabilisation synaptique et la plasticité liée aux lésions. (Lam et *al.* 2019). Comme toutes les autres MEC, la MECc est une réserve en facteurs de croissance et cytokines. Par exemple, les HS possèdent des domaines de liaison pour le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), facteur de croissance des hépatocytes (HGF) (Wiranowska et Rojiani, 2011)

#### 2.1.2.1 L'acide hyaluronique

L'AH est la molécule la plus présente dans le MECc. Elle est constituée d'une succession d'assemblages d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-glucosamine. Elle possède des domaines de branchements aux PG de la MECc permettant de former le réseau tridimensionnel de macromolécules. L'AH possède également de nombreux résidus hydrophiles contribuant à l'hydratation interstitielle (Ferrer et *al.* 2018).

L'AH est synthétisée par les cellules gliales grâce à une enzyme appelée hyaluronane synthase. Le poids moléculaire de l'AH contenue dans le parenchyme cérébral est variable et peut atteindre 10000 kDa. Différentes isoformes de la hyaluronane synthase coexistent dans le cerveau et expliqueraient la diversité des poids moléculaires de l'AH cérébrale détectée. L'isoforme 1 peut synthétiser des AH de 200 à 2,000 kDa, l'isoforme 2 des AH dont le poids est supérieur à 2,000 kDa et l'isoforme 3 peut synthétiser des AH de 100 à 1,000 kDa (Chen et *al.* 2019).

De même, la dégradation de l'AH par la hyaluronidase pour le remodelage et l'entretien de la MECc peut produire des fragments finaux de différents poids moléculaires, pouvant être inférieurs à 20 kDa. Le poids moléculaire de l'AH a une répercussion sur la biologie du tissu, l'AH de poids moléculaire supérieur à 500 kDa est important pour le soutien structurel et les propriétés biophysiques des tissus (Chen et *al.* 2019). De plus, plusieurs rapports ont démontré que les modifications de la quantité et de la taille de l'AH sont fonctions des conditions physiopathologiques. La présence d'AH de poids moléculaire inférieur à 50 kDa est prédominante dans les lésions tissulaires et serait capable d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Tavianatou et *al.* 2019).

Dans le cas des tumeurs solides, l'augmentation de la synthèse et la fragmentation supplémentaire de l'AH par les cellules tumorales stimule l'inflammation, qui à son tour favorise la malignité et la progression tumorale. L'accumulation d'AH de faible poids moléculaires est ainsi considérée comme un marqueur de malignité (Tavianatou et *al.* 2019). Les cellules tumorales sont aussi capables de se lier à l'acide hyaluronique *via* le récepteur membranaire CD44 (Kim et Kumar, 2014). CD44 est à l'origine de l'activation de voies de signalisation facilitant le déploiement des prolongements cellulaires nécessaires à la migration cellulaire (Wolf et *al.* 2020).

#### 2.1.2.2 Les glycoprotéines sulfatées

Les glycoprotéines sulfatées sont des assemblages de disaccharides contenant des groupements sulfate et attachés de manière covalente à des protéines. On distingue deux classes principales dans la MECc : la chondroïtine sulfate et l'héparane sulfate (Miyata et Kitagawa, 2017).

Les chondroïtines sulfates sont fortement synthétisées par les neurones au niveau de leur prolongement cellulaire (région périneuronale) (Miyata et Kitagawa, 2017), par les astrocytes et les cellules souches neurales (Wiranoski et Rojiani 2011). Les CS représentés dans le parenchyme cérébral sont les lecticans, une famille de CS agrégateurs représentée par quatre membres dans la MECc : aggrecan, versican, neurocan, et brevican. La particularité de ces molécules est qu'elles sont capables de se lier à un large répertoire de composés retrouvés dans la MECc *via* leur domaine N-terminal (AH, CD44 à la surface des cellules gliales, les lecticans) et C-terminal (ténascine, fibronectine). Elles possèdent également des domaines de liaison à des facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ , EGF, PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), FGF (Facteur de croissance fibroblastique) (Miyata et Kitagawa, 2017 et Wiranoski et Rojiani 2011). Toutes ces propriétés font des chondroïtines sulfate de puissants modulateurs de la plasticité neuronale et certains auteurs ont également mis en évidence un rôle barrière dans la diffusion de certaines molécules et des cellules dans le parenchyme cérébral (Lee et Kim, 2015).

L'héparane sulfate possède des fonctions de réserve en facteurs de croissance similaires aux chondroïtines sulfate, pouvant lier l'IGF, l'HGF et le TGF- $\beta$ . L'héparane sulfate peut également lier certaines cytokines comme l'IL-10, l'IL-7 ou l'IL-8, qui peuvent ainsi être utilisées localement pour les réactions inflammatoires dans le parenchyme cérébral (Wiranowska et Plaas, 2008). Le glypican et le syndécan, deux héparanes sulfate de la MECc, sont particulièrement exprimées dans les niches de cellules souches neurales et présenteraient un rôle majeur dans la formation des synapses et la plasticité neuronale (Kamimura, 2021).

#### 2.1.2.3 Les glycoprotéines fibreuses

Les GP fibreuses sont majoritairement présentes dans la lame basale des vaisseaux sanguins cérébraux. On y distingue quatre grands types : les laminines, la vitronectine, la fibronectine et le collagène de type IV. Elles vont servir à la neurogénèse, à l'hémostase et peuvent aussi servir de points d'ancrage aux cellules migrant le long de la paroi des vaisseaux (Jia et al. 2019).

#### 2.1.2.4 Les galectines

Les galectines sont des GP de la famille des lectines. Elles sont exclusivement sécrétées sous forme polymérique par les cellules gliales et endothéliales. Elles sont capables de réaliser des liaisons N-acétylgalactosamines avec des protéines transmembranaires comme les intégrines ou bien des GP de la lame basale comme la laminine et la fibronectine. Ces GP vont entraîner l'induction de cascades de signalisation régulatrices du développement cérébral mais aussi de l'angiogenèse et des interactions cellulaires (Le Mercier et al. 2010).

#### 2.1.2.5 La ténascine C

La ténascine C est constituée huit sous-unités FN3 reliées par des ponts disulfures et possède de nombreux domaines EGF/fibronectine III/fibrinogène – like. Les domaines de la ténascine-C seraient capables de fixer la sous-unité  $\beta 1$  et l'hétérodimère  $\alpha \beta 3$  des intégrines exprimées à la surface des cellules tumorales, ce qui permettrait de fournir un point d'ancrage aux cellules tumorales pour leur mise en mouvement (Tucker et Chiquet-Ehrismann, 2015). La ténascine C serait également fortement sécrétée par les cellules gliales au niveau des niches de cellules souches neuronales pour permettre de réguler la croissance cellulaire (Xia et al. 2016).

#### 2.1.2.6 Les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire cérébrale

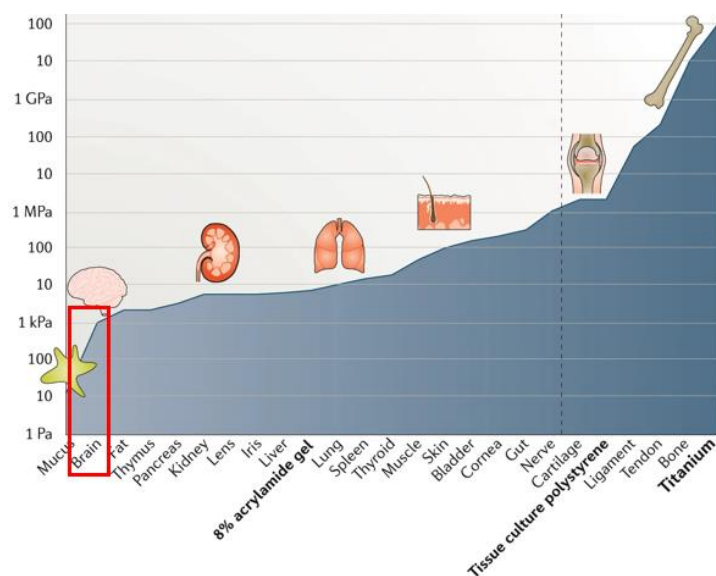
Chaque tissu de l'organisme est caractérisé par des propriétés mécaniques liées à la composition moléculaire de la MEC mais aussi par les cellules du tissu. Localement, une cellule est soumise à des forces endogènes en grande partie produites par la contractilité du cytosquelette des cellules environnantes. Elle est aussi soumise à des forces exogènes liées aux réseaux de molécules de la MEC, comprenant la gravité, les contraintes de cisaillement, les forces de traction et les forces de compression. Ces forces exogènes sont liées aux interactions cellules/MEC et à la rigidité locale (Handorf et al. 2015).

##### 2.1.2.6.1 La rigidité de la matrice extracellulaire cérébrale

La MEC est définie par sa résistance aux forces de compression, c'est-à-dire sa capacité à résister aux contraintes physiques exercées. La rigidité de la MEC peut se traduire par une valeur quantifiable que



l'on appelle le module d'Young. Cette valeur indique la force qu'il est nécessaire d'exercer pour déformer la MEC et est exprimée en Pa. Dans le cerveau, la rigidité de la MECc serait comprise entre 1 et 4 kPa (**Figure 11**). Comparée aux autres tissus de l'organisme, cette faible rigidité s'explique par l'abondance en protéines non fibrillaires comme l'AH. (Handorf et al. 2015).



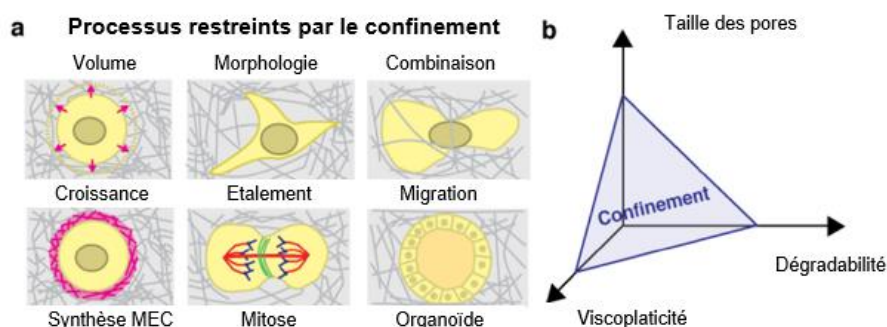
**Figure 11. La rigidité du cerveau à l'échelle de l'organisme.** Chaque tissu de l'organisme est caractérisé par une rigidité qui lui est propre, c'est-à-dire une capacité à résister à des forces de compression. Le tissu cérébral est le deuxième tissu le moins rigide de l'organisme après les muqueuses et avant le tissu adipeux. Sa rigidité, exprimée en Pa est comprise entre 1 et 4 kPa. A titre d'exemple, un gel de polyacrylamide à 8% peut être jusqu'à 8 fois plus rigide que le tissu cérébral (D'après Guimaraes et al. 2020)

Lors du développement cérébral, la MECc qui entoure les neurones engendrent des signaux mécaniques variés et évolutifs selon sa composition et sa rigidité. Il a été montré dans de nombreuses études que la rigidité influence la morphogenèse des circuits neuronaux comme l'élongation des axones (distance, direction, etc) (Gangatharan et al. 2018). L'épaisseur et la rigidité de la MECc est aussi fondamentale dans le maintien de l'homéostasie du parenchyme cérébral. La rigidité de la MECc située au niveau de la région périneuronale est par exemple supérieure à celle située autour des autres cellules gliales (1 kPa contre 400 Pa) ce qui va faciliter la modulation de la morphologie des neurones lors de la neurogenèse. En revanche, une MECc trop rigide peut empêcher la neurogenèse, c'est-à-dire que les forces d'accroche générées déclenchent l'expression de voies de signalisation qui empêche la migration des cellules souches neurales (Barnes et al. 2017).

#### 2.1.2.6.2 La viscoélasticité de la matrice extracellulaire cérébrale

Le point de vue mécanistique actuel est que les cellules exercent des forces de traction lorsqu'elles sont attachées à la MEC et qu'elles détectent les variations de la rigidité de la MEC. Cependant, les tissus ne peuvent être définis uniquement par leur seul degré de rigidité. En effet, les tissus ne sont pas entièrement élastiques, ils présentent une réponse mécanique dépendante du temps et dissipent une fraction de l'énergie qu'il a fallu dépenser nécessaire à leur déformation. De nombreux tissus mous possèdent une élasticité non linéaire : ils deviennent de plus en plus difficiles à étendre lorsqu'ils sont déformés pour prévenir les trop grandes déformations qui endommagent les tissus.

Cette propriété, appelée viscoélasticité, a été analysée dans une récente revue de la littérature afin de mettre en évidence la contribution de la viscoélasticité des MEC dans les processus biologiques (Chaudhuri et al. 2020) (**figure 12a**). Les observations de culture cellulaire *in vitro* montrent que les contraintes mécaniques qu'exerce la MEC sur les cellules dans les trois dimensions spatiales entraîneraient une modification de leur volume et/ou de leur morphologie, ce qui impacterait des processus comme la croissance, l'étalement et la migration des cellules. Ainsi, la synthèse de la MEC, la mitose ou encore la formation d'organoïde serait par exemple impacté par la structuration de la MEC. (taille des pores de la MEC, dégradabilité et plasticité intrinsèque ou viscoplasticité) (**figure 12b**).



**Figure 12. Corrélation entre le confinement mécanique des cellules et la viscoélasticité de la MEC.** a, Lorsque les cellules sont entourées d'un environnement exerçant des contraintes mécaniques, l'ensemble des processus physiologiques de la cellule sont dépendantes de la MEC environnante. Le confinement restreint les variations de volume cellulaire, les changements morphologiques ou une combinaison de ces deux paramètres. b, Le confinement est régi par la taille des pores de la MEC, de la dégradabilité de la matrice et de la viscoplasticité de la matrice. Une valeur suffisamment grande pour l'une de ces propriétés diminue le confinement des cellules. (Chaudhuri et al. 2020)

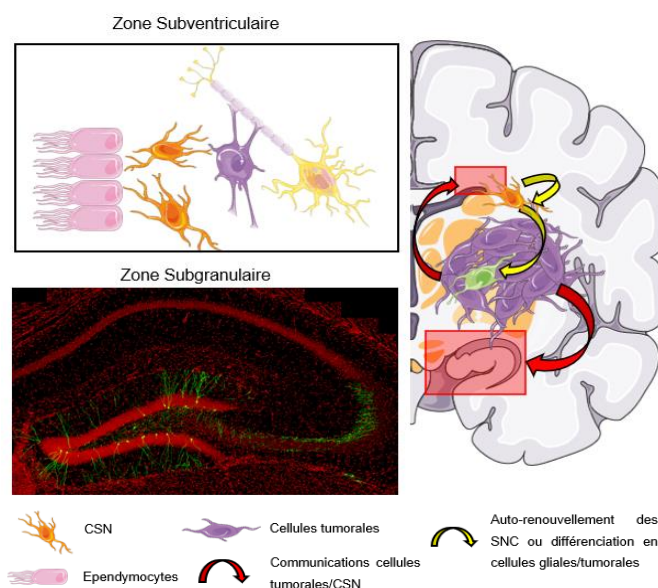
Wisdom et al. ont notamment démontré que les cellules cancéreuses mammaires étaient capables de générer des forces initiées par leurs protrusions afin de migrer à travers des matrices nanoporeuses. De plus, l'écartement des pores des matrices était uniquement possible lorsque les matrices présentaient une plasticité mécanique suffisante, démontrant un impact de la plasticité globale de la MEC sur le processus de migration (Wisdom et al. 2018).

## 2.2 LE GLIOBLASTOME, UNE TUMEUR HETEROGENE

### 2.2.1 Les hypothèses de l'origine du glioblastome

#### 2.2.1.1 Origine cellulaire du glioblastome

A l'heure actuelle, l'origine des cellules GBM n'est pas encore tranchée dans la communauté scientifique. Quelques éléments d'explications sur leur apparition ont été documentés dans la littérature afin de comprendre à partir de quelles cellules du cerveau les cellules de GBM dériveraient (Llaguno et Parada, 2016). Les GBM pourraient résulter d'une accumulation de mutations génétiques oncogéniques au niveau des cellules souches neurales adultes. Chez l'adulte, il existe deux niches neurogéniques de CSN : la zone subventriculaire des ventricules latéraux et la zone subgranulaire du gyrus denté au niveau de l'hippocampe (**figure 13**). Ces cellules sont multipotentes, capables de se différencier en neurones, en astrocytes ou en oligodendrocytes et sont capables de s'auto-renouveler. Dans la revue de Llaguno et Parada récapitulant les expérimentations réalisées pour comprendre la neurogenèse sur des modèles murins adultes, il semblerait que les mutations touchant des gènes contrôlant le cycle



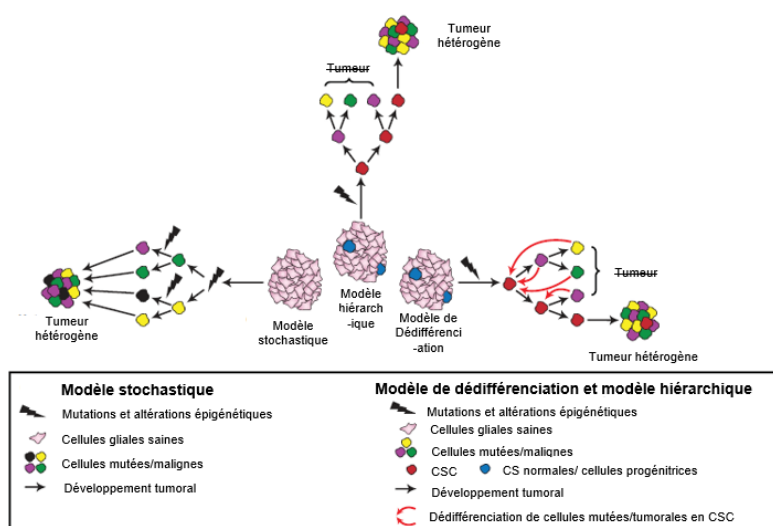
**Figure 13. Localisation des cellules souches dans le cerveau sain adulte.** Chez l'adulte, il existe deux niches neurogéniques de CSN : la zone subventriculaire des ventricules latéraux (haut) et la zone subgranulaire du gyrus denté au niveau de l'hippocampe. Ces cellules sont multipotentes, capables de se différencier en neurones, en astrocytes, en oligodendrocytes voir en cellules tumorales et sont capables de s'auto-renouveler (Imagerie microscopie de fluorescence, Université de Lausanne, Département des neurosciences fondamentales, UNIL. Images obtenues à partir de Medical Servier Art. Adapté de Llaguno et Parada, 2016)

cellulaire et la survie (TP53, PTEN, Rb) ainsi que sur les gènes contrôlant le caractère souche des cellules (Nestine et GFAP) induisent l'apparition de gliomes de haut grade, dont des GBM. Certaines cellules de GBM présentent des caractéristiques proches de certaines cellules gliales comme les astrocytes, c'est pourquoi certains auteurs ont émis l'hypothèse que les GBM pourraient également provenir de la dédifférenciation de cellules gliales suite à l'accumulation de mutations géniques (Llaguno et Parada, 2016 et Yao et *al.* 2018). Un ensemble hétérogène de cellules cancéreuses se formerait, avec l'apparition de niche de cellules souches de GBM qui permettrait la croissance tumorale (Llaguno et Parada, 2016 et Yao et *al.* 2018).

#### 2.2.1.2 Modèles de développement du glioblastome

Dans le cas du GBM, l'hétérogénéité cellulaire intratumorale se développerait au fur et à mesure des divisions et différenciations des cellules souches. Il s'agit d'un phénomène asymétrique avec une possibilité d'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques qui confèrent aux cellules de nouvelles propriétés (auto-renouvellement, résistances aux thérapies, etc). Deux modèles décrivant l'hétérogénéité tumorale sont distingués : le modèle hiérarchique et stochastique (Rich, 2016) (**figure 14**).

Le postulat du modèle hiérarchique est que l'origine des cellules tumorales provient des cellules souches cancéreuses. Une partie de cette population, minoritaire et auto-renouvelable dans la tumeur, se différencie en progéniteurs de cellules cancéreuses qui vont être capables de se différencier en cellules cancéreuses « matures » dont le phénotype peut être différent en fonction des dérives géniques. La tumeur va donc être constituée de plusieurs populations de cellules dont le phénotype sera différent et dont les capacités de prolifération et d'auto-renouvellement seront différentes.



**Figure 14. Hypothèses du développement des GBM : les modèles stochastique, hiérarchique et de dédifférenciation.** Dans le modèle stochastique, les mutations s'accumulent au fil du temps et toute cellule peut avoir un potentiel tumorigène. Cependant, ce potentiel ne peut être isolé ou enrichi. Dans le modèle hiérarchique, seules les cellules souches possèdent un potentiel tumorigène, tandis que les cellules différenciées en ont peu ou pas du tout. Selon le modèle de dédifférenciation, les cellules non tumorigènes ou tumorales différenciées peuvent redevenir des cellules souches cancéreuses (CSC) (D'après Rich et al. 2016).

A l'inverse, le modèle stochastique part du principe que toutes les cellules d'une tumeur peuvent être des cellules initiatrices de la tumorigénèse. Ce modèle, appelé aussi « évolution clonale », stipule que chaque cellule est susceptible de dériver au fur et à mesure de l'accumulation de mutations, de régulations épigénétiques, de réponses au microenvironnement cellulaire et moléculaire et des mitoses, générant une hétérogénéité tumorale.

Ces deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. Un modèle alternatif de plasticité cellulaire réversible relie les modèles hiérarchique et stochastique et énonce que les cellules cancéreuses peuvent osciller entre des profils souches et des états différenciés. Selon le modèle de plasticité, les processus intrinsèques des cellules tumorales et/ou des stimuli au sein du microenvironnement cérébral pourraient influencer les cellules tumorales différenciées à réacquérir des caractéristiques de cellules souches. Inversement, ces processus pourraient également conduire les cellules souches cancéreuses à perdre leur profil souche pour des cellules cancéreuses différenciées (Rich, 2016).

#### 2.2.1.3 Les cellules souches de glioblastome

Les cellules souches de GBM représentent une population cellulaire bien particulière qui est capable d'autorenouvellement et de différenciation. Leur rôle central dans le développement de la tumeur a amené les chercheurs à identifier leurs caractéristiques (Prager et al. 2020).

L'identification des cellules souches de GBM est réalisée par la détection de marqueurs de surface, dont les plus connus sont CD15/SSEA, Sox2, Nestin, Olig2, CD44, CD133 et A2B5. Cependant, l'utilisation de ces marqueurs pour la caractérisation est encore soumise à controverse. En 2015, Kenney-Herbert et al. ont étudié la corrélation entre l'expression du marqueur CD15 et l'identification de populations souches cancéreuses isolées de biopsies de dix GBM de patients. Les auteurs ont démontré par immunocytochimie que les cellules isolées CD15+ et CD15- ne présentent pas de différences significatives d'expression de marqueurs neural souches (Nestin 100% vs 97%, Sox2 100%

vs 100%, Olig2 68,8% vs 75%, PDGFRA 100% vs 100% et NG2 21,6% vs 27%). De plus, les cellules CD15+ et CD15- sont capables de former un nombre de clones similaires (5 à 50% des cellules selon les clones cultivés) et peuvent initier la croissance tumorale *in vivo* chez la souris nude (Kenney-Herbert et al. 2015). Une revue de la littérature publiée en 2018 par Ahmed et al. s'est centrée sur l'expression CD133 dans le glioblastome. Le marqueur rendrait compte du degré de malignité de la tumeur, des capacités clonogéniques et prolifératives mais que le marqueur n'était pas toujours exprimé sur des populations de cellules agressives, présentant des caractéristiques souches (Ahmed et al. 2018).

Ces marqueurs sont en revanche connus pour être utilisés pour l'enrichissement cellulaire dans le but de sélectionner des populations de cellules de GBM au profil hétérogène et pour la formation de neurosphère en 3D (Kim et al. 2015). Plus récemment, Dirkse et al ont étudié l'évolution des cultures de GBM primaires issus de patients après enrichissement et en culture neurosphère 3D. Chaque sphère exprimait les différents marqueurs de surface CD15, CD133, CD44 et A2B5 d'enrichissement souche. De manière intéressante, les auteurs ont caractérisé 16 sous-populations de cellules par séquençage puis par tri cellulaire à l'aide d'un cytomètre en flux. Les capacités prolifératives de ces cellules étaient différentes (population à l'équilibre entre 90 et 350 jours) et la distribution cellulaire dans la sphère évoluait après 39 jours de culture. Non seulement les capacités intrinsèques des cellules souches de GBM peuvent être différentes dans une même tumeur mais elles sont aussi capables de transiter d'un phénotype différencié à indifférencié (Dirkse et al. 2019). En effet, il a déjà été rapporté dans une revue de la littérature parue en 2021 que les cellules souches de GBM sont capables d'adopter les différents sous-types moléculaires de GBM et de transiter vers un profil prolifératif ou bien quiescent en fonction des conditions microenvironnementales (hypoxie, apport en glucose, nécrose) (Wang et al. 2021).

## 2.2.2 Les étapes de la gliomagenèse

La gliomagenèse désigne l'ensemble des étapes de la progression tumorale qui sont mises en place dans les gliomes. Le développement des cancers est défini par six caractéristiques principales dont certaines varient selon la tumeur considérée (Hanahan et Weinberg, 2011, Noroxe et al. 2017) (**Figure 15**).

### 2.2.2.1 La dérégulation de la prolifération

Dans un contexte physiologique, la prolifération cellulaire est régulée par une signalisation médiée par des facteurs sécrétés, des récepteurs transmembranaires et des protéines intracellulaires. Dans le cas de la cellule cancéreuse, des mécanismes se mettent en place pour maintenir les voies de signalisation de la prolifération. Cette dérégulation se traduit par des aberrations dans la signature des gènes impliqués dans la prolifération et sa régulation. Par exemple, l'expression de certains oncogènes comme le récepteur à l'EGF est amplifiée tandis que l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire comme P53 est inhibée. L'immortalisation des cellules de GBM est également un phénomène récurrent avec une amplification du gène codant la télomérase TERT.

### 2.2.2.2 La résistance à la mortalité cellulaire

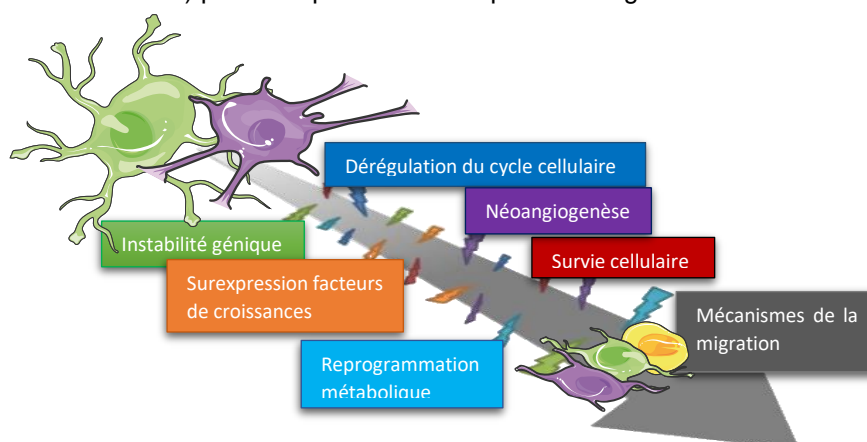
La progression tumorale est également maintenue par la résistance à la mort cellulaire. Dans les cellules normales, la mort cellulaire peut être programmée, en réponse à un microenvironnement défavorable et peut se produire en réponse en cas de stress métabolique.



Dans le cas des cellules de GBM, des mécanismes de résistance à la mort cellulaire par apoptose se mettent en place par le biais des altérations d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs comme P53. La résistance à la mort cellulaire peut également se déclencher par autophagie qui permet aux cellules de GBM de décomposer les organites pour en recycler les catabolites nécessaires au maintien de leurs activités métaboliques. La libération de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-2 est aussi un facteur de résistance à la mort cellulaire car les cytokines produites vont se fixer aux cellules tumorales adjacentes et enclencher des voies de survie.

### 2.2.2.3 La reprogrammation métabolique

La masse tumorale est caractérisée par des gradients en nutriments et en oxygène qui nécessitent une adaptation des cellules les plus centrales. Pour s'adapter au manque d'oxygène et en nutriments, les cellules cancéreuses peuvent reprogrammer leur métabolisme pour produire de l'énergie sous forme d'ATP par le biais d'une glycolyse anaérobie. Elles produisent alors de l'acide lactique à partir du glucose, qui subit ensuite une fermentation pour produire deux à trois molécules d'ATP par molécule de glucose. Ce type de métabolisme est peu énergétique comparé à la production normale d'énergie par phosphorylation oxydative mitochondriale. La cellule tumorale augmentera ses apports en glucose grâce à l'augmentation du nombre de transporteurs transmembranaires spécifiques du glucose comme GLUT1. De plus, la glycolyse anaérobie produit des intermédiaires utilisés pour faciliter d'autres voies de biosynthèse (nouveaux organites, macromolécules, ... nécessaires à la formation de nouvelles cellules filles lors de la division) pour compenser le manque en énergie.



**Figure 15. Principales étapes de la gliomagenèse menant à la mise en place des mécanismes de migration cellulaire.** Préalablement à la migration, les cellules de gliome mettent en place des mécanismes assurant la prolifération cellulaire (dérégulation du cycle cellulaire, surexpression de facteurs de croissance), l'inhibition de l'apoptose (survie cellulaire) et la facilitation de la nutrition et de l'oxygénation (reprogrammation métabolique, néoangiogenèse). Toutes ces étapes permettront la progression des cellules lors de l'infiltration du parenchyme cérébral sain. (Adapté de Hanahan et Weinberg, 2011 et Noroxe et al. 2017)

## 2.3 LES CARACTERISTIQUES TISSULAIRES DU GLIOBLASTOME

### 2.3.1 Les principales caractéristiques tissulaires du GBM

Les GBM sont connus pour leur grande hétérogénéité histopathologique, notamment par la forte activité mitotique, une densité cellulaire accrue, la présence de zones nécrotiques et d'une microvascularité. Dans les coupes histologiques de GBM, il est également possible d'observer d'éventuelles thromboses

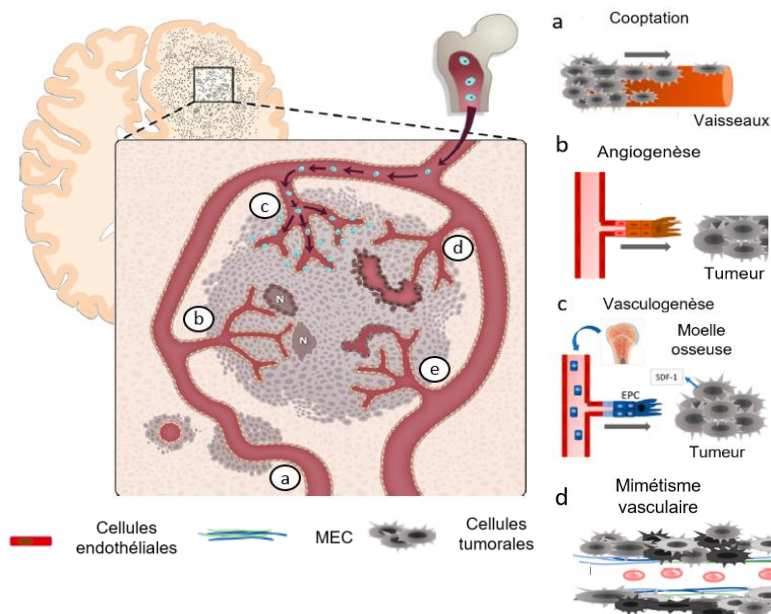
et une infiltration bien particulière des cellules tumorales dans le tissu sain environnant, pouvant adopter des patterns précis (présence diffuse de cellules tumorales, présence de cellules tumorales autour des vaisseaux sanguins ou des neurones). Le tissu tumoral du GBM est irrégulier, que cela soit par rapport à sa vascularisation que son extension (Mikkelsen et *al.* 2020).

### 2.3.2 Le réseau vasculaire tumoral

Le GBM est une tumeur particulièrement vascularisée par rapport aux gliomes de bas grade. Le réseau vasculaire apparaît également chaotique, immature, par rapport à celui du cerveau sain. Comme beaucoup d'autres tumeurs solides, l'expansion du GBM dépend d'un apport sanguin spécifique, qui provient de la vascularisation cérébrale. La masse tumorale affecte considérablement le réseau vasculaire en place. L'ensemble du réseau vasculaire tumoral se caractérise par des vaisseaux tortueux, désorganisés, dépourvus d'une régulation physiologique et d'une architecture contrôlée. Ces vaisseaux tumoraux présentent une forte dilatation avec des membranes basales plus denses et un recouvrement anormal des péricytes. La tumeur contient donc des zones hémorragiques, inflammatoires et est caractérisée par un réseau vasculaire tumoral hétérogène. Le tissu tumoral est mal perfusé et les apports en nutriments et en oxygène ( $< 10$  mmHg) seront limités : c'est l'hypoxie (Rosinska et Gavard, 2021). La réponse hypoxique est essentiellement médiée par HIF-1 $\alpha$ , le facteur de transcription qui régule l'expression d'environ 60 gènes impliqués dans plusieurs voies cellulaires critiques pour la progression tumorale. Ce facteur induit l'expression du VEGF afin de favoriser l'angiogenèse au niveau des régions hypoxiques (Huang et *al.* 2016).

### 2.3.3 L'établissement des vaisseaux sanguins tumoraux

Le réseau vasculaire tumoral se forme de plusieurs manières (figure 16).



**Figure 16. Établissement de la vascularisation dans le glioblastome.** La vascularisation du GBM est un processus complexe et hautement régulé, qui est induit par l'hypoxie. Au moins cinq voies distinctes de formation du réseau vasculaire ont été décrites: a, la cooptation vasculaire ; b, l'angiogenèse ; c, la vasculogénèse ; d, Le mimétisme vasculaire et e, la transdifférenciation des cellules de GBM en cellules endothéliales. Les EPC sont représentés en bleu. N, nécrose. (Adapté de Zagzag et Hardee, 2012. Rosinska et Gavard, 2021)

L'angiotropisme correspond à une migration des cellules endothéliales formant les vaisseaux cérébraux préexistants vers la masse tumorale, ce qui permet aux cellules tumorales de bénéficier d'un réseau vasculaire. Il s'agit d'un processus non angiogénique (non dépendant de facteurs angiogéniques comme le facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF) qui destabilise le réseau vasculaire existant. Les cellules tumorales isolées ou groupées/clusters auront recours à ce processus pour soutenir leur croissance, leur survie et le développement de la tumeur.

En plus de la cooptation, l'angiogenèse peut être définie comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux tumoraux déjà en place. Elle implique la prolifération, la migration et la différenciation des cellules endothéliales. L'angiogenèse tumorale donne naissance au réseau vasculaire anormal caractéristique qui conduit à une perfusion anormale. Les GBM, en particulier, présentent un système vasculaire immature avec des effusions de sang excessives. L'infiltration des cellules de GBM au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux peut entraîner le déplacement des pieds astrocytaires, créant une perte de l'étanchéité de la BHE (Hardee et Zagzag, 2012, Rosinska et Gavard, 2021).

La formation *de novo* de nouveaux vaisseaux sanguins au sein de la tumeur porte le nom de vasculogenèse. Ces processus sont indépendants des facteurs angiogéniques classiques comme le VEGF. La vasculogenèse peut impliquer la différenciation des cellules circulantes dérivées de la moelle osseuse en cellules endothéliales progénitrices. Il a également été montré que les monocytes exprimant Tie-2, peuvent se différencier en cellules endothéliales (Rosinska et Gavard, 2021). Ainsi, ces deux populations de cellules peuvent donner un nouveau pool de cellules endothéliales pour la création de nouveaux vaisseaux.

Un nouveau réseau vasculaire peut également se créer par mimétisme vasculaire au cours duquel les cellules de GBM peuvent former des structures semblables à des vaisseaux sanguins. A ce moment, les cellules tumorales se transdifférencient en nouvelles cellules endothéliales (Hardee et Zagzag, 2012 et Rosinska et Gavard, 2021).

#### **2.3.4 La barrière hémato-encéphalique et le glioblastome**

Au cours de l'angiogenèse tumorale, les cellules endothéliales dérivées des vaisseaux cérébraux sont détournées de leur structure initiale ce qui perturbe la structure des vaisseaux préexistants et mène à une perte de l'intégrité de la BHE. Une des complications majeures qui apparaît est l'apparition d'un œdème vasogénique, c'est-à-dire une augmentation de la pression intracrânienne due à l'accumulation de liquide plasmatique (Dubois et *al.* 2014).

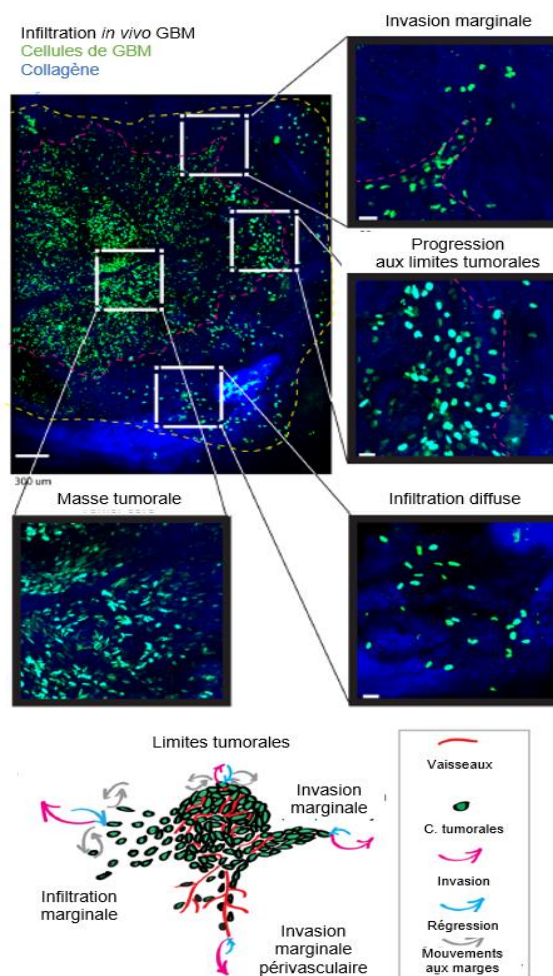
Les anomalies de la BHE sont détectées par l'IRM conventionnelle après administration intraveineuse d'agents de contraste à base de gadolinium. Dans les régions où la BHE présente des fuites, les molécules de contraste hydrophiles diffusent hors de la lumière du vaisseau et s'accumulent dans l'espace extravasculaire extracellulaire. Ces zones de rupture se manifestent par des signaux hyperintenses, blancs sur fond noir, sur les séquences pondérées en T1 dans presque tous les GBM. Cependant, l'IRM conventionnelle ne peut fournir qu'une évaluation qualitative brute de la perméabilité de la BHE, qui peut varier d'un patient à l'autre et peut varier dans différentes régions d'une même



tumeur. Dans les imageries T2/FLAIR, pratiquement tous les GBM présentent un œdème non rehaussé au-delà de la zone observée en T1. La combinaison de ces imageries avec des imageries PET a permis de montrer qu'une majorité des GBM possèdent des zones marquées par une BHE qui s'étend au-delà du centre de la tumeur et apparaît intacte, ce qui souligne l'hétérogénéité de la BHE dans les GBM (Sarkaria et al. 2018 et Arvanitis et al. 2020).

### 2.3.5 L'infiltration tissulaire du glioblastome

Au cours des examens histopathologiques, les frontières de la tumeur ne sont pas toujours délimitées. Une récente étude s'est intéressée à la corrélation entre la dissémination macrosopique péri-tumorale et les modèles de migration et de croissance tumorale actuellement admis chez le GBM. Alieva et al. ont récapitulé l'invasion *in vivo* de greffe orthotopique de cellules de GBM issues de patients chez la souris SCID. Les auteurs ont défini trois schémas d'infiltration pour lesquels les imageries obtenues en microscopie mettaient en évidence une progression cellulaire distincte (Alieva et al. 2019) (**figure 17**).



**Figure 17. Dynamique de l'infiltration tumorale chez le glioblastome.** Les observations de l'infiltration de cellules de GBM transplantées chez la souris ont été obtenues à partir de photos prises à l'aide d'un microscope confocale de fluorescence. Il a été décrit quatre profils d'infiltrations qui contribuent de manière différente à la progression tumorale. Ces profils ont été **récapitulés à l'aide d'un schéma** proposant une description de la dynamique d'infiltration des cellules tumorales dans le tissu cérébral sain (Adapté d'Alieva et al. 2019).

- Les marges tumorales ne présentant aucune dissémination nette des cellules tumorales ont été nommées « bordure tumorale bien définie (well-defined tumoral border) ». Elles correspondent à la croissance locale aux marges de la masse centrale. Les cellules ne contribuent pas à l'infiltration tumorale. Leur vitesse est cependant relativement élevée (4.5  $\mu\text{m/h}$  à 12  $\mu\text{m/h}$  soit deux fois plus que les cellules de la masse centrale) avec un pourcentage de cellules mobiles élevé (60%).
- La migration de cellules infiltrantes isolées à travers le parenchyme cérébral a été définie comme une « infiltration cellulaire diffuse ». Elle correspond à l'infiltration périphérique rapide des cellules tumorales à travers le parenchyme cérébral. La vitesse cellulaire est la plus élevée (5  $\mu\text{m/h}$  à 12  $\mu\text{m/h}$ ) avec un pourcentage de cellules mobiles élevé (65%).
- Les groupes multicellulaires infiltrants provenant de l'interface entre la tumeur et le parenchyme cérébral ont été définis comme « marge invasive ». Tout comme l'infiltration cellulaire diffuse, ces cellules contribuent à l'extension de la tumeur. Cependant, la vitesse cellulaire est comparable à celle de la masse centrale (2.5  $\mu\text{m/h}$  à 7.5  $\mu\text{m/h}$ ) mais le pourcentage de cellules mobiles est moins élevé (environ 45%). De plus, la trajectoire des cellules est plus régulière que les autres formes de progression, décrits précédemment, avec une variation de la trajectoire spatiale inférieure à 10  $\mu\text{m}$  (contre 50  $\mu\text{m}$  dans les deux dimensions pour la masse centrale et 50 à 100  $\mu\text{m}$  dans les deux dimensions pour les deux formes de diffusion). La marge invasive contiendrait donc une proportion de cellules qui infiltrent plus massivement le parenchyme cérébral que les cellules isolées.

D'autres études ont également mis en évidence que les cellules tumorales pouvaient également s'accumuler plus localement dans certaines zones de la masse tumorale. Colditz et Jeffree s'étaient intéressés aux régions infiltrantes pour aider à définir les zones d'intérêt pour la résection tumorale de gliomes de haut grade. Pour cela, les auteurs se sont basés sur l'imagerie peropératoire en utilisant la Protoporphyrine IX (PpIX) induite par l'acide 5-aminolévulinique (ALA). Brièvement, l'ALA est administré par voie orale au patient avant l'intervention chirurgicale, ce qui entraîne l'accumulation sélective d'un composé fluorescent, PpIX, dans les cellules tumorales. La PpIX accumulée est mise en évidence en utilisant une excitation lumineuse bleu-violet (pic d'excitation à 405 nm) et des filtres appropriés pour détecter la fluorescence réémise (pic d'émission principal à 635 nm) (Valdes et *al.* 2014). La fluorescence PpIX présente une sensibilité et une spécificité élevée pour les zones où la densité cellulaire est élevée. De plus, 90% des autres zones fluorescentes détectées sont anormales, comprenant entre autres les œdèmes et les régions hémorragiques. Ainsi, dans le tissu tumoral, il peut également y avoir une concentration de cellules infiltrantes dans les zones où la BHE est rompue et dans les régions hémorragiques (Colditz et Jeffree, 2012).

## 2.4 HETEROGENEITE CELLULAIRE DU GLIOBLASTOME

### 2.4.1 Principales caractéristiques de l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire au sein de la masse tumorale

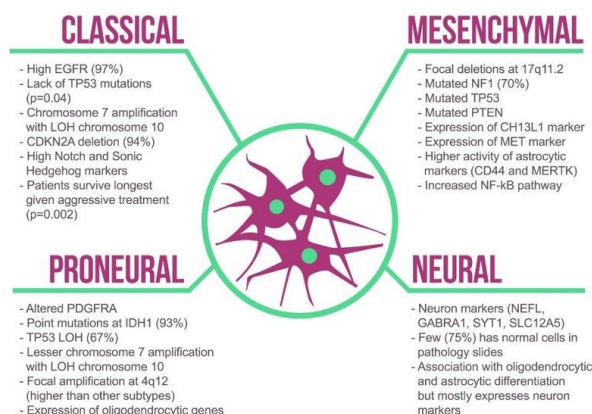
#### 2.4.1.1 Mise en évidence de l'hétérogénéité cellulaire et moléculaire du GBM

La description de l'hétérogénéité des cellules de GBM découle des premières descriptions histopathologiques. Elles décrivaient des populations cellulaires hétérogènes au sein de la même masse tumorale, dotées d'un degré élevé de polymorphisme cellulaire et nucléaire. Par exemple, des cellules géantes peuvent coexister avec des cellules dont la morphologie est plus standard.

Les premières bases de données moléculaires ont été établies à partir des caryotypes et des hybridations *in situ* des coupes de GBM. Les caryotypes réalisés présentaient de nettes différences entre les différentes cellules tumorales fraîchement isolées. Les conséquences de ces différences se sont reflétées dans le phénotype *in vitro* des cellules tumorales avec des variations dans leur morphologie, leur taux de prolifération et la réponse aux traitements, notamment la chimiothérapie. De même, les données obtenues grâce à l'hybridation *in situ* ont mis en évidence l'hétérogénéité moléculaire des cellules au sein d'une même tumeur. Lorsque plusieurs coupes d'une tumeur sont réalisées, il est possible de détecter des aberrations chromosomiques différentes en fonction de la coupe (Bonavia et al. 2011).

#### 2.4.1.2 Les sous-types moléculaires tumoraux et cellulaires détectés dans le GBM

A partir des sous-types moléculaires de GBM définis par la TCGA (Verhaak et al. 2010) (**figure 18**), Pattel et al. se sont également intéressés à la caractérisation individuelle des sous-types moléculaires.



**Figure 18. Profils moléculaires de glioblastome.** En 2010, Verhaak et al. ont illustré les profils moléculaires des GBM à partir d'analyses génomiques réalisées sur des échantillons de patients dont les profils étaient compilés dans le TCGA. Ils y ont identifié quatre sous-types moléculaires (classique, proneural, neural, mésoenchymateux). Le sous-type classique exprime des marqueurs classiquement diagnostiqués dans le GBM et est également marqué par une élévation de l'expression de marqueurs de cellules souches comme NES, la surexpression des voies de signalisation Notch et Sonic Hedgehog. Le sous-type mésoenchymateux est quant à lui marqué par des mutations variées concernant des gènes impliqués dans l'inflammation et la nécrose (superfamille TNF et NF-Kb) et une surexpression de gènes codant des protéines impliquées dans la migration cellulaire (CD44, MET, NF1). Le sous-type proneural présente une amplification du chromosome 7 et une perte du chromosome 10 moins marquée que le sous-type classique (54% des tumeurs), représente la majorité des mutations TP53 (64% des tumeurs), une majorité de cellules ayant une mutation IDH1 (91%). Le sous-type proneural n'a pas encore été confronté à la classification 2021 qui exclue la mutation IDH1 des GBM. Le sous-type neural est caractérisé par l'expression de gènes impliqués dans les projections neurales, axoniques et la transmission synaptique (D'après Sasmita et al. 2018)

Ils ont cherché à comprendre si c'est l'ensemble de la tumeur qui est définie par un sous-type moléculaire ou bien s'il y avait des populations de cellules présentant des sous-types différents. Les analyses du transcriptome des GBM, notamment des séquences ARN sur les cellules individualisées (RNA-seq) ont permis de mieux définir l'hétérogénéité intratumorale dans les GBM. En effet, les analyses RNA-seq menées par Pattel et *al.* ont permis une caractérisation fonctionnelle *in vitro* de l'expression des gènes altérés identifiés en clinique dans les cellules de tumeurs prélevées (420 cellules au total) chez cinq patients. Brièvement, les auteurs ont représenté les similarités transcriptionnelles par positionnement multidimensionnel.

**Les cellules ont eu tendance à être classées en fonction de l'origine de la tumeur mais il y a eu un certain nombre de cellules tumorales dont les profils se chevauchaient indépendamment de l'origine tumorale.**

La variabilité d'une cellule à l'autre était également mise en évidence dans les schémas d'expression et d'épissage des voies de signalisation de la prolifération telles que les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) comme l'EGFR. Dans une des tumeurs de patients, l'expression du récepteur EGFR n'était pas altérée dans 7% des cellules, 19% d'entre elles perdaient l'expression de la portion extracellulaire du récepteur et 25% d'entre elles présentaient un variant oncogénique. Les auteurs ont ensuite réalisé un regroupement hiérarchique des données afin de définir quatre méta-signatures. Il s'agit des signatures de l'expression de gènes associés à un processus biologique (hypoxie, cycle cellulaire, réponse immunitaire, profils proches des cellules saines cérébrales, ici les oligodendrocytes) qui varient entre les cellules d'une tumeur donnée ou de l'ensemble des données. Chaque méta-signature présentait des résultats hétérogènes entre les cellules mais aussi d'une tumeur à l'autre, avec par exemple 1,4% à 21,9% des cellules positives pour l'expression des gènes associés au cycle cellulaire (Patel et *al.* 2014). Toutes les tumeurs présentaient des cellules conformes à un sous-type proneural, quel que soit le sous-type dominant de la tumeur. La définition de l'hétérogénéité moléculaire à partir de la tumeur entière ne permettait donc pas de définir exactement les sous-types présents dans la tumeur. En effet, ils ont également montré qu'il existait des cellules « hybrides », obtenant un score élevé pour deux sous-types moléculaires (le plus souvent classique et proneural ou mésenchymal et neural).

**Ces états hybrides refléteraient le développement aberrant et la diversité phénotypique des cellules de GBM.**

#### 2.4.1.3 Les profils phénotypiques cellulaires dans la masse tumorale du glioblastome

Plus récemment, les séquençages ARN *single cells* de 28 GBM menés par Neftel et *al.* ont permis de montrer un degré supplémentaire d'hétérogénéité lié à l'état cellulaire des cellules de GBM (Neftel et *al.* 2019). Brièvement, ils ont caractérisé de manière exhaustive l'hétérogénéité intratumorale moléculaire parmi les cellules de GBM en définissant les programmes d'expression de gènes qui variaient entre les cellules. Ils ont ensuite défini les programmes récurrents (méta-modules) entre les différentes tumeurs analysées et ont établi des profils types de cellules retrouvés dans chaque tumeur.

**Les auteurs ont décrit plusieurs ensembles de gènes retrouvés systématiquement dans les tumeurs (panels de gènes du cycle cellulaire, de la glycolyse, de l'hypoxie, etc). Deux étaient associés à un ensemble de gènes caractéristiques de cellules mésenchymateuses (MES-like,**

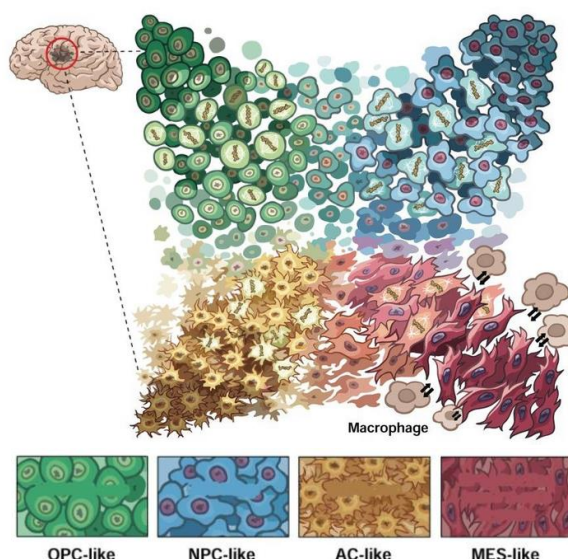
indépendantes à l'hypoxie ou dépendantes à l'hypoxie). Les autres ensembles de gènes étaient associés au développement neurologique caractéristique des lignées gliales ou des cellules progénitrices (marqueurs astrocytaires « APC-like », oligodendrocytaires « OPC-like » et de cellules progénitrices « NPC-like »).

La comparaison des méta-modules aux signatures des cellules neurales normales issues de RNA-seq de cerveaux de fœtus, de cerveaux d'adultes et de cultures *in vitro* de cellules saines du cerveau a permis de montrer que chaque ensemble de gènes correspondait à leur équivalent physiologique sain. Par exemple, les cellules tumorales astrocytaires-like « APC-like » présentaient une signature de gènes proche des astrocytes sains.

**Ainsi, les cellules de GBM présenteraient des imitations de programmes d'expression de gènes retrouvés dans les différents types de cellules saines retrouvées dans le cerveau mais avec d'importantes distorsions par rapport aux programmes normaux.**

Selon la signature de « type cellulaire », la physiologie des cellules de GBM pourrait varier, notamment leur prolifération. Par exemple 3 à 51% de cellules prolifératives étaient détectées dans les tumeurs, avec une détection majoritaire de cellules prolifératives ayant des profils oligodendrocytaires-like « OPC-like » et progéniteurs-like « NPC-like ». Les auteurs ont également détecté des cellules de GBM avec des profils hybrides, (AC-like/MES-like, NPC-like/OPC-like et AC-like/OPC-like), chacune ayant des capacités prolifératives variables.

**Quatre profils cellulaires coexisteraient donc dans le GBM : des cellules tumorales à profil mésenchymateux, astrocytaire, progéniteurs et oligodendrocytaires (figure 19).**



**Figure 19. Schématisation de l'hétérogénéité cellulaire intratumorale : les quatre principaux phénotypes cellulaires adoptés par les cellules de glioblastome.** Chaque cellules tumorales composant la masse tumorale possèdent une signature moléculaire qui lui est propre. Selon les signatures, plusieurs profils cellulaires peuvent être dégagés et se rapprocheraient des caractéristiques de cellules gliales saines. Netfel et al. ont par exemple identifié des profils OPC-like (cellules progénitrices des oligodendrocytes), NPC-like (cellules progénitrices neurales), AC-like (astrocytes), MES-like (cellules mésenchymateuses) (D'après Netfel et al. 2019)

Les données recueillies par les auteurs indiquent que les fréquences de ces profils varient entre les différentes tumeurs analysées et même, dans une certaine mesure, entre les différentes régions d'une même tumeur (des variations jusqu'à 60% pour les cellules à profil astrocytaires-like « AC-like » par



exemple). Les auteurs ont également constaté que dans un même sous type moléculaire défini par le TCGA, plusieurs profils cellulaires pouvaient coexister. Par exemple, une tumeur de sous-type neural contenait environ 20% de cellules tumorales progénitrices-like « NPC-like » et 10% de cellules des trois autres profils alors qu'une tumeur de sous-type proneural contenait environ 55% de cellules tumorales « NPC-like », 35% de cellules tumorales astrocytaires « AC-like », 5% de cellules tumorales oligodendrocytaires-like « OPC-like » mais pas de cellules tumorales mésenchymateuses-like « MES-like ».

**Neftel et al. ont ainsi mis en évidence une forte plasticité entre ces quatre profils cellulaires, ce qui démontre qu'une seule cellule avec un profil cellulaire donné peut donner naissance aux quatre profils cellulaires.**

#### 2.4.1.4 *Implication des cellules souches cancéreuses dans l'hétérogénéité cellulaire de la masse tumorale*

Dans la littérature, il a été montré que les cellules souches de GBM sont capables *in vivo* de générer une nouvelle tumeur lorsqu'elles sont greffées chez l'animal.

**La tumeur est alors caractérisée par une hétérogénéité cellulaire avec de nouvelles cellules tumorales générées dont le degré de différenciation et les capacités à l'auto-renouvellement sont variables les unes des autres (Lathia et al. 2015).**

Il n'y aurait donc pas qu'une seule population donnée de cellules souches de GBM mais une multitude de sous-populations contribuant à des degrés différents à l'enrichissement de la diversité cellulaire dans la masse tumorale. Récemment, Bhaduri et al. se sont intéressés à l'impact de la diversité des CSC sur la distribution des populations cellulaires dans le GBM. Leur recherche c'est basé sur un modèle de greffe de tumeurs issues de patients sur organoïde cortical. Le modèle organoïde cortical reproduit le modèle développement du cerveau généré à partir de cellules souches pluripotentes induites chez l'homme.

**Il contient alors la plupart des principaux types de cellules présents dans le cerveau humain en développement et peut favoriser le développement de l'hétérogénéité cellulaire tumorale et l'établissement d'une niche tumorale (Bhaduri et al. 2020).**

Leur modèle a bien permis de détecter la présence de multiples populations cellulaires aux propriétés souches au sein d'une même tumeur, dont au moins deux d'entre elles étaient capables de former à des populations tumorales hétérogènes. De plus, l'expression des gènes qui dictent le caractère souche (CD44, Sox2, Nestin, CD133, CD15) sont très hétérogènes entre les tumeurs, indiquant que les marqueurs de cellules peuvent être exprimés par de multiples types de cellules dans diverses combinaisons (Munthe et al. 2016 et Bhaduri et al. 2020). Cependant, ces signatures se sont révélées très similaires entre certaines cellules différenciées et certaines populations souches dans une même tumeur. Ceci suggérerait que la composition du type cellulaire d'une tumeur puisse dériver directement de sous-types de cellules souches précis contenus dans chaque tumeur. Par exemple, dans un échantillon de tumeurs, le principal sous-type cellulaire de cellules souches de GBM présentait des caractéristiques proches des progéniteurs neuraux en division et était corrélé à une augmentation de la proportion d'oligodendrocytes formés dans cet échantillon (plus de 30% de l'échantillon) (Bhaduri et al.

2020). Dans d'autres tumeurs, la composition cellulaire de la tumeur était beaucoup plus hétérogène et semblait corrélée à beaucoup plus de types de cellules souches. C'est le cas des cellules souches de GBM présentant des caractéristiques de cellules souches neurales capables de générer des neurones, des astrocytes ou des oligodendrocytes.

**Les tumeurs présentant un enrichissement de ces cellules souches de GBM bien particulières présentaient un enrichissement en astrocytes et en neurones et étaient capables d'infiltrer le cerveau lorsqu'elles sont greffées chez la souris.**

Pour étudier leur capacité migratoire, les auteurs ont procédé à la dissociation des tumeurs puis ont transfecté les cellules de sorte à induire une inhibition par ARN interférant (shRNA) de l'expression du marqueur PTPRZ1 caractéristique des cellules souches neurales. La migration *in vitro* des cellules dissociées en test de blessure est divisée par deux lorsque le marqueur souche PTPRZ1 n'est pas exprimé après un jour de migration. L'inhibition de la migration reste constante après trois jours de migration alors que la proportion de cellules non transfectées migratrices a augmenté de 20% après trois jours de migration.

**Ainsi, le type de cellule souche de GBM pourrait avoir un impact sur la progression tumorale, notamment sur l'enrichissement en certaines populations propices à l'extension de la tumeur (Bhaduri et al. 2020).**

Cependant, certaines publications nuancent l'implication stricte des cellules souches de GBM dans l'hétérogénéité intratumorale et préfèrent parler de plasticité cellulaire, c'est-à-dire que toutes les sous-populations cellulaires présentes dans la tumeur présenteraient des propriétés à la fois souches et tumorigéniques. Elles transiteraient en différents états cellulaires selon les signaux reçus par leur microenvironnement. En effet, Dirske et al. ont mis en évidence que l'expression des marqueurs de cellules souches de GBM tel que CD133 était augmentée lors des cultures de cellules de GBM sous hypoxie.

**Plus de neuf profils cellulaires détectés étaient capables de former des sous-populations spécifiques sous hypoxie et certaines sous-populations formées pouvaient transiter d'un état à un autre (Dirkse et al. 2019).**

#### *2.4.1.5 Contribution des cellules saines du cerveau à l'hétérogénéité cellulaire au sein de la masse tumorale*

Lors des dissociations de GBM de patients dans l'étude de Neftel et al. sur l'hétérogénéité tumorale, les auteurs ont constaté la présence de cellules saines : des oligodendrocytes, des lymphocytes T et des macrophages. Si la présence de cellules endothéliales et de péricytes est depuis longtemps connue, certains auteurs se sont intéressés à l'infiltration des cellules du parenchyme cérébral dans les tumeurs de GBM. En 2017, Darmanis et al. ont déterminé les populations cellulaires présentes dans la masse tumorale par séquençage ARN. Sur les douze clusters obtenus, seuls trois d'entre eux correspondaient à des cellules tumorales (sous-type proneural, classique et mixte classique/mésenchymateux). La moitié des clusters renvoie à des signatures moléculaires endothéliales et microgliales et les autres à des signatures moléculaires oligodendrocytaires et astrocytaires. Parmi ces populations de cellules

saines, les cellules progénitrices, les neurones, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales infiltraient la masse tumorale.

## 2.4.2 Hétérogénéité cellulaire des glioblastomes au niveau péri-tumoral

### 2.4.2.1 *Les principales caractéristiques cellulaires et moléculaires au niveau péri-tumoral*

L'hétérogénéité serait également marquée au niveau de la région péri-tumorale infiltrante et non uniquement au sein de la masse tumorale. Gill et *al.* ont caractérisé les sous-types moléculaires des cellules de GBM récurrents présentes au niveau de la région péri-tumorale par séquençage de l'ARN et une analyse histologique sur des biopsies guidées par IRM. Les régions non-contrastées en IRM des GBM proneuraux, correspondant aux marges tumorales, expriment des gènes exprimés physiologiquement par les cellules Olig2 positives/OPC. À l'inverse, les régions non-contrastées en IRM des GBM mésenchymateux expriment des gènes normalement exprimés par les cellules de la microglie et les astrocytes exprimant CD44+.

Les marges des GBM proneuraux seraient marquées par des cellules de GBM aux propriétés infiltrantes (oligodendrocytes-like « OPC-like ») tandis que les marges des GBM mésenchymateux sont marquées par des cellules de GBM pouvant générer une inflammation. Cette propriété chez les GBM mésenchymateux a été confirmée par la détection de cellules de la microglie au niveau de la zone péri-tumorale qui ne sont pas présentes dans les marges des GBM proneuraux. Il est cependant important de souligner que les profils moléculaires des cellules des marges tumorales sont susceptibles de varier selon les conditions.

Les profils moléculaires auraient donc un impact sur la réponse aux traitements puisqu'il a déjà été montré que les cellules de GBM « OPC-like » sont très sensibles à la chimiothérapie et aux radiations ionisantes par rapport aux cellules de GBM CD44+. De plus, il a été montré dans les GBM récurrents que les cellules tumorales OPC-like sont capables d'évoluer vers un profil mésenchymateux et seraient caractéristiques de la reprise tumorale (Gill et *al.*, 2014 et Piao et *al.* 2013).

### 2.4.2.2 *Contribution des cellules souches de glioblastome à l'hétérogénéité péri-tumorale*

Certains auteurs ont rapporté l'existence de cellules tumorales exprimant des marqueurs souches comme Nestin, Sox2, CD133 et CD44 dans la zone péri-tumorale. Ces cellules souches périphériques de GBM contribueraient à l'extension de la tumeur dans les tissus sains adjacents (D'Alessio et *al.* 2019). La récupération et la mise en culture de populations tumorales exprimant des marqueurs souches dans la région péri-tumorale de GBM de patients dans l'étude de Nishikawa et *al.* a confirmé leur potentiel migratoire et invasif en chambre *transwell* (Nishikawa et *al.* 2018).

De plus, lorsque ces cellules souches péri-tumorales de GBM sont mises en culture dans un milieu neurosphère permettant l'enrichissement en cellules souches, leur potentiel invasif et migratoire est fort quelques soient les sous-populations isolées (population souche 1 : +43% et +66%, population souche 2 : +80% et +66% par rapport aux cellules tumorales isolées). L'inhibition de CD44 dans les cellules souches de GBM par ARN interférence réduit considérablement ce profil infiltrant, ce qui confirmerait le rôle des cellules souches péri-tumorale de GBM dans l'extension de la tumeur (Nishikawa et *al.* 2018).



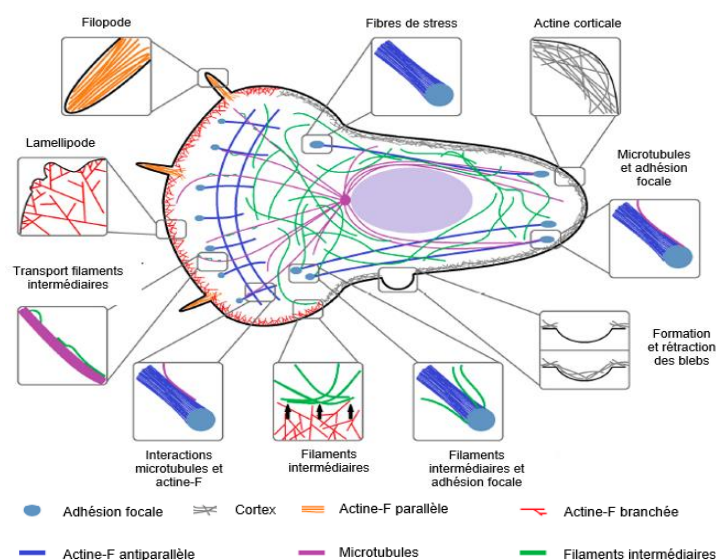
### 2.4.2.3 Contribution des cellules du cerveau à l'hétérogénéité péri tumorale

Dans la région péri tumorale des GBM, certains auteurs ont observé une accumulation de certaines gliales. Par exemple, les cellules de la microglie qui migrent vers la tumeur se localiseraient préférentiellement au niveau des marges de la masse tumorale (Müller et al. 2017). Certains astrocytes (exprimant les marqueurs GFAP et PDGFR1) seraient également localisés autour de la masse tumorale (Mega et al. 2020), ainsi que des cellules progénitrices des oligodendrocytes (Huang et al. 2014). Les mécanismes de communication de ces cellules gliales avec les cellules tumorales périphériques sont encore en cours d'étude, il semblerait que les cellules gliales et les cellules tumorales sécrètent des facteurs solubles modulant la prolifération, la survie et la réponse immunitaire. Ces échanges moléculaires, normalement mis en place par les cellules saines pour lutter contre la croissance tumorale, contribueraient indirectement à des modifications locales du comportement cellulaires au niveau des zones d'infiltration qui se traduiraient par une diminution de la médiane de survie des patients (7 mois lorsqu'il y a présence d'astrocytes péri tumoraux contre 12,2 mois pour les patients témoins par exemple) (Leiss et al. 2020 et Altieri et al. 2021). D'autre part, les cellules progénitrices des oligodendrocytes péri tumorales seraient capables d'induire une angiogenèse localisée au niveau des zones d'infiltration des cellules de GBM et serait de plus mauvais pronostic lorsque les cellules progénitrices des oligodendrocytes sont détectées dans les échantillons de patients (Huang et al. 2014).

## 2.5 DESCRIPTION DES MECANISMES DE MIGRATION ET D'INVASION CHEZ LE GBM

### 2.5.1 L'architecture de la cellule : le cytosquelette

Depuis que les fibres musculaires ont été examinées en microscopie au XVII<sup>ème</sup> siècle, les chercheurs ont tenté de comprendre le processus qui génère des structures dynamiques et robustes qui organisent et permettent la dynamique des cellules. La structure permettant la déformation et la mobilité de la

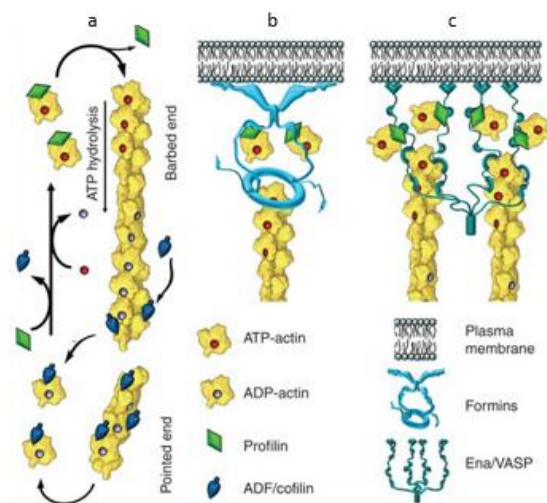


**Figure 20. Schématisation de l'organisation du cytosquelette.** Le cytosquelette est composée de trois types de filaments : l'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Chacun d'entre eux vont moduler l'architecture de la cellule, avec des interactions physiques possible notamment aux niveaux des adhésions. L'organisation de l'actine-F va être à l'origine de la morphologie de la cellule ou de l'émission de protrusions (D'après Hohmann et Dehghani, 2019)

cellule s'appelle le cytosquelette. Il remplit trois grandes fonctions : il gère la structuration de la cellule, permet les interactions entre la cellule et son microenvironnement et il permet à la cellule de se déplacer et d'adapter la morphologie de la cellule au cours du déplacement. Pour réaliser ces fonctions, le cytosquelette interagit directement avec un ensemble de protéines adaptatrices. Le cytosquelette n'est pas une structure fixe, elle s'adapte continuellement notamment lors de la migration. Le cytosquelette est constitué de trois groupes de filaments, chacun ayant une organisation particulière (Hohmann et Deghani, 2019) (**figure 20**).

#### 2.5.1.1 Les Filaments d'actines

Dans les cellules, les microfilaments d'actine (actine-F) se présentent sous forme de double hélice de 5 à 7 nm de diamètre. L'actine-F est formée d'assemblages d'actines monomériques globulaires (Actine-G). La modulation du cytosquelette d'actine est régulée par l'équilibre entre l'actine-G et l'actine-F. L'actine est considérée comme la plus dynamique des trois protéines du cytosquelette, capable d'effectuer de fortes modifications structurales en l'espace de quelques minutes, déterminant ainsi la forme d'une cellule. Les actine-G sont des monomères dits polarisés, présentant une extrémité positive et une extrémité négative, c'est-à-dire que la polymérisation des monomères pour former l'actine-F sera rapide à l'extrémité positive et lente à l'extrémité négative. La polymérisation de l'actine-F est un processus spontané mais qui est insuffisant pour créer un réseau entier. Elle sera régulée par de nombreux complexes protéiques (**figure 21**) (Hohmann et Deghani, 2019).



**Figure 21. Polymérisation des filaments d'actine.** a. La polymérisation du filament d'actine se produit préférentiellement à l'extrémité barbée à partir des complexes ATP-actine-profiline. Après l'incorporation d'un monomère d'actine au filament naissant, la profiline se dissocie. L'hydrolyse de l'ATP déclenchée par la polymérisation et la libération ultérieure de phosphate inorganique par les sous-unités d'actine rendent les filaments plus sensibles à la dépolymérisation et augmentent leur affinité pour le facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF)/cofiline. Les sous-unités d'actine libérées se lient à la profiline, produisant de nouveaux complexes ATP-actine-profiline. b. Les formines et c. les protéines Ena/VASP s'associent aux extrémités barbées des filaments d'actine. Elles favorisent leur élancement en recrutant les complexes actine-profiline qui protègent et ancrent les extrémités barbées à la membrane plasmique (D'après Svitkina et al. 2018).

#### 2.5.1.2 Les microtubules

Les microtubules sont les plus rigides des trois filaments du cytosquelette et présentent la dynamique d'assemblage et de désassemblage la plus complexe. Un microtubule peut couvrir la longueur d'une cellule animale. Les microtubules sont constitués d'hétérodimères d' $\alpha$ - et  $\beta$ -tubuline formant des

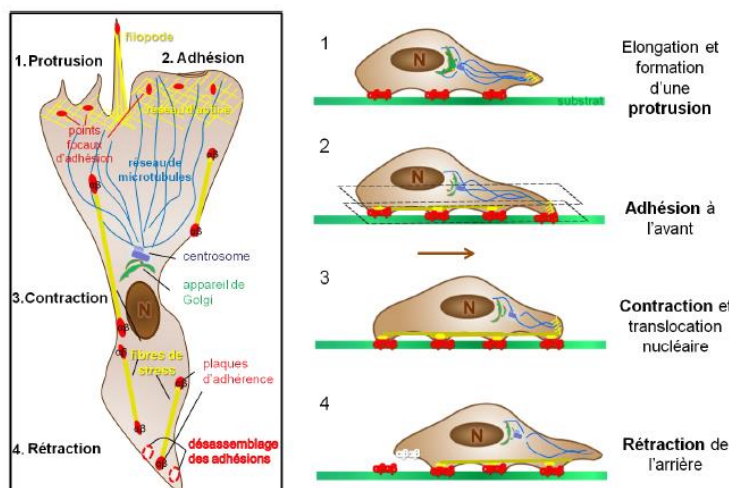
filaments creux, généralement composés de 13 protofilaments. L'élongation des microtubules démarre au niveau du centre d'organisation des microtubules (MTOC) qui peut être localisé au niveau des centrosomes ou de l'appareil de Golgi. Le MTOC contient de la  $\gamma$ -tubuline qui permet d'amorcer la nucléation, l'assemblage des hétérodimères de tubulines, ainsi que des protéines de stabilisation d'ancrage et d'adaptation pour la stabilité et la fixation des microtubules à la membrane plasmique. (Fletcher et Mullins, 2010 et Hohmann et Deghani, 2019)

### 2.5.1.3 Les microfilaments intermédiaires

Les protéines formant des filaments intermédiaires constituent une grande classe de protéines, codées par au moins 70 gènes, organisant des filaments d'un diamètre de 10 nm. Les filaments intermédiaires sont regroupés en 5 classes selon leur structure et l'homologie de leur séquence. Ainsi, les quatre premières classes représentent les filaments intermédiaires cytoplasmiques, dans lesquelles on retrouve la vimentine, la nestine et la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) fortement exprimées dans les astrocytes, tandis que le type V sont des filaments nucléaires, appelés lamines (lamine A/C, B1, B2). Tous les filaments intermédiaires cytoplasmiques ont une structure similaire, constituée d'une hélice  $\alpha$  centrale avec une structure non hélicoïdale à ses deux extrémités. La structure finale d'un microfilament intermédiaire est constituée de huit tétramères (Hohmann et Deghani, 2019).

## 2.5.2 Les principales caractéristiques de la mise en place de la motilité

La capacité des cellules cancéreuses à se propager en envahissant les tissus adjacents, parfois suivie de métastases locales ou distantes selon les tumeurs, est une caractéristique des cancers. La migration est un phénomène central de la progression des cellules cancéreuses dans le tissu sain et représente l'ensemble des étapes permettant l'induction de la motilité : la génération de protrusions cellulaires, l'adhésion à la MEC, la contraction du cytosquelette et la rétraction des adhésions. Pour que la migration

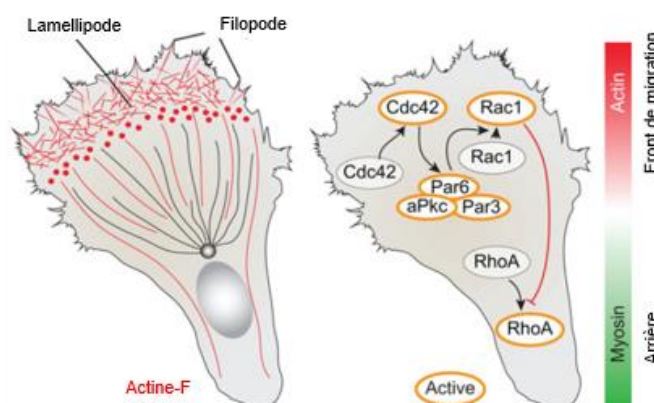


**Figure 22. Les principales étapes de l'établissement de la motilité cellulaire.** La première étape de la mise en place de la motilité cellulaire est la polarisation. La cellule met en place un front de migration en fonction de signaux extracellulaires captés (chimiotactisme, durotaxisme, etc) et met en place des réarrangements du cytosquelette en conséquence. La deuxième étape est caractérisée par la mise en place des adhésions cellulaires avec la MEC, plus particulièrement des points focaux via les intégrines et les protéines adaptatrices des adhésions comme FAK. La troisième étape se déroule une fois les forces d'adhésion mises en place. Les fibres de stress d'actine et l'actinomyosine s'organisent au niveau des adhésions et vont se contracter pour générer des forces de tension nécessaires à l'avancée de la cellule en direction du front de migration. La quatrième étape est caractérisée par la rétraction du pôle opposé de migration. Elle est permise par la contraction des fibres de stress et le recyclage des intégrines, permettant la perte d'adhésion en arrière. (D'après Peglion, 2012)

soit dirigée, ces événements doivent être contrôlés et coordonnés dans l'espace et dans le temps, le long de l'axe de polarité avant/arrière mis en place par la cellule (Etienne-Manneville, 2013) (**figure 22**).

#### 2.5.2.1 La mise en place de la polarité cellulaire

L'acquisition de la polarité asymétrique fait intervenir les petites protéines cytoplasmiques de la famille RhoGTPase : Cdc42, Rac1 et RhoA. RhoA est responsable de la coordination de la contractilité du centre et de l'arrière de la cellule, Rac1 régule la formation de protrusions au niveau du front de migration et CDC42 module la polarité cellulaire (Armento et al. 2017). Dans le cas des cellules de GBM, chacune de ces protéines vont s'accumuler dans des localisations cellulaires bien spécifiques qui pourrait dépendre des régions infiltrées. Le suivi *in vivo* de cellules de GBM C6 injectées par stéréotaxie chez le rat Wistar par microscopie confocale a montré que les cellules infiltrant le parenchyme cérébral et la région périvasculaire présentaient une augmentation de l'activité Cdc42 et Rac1 au niveau du front de migration par rapport aux cellules de la masse centrale. Cependant, l'activité Rac1 des cellules infiltrant le parenchyme cérébral était plus forte au niveau des protrusions par rapport aux cellules infiltrants le long de la paroi des vaisseaux sanguins. De plus, l'activité RhoA est inversement corrélée à celle de Cdc42 et Rac1, avec une inhibition plus marquée dans les cellules infiltrants le parenchyme cérébral. Ces résultats suggéreraient que les cellules de GBM infiltrantes présentant des activités Rac1 et Cdc42 les plus élevées au front de migration et la plus faible activité RhoA pénétreraient préférentiellement dans le parenchyme cérébral (Hirata et al. 2012) (**figure 23**).



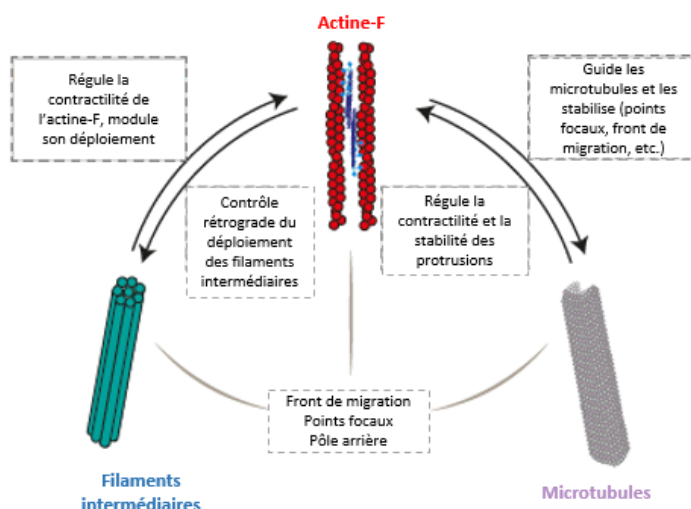
**Figure 23. Polarisation des cellules au cours de la migration.** L'établissement du front de migration nécessite une cascade de signalisation médiée par l'activation de Cdc42/RAC1/Par6-aPkc-Par3 à l'avant et par la régulation de l'activation de RhoA à l'arrière. Lorsque Cdc42 s'accumule au niveau du front de migration, elle est capable d'activer un complexe protéique (aPKC-Par6-Par3) pour entraîner l'augmentation de l'activité Rac1 au front de migration. Rac1 active à l'avant de la cellule supprime l'activité de RhoA à l'avant, qui se localisera sur les côtés et le pôle arrière des cellules. L'activité RhoA augmentera dans ces zones où elle supprime l'activité de Rac1. RhoA affecte la contractilité de l'actomyosine via la kinase Rho (ROCK). En outre, les adhésions fortes à l'arrière de la cellule entraînent une augmentation de la tension, l'ouverture de canaux  $Ca^{2+}$  activés par l'étirement et l'activation ultérieure de protéases susceptibles de cliver les protéines d'adhésion focale (Reig et al. 2014)

#### 2.5.2.2 Le cytosquelette de la cellule au cours de la migration

##### 2.5.2.2.1 Les interactions entre les filaments d'actine-F et les autres filaments du cytosquelette pour la mise en place du front de migration

Il semblerait que l'organisation des différents filaments du cytosquelette contribueraient à la mise en place de la polarité cellulaire. S'il est établi que les microtubules participent à la polarité de différentes cellules cancéreuses, il a été montré que les microfilaments intermédiaires pouvaient interagir avec

l'actine-F pour également faciliter la polarisation des cellules pour l'établissement du front de migration (Lanier et al. 2015, Seetharaman et Manneville, 2020) (**figure 24**).



**Figure 24. Les interactions entre l'actine-F, les filaments intermédiaires et les microtubules.** Les interactions entre les différents filaments du cytosquelette seraient multiples et permettraient leur régulation mutuelle. Il existe de plus en plus de preuves d'une interaction entre les filaments intermédiaires, le réseau d'actine-F et le réseau de microtubules polarisés au front de migration. Par exemple, la vimentine est un type de filaments intermédiaires dont le déploiement serait corrélé à l'organisation de l'actine-F au niveau des lamellipodes et des fibres de stress. Elle participerait au renforcement des fibres de stress pour contrôler la polymérisation de l'actine-F. Les microtubules sont capables d'acheminer certaines protéines comme Arp2/3 pour générer un réseau branché d'actine-F. L'acheminement et l'activation de Rac1 et RhoA à leur pôle cellulaire respectif peut également réguler la dynamique de formation et déstructuration du cytosquelette. Si les microtubules peuvent influencer l'organisation du réseau d'actine-F, la réorganisation de l'actine-F au niveau du front de migration va à son tour favoriser la polarisation du réseau de microtubules déployé au front de migrations. Ceci permet d'assurer un réseau de faisceaux équilibrés à chaque pôle de la cellule. (Adapté de Lanier et al. 2015, Seetharaman et Manneville, 2020).

#### 2.5.2.2.2 L'organisation du cytosquelette d'actine pour la mise en place de la motilité

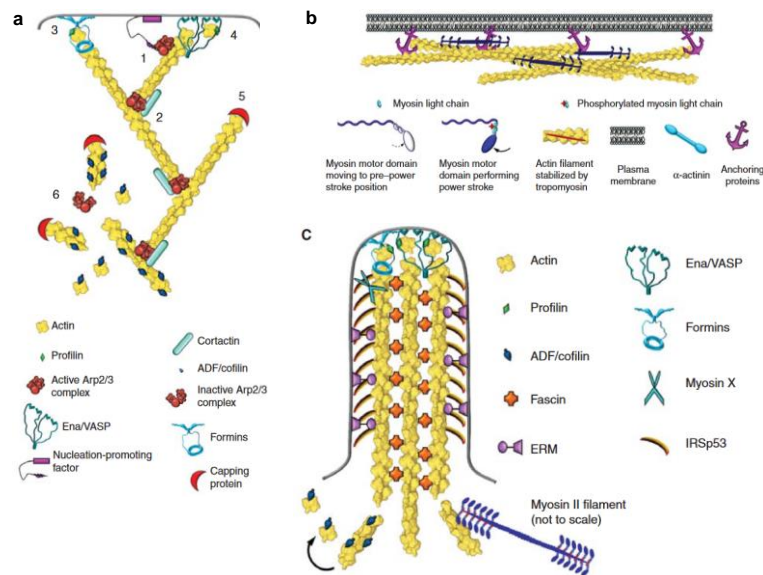
Au niveau du front de migration, les cellules émettent plusieurs types de prolongements cytoplasmiques : les lamellipodes, les filopodes, les fibres de stress, les petites protrusions membranaires blebs et les invadopodes.

Chacune de ces structures contribue de manière unique à la migration. Les lamellipodes peuvent s'étendre sur de longues distances à travers la MEC, permettant leur traction à travers les tissus. Les fibres de stress sont de longs prolongements denses permettant l'accroche des cellules à la MEC et de générer les forces de tractions.

Les filopodes permettent de sonder la composition du microenvironnement de la cellule. La formation de blebs a été décrite comme un facteur de migration cellulaire directionnelle au cours du développement. Les invadopodes sont des protubérances qui permettent la dégradation locale de la



MEC pour faciliter l'infiltration (Ridley et al. 2011). Toutes ces structures sont très riches en filaments d'actine-F, qui s'organisent différemment selon les structures (**figure 25**)



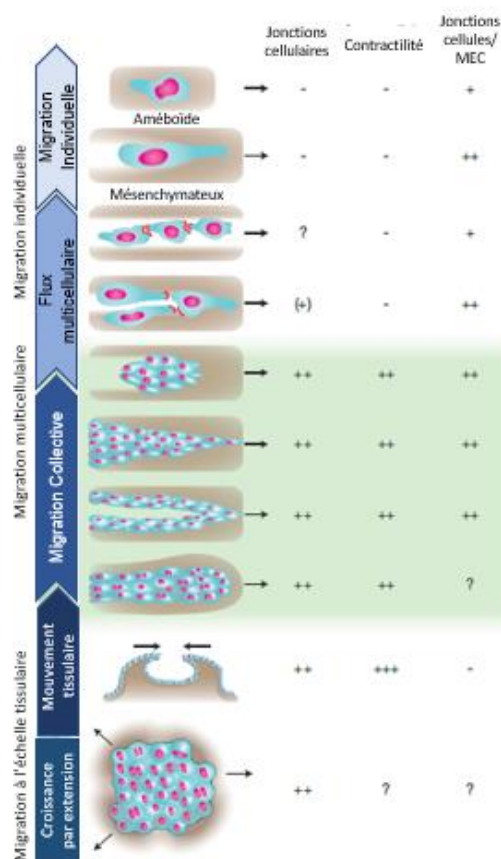
**Figure 25. Organisation de l'actine-F dans la cellule.** a. Le réseau d'actine-F dans les prolongements de la cellule a été dans un premier temps caractérisé selon la synthèse du réseau par branchement, donc par action du complexe Arp2/3. Il existe d'autres arrangements du réseau d'actine dans les structures de la cellule motile. Les réseaux réticulés d'actine-F sont formés d'enchevêtrements d'actine-F déjà polymérisés. Ils sont ordonnés grâce à l'action de protéines de réticulation (fascine, actinine  $\alpha$ , etc). Ils sont présents au niveau du cortex cellulaire et des lamellipodes et sont impliqués dans le contrôle de la forme de la cellule et de sa mise en mouvement vers le front de migration. b. Certains faisceaux d'actine-F peuvent être associés à des protéines contractiles comme la myosine. Ces faisceaux, appelés actine antiparallèle, constitueront les fibres de stress, des prolongements d'actine-F responsables des capacités contractiles de la cellule grâce à la fixation de protéine motrice telle que la myosine II. c. Les filaments des réseaux d'actine-F peuvent également être organisés parallèlement, notamment dans les filopodes. Les protéines de réticulations vont ordonner chaque faisceau d'actine-F dans la même direction, en face de la membrane plasmique. (D'après Blanchoin et al. 2014 et Svitkina et al. 2017)

### 2.5.3 Le mode de déplacement des cellules de GBM

Les différences histologiques des tumeurs et les études *in vitro* du comportement des cellules cancéreuses migratrices suggèrent que les cellules tumorales peuvent déployer différents modes de migration. Ils dépendraient de mécanismes spécifiques au type de cellule et de la topographie du microenvironnement local (Friedl et al. 2012). La migration individuelle et la migration collective sont les deux principaux modes de migration caractérisés dans les cancers (**figure 26**).

#### 2.5.3.1 La migration individuelle

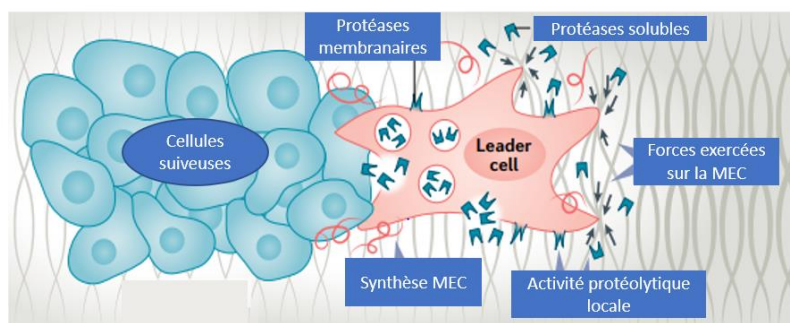
Les cellules tumorales sont capables de se détacher de la masse tumorale et de migrer individuellement. Dans le cas du GBM, ce type de migration peut être rencontrée lors de l'extension périphérique de la tumeur. Gritsenko et al. ont récapitulé l'infiltration de sphéroïdes constitués de cellules de GBM U251 et E98 à différentes échelles (*in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*), permettant le suivi des différentes étapes de l'infiltration à l'échelle cellulaire. Après deux jours de suivis vidéomicroscopiques



**Figure 26. Les différents types de migration individuelle et collective des cellules.** Les cellules sont capables de migrer collectivement ou individuellement en fonction du contexte physiologique comme l'embryogenèse (mouvement tissulaire collectif) ou la réponse immunitaire (diapédèse des cellules immunitaires, migration individuelle). Les migrations collectives sont majoritairement dépendantes des jonctions cellulaires, de la contractilité des cellules et de la dégradation de la MEC alors que les cellules individuelles se révèlent moins dépendantes voire plus hétérogènes par rapport à ces critères (D'après Friedl et al. 2012).

*in vitro* 3D (matrice extracellulaire dérivée de la lame basale des vaisseaux sanguins, riche en acide hyaluronique et formées de couches d'astrocytes), quelques cellules de GBM se sont détachées de la périphérie de la masse tumorale et ont progressé dans la MECc environnante (Gritsenko et al. 2017). Les fronts d'invasion des structures tumorales sont généralement constitués de cellules ayant un fort potentiel infiltrant. Elles sont caractérisées par un réseau d'actine-F dense au niveau de leurs protrusions et possèdent de forte capacité à dégrader la MECc. Ces cellules du front d'invasion, appelées *leader cells*, vont analyser l'organisation du microenvironnement physico-chimique ce qui va leur permettre de créer un chemin d'infiltration de plus faible résistance pour les cellules « suiveuses » (Vilchez Mercedes et al. 2021) (**figure 27**).

De plus, les *leader cells* sont capables de sécréter des facteurs chimioattractants captés par les cellules tumorales environnantes. Les cellules suiveuses migreront dans la direction des *leader cells* (Roussos et al. 2011). La migration individuelle est dépendante de la topographie du réseau de la MEC environnante et de la plasticité cellulaire, c'est-à-dire sa capacité à la déformation, la contraction de la cellule au cours du déplacement et ses interactions avec la MEC (Friedl et al. 2012).



**Figure 27. Infiltration des leaders cells et des cellules suiveuses.** Les *leader cells* sont les premières cellules à infiltrer la MEC. Elle remodelent la MEC pour créer une nouvelle voie de passage pour les cellules suiveuses. Les *leader cells* sécrètent des protéases matricielles et des molécules de la MEC pour faciliter l'invasion des cellules suiveuses (voie de migration indiquée par un gradient sombre dans l'environnement). Les *leader cells* peuvent également exercer des forces de tension sur la MEC pour modifier son agencement spatiale (D'après Vilchez Mercedes et al. 2021)

#### 2.5.3.2 La migration collective

Au cours de l'initiation de l'infiltration depuis les marges tumorales, les cellules leaders et les cellules suiveuses vont interagir ensemble transitoirement. Cette coordination permet à des groupements entiers de cellules de progresser ensemble dans le tissu sain. Les *leaders cells* se détacheront périodiquement pour ouvrir de nouvelles voies de passage mais les cellules suiveuses maintiendront leurs interactions cellulaires. Ce mode de migration a été observé chez le GBM dans les travaux de Gritsenko. Les cellules ayant migré dans le sillage des *leaders cells* semblent maintenir des jonctions cellulaires au cours de leur trajet (Gritsenko et al. 2017).

Pendant la migration collective, les jonctions intercellulaires assurent l'adhésion supracellulaire, la polarisation et le couplage mécanique de chaque cellule. Chaque cellule partage, au sein du collectif, la détection et l'intégration des signaux de guidage des *leaders cells* et de la topographie du microenvironnement (gradient de rigidité de la MEC, gradient moléculaire de la MECc, gradient électrochimique) (Haeger et al. 2015). Le traitement de ces signaux et la transmission des forces de tractions et d'adhésion à travers le groupement collectif en migration est assuré par des jonctions intercellulaires de différentes natures :

- Des jonctions serrées impliquant la famille des claudines, occludines et zonula occludens. Ces jonctions permettent de coordonner la cohésion des groupements cellulaires par rapport à la motilité des cellules (Friedl et Mayor, 2017).
- Des jonctions adhérentes impliquant la famille des cadhérines. Ce sont les protéines les plus impliquées dans les jonctions des cellules migrant collectivement. Les cadhérines forment des complexes avec des protéines intracellulaires comme les caténines qui assurent la stabilité des cadhérines des jonctions adhérentes (Kourtidis et Anastasiadis, 2013). Mais aussi, avec d'autres molécules de surface comme les intégrines qui sont majeures lors des adhésions avec la MEC. Leur association permet de réguler les jonctions intercellulaires en fonction des forces d'adhésions que la cellule tumorale va déployer (Collins et Nelson, 2015). De plus, dans les récents travaux de Gritsenko et al. visant à caractériser la migration collective des cellules de GBM issus de deux patients, il a été montré par la détection des protéines des jonctions adhérentes et par vidéomicroscopie 3D time-lapse que les jonctions adhérentes sont



constamment maintenues au cours de la migration collective (2 à 6 connexions par cellule, réparties sur tous les pôles de la cellule). Les cellules de GBM collectives exprimaient bien les acteurs principaux des jonctions adhérentes la E-cadhérine, la N-Cadhérine, la  $\beta$ -caténine et la p120 caténine. La perte d'expression des cadhérines et des caténines par ARN interférent perturbait les jonctions et entraînait une individualisation des cellules. En particulier, la perte d'expression de p120 caténine réduisait la progression tumorale des cellules injectées par stéréotaxie chez la souris se caractérisait par une diminution de la progression de cellules de GBM de 10 à 25% selon le patient (Gritsenko et al. 2020).

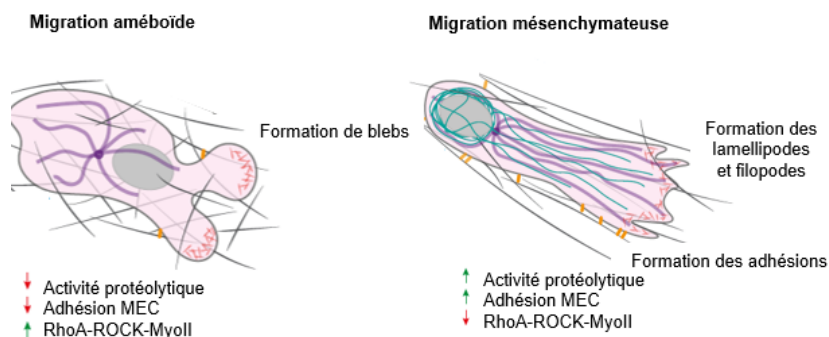
- Les Gap junctions ou jonctions communicantes, formées par 6 sous-unités connexines comme la connexine 43 (Cx43) dans le GBM. Ce type de jonctions permet le transfert de cofacteurs tels que les ions calcium nécessaires à l'activité protéique au cours de la migration (Trepats et al. 2012). L'implication de la Cx43 dans la migration collective des cellules de GBM apparaît encore mal définie. Il a été montré dans une étude sur la migration collective des cellules de GBM U118 que la perte d'expression de la Cx43 par ARN interférant induisait une migration individuelle *in vitro* en 2D (test de blessure et suivi de vidéomicroscopie) et en 3D (test de bourgeonnement) (Aftab et al. 2015). Dans une étude plus récente d'Aftab et al. sur les cellules de GBM C6 ont démontré que l'expression de la Cx43 induisait une augmentation de plus de 50% de la migration collective en test de blessure et induirait une augmentation de l'activité MMP3 par zymographie (Aftab et al. 2019). La Cx43 pourrait donc permettre le maintien de la migration collective dans les cellules de GBM.

L'impact de cette migration collective médiée par la Cx43 n'a pas encore été étudiée dans le cas de la réponse au traitement, la Cx43 étant impliquée dans l'infiltration des cellules de GBM pour la recolonisation des zones réséquées, irradiées ou pour la résistance à la chimiothérapie (Weil et al. 2017). En effet, Osswald et al. ont publié un ensemble de travaux mettant en évidence pour la première fois l'importance de l'établissement de jonctions communicantes fonctionnelles Cx43 dans l'infiltration des GBM. En effet, la perte d'expression Cx43 de cellules de GBM issus de patients greffées chez la souris par stéréotaxie entraînent une perte de la formation de jonctions intercellulaires Cx43 dépendantes, une diminution de 33% du volume tumoral 72h après l'implantation et une diminution de 75% des transferts de calcium (Osswald et al. 2015).

Il existe également plusieurs isoformes de la Cx43, notamment la forme Cx43-20k un fragment de l'extrémité C-terminale. Dans certains processus, comme la migration des crêtes neurales, cet isoforme agit comme un facteur de transcription responsable de l'induction de l'expression de la N-cadhérine dans les cellules à migration collective (Kotini et al. 2018). Ainsi, la Cx43 pourrait également participer à la formation des jonctions adhérentes pour la migration collective.

### 2.5.3.3 Le phénotype des cellules migratrices

Les différentes recherches sur la migration individuelle et collective des cellules tumorales ont mis en évidence que différents phénotypes cellulaires qui traduisent la façon dont les cellules vont se comporter au cours de la migration. Il existe à ce jour deux principaux phénotypes (Friedl et *al.* 2012) (**figure 28**) :



**Figure 28. Les différents types de migration individuelle.** Lorsque les cellules migrent dans des espaces confinés, elles peuvent faire preuve de fortes capacités à la déformation (migration améboïde) ou bien se servir de la MEC comme point d'accroche (migration mésenchymateuse) (Adapté d'après Seetharaman et Etienne-Manneville, 2020)

- Les cellules de phénotype mésenchymateux possèdent une forme allongée qui va permettre une adaptation au réseau des fibres de la MEC locale. La migration des cellules est directement influencée par la capacité des cellules à interagir avec les molécules de la MEC et de l'activité protéolytique cellulaire nécessaire pour remodeler la MEC locale pour se frayer un passage (Friedl et *al.* 2012). L'utilisation de gels de collagène tridimensionnels (3D), de cultures organotypiques sur coupes de cerveau et de l'imagerie des cellules de GBM par microscopie de fluorescence dans des modèles de souris *in vivo* a permis d'établir que les cellules leader de GBM possèdent un phénotype mésenchymateux. Ce profil est caractérisé par une extension polarisée des protrusions (pseudopodes, lamellipodes et filopodes) dans la direction de la migration cellulaire. Les cellules mettent en place des points focaux d'adhérence renforcés par l'expression des sous-unités  $\alpha\beta3$  des intégrines et la phosphorylation des protéines intracellulaires FAK et Src (Zhong et *al.* 2010).
- Les cellules de phénotype amiboïde possèdent une morphologie plutôt arrondie avec des protrusions de faible longueur. Elles établissent peu d'adhésion cellule/MEC pour progresser à travers les tissus. A la place, elles possèdent de fortes capacités à la déformation pour s'adapter au maillage moléculaire de la MEC (Liu et *al.* 2015). En pénétrant dans les zones vides du maillage, la membrane plasmique des cellules va se déformer pour adopter la forme de ces espaces, formant des blebs. L'augmentation de la pression dans les espaces libres va déformer la MEC locale, ce qui permet ensuite le passage des cellules (Paluch et *al.* 2016). La composition de la MEC, notamment la concentration en AH, pourrait avoir un impact sur l'expression d'un phénotype améboïde par les cellules de GBM. Récemment, Cui et *al.* ont démontré que la culture de cellules U87 dans des hydrogels de collagène provoque l'apparition de profils mésenchymateux et amiboïdes. Cependant, lorsqu'elles sont cultivées dans des matrices avec une faible concentration en AH, les profils mésenchymateux possèdent des protrusions moins longues et plus épaisses et la culture en matrice riche en AH provoquent une

surreprésentation des phénotypes amiboïdes. Ces profils seraient corrélés à une diminution croissante de l'expression de la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines et une concentration croissante de l'actine corticale observés en microscopie de fluorescence en fonction de la concentration en AH (Cui et *al.* 2020). De plus, il existe également des profils de migration intermédiaires pour lesquels les cellules peuvent passer d'un phénotype à l'autre. Par exemple, les cellules mésenchymateuses peuvent basculer vers un phénotype amiboïde si les forces d'accroche à la MEC sont faibles, ce qui montre que le phénotype de la migration est extrêmement dynamique selon les propriétés du microenvironnement (Liu et *al.* 2015).

## 2.5.4 La phase d'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire environnante

Quel que soit le mode de migration adopté par les cellules infiltrant les tissus, elles doivent être capables d'interagir rapidement avec leur environnement. Les cellules migratrices mettent alors en place des adhésions cellule/cellule ou bien cellule/MEC. Les forces d'accroches à la MEC s'établiront aussi bien au front de migration pour la traction des cellules qu'à leur flanc pour leur stabilisation. Le processus d'adhésion est un processus dynamique, avec des cycles d'adhésion et de dé-adhésion pour permettre la progression des cellules (Peglion et *al.* 2012).

### 2.5.4.1 L'adhésion médiée par les intégrines

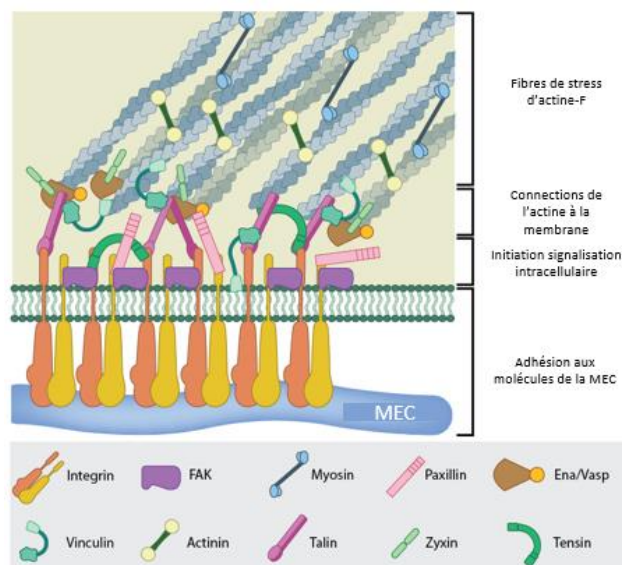
#### 2.5.4.1.1 Définition générale de l'adhésion cellule/MEC

Les cellules individuelles en migration doivent détecter les propriétés physiques de la MEC (rigidité, composition moléculaire, etc) et, en réponse, appliquer les forces appropriées pour générer le mouvement. L'adhésion et la traction sur l'ECM reposent principalement sur les protéines transmembranaires de la famille des intégrines. Au fur et à mesure que la surface des cellules interagit sur la MEC, un nombre croissant d'intégrines interagissent avec les protéines de la MEC. Ceci est à l'origine de la formation de multiples adhésions localisées appelées complexes focaux. Les étapes initiales menant à la formation des complexes focaux se produisent avant la détection des propriétés mécaniques de la MEC. Ce sont les forces générées entre les complexes focaux et la MEC (résistance, rigidité, capacité des cellules à se contracter) qui contribuent à la maturation des adhésions naissantes en points focaux d'adhérences (De Pascalis et Etienne-Manneville, 2017) (**figure 29**).

#### 2.5.4.1.2 Signalisation médiée par les intégrines

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques transmembranaires constitués de deux sous-unités alpha et bêta. Il existe actuellement plus de 24 associations de sous-unités connues à ce jour. Les sous-unités  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha V\beta 1$  sont particulièrement surexprimées dans les adhésions des GBM et seraient un facteur de résistance à la thérapie. De manière intéressante, certaines recherches ont mis en évidence que certaines sous-unités comme  $\alpha 3$  et  $\alpha 6$  sont surexprimées dans des populations de cellules souches de GBM capables d'initier la progression tumorale. Ainsi, les cellules souches de GBM à forte expression  $\alpha 6$  présenteraient une prolifération plus élevée et une capacité accrue à former des neurosphères *in vitro*, ainsi qu'une progression tumorale accrue *in vivo* par rapport aux CSC à faible expression  $\alpha 6$ .  $\alpha 6$  et  $\alpha 3$  favoriseraient également le processus d'invasion, par coopération avec la N-

cadhérine et l'activation de voies de signalisation associées à la migration et la survie (ERK par exemple) (Malric et al. 2017).



**Figure 29. Organisation des protéines impliquées dans l'établissement des adhérences cellulaires.** Les adhésions cellulaires à la MEC sont caractérisées par l'interaction des intégrines avec les molécules de la MEC. Ceci va générer une signalisation intracellulaire vers les protéines adaptatrices du cytosquelette d'actine. Ces protéines adaptatrices forment un pont physique entre les intégrines engagées avec la MEC et les fibres contractiles d'actine-F. Les intégrines et l'actine sont séparées par un noyau d'adhésion focal de 40 nm subdivisé en trois groupes :

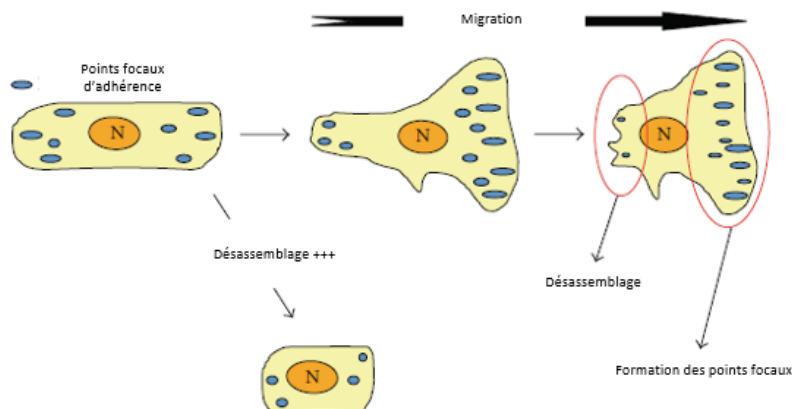
- Un groupe inférieur qui est directement fixé à la partie intracellulaire des intégrines. La paxilline et la kinase d'adhésion focale (FAK) possèdent des domaines de fixation pour d'autres protéines associées à la transduction des forces et pour des protéines de voies de signalisation de la migration comme Src, protéine activant Rac1 et Cdc42 au niveau des complexes d'adhésions dans les lamellipodes (Sulzmaier et al. 2014 et Lopez-Colomé et al. 2017). Leur activation permettra la polymérisation de l'actine-F pour la motilité (Devreotes et Horwitz 2015).
- Un groupe intermédiaire permettant la transduction des forces d'accroches, c'est le cas de la taline et de la vinculine. FAK et la paxilline activée par phosphorylation peuvent recruter ces deux protéines vers les adhésions focales naissantes. Ces protéines se fixent à l'actine-F et peuvent changer de conformation lors d'un étirement induit par les forces mises en jeu dans l'adhésion. Ainsi, elles permettent la transmission de la force par les sous-unités intégrines  $\beta$  pour moduler la signalisation de la migration.
- Un groupe supérieur permettant de réguler le branchement du réseau d'actine-F aux adhésions, c'est le cas des protéines de la famille Ena/Vasp ou encore de l' $\alpha$ -actinine, notamment l'actinine 4 qui est surexprimée dans les gliomes de haut grade (Tentler et al. 2019)

(Schéma obtenu sur le site internet "mechanobio" à partir de l'adresse suivante : <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanobiology/how-do-focal-adhesions-facilitate-mechanosensing/> )

Chacune de ces sous-unités sont capables de se lier à des séquences en acides aminés bien précises de protéines de la MEC, comme le motif Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD). Les interactions entre la partie extracellulaire des intégrines et ces motifs engendrent une signalisation intracellulaire qui se propage aux protéines associées à la partie intracellulaire des intégrines (Ellert-Miklaszewska et al. 2020).

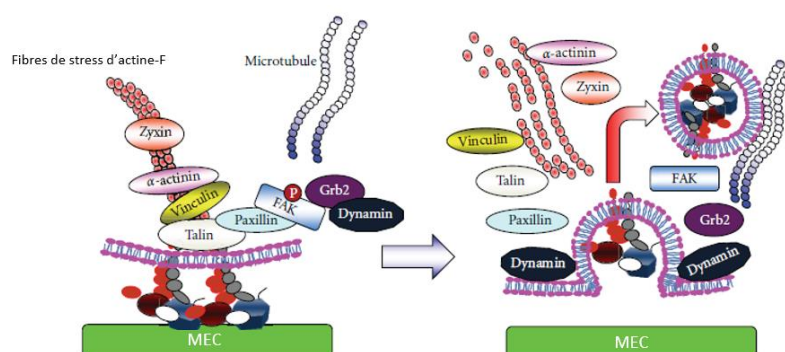
### 2.5.4.2 Le recyclage des intégrines

Pour permettre la traction des cellules, le front de migration doit se dissocier de la MEC. Un trafic des intégrines va se mettre en place pour assurer la diminution de la tension à l'avant de la cellule, puis leur relocalisation dans la direction de migration (**figure 30**).



**Figure 30. Désassemblage des adhérences focales et impact sur la migration.** La dynamique de formation des adhésions cellulaires à la MEC est crucial pour permettre la traction des cellules. Il est nécessaire que la cellule mette en place un équilibre entre l'assemblage/désassemblage des points focaux d'adhérence au front de migration et le décrochage des jonctions entre les intégrines au pôle arrière de la cellule au cours du mouvement. Si les cycles de désassemblage sont prédominants, la cellule ne migre plus. (Adapté d'après Nagano et al. 2012).

Le recyclage des intégrines est donc un mécanisme important pour maintenir des adhésions dynamiques et une génération adéquate des protrusions (Nagano et al. 2012) (**figure 31**).



**Figure 31. La perte des adhésions focales implique l'endocytose des intégrines.** FAK phosphorylée sur la tyrosine 925 permet l'interaction avec Grb2, qui permet de recruter la dynamine. Ce complexe ternaire est responsable de l'internalisation des intégrines par endocytose, permettant le désassemblage des points focaux. Cependant, la régulation de la phosphorylation d'autres acides aminés composant FAK est important dans le désassemblage des intégrines. La déphosphorylation de la tyrosine 397 de FAK est un facteur de désassemblage qui survient après l'extension des microtubules dans les points focaux. FAK a donc un rôle central dans la formation et le désassemblage des points focaux médiés par les intégrines (Nagano et al. 2012).

Le trafic des intégrines semblerait dépendant de l'hétérodimère et de l'environnement de la cellule. Par exemple, dans le cas d'une migration cellulaire directionnelle 2D, le recyclage est préférentiel pour l'hétérodimère  $\alpha\beta3$  par rapport à l'intégrine  $\alpha\beta1$ , et inversement dans le cas de l'invasion 3D (Hamidi et Ivaska, 2018).

### 2.5.4.3 L'adhésion et le cas particulier du récepteur CD44

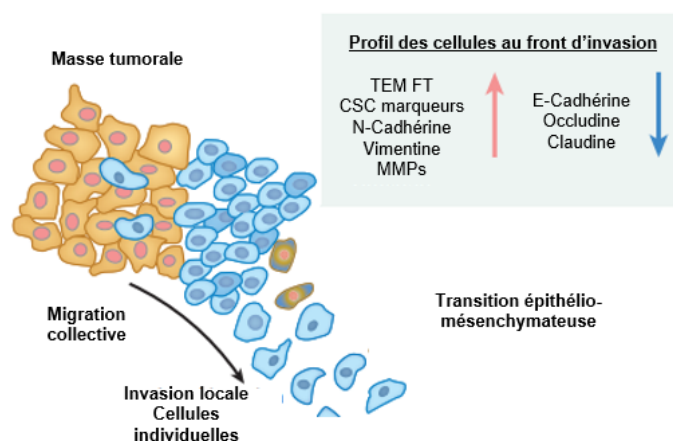
CD44 est un récepteur transmembranaire surexprimé par une grande proportion des cellules de GBM, certains auteurs rapportant une expression à 70% (Kim et Kumar, 2014). Ce récepteur a été décrit

comme contribuant à l'adhésion *via* la fixation à l'acide hyaluronique. Des tests de dé-adhésion cellulaire de cellules de GBM U373 sur des revêtements d'épaisseur croissante en acide hyaluronique (0,95 à 4,9 kPa) ont montré une corrélation entre la concentration en acide hyaluronique et les forces d'accroche des cellules U373 (2,5% à 22% de cellules adhérentes après trente minutes). La perte d'expression du récepteur entraîne une inhibition de l'adhésion des cellules à l'acide hyaluronique (Kim et Kumar, 2014). CD44 serait localisé aux extrémités des protrusions et aux niveaux des points focaux. Récemment, CD44 a aussi été observé dans des structures appelées « microtentacules ». Il s'agit de prolongements cellulaires pouvant mesurer plusieurs micromètres et qui se développent au cours de l'infiltration. Ces structures, composées de prolongements largement dépendants des microtubules, se développeraient uniquement dans les zones riches en acide hyaluronique et sont CD44 dépendant (Wolf et al. 2020).

## 2.5.5 L'invasion chez le glioblastome

### 2.5.5.1 Définition de la transition épithélio-mésenchymateuse

Les cellules migratrices vont modifier leur propriété physique tout au long de la migration : la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). La TEM consiste à une transition d'un phénotype cellulaire épithélial à un phénotype mésenchymateux (**Figure 32**).



**Figure 32. La transition épithélio-mésenchymateuse.** Les cellules tumorales subissant une TEM sont associées à des modifications cellulaires et moléculaires qui entraînent une perte des jonctions intercellulaires. Ce phénomène favorise la migration individuelle des cellules au front de migration ainsi qu'une invasion locale. Par ailleurs, certaines cellules infiltrantes possèderaient déjà un profil mésenchymateux et acquerraient des marqueurs de cellules souches. (Adapté d'après Mittal, 2018 et Iwadate et al. 2016).

Ce type de transition a été démontré pour de nombreux types de cancers épithéliaux. Les cellules tumorales vont perdre l'expression de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine et vont alors exprimer des marqueurs mésenchymateux de surface comme la N-cadhérine. Plus spécifiquement, l'activation de la voie canonique Wnt et la perte d'expression de la E-cadhérine entraîne une délocalisation de la  $\beta$ -caténine vers le noyau (Iwadate et al. 2016). Ceci permet aux cellules tumorales de surexprimer les facteurs de transcriptions comme SNAIL, Slug, ZEB1 et Twist qui vont induire l'expression de gènes de marqueurs de TEM comme la N-cadhérine, les protéines RhoGTPase responsables de la contraction de l'actine-F au front de migration (Mrozik 2018) ou encore la vimentine. En effet, la vimentine se déploie au niveau des adhésions focales et jouerait un rôle dans les cycles



d'adhésion lors de la motilité. Elle permet aussi de guider l'élongation des microtubules au niveau des protrusions du front de migration et permet l'alignement parallèle des fibres de stress d'actine (Battaglia et *al.* 2018).

Un microenvironnement hypoxique est généralement considéré comme un puissant inducteur de la TEM. Dans les gliomes diffus, les régions inflammatoires et hypoxiques au sein de la tumeur ou des tissus sains adjacents peuvent entraîner le recrutement de cellules immunitaires circulantes ou résidentes. Ces cellules libèrent un certain nombre de facteurs de croissance, notamment le TGF- $\beta$ , l'EGF, le PDGF et le FGF. Ces facteurs augmentent l'expression des facteurs de transcription nécessaires à l'initiation de la TEM, l'expression des marqueurs décrits précédemment, ainsi que de nombreuses protéases comme MMP2 et MMP9 qui renforcent le caractère infiltrant des cellules tumorales (Pala et *al.* 2013 et Xu et *al.* 2015).

#### 2.5.5.2 *La transition épithélio-mésenchymateuse chez le glioblastome*

Cependant, dans le cas des cellules de GBM, l'expression basale des protéines du phénotype épithélial est faible. La TEM dans les cellules GBM serait donc un moteur permettant la rupture des jonctions intercellulaires permettant la dissémination des cellules plutôt qu'une transition phénotypique et un switch de l'expression des cadhérines (Iwadate, 2016). La TEM chez le GBM est un processus similaire à la TEM des cancers épithéliaux dont les caractéristiques commencent à être mieux décrites. Les cellules de GBM qui infiltrent le parenchyme cérébral sembleraient posséder un phénotype intermédiaire à ceux décrits par la TEM, avec une redistribution de la N-cadhérine de la membrane plasmique au cytoplasme (Siebzehnrbuhl et *al.* 2013).

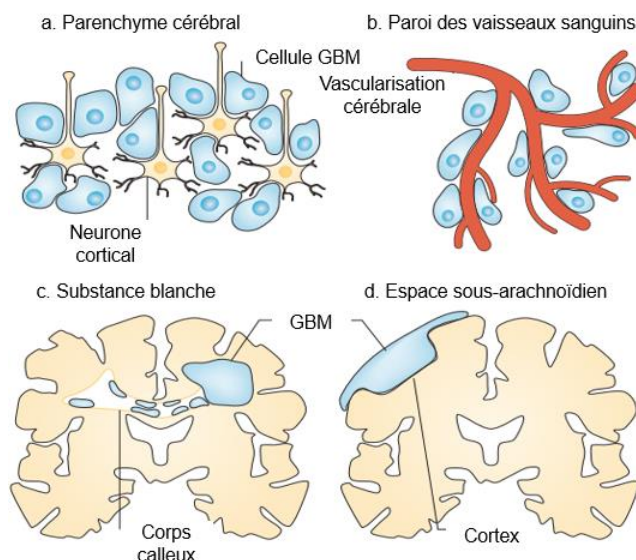
Paradoxalement, certains auteurs ont reporté que lors de la TEM, les cellules migratrices peuvent présenter une expression des facteurs de transcriptions de la TEM plus contrastée qu'au cours de la TEM standard et peuvent adopter des caractéristiques proches des cellules souches (expression CD44, CD133, CD15, OLIG2). Ceci s'expliquerait par le fait que les cellules migratrices possèderaient déjà des caractéristiques mésenchymateuses (Iser et *al.* 2017). Les protéines responsables de la modulation de l'expression des facteurs de la TEM chez le GBM sont encore mal isolées. Drachsler et *al.* ont constaté à travers l'analyse de coupes de GBM de patients que les tumeurs dont les cellules présentaient un profil agressif décrit par la TEM présentent une expression CD95 élevée. Elle est marquée par l'expression des marqueurs souches CD15 et CD44 20 à 40% supérieure selon le degré d'expression de CD95 (faible ou négative respectivement) et le maintien de l'expression des transcrits SNAIL et de la vimentine (Drachsler et *al.* 2013).

#### 2.5.5.3 *Les voies de passage des cellules de glioblastome*

##### 2.5.5.3.1 *Migration depuis les structures de Scherer secondaires*

Bien que les cellules de GBM infiltrent le tissu sain, le parenchyme cérébral demeure un environnement complexe. Les maillages de la MECc et la composition cellulaire engendrent une résistance physique qui peut entraver l'infiltration. (Lyutfi et *al.* 2020). Pour faciliter leur progression, les cellules tumorales vont utiliser à leur avantage les prolongements des cellules gliales, les réseaux de fibres blanches et les vaisseaux sanguins pour guider leur progression (**figure 33**) (Cuddapah et *al.* 2014). En 1938, Scherer est le premier à avoir décrit le passage des cellules de GBM dans le tissu cérébral sain par ces

voies anatomiques. Ses recherches ont été réactualisées par ses contemporains puis récapitulées par Claes et *al.* en 2007. Le terme "structures secondaires de Scherer" a été utilisé pour décrire les structures formées par les cellules infiltrantes autour des tissus préexistants, par opposition aux « structures primaires de Scherer » représentées par une accumulation des cellules au niveau des



**Figure 33. Schématisation des structures secondaires de Scherer.** Les structures secondaires de Scherer sont des voies de passage naturelles des cellules des gliomes diffus qui contribuent à leur dissémination à travers le parenchyme cérébral. Les cellules tumorales peuvent migrer à partir des réseaux neuronaux (a.), s'aider du réseau vasculaire préexistants (b.), des grands faisceaux de fibres blanches comme le corps calleux (c.) ou s'accumuler au niveau de l'espace sous-arachnoïdien (d.). (D'après Cuddapah et al. 2014)

zones nécrotiques et de la microvascularité tumorale. Il est maintenant utilisé pour décrire les structures sur lesquelles les cellules de gliomes diffus envahissent. Elles comprennent l'accumulation des cellules tumorales autour des corps cellulaires des neurones, la surface sous-piale, la migration le long de la paroi des vaisseaux sanguins et des faisceaux de fibres myélinisées reliant les régions cérébrales (Hatoum et *al.* 2019).

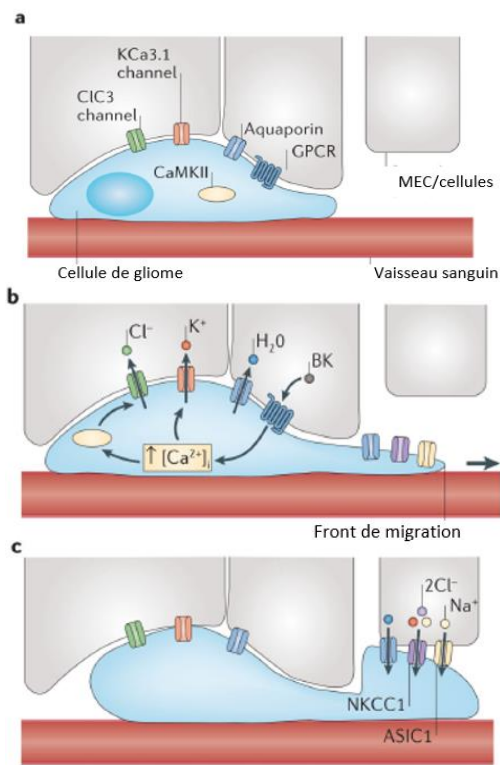
Récemment, Lyutfi et *al.* ont récupéré des colorations hématoxyline/éosine de suivis histologiques de patients atteints de GBM afin d'identifier les patterns d'infiltration à partir des classifications en vigueur à ce moment. Ils ont constaté que l'ensemble des cellules de GBM s'accumulaient au niveau périvasculaire et périneuronal (Lyutfi et *al.* 2020). L'affinité des cellules tumorales pour ce mode de dissémination n'est pas encore clairement déterminée. L'espace périvasculaire représente un point d'entrée de l'oxygène, du glucose et d'autres nutriments dans le cerveau. Il s'agirait donc d'un point d'accès que les cellules de GBM utiliseraient pour répondre à leur besoin métabolique. De plus, la membrane basale des cellules endothéliales est riche en protéines de MECc telles que la laminine, la fibronectine et la vitronectine. Elles serviraient de point d'ancrage médié par les intégrines et favoriseraient la migration cellulaire (Baker et *al.* 2014). Les cellules endothéliales produiraient également des facteurs chimiotactiques comme la bradykinine qui se fixe sur les récepteurs B2 des cellules de gliomes et enclencherait la libération intracellulaire d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , facilitant la migration des cellules tumorales (Seifert et Sontheimer, 2014. Cuddapah et *al.* 2014).



La dissémination tumorale peut également passer par les fibres myélinisées intra-hémisphériques et les fibres de projection de la capsule interne (corps calleux) reliant les deux hémisphères. Ainsi, les cellules tumorales vont se disséminer dans les régions du même hémisphère ou bien dans les régions de l'hémisphère opposé. Les cellules de GBM expriment une multitude de protéines agissant comme des molécules de guidage axonal. Les molécules de guidage axonal les plus importantes sont : les éphrines (Eph), les netrines, les Slits et leurs récepteurs roundabout (Robo) ainsi que les sémaphorines et leurs récepteurs, la plexine et la neuropiline. L'association des couples ligands/récepteurs exprimés à la surface des axones et des dendrites myélinisés et des cellules de gliomes serait à l'origine de la migration le long des fibres blanches (Armento et al. 2017).

#### 2.5.5.3.2 Adaptation morphologique des cellules à la topographie du microenvironnement

Au cours de l'infiltration, les cellules de GBM doivent être capable de s'adapter au réseau de fibres de la MECc. La conduction de suivis en temps réel de l'infiltration *in vivo* et *ex vivo* montre que les cellules infiltrantes de GBM subissent des changements morphologiques et de volume au cours de leur progression (Cuddapah et al. 2014).



**Figure 34. La régulation hydrodynamique des cellules de gliome au cours du mouvement.** a. Les cellules de gliome sont soumises à des contraintes spatiales environnementales, que ce soit les cellules environnantes, la MEC ou lorsqu'elles migrent le long des vaisseaux sanguins. Les cellules de gliome expriment divers canaux ioniques et des aquaporines à leur surface qui permettent des transferts d'ions et en eau respectivement. b. Lors de la stimulation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), on observe une augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  dans les cellules de gliome, ce qui entraîne une activation  $Ca^{2+}$ -dépendante de l'ouverture des canaux  $ClC3$  et  $KCa3.1$  dépendants de la protéine kinase II  $Ca^{2+}$ /calmoduline (CaMKII). Cela entraîne l'efflux de  $Cl^-$  et de  $K^+$ , ce qui entraîne des efflux en eau. Cette diminution de volume permet aux cellules de gliome de réduire le volume cytoplasmique et de s'adapter à une topographie plus exiguë. c. Après avoir franchi une zone étroite, les cellules de gliome peuvent regagner du volume grâce à l'afflux d'ions (cotransporteur  $Na^+-K^+-Cl^-$  (NKCC1) et le canal ionique). (Adapté de Cuddapah et al. 2014)

En effet, Watkins et Sontheimer ont démontré *ex vivo* que les cellules de GBM U251 et D54 mises en culture sur des coupe de cerveau de souris présentaient des modifications périodiques du volume cellulaire (jusqu'à 33 %) lorsque les cellules génèrent des protrusions cellulaires et lors de la rétraction de ces processus. Ces modifications du volume cellulaire apparaissaient également *in vitro* lorsque les cellules migrent à travers différentes tailles de pores de chambre *transwell* (3 à 8 µm de diamètre) (Watkins et Sontheimer, 2011). Ces modifications du volume cellulaire pourraient être dues à la surexpression en surface des aquaporines ou une modification d'expression des canaux ioniques (**figure 34**).

Les aquaporines (AQP) sont des canaux transmembranaires permettant le passage de l'eau, présents à la surface des cellules sous forme de tétramères exprimés par la majorité des cellules gliales. Chaque monomère est une protéine de 28-30 kDa, qui contient six α-hélices transmembranaires. Dans les cellules de GBM, l'AQP1 et 4 seraient surexprimées, notamment au niveau des cellules péricytaires et dans les zones où la pression osmotique augmente (œdème vasogénique, régions hypoxiques) (Mou et al. 2010 et Maugeri et al. 2016). Les échanges ioniques, *via* les canaux chlorures et potassiques notamment, permettraient également de modifier les entrées et sorties en eau du comportement intracellulaire et extracellulaire. Par exemple, dans les cellules de gliomes, le co-transporteur Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> est surexprimé et augmente les influx en ions Cl<sup>-</sup>. Pour faire face à cet influx, le canal ionique ClC3 s'active et induit un efflux de Cl<sup>-</sup>. Cette perte en ions Cl<sup>-</sup> entraîne un efflux en eau, diminuant le volume cellulaire (Cuddapah et al. 2014).

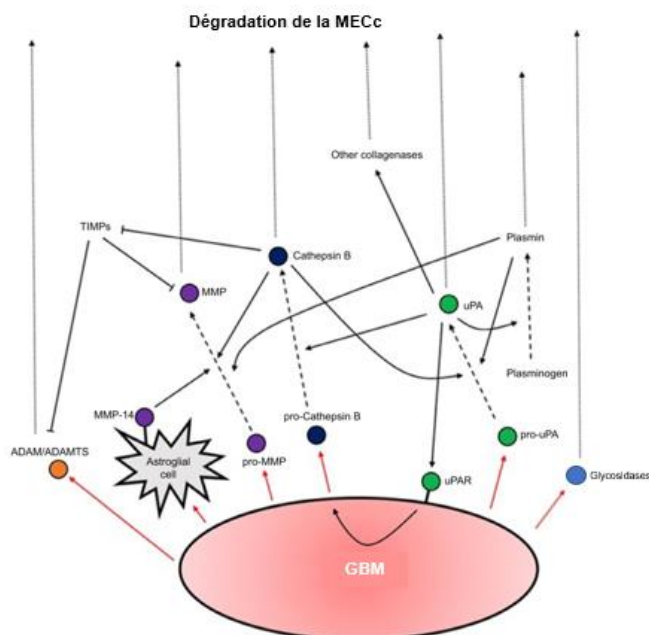
#### 2.5.5.3.3 L'activité protéolytique au cours de l'invasion

Les modifications morphologiques et du volume cellulaire des cellules migratrices de GBM ne sont pas toujours suffisantes selon le phénotype des cellules tumorales. En effet, elles doivent rompre la MEC locale pour poursuivre la progression à travers le parenchyme cérébral. Pour cela, les cellules tumorales vont sécréter localement des facteurs dont l'activité protéolytique va rompre les différentes molécules de la MEC. Parmi ces facteurs, les métalloprotéases matricielles (MMP) seront un des acteurs majeurs de la dégradation de la MEC, en particulier MMP2, MMP9 et MMP14 dans le GBM. Les MMP sont sécrétées sous forme pro-enzyme et seront activées après sécrétion ou par d'autres MMP. En plus des MMP sécrétées, il existe des MMP particulières, comme MMP14, qui possèdent une expression transmembranaire. Dans le cas des cellules de GBM, MMP14 va s'accumuler au niveau des lamellipodes et des filopodes. Elle va interagir avec CD44 et les intégrines ce qui entraîne une dégradation locale de la MEC au niveau du front de migration (Jabłońska-Trypuć et al. 2016).

D'autres systèmes protéolytiques ont été décrits chez le GBM. C'est le cas du système fibrinolytique impliquant la conversion du plasminogène en plasmine active. La plasmine est une protéase capable de dégrader un spectre large de molécules de la MEC. Son activation est réalisée par le biais de la fixation du facteur sécrété uPA sur son récepteur uPAR présent à la surface des cellules tumorales. Le facteur uPA est également connu pour activer les pro-MMP2 et 9, renforçant ainsi la dégradation de la MEC (Zhang, 2007 et Geraschenko, 2019) (**figure 35**).

Les cathepsines sont des protéases lysosomales qui sont surexprimées chez le GBM. Elles sont relarguées dans l'espace extracellulaire sous forme de pro-enzymes et seront activées par d'autres

enzymes protéolytiques. Par exemple, la cathepsine B peut être activée par uPA (Levicar et *al.* 2003 et Hatoum et *al.* 2019).



**Figure 35. Principaux systèmes protéolytiques mis en place par les cellules de glioblastome** (Adapté d'après Hatoum et *al.* 2019).

Les protéines de la famille ADAM et ADAMT sont des protéases transmembranaires qui sont capables de dégrader la MEC mais aussi de cliver les interactions entre les intégrines et la MECc pour poursuivre l'invasion (Wildeboer et *al.* 2006 et Sarkar et *al.* 2015). Ces enzymes sont encore peu décrites dans la littérature des tumeurs cérébrales mais il semblerait que leur surexpression puisse être corrélée à une augmentation de l'invasion, particulièrement ADAMT4, 5 et ADAM17 (Hatoum et *al.* 2019).

Enfin, les glycosidases sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse de glucides des PG et des GAG de la MECc. Les hyaluronidases (dégradation de l'AH) et les héparanases (dégradation des HS comme le syndécan) sont deux exemples d'enzymes dont l'activité semblerait augmenter dans le GBM au cours de l'invasion (Ferrer et *al.* 2018).

## 2.5.6 L'implication de la MEC tumorale dans l'invasion du glioblastome

### 2.5.6.1 Modification moléculaire de la matrice extracellulaire tumorale

De plus en plus de recherches démontrent l'importance de la prise en compte des cellules non tumorales et du microenvironnement moléculaire en plus de la physiologie de la tumeur (hypoxie, inflammation, etc), des propriétés intrinsèques des cellules tumorales dans le processus d'infiltration. Les cellules tumorales vont moduler localement ce microenvironnement qui a son tour va moduler la progression tumorale, en particulier le processus d'infiltration (Manini et *al.* 2018). La composition moléculaire de la MECc sera modifiée par les cellules de GBM au cours de leur infiltration, non pas uniquement par la dégradation protéolytique mais aussi par la sécrétion de nouvelles molécules de la MECc, ce qui aura de nombreuses conséquences sur l'infiltration tumorale (**tableau 1**).

**Tableau 1. Récapitulatif des effets des différents composants de la MECc saine et tumorale par le microenvironnement tumoral sur les cellules de GBM.** + représente une forte synthèse basale par le microenvironnement, - représente l'absence de synthèse supplémentaire, +/- représente une synthèse en fonction des conditions physiologiques, +++ représente une augmentation de la synthèse par rapport au niveau basal (Adapté à partir de Wiranowska et Rojiani, 2011)

Composants de la MECc	Synthèse protéique		Effets sur les cellules de GBM	
	MECc saine	MECc tumorale	MECc saine (Wiranowska et Rojiani, 2011)	MECc tumorale
Acide Hyaluronique	+	+++ Fragments entre 1000 et 10 kDa	Prolifération, survie, invasion	Croissance tumorale Induction de l'invasion tumorale, en particulier AH < 500 kDa (Chen et <i>al.</i> 2018) Activation CD44 (Monslow et <i>al.</i> 2015)
Chondroïtine sulfate (lecticans)	+	+++	Régulation de la signalisation intracellulaire (prolifération, survie)	Promotion invasion (U251 et U87) (Pan et <i>al.</i> 2020) Activation CD44 (Kim et Kumar, 2014) Chondroïtine sulfate glycolylée : induction croissance tumorale. Non glycosylée : infiltration des cellules périphériques (Silver et <i>al.</i> 2013)
Héparane sulfate (glypican)	+	+++	Liaison et stockage facteurs de croissance dans la MECc	Promotion carcinogenèse par la dégradation des héparane sulfate (mise à disposition de la réserve de facteurs de croissance) (Kundu et <i>al.</i> 2016)
Glycoprotéines fibreuses : <u>Structure</u> : Collagène IV <u>Adhérence</u> : Fibronectine, Laminine, Vitronectine	-	+/-	Structuration de la paroi des vaisseaux (lame basale) et MECc	Collagène : modification de l'agencement des fibres (disposition moins régulière avec une augmentation des angles formés et une diminution de leur épaisseur). Corrélié à une augmentation de l'infiltration des cellules de GBM (Pointer et <i>al.</i> 2017). Fibronectine/laminine/vitronectine : Accumulation au niveau périvasculaire (lame basale, proximité des vaisseaux sanguins). Augmentation infiltration le long des vaisseaux sanguins Wiranowska et Rojiani, 2011).
Galectines (1,3 et 8)	+	+++	Développement cérébral, angiogenèse, interactions avec les glycoprotéines fibreuses	Galectine 1 : expression élevée au niveau des marges de la tumeur, corrélée à une augmentation de l'infiltration tumorale (Toussaint et <i>al.</i> 2012) Galectine 3 : Chimioattractant des cellules de la microglie, induction de l'expression des intégrines et modulation du cytosquelette (Le Mercier et <i>al.</i> 2010) Galectine 8 : Expression associée à une augmentation de la motilité cellulaire (Metz et <i>al.</i> 2016)
Ténascine C	+/-	+++	Prolifération, migration, survie cellulaire, contrôle différenciation (zones neurogéniques)	Renforce l'infiltration des cellules tumorales au niveau des marges (Xua et <i>al.</i> 2016)

#### 2.5.6.2 Topographie de la MECc tumorale et migration des cellules de glioblastome

La rigidité de la MECc tumorale des GBM apparaît plus élevée que la MECc saine et est corrélée à l'augmentation globale de la synthèse des molécules de la MECc par l'ensemble des types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral. Notamment, la synthèse augmentée de l'AH, de collagène IV dans la membrane basale, de la ténascine C et des lecticans forme des complexes non covalents qui limitent la flexibilité de la MEC tumorale. (Barnes et *al.* 2017).

La rigidification de la MECc va entraîner plusieurs conséquences sur l'évolution de la progression tumorale. Il a été démontré dans les cancers solides que l'accumulation de certains composants, comme l'AH et le collagène, dans le microenvironnement tumoral soient capables de créer des barrières entourant et protégeant la tumeur. Dans les GBM humains et murins, une infiltration plus faible des lymphocytes T a pu être observée dans les zones tumorales contenant beaucoup d'AH, par rapport aux zones tumorales pauvres en AH. La MECc tumorale pourrait contribuer à une immunosuppression indirecte en rendant plus difficile l'accès des cellules immunitaires à la masse tumorale. De même, des niveaux élevés de composants de la MEC pourraient diminuer l'apport en nutriments et en oxygène à la tumeur. Ceci renforcerait l'hypoxie et induire stress métabolique qui seraient susceptibles d'augmenter l'agressivité de la tumeur (Mohiuddin et Wakimoto, 2021).

L'augmentation de la rigidité de la MECc est détectée grâce aux protrusions émises par les cellules de GBM et va conditionner les propriétés biomécaniques des cellules tumorales. En 2014, Pogoda et *al.* ont constaté que l'augmentation des forces de compression dans des matrices de collagène I et de laminine (0,3 kPa à 14 kPa) entraînait une polymérisation des filaments intermédiaires de vimentine et des filaments d'actine des cellules LN-229. Cette polymérisation se caractérisait par un étalement cellulaire plus important et l'augmentation de protrusions émises. Parallèlement, les auteurs ont également constaté par microscopie de force atomique que la rigidité membranaire des cellules LN-229 était 4 fois plus faible que celle des astrocytes pour une MEC à 10 kPa et que l'élasticité du tissu tumoral était 50% plus élevée que le tissu cérébral sain. Les cellules de GBM présenteraient un phénotype mésenchymateux, et plus particulièrement des capacités à la déformation et d'adhérence leur permettant de s'adapter aux variations de la rigidité de la MEC tumorale cérébrale (Pogoda et *al.* 2014). Ainsi, la rigidité de la MEC environnante serait directement corrélée aux capacités des cellules à se mouvoir dans un espace confiné (Ulrich et *al.* 2009).

La disposition des fibres et la longueur des fibres de la MEC tumorale pourrait également avoir un impact sur l'invasion des cellules de GBM. Rubenstein et Kaufman ont élaboré un modèle *in silico* Q-potts à partir de modèles *in vitro* d'invasion tri-dimensionnel de sphéroïdes de cellules de gliome C6 afin d'évaluer les paramètres de la MEC susceptibles de faire varier l'invasion cellulaire. Les auteurs ont ainsi constaté que l'alignement parallèle des fibres de collagène I augmentait le nombre de cellules de gliome interagissant avec les fibres. Cependant, la longueur des fibres de collagène I aurait peu d'impact sur l'invasion pour de fortes concentrations en collagène mais les fibres les plus longues dans des matrices faibles en collagène augmenteraient l'invasion des cellules de gliome (Rubenstein et Kaufman, 2008). Dans une récente étude, des sphéroïdes U87 inclus dans des hydrogels de collagène I

naturellement hautement organisés se développent plus rapidement et les cellules infiltrant plus profondément la MEC environnante par rapport à des hydrogels d'AH dont les fibres sont naturellement moins bien organisées. Huit jours après l'inclusion des sphéroïdes, les sphéroïdes dans les hydrogels de collagène I possèdent un front d'infiltration plus développé (distance de 661,65  $\mu\text{m}$ ) avec une migration préférentiellement individuelle alors que ceux d'AH présentent un front d'infiltration plus restreint (distance de 345,55  $\mu\text{m}$ ) mais plus dense qui laisse suggérer une migration collective plus marquée (Pereira et *al.* 2020). Ainsi, la topographie de la MECc aurait un effet considérable sur la dynamique de la migration des cellules de GBM.



### 3 PARTIE III : LA RADIOTHERAPIE DANS LE GLIOBLASTOME

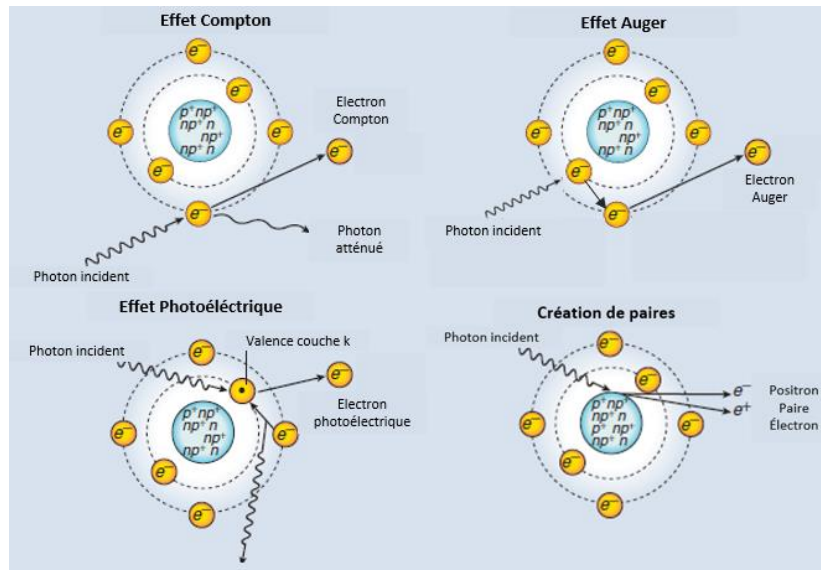
#### 3.1 LES CARACTERISTIQUES DE LA RADIOTHERAPIE

##### 3.1.1 Interactions physiques des radiations ionisantes et des tissus biologiques

La radiothérapie est un traitement loco-régional anticancéreux qui repose sur la délivrance de radiations ionisantes. L'action des rayonnements ionisants sur les tissus biologiques en clinique ne tient pas uniquement compte des dommages directs engendrés sur les cellules tumorales. C'est l'ensemble du tissu biologique qui est touché (membranes biologiques, MECc, eau, cellules tumorales et saines). La phase physique représente le moment où les radiations ionisantes entrent en contact avec les atomes du tissu biologique. Au cours de cette étape, l'ionisation des atomes par les radiations ionisantes peut déplacer les électrons d'une orbitale à l'autre, des électrons peuvent être expulsés des atomes ionisés. Les photons peuvent interagir avec les électrons des couches internes, les électrons des couches externes, l'espace extranucléaire entourant le noyau et le noyau lui-même. La probabilité de survenue de ces événements dépend à la fois de l'énergie du rayon incident et de la nature de l'atome rencontré qui est caractérisée par son numéro atomique  $Z$  (Butterworth et *al.* 2012, Zeman et *al.* 2014).

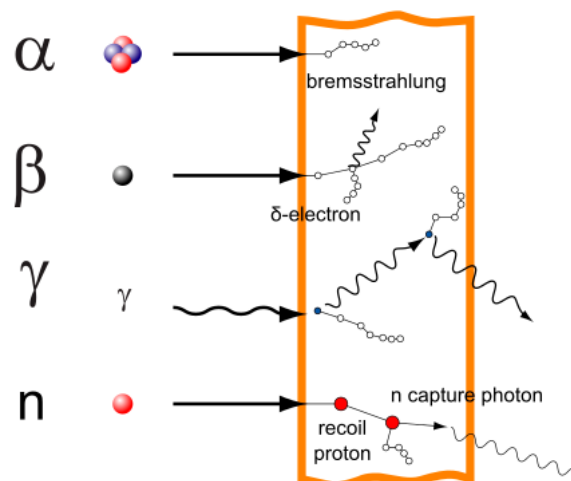
L'effet photoélectrique correspond à une absorption totale de l'énergie des photons par les électrons de l'atome et est dominant dans les tissus biologiques pour des énergies inférieures à 30 keV. Une partie de cette énergie est perdue et brise l'énergie de liaison de l'électron, entraînant l'émission d'un électron. L'effet Compton survient lorsque l'énergie des photons incidents est supérieure à l'énergie de liaison des électrons de l'atome. L'énergie du photon n'est pas totalement absorbée et un photon de plus faible énergie sera rejeté et un électron ayant absorbé une partie de l'énergie du photon sera également rejeté. Il survient dans les tissus pour des énergies comprises entre 30 keV et 30 MeV. Toutes les molécules biologiques contenues dans le milieu sont des cibles potentielles pour ces événements de dépôt d'énergie. L'ionisation des atomes peut produire des particules secondaires chargées et peuvent elles-mêmes déposer de l'énergie. Le dépôt d'énergie et la réaction en chaîne est dépendante de la source d'ionisation et de la densité du tissu. Cette réaction en chaîne se poursuit jusqu'à ce que toute l'énergie déposée par le photon ou la particule incidente soit consommée (**figure 36**) (Butterworth et *al.* 2012 et Zeman et *al.* 2014).

La quantité totale d'énergie transférée au tissu lors du passage d'un rayonnement ionisant est exprimée en unités de dose (Gy). Cependant, selon la source des radiations ionisantes (rayons X, particules, etc) la quantité totale d'énergie déposée à la cellule lors du passage d'un rayonnement ionisant ne produit pas les mêmes effets biologiques. Par exemple, 1 Gy de rayons X et 1 Gy de neutrons délivrent la même énergie totale à une cellule mais les effets biologiques seront dépendants des événements d'ionisation. Dans cet exemple, les conséquences biologiques d'une dose de 1 Gy de neutrons sont beaucoup importantes car l'énergie moyenne déposée localement le long de la trajectoire de chaque



**Figure 36. Les photons interagissent avec les atomes par le biais de mécanismes majeurs.** Les photons de faible énergie interagissent par l'effet photoélectrique, dans lequel les photons sont absorbés par un atome, qui éjecte alors un électron énergétique. Les photons de plus haute énergie subissent la diffusion Compton, dans laquelle le photon et l'électron sont tous deux diffusés par un atome. L'effet Auger peut survenir lorsqu'un photon entraîne l'éjection d'un électron des couches internes. L'énergie peut être transférée vers un électron d'une couche externe et un électron d'Auger peut être expulsé. L'effet de création de paires survient lorsque le photon interagit avec le voisinage du noyau, permettant de générer une paire d'électron et de positron (Adapté d'après Zeman et al. 2014).

neutron est plus élevée que pour les rayons X. C'est pourquoi, différentes sources de radiations ionisantes sont déployées en radiothérapie selon leurs propriétés respectives (**figure 37**) (Zeman et al. 2014).

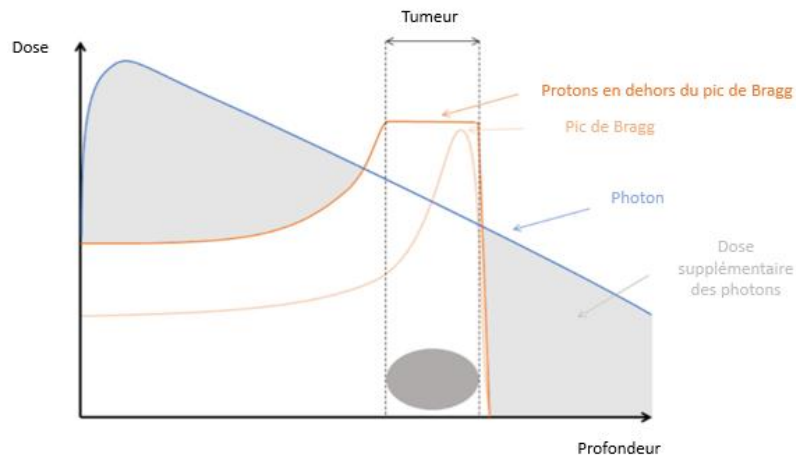


**Figure 37. Schématisation du dépôt d'énergie de différentes sources de radiations ionisantes.** Les particules chargées vont interagir fortement avec la matière et vont ioniser directement les atomes. Les particules neutres ionisent indirectement mais pénétreront plus en profondeur dans la matière (Schéma obtenu d'après le site [https://www.wikiwand.com/en/Ionizing\\_radiation](https://www.wikiwand.com/en/Ionizing_radiation))

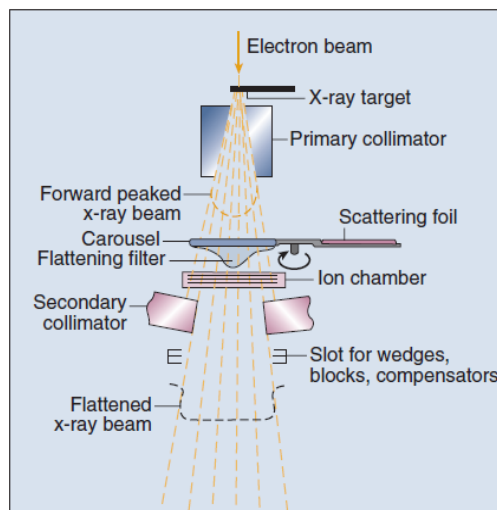
### 3.1.2 Les sources de radiations ionisantes utilisées

#### 3.1.2.1 Les rayons X

La source de radiations ionisantes la plus répandue en radiothérapie clinique est actuellement les rayons X. Les photons X générés par les rayons X sont caractérisés par un dépôt élevé d'énergie avec une diminution exponentielle de la libération d'énergie en fonction de la profondeur, ce qui limite la diffusion des radiations ionisantes dans les tissus environnants (Garibaldi et al. 2017) (**figure 38**). Les rayons X sont classiquement produits à l'aide d'un accélérateur linéaire de particules (LINAC) (**figure 39**).



**Figure 38. Comparaison de la distribution de la dose en fonction de la profondeur (photons X, gamma et particules chargées).** Les photons X (et de manière similaire les photons gamma) diffusent en profondeur et sont profondément atténués en fonction de la profondeur. Elles toucheront donc le tissu traversé proportionnellement à la profondeur, avec une distribution non sélective à la tumeur. Les protons sont des particules chargées dont la pénétration dans les tissus est bien définie et est appelée pic de Bragg. En pénétrant dans les tissus, les protons sont ralentis et déposent la majeure partie de leur énergie en fin de parcours. La diffusion peut être contrôlée pour un ciblage plus précis de la tumeur (D'après Vanderwaeren et al. 2020)



**Figure 39. Schématisation de la génération des faisceaux de photons X à l'aide d'un accélérateur linéaire de particules (LINAC).** Les faisceaux de photons X sont classiquement produits au moyen d'un accélérateur linéaire (LINAC). Il accélère des particules chargées (électrons) à des vitesses proches de celle de la lumière en utilisant des champs électriques pour pousser les électrons à travers une série de cavités accélératrices. Les électrons sont accélérés à des énergies généralement comprises entre 4 et 18 MeV. Des champs électriques et magnétiques concentrent et orientent les électrons à haute énergie de manière qu'ils frappent une fine cible métallique qui arrête le faisceau d'électrons. Le faisceau de photons passe ensuite par une série de filtres et d'éléments de mise en forme du faisceau qui aplatissent et définissent les bords du faisceau. (D'après Zeman et al. 2014)

La forme du faisceau peut être contrôlée par un collimateur multilame intégré dans l'irradiateur. Il s'agit d'un filtre possédant des lames mobiles qui peuvent bloquer certaines fractions du faisceau de photons. En déplaçant et en contrôlant un grand nombre de lames, il est possible de générer presque n'importe quelle forme de champ d'irradiation souhaitée (Jeraj et Robar, 2004).

### 3.1.2.2 Les particules chargées

L'hadronthérapie regroupe les traitements basés sur la délivrance des neutrons ou d'ions ionisés comme l'ion carbone (Jiang et *al.* 2012). L'utilisation de sources de protons et des ions carbones sont les plus étudiées pour le GBM (Kong et *al.* 2020). Ces deux sources possèdent plusieurs avantages par rapport à l'utilisation des rayons X. Elles permettent une meilleure distribution de la dose par rapport aux rayons X et gamma. En effet, en pénétrant dans les tissus, les protons sont ralentis et déposent la majeure partie de leur énergie à la fin de leur parcours. Il en résulte une distribution de l'énergie très caractéristique appelée pic de Bragg. En modifiant l'énergie des protons accélérés, on peut ajuster la profondeur de pénétration et ainsi mieux maîtriser la ballistique. En combinant différents pics de Bragg sur toute la tumeur, il est possible d'irradier plus spécifiquement la tumeur, tout en limitant la dose reçue par les tissus sains (Vanderwaeren et *al.* 2021).

Certaines études sur les particules chargées font l'objet de suivi de patients traités en clinique (Malouff et *al.* 2019) et sont actuellement en phase 2 (Protons, 90 patients avec GBM nouvellement diagnostiqués, M.D. Anderson Cancer Center, 2013-en cours) voir 3 (Protons et ions carbone, 369 patients avec GBM nouvellement diagnostiqués, Jiade J. Lu, Shanghai Proton and Heavy Ion Center, 2020-en cours) d'essais cliniques. En outre, les objectifs de ces deux études cliniques en cours sont de comparer respectivement l'efficacité de la protonthérapie par rapport à des systèmes de délivrance des photons X actuellement déployés (Radiothérapie par Intensité Modulée) et d'évaluer l'efficacité de l'utilisation des protons et des ions carbone dans le protocole Stupp par rapport aux photons X.

### 3.1.2.3 Les radioisotopes

La génération de radiations ionisantes peut être permises grâce à l'utilisation de radioisotopes (Bailly et *al.* 2019) (**tableau 2**). Cependant, aucun radioisotope n'est actuellement utilisé en routine et font l'objet de suivis de quelques dizaines de patients ou bien d'études cliniques de phase 1 à 2 (Wang et *al.* 2020, Telix International Pty Ltd, NCT03849105, 2021). Les études se sont plutôt centrées sur des cas de GBM récidivants ou ne répondant pas au protocole Stupp, en complément à d'autres agents thérapeutiques (anticorps monoclonal, TMZ, etc) (Peregrine Pharmaceuticals, NCT00677716, 2014 et Novartis Pharmaceuticals NCT05109728, 2021), ou non (Wang et *al.* 2020).

**Tableau 2. Propriétés des radioisotopes étudiés dans les suivis de patients ou les études cliniques sur le glioblastome.** Les radioisotopes étudiés dans le GBM sont par exemple l'iode 125 et 131, Yttrium 90, le Lutetium 177, l'Astatine 211, le Bismuth 213 ou encore l'Actinium 225. Ils délivrent leur énergie ionisante de manière locale sous la forme d'électrons Auger, de particules  $\beta^-$  ou  $\alpha$ . Le choix du radionucléide se ferait en fonction de la taille de la tumeur. Les électrons Auger sont des électrons de faible énergie qui émettent une irradiation très localisée (plusieurs nanomètres autour du point d'émission) avec des effets biologiques élevés. Les particules  $\beta^-$  qui ont un transfert d'énergie linéique relativement faible émettent leur énergie sur quelques millimètres. Les particules  $\alpha$  délivrent une fraction élevée de leur énergie à l'intérieur des cellules ciblées. Elles conviendraient donc pour cibler les cellules tumorales isolées et les maladies résiduelles. Actuellement, certains de ces radioisotopes font l'objet d'études cliniques de phase 1 à 2 (Adapté d'après Bailly et *al.* 2019).

Particules émises	Radioisotopes	Profondeur de pénétration dans les tissus mous (mm)	Suivi de patients / Essais cliniques	Auteurs / référence <i>clinical trials</i>
Auger	Iodine-125	Echelle du nanomètre	Etude rétrospective (2004-2017), 58 patients dont 29 ayant été traités par curiethérapie à l'iode-125	Wang et <i>al.</i> 2020
$\beta^-$	Iodine-131, Yttrium-90, Lutetium-177	Entre 2 et 12	Iodine-131 : Phase 2. 41 patients, GBM première récurrence. Phase 1/2 : 44 patients, GBM récidivant  Yttrium -90 : Phase 1. 60 patients, divers cancers dont GBM récurrent ou non répondeurs  Lutetium-177 : Phase 1b. 45 patients, GBM nouvellement diagnostiqué	Iodine-131 NCT00677716 NCT03849105  Yttrium-90 NCT00006368  Lutetium-177 NCT05109728
$\alpha$	Astatine-211, Bismuth-213, Actinium-225	$\leq 0,01$	Bismuth-213, suivi de 20 patients, GBM récidivant	Krolicki et <i>al.</i> 2018

### 3.1.3 Les différents types de radiothérapie et leur innovation

Dans le cas des tumeurs cérébrales, il existe deux grands types de radiothérapie : la radiothérapie dont la source est interne, directement délivrée dans le tissu tumoral ou au voisinage de celui-ci et la radiothérapie externe dont les radiations ionisantes sont délivrées sous la forme de rayonnements externes (**Tableau 2**).

#### 3.1.3.1 La radiothérapie externe

##### 3.1.3.1.1 Le fractionnement des radiations ionisantes

La radiothérapie externe est la radiothérapie standard. Basée sur le protocole Stupp (dose cumulative de radiothérapie délivrée est de 60 Gray (Gy), répartie en trente fractions de 2 Gy (cinq jours par semaine, répétées sur six semaines)) est le plus souvent fractionnée, spatialement et temporellement.

Les faisceaux de rayonnement sont généralement délivrés selon plusieurs angles d'approche de la lésion, chacun des faisceaux étant formés et modifiés en intensité pour maximiser la délivrance de la dose à la tumeur tout en minimisant la dose aux tissus normaux. Généralement, ces traitements sont administrés à l'aide de rayons X dont l'énergie est comprise entre 6 MV et 15 MV, la pénétration des rayonnements est proportionnelle à l'augmentation des énergies (Zeman et *al.* 2015). Bien que le fractionnement défini par le protocole Stupp soit appliqué pour le traitement de tous les GBM, différents schémas de fractionnement sont testés en fonction des patients.

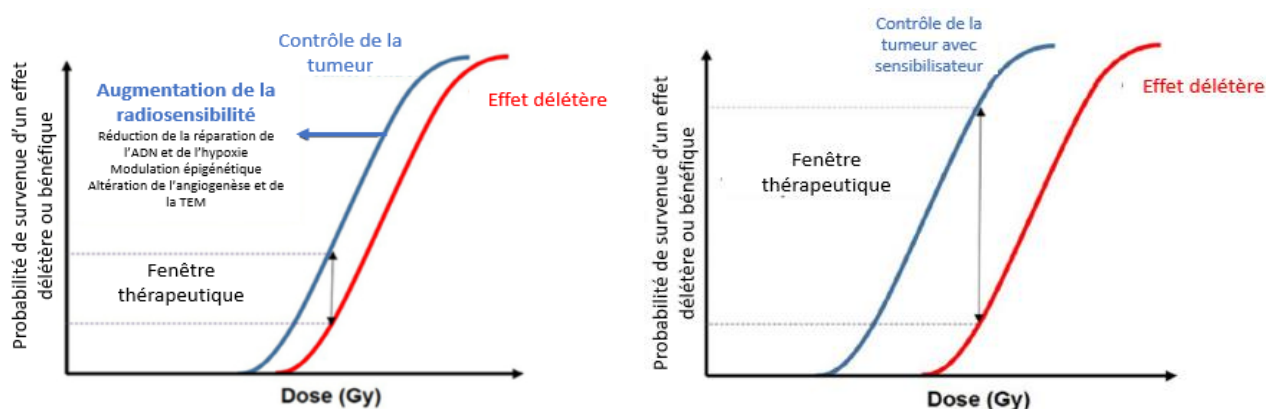
- L'hyperfractionnement est un schéma qui consiste à appliquer des doses moins fortes (entre 1 à 1,8 Gy) mais plus fréquemment pour diminuer le temps de traitement ou augmenter la dose totale délivrée. Les premières études cliniques menées chez des patients atteints de gliomes diffus présentaient également des résultats hétérogènes. Par exemple, en 1997, Shibamoto et *al.* ont constaté que les patients qui ont suivis un protocole de radiothérapie standard (1,8 Gy/jour, dose totale 64,8 Gy) ont une survie globale moyenne de 14 mois alors que les patients qui ont suivi un protocole d'hyperfractionnement (1,5 Gy/deux fois par jour, dose totale 69 Gy) ont une survie globale de 14,5 mois. Ces deux protocoles associaient alors un traitement de chimiothérapie à base de nitrosourée, le schéma d'hyperfractionnement n'apportait donc pas de gain de survie des patients (Shibamoto et *al.* 1997). Dans une étude rétrospective plus récente, Lewitzki et *al.* ont comparé l'efficacité du protocole Stupp et *al.* (Chimiothérapie par témozolomide, TMZ) standard par rapport celle d'un protocole Stupp incorporant un schéma d'hyperfractionnement (1,8 Gy 2 fois par jour, 54 Gy total). Les auteurs ont mis en évidence que la survie globale des patients traités avec le schéma d'hyperfractionnement n'était pas significativement différente de celle des patients recevant le schéma standard (18,5 mois contre 24,4 mois ( $p = 0,131$ )) (Lewitzki et *al.* 2019)
- L'hypofractionnement est un schéma qui permet de délivrer des doses supérieures à 2,5 Gy, certains protocoles sont allés jusqu'à 20 Gy par fraction (Trone et *al.* 2020). Il permet d'écourter la durée du traitement si les tumeurs sont irradiées tous les jours ou bien d'espacer les irradiations. L'étude prospective (2015 à 2018) de Rayan et *al.* a mis en exergue que l'association de l'hypofractionnement (45 Gy total, fraction de 3 Gy, 5 jours par semaine pendant 3 semaines) au TMZ n'améliorait pas significativement la survie globale des patients par rapport à ceux traités de manière conventionnelle (10,03 mois contre 11,48 mois) (Rayan et *al.* 2020). Trone et *al.* ont compilé 2283 publications datant de 1985 à 2020 et ont réalisé une métaanalyse de quatre essais randomisés et de sept études observationnelles. Les auteurs ont conclu que l'hypofractionnement n'augmentait pas la survie globale des patients par rapport à un fractionnement classique, y compris en association au TMZ. De manière intéressante, les suivis IRM (lésions en T2/FLAIR, anomalie hématologique) et l'évaluation des capacités cognitives et symptômes (migraine, latéralisation, échelle de Karnofsky, augmentation de la posologie des corticostéroïdes) n'ont pas révélé de toxicité supplémentaire de l'hypofractionnement par rapport au fractionnement classique (Ohno et *al.* 2019).



### 3.1.3.1.2 Les avancées en radiothérapie externe

#### La fenêtre thérapeutique

Les radiations ionisantes sont non sélectives du tissu tumoral et déposeront leur énergie à la fois le tissu sain et le tissu tumoral. L'objectif est d'obtenir des effets cytotoxiques sur le tissu tumoral tout en préservant un maximum l'intégrité du tissu sain. En d'autres termes, les effets biologiques induits par les radiations ionisantes peuvent notamment générer une modification de la plasticité cérébrale voire l'apparition de radionécroses (Dhermain et Barani, 2016). La fenêtre thérapeutique décrit, pour une dose donnée, les effets cytotoxiques recherchés au tissu tumoral pour le détruire et les effets cytotoxiques indésirables qui surviennent sur le tissu sain. (Reda et *al.* 2020) (**figure 40**).



**Figure 40. La fenêtre thérapeutique en radiothérapie.** Le tissu tumoral est souvent décrit dans la littérature comme plus radiosensible que le tissu sain. L'un des enjeux de la radiothérapie est d'améliorer le contrôle de la tumeur (courbe en bleu) et de réduire les effets délétères possibles (courbe en rouge). La tumeur et les tissus environnants peuvent présenter deux courbes de réponse être plus ou moins proches de l'autre : c'est la fenêtre thérapeutique. Plus la taille de la fenêtre thérapeutique augmente, par ajout d'un radiosensibilisateur par exemple, plus la tumeur est radiosensible et son contrôle simplifié (Reda et *al.* 2020).

L'irrégularité de la topographie de la tumeur peut être un facteur déterminant les doses à appliquer pour détruire le tissu tumoral tout en préservant un maximum l'intégrité du tissu sain. Elle est liée à une impossibilité d'augmentation des doses d'irradiations délivrées en fonction des régions à irradier, ce qui a pour conséquence un manque de contrôle local, induisant inévitablement une reprise tumorale dans le volume cible de la radiothérapie (Gzell et *al.* 2017 et Cabrera et *al.* 2016).

Les innovations en radiothérapie se concentrent sur tous les aspects du traitement, avec des améliorations dans l'immobilisation du patient pour diminuer les imprécisions du dépôt de dose. Mais aussi, elles se concentrent dans l'imagerie et les modalités d'administration du traitement pour mieux délimiter la tumeur et adapter la délivrance des rayonnements à la géométrie de la tumeur. L'objectif principal est donc d'améliorer la fenêtre thérapeutique, la préservation du tissu sain afin de réduire la toxicité potentielle à long terme tout en maintenant son efficacité sur le tissu tumoral (Scaringi et *al.* 2018).

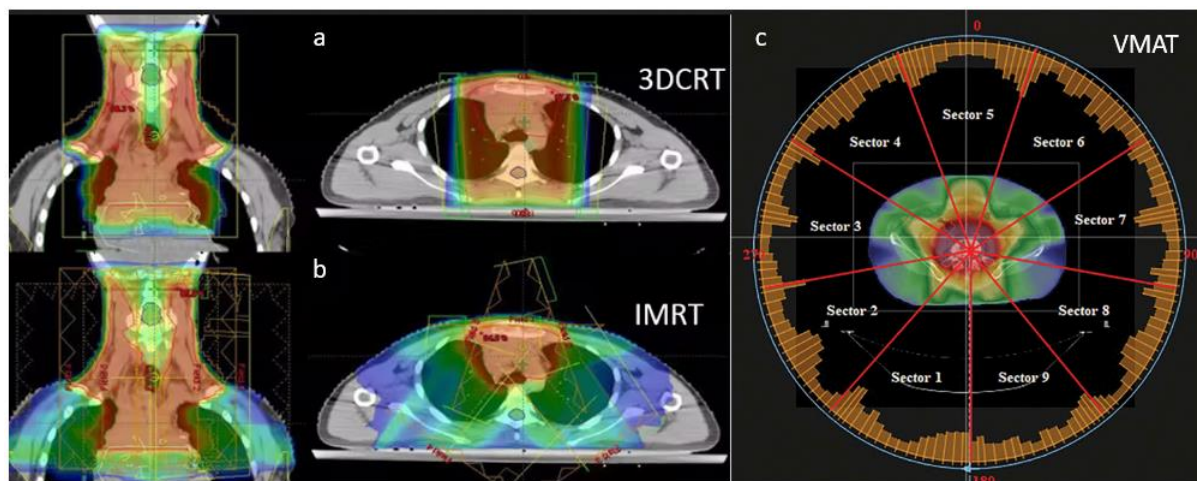
A l'heure actuelle, des dispositifs de délivrance de la radiothérapie externe de haute précision sont actuellement disponibles dans la pratique clinique. Les dispositifs peuvent permettre une visualisation de la tumeur en même temps que la délivrance des rayonnements, une adaptation à la géométrie de la tumeur ou une variation de la dose et du débit.

### La radiothérapie conformationnelle 3D, avec modulation d'intensité et volumétrie

La radiothérapie conformationnelle est la technique de radiothérapie externe la plus répandue à l'heure actuelle. La radiothérapie conformationnelle 3D (3D-CRT) est une technique de radiothérapie qui prend en compte des données volumétriques obtenues par IRM et tomodensitométrie pour définir le volume tumoral à traiter. Un logiciel de planification de la radiothérapie est utilisé pour déterminer les zones de délivrance des faisceaux tout en évaluant les doses à utiliser selon les régions irradiées (Gunderson et Tepper, 2012) (**figure 41a**)

La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT) représente la principale évolution de la 3D-CRT. Les faisceaux sont délivrés de manière dynamique (par pallier, par balayage, etc) sous la forme d'une séquence de nombreux petits faisceaux modulés par un collimateur multilame. Ceci permet à la fois une modulation de la forme des faisceaux et de leur intensité. L'IMRT permet ainsi une meilleure distribution de la dose dans le volume cible avec une délivrance des rayonnements qui est hautement conforme à des volumes concaves et de forme irrégulière (Scaringi et al. 2018) (**figure 41b**).

L'IMRT volumétrique (VMAT) constitue une évolution supplémentaire de la radiothérapie conformationnelle. Le système est muni d'un portique rotatif permettant de délivrer les radiations ionisantes sur tout le tour de la zone à irradier. Le VMAT permet d'obtenir une distribution de dose très conforme à la volumétrie de la tumeur, en modulant l'intensité du faisceau de rayonnement, le débit de dose et la vitesse de rotation du portique. Il permet également de raccourcir la durée du traitement par rapport à l'IMRT classique (Scaringi et al. 2018) (**figure 41c**).

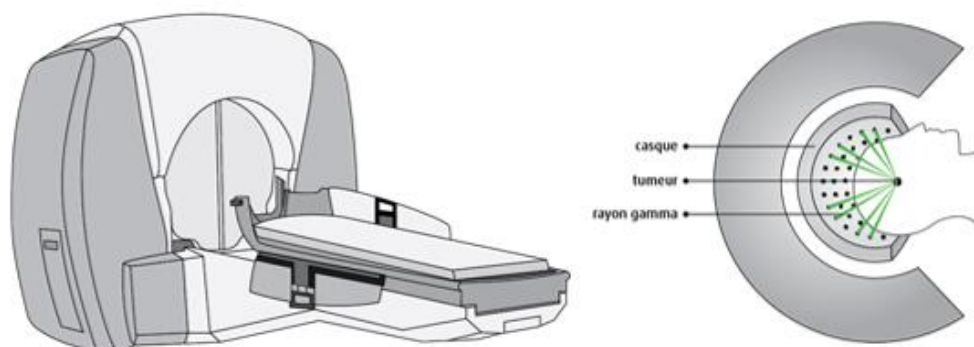


**Figure 41. La radiothérapie conformationnelle 3D (3D-CRT), avec modulation d'intensité (IMRT) et volumétrique (VMAT).** a. La 3D-CRT est une technique de radiothérapie combinant l'imagerie IRM pour la localisation précise de la tumeur et de ses limites dans le but de délivrer des radiations ionisantes adaptées à la géométrie de la tumeur et d'intensité différente selon la zone à irradier. b. L'IMRT est une évolution de la 3D-CRT permettant de moduler la forme des faisceaux d'irradiation et leur intensité. c. La VMAT est une des dernières évolutions de la radiothérapie conformationnelle. Elle se base sur la distribution des radiations ionisantes en fonction de la volumétrie de la tumeur à l'aide d'un portique rotatif (Adapté d'après De Sanctis et al. 2012 et Chen et al. 2020)

### La radiothérapie stéréotaxique

La radiothérapie stéréotaxique est une technique qui consiste à converger plusieurs faisceaux pour irradier fortement une zone avec une grande précision (ordre du millimètre). Le crâne du patient est

immobilisé afin de réduire les imprécisions du dépôt de dose au cours de l'irradiation. Elle permet ainsi de délivrer de fortes doses d'irradiation en une fraction ou bien sur plusieurs fractions (2 à 5) et de réduire le volume de tissu sain irradié. La radiothérapie stéréotaxique ablative SABR est réalisée à la manière d'un acte chirurgical en utilisant des dispositifs particuliers comme le Gammaknife® (Scaringi et al. 2018) (**figure 42**).



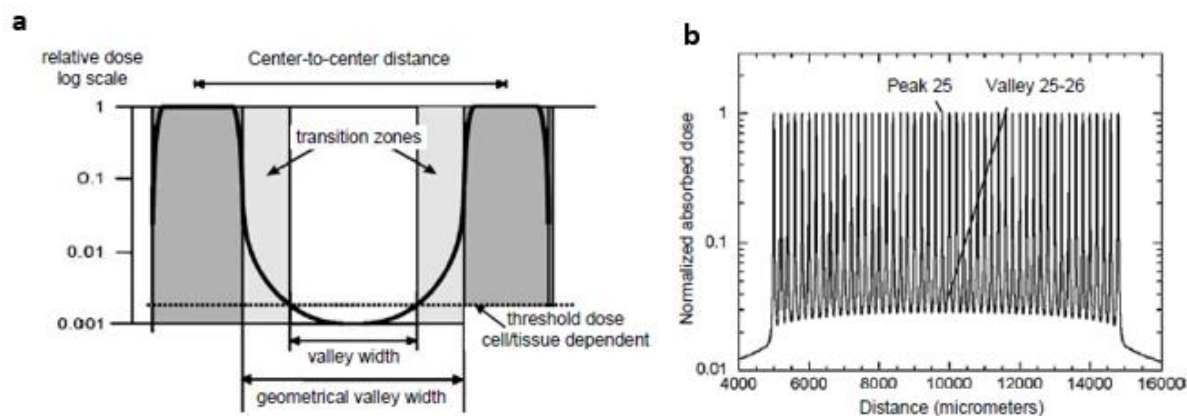
**Figure 42. La radiothérapie stéréotaxique : exemple avec le Gammaknife®.** Le Gammaknife® est un appareil embarquant un imageur permettant de diffuser un grand nombre de faisceaux de photons gamma avec une grande précision. Le patient est immobilisé. (Images obtenues sur le site internet de [la Société canadienne du cancer : https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types/radiation-therapy/external-radiation-therapy](https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types/radiation-therapy/external-radiation-therapy)).

Dans le cadre des tumeurs cérébrales, la radiothérapie stéréotaxique a surtout été envisagée pour les tumeurs cérébrales de petites tailles et les métastases mais a également été testée dans le GBM récidivant lorsque la tumeur n'a pas répondu au protocole standard ou pour des GBM nouvellement diagnostiqués peu étendus (contraste résiduel à l'examen inférieur à 6 cm) (Redmond et Mehta, 2015). La radiothérapie stéréotaxique est notamment étudiée dans des essais cliniques sur le GBM récidivant en association avec différents agents thérapeutiques comme les anticorps monoclonaux (Phase 1/2, 112 patients, NCT02866747, 2016-en cours) ou dans le cadre de l'élimination des cellules résiduelles tumorales post-excérèse dans le GBM nouvellement diagnostiqué (Phase 2, 50 patients, NCT03055208, 2017-en cours).

#### La radiothérapie par microfaisceaux

La radiothérapie par microfaisceaux est un type de radiothérapie externe qui est basé sur le fractionnement spatial d'un faisceau initial généré par un synchrotron au lieu d'un LINAC. Il en résulte un ensemble de microfaisceaux (25 à 50  $\mu\text{m}$ ), espacés et quasi-parallèles (200 à 400  $\mu\text{m}$  par rapport au centre des microfaisceaux). Le fractionnement des microfaisceaux correspond à une succession des zones extrêmement énergétiques, atteignant des doses supérieures à 100 Gy, et de zones de faibles énergies sur une fraction de seconde. Ceci permettrait à la fois une augmentation de l'efficacité de l'irradiation du tissu tumoral et la préservation du tissu cérébral sain. Les études sont cependant encore

expérimentales, réalisées chez la souris pour en étudier les mécanismes tissulaires et cellulaires sous-jacents (Grotzer et al. 2015) (**figure 43**).



**Figure 43. Schématisation d'un réseau de microfaisceaux utilisés en radiothérapie.** a. Lorsque deux microfaisceaux sont créés, il y aura apparition de régions de fortes doses au centre des microfaisceaux. L'intensité va décroître progressivement (zones de transitions) jusqu'à atteindre une dose beaucoup plus faible que le centre des microfaisceaux. b. Dans un réseau entier, les microfaisceaux sont espacés de 200 à 400  $\mu\text{m}$  pour un diamètre de 25  $\mu\text{m}$ . Le dépôt de dose sera plus efficace, adapté à la taille des cellules et plus contrôlé grâce à la succession des zones de forte et de faible dose (D'après Eling et al. 2020)

#### La radiothérapie FLASH

La radiothérapie FLASH est la technique la plus récemment développée. Elle consiste à appliquer une dose d'irradiation concentrée avec un fort débit ( $> 40 \text{ Gy/s}$ ). Ceci permet de réduire le temps d'exposition (90 ms au cours des premiers essais cliniques) des tissus à l'irradiation et a démontré une préservation des tissus sains par rapport à la radiothérapie externe conventionnelle (Lin et al. 2021). La radiothérapie FLASH est encore au stade expérimental chez la souris dans le cas du traitement du GBM (Montay-Gurel et al. 2021), quelques suivis de patients existent pour d'autres cancers comme les patients atteints de métastases aux os (10 patients, NCT04592887, 2020-en cours).

#### 3.1.3.2 La radiothérapie interne

##### 3.1.3.2.1 La curiethérapie

La curiethérapie implique l'utilisation de radioisotopes qui produisent des radiations ionisantes indirectes. La formulation et l'application peuvent varier, pouvant être des sources scellées solides déposées au cours d'un acte chirurgical ou bien peuvent être sous forme liquide injectée par cathéter (Tatter et al. 2003). Après délivrance, lorsque les noyaux instables des radioéléments se décomposent en formes plus stables, des radiations ionisantes de haute énergie sont libérés dans les tissus environnants qui provoqueront des dégâts. La curiethérapie permettrait d'avoir un bon contrôle sur le dépôt de dose à la tumeur tout en limitant les dommages du tissu sain environnant. Il est possible de moduler l'énergie utilisée en fonction de l'isotope (Barbarite et al. 2017). La curiethérapie a fait l'objet de quelques études cliniques de phase 1 et 2 pour le traitement des GBM récidivants comme traitement de première ligne (Phase 1, 20 patients, National Cancer Institute (NCI), NCT00045474, 2003. Phase 2, 40 patients, National Cancer Institute (NCI), NCT00003574, 2004) ou en association avec le protocole de Stupp pour les GBM nouvellement diagnostiqués (Phase 1/2, 3 patients, Methodist Healthcare, NCT00376103, 2006-2008). Des suivis de patients atteints de GBM récidivants traités par curiethérapie sont toujours menés, notamment pour développer la précision de dépôt de la source radioactive

(guidage par imagerie) (He et al. 2020) mais la curithérapie reste un traitement qui n'est pas appliqué en routine.

### 3.1.3.2.2 La radiothérapie vectorisée

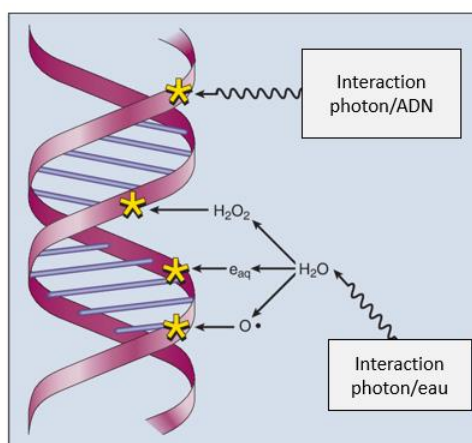
Ce type de radiothérapie interne consiste à placer les radioisotopes dans des vecteurs (liposome, nanocapsules à base de lipides ou à base de metallofullerènes) couplés ou non à des agents de ciblage (anticorps spécifiques du tissu tumoral, peptides affins pour le tissu tumoral. Ils seront injectés par voie intraveineuse ou injectés directement dans la tumeur. L'avantage de ce type de radiothérapie interne serait que la distribution des radioisotopes sera localisée à la tumeur (Bailly et al. 2019). La radiothérapie vectorisée est peu testée dans les essais cliniques sur le GBM, deux études de phase 1 et 2 avaient été menées pour le traitement du GBM récidivant par le ciblage actif de la tumeur et la délivrance d'iode-131 au sein de la masse tumorale sur un total de 51 patients, ce qui en fait encore une méthode d'irradiation expérimentale (Bailly et al. 2019).

## 3.2 LES MECANISMES RADIOBIOLOGIQUES

### 3.2.1 Les dégâts sur les molécules biologiques

#### 3.2.1.1 La radiolyse de l'eau

L'eau est la molécule la plus abondante et est la plus susceptible d'être ionisée. Lors des dépôts d'énergie par les radiations ionisantes, l'ionisation aboutit à une décomposition de la molécule d'eau qui est appelée radiolyse de l'eau. Elle entraîne l'apparition de molécules nommées espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), les radicaux hydroxyles ( $OH^-$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), sont les ROS générés au cours de la radiolyse de l'eau et sont toxiques pour les cellules tumorales et le tissu cérébral sain (**figure 44**) (Kim et al. 2019).



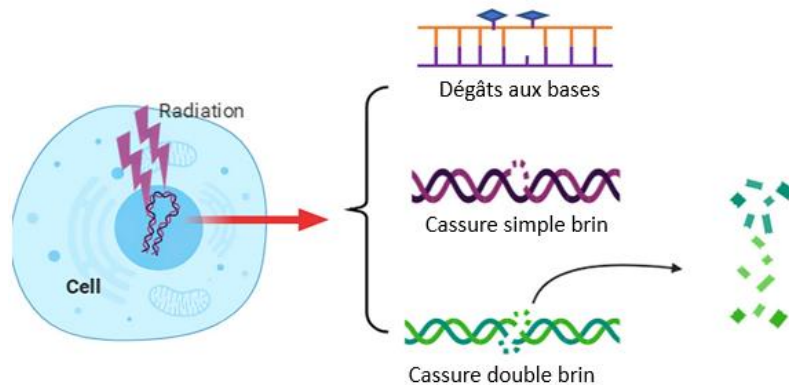
**Figure 44. Schématisation des dégâts à l'ADN par les radiations ionisantes : les dégâts directs et la radiolyse de l'eau** (D'après Zeman et al. 2015)

#### 3.2.1.2 Les dommages à l'ADN

L'ADN est la macromolécule la plus importante au fonctionnement de la cellule, qu'elle soit nucléaire ou mitochondriale. Des dommages à l'ADN causés par les radiations ionisantes de façon directe peuvent entraîner des conséquences délétères pour la cellule (30%) et par des effets indirects (70%), notamment liés aux ROS formés par la radiolyse de l'eau. Les dégâts formés peuvent être des cassures

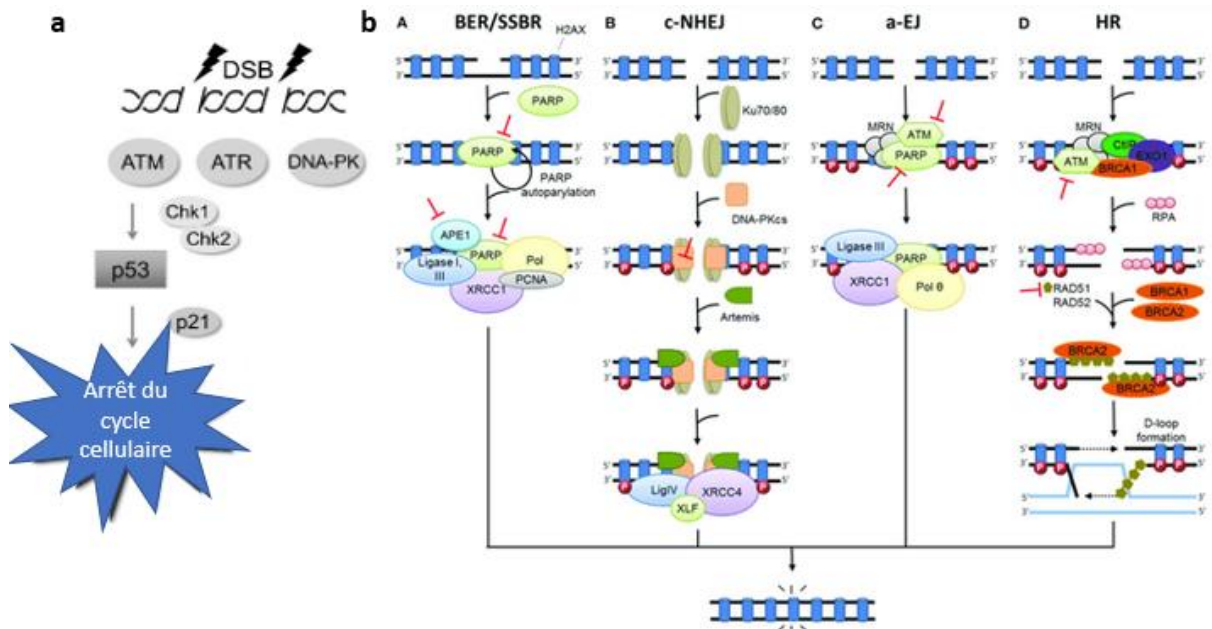


simple brin (SSB), une oxydation des bases, des sites apuriques ou apyrimidiniques (AP) et des cassures double brin (DSB) (**figure 45**).



**Figure 45. Principaux dommages à l'ADN par les radiations ionisantes.** La génération des ROS par les radiations ionisantes et leur action directe peuvent induire des dégâts aux bases telles que des oxydations. Ils peuvent aussi aboutir à des cassures simple brin et double brin. Ces dégâts peuvent être délétères pour la cellule si les mécanismes de réparation de l'ADN ne sont plus en mesure de prendre en charge les réparations. (D'après Huang et Zhou, 2020)

La cellule animale possède des systèmes « checkpoint » détectant les dommages de l'ADN ainsi que des systèmes de réparation propres à chaque type de dommages (Zeman et al. 2015 et Kim et al. 2019) (**figure 46a**). Selon la nature des dommages détectés, la cellule va mettre en place des systèmes de réparation adéquats (**figure 46b**). L'accumulation de dommages mal ou non réparés entraîne une instabilité génomique (Huang et Zhou, 2020).

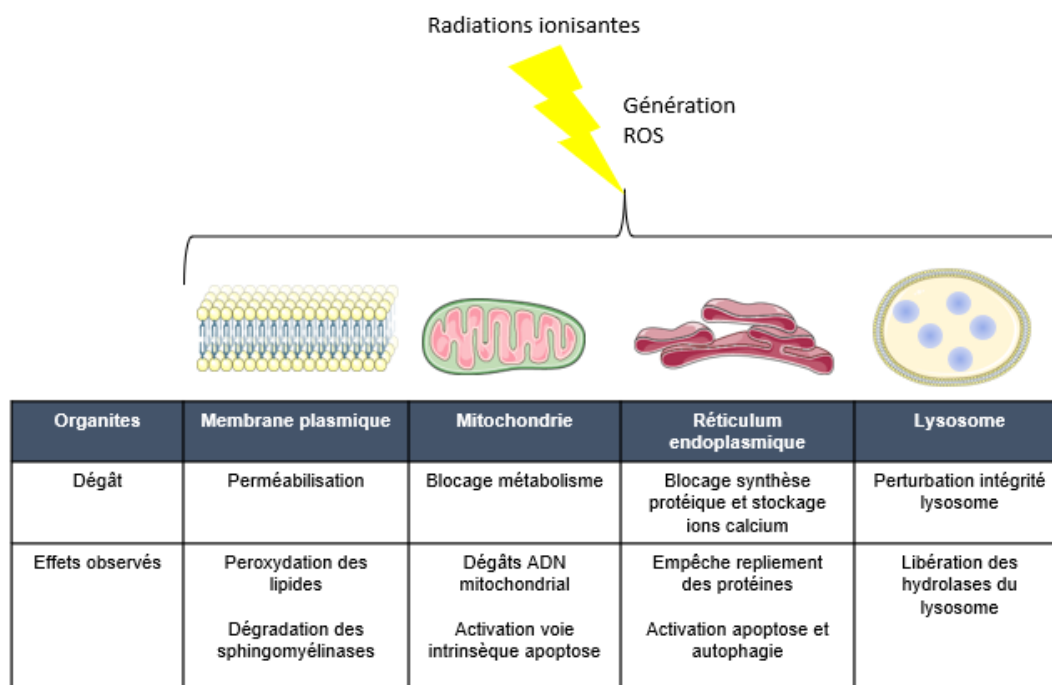


**Figure 46. Exemples de réparation de l'ADN liés aux dégâts de la radiothérapie.** a. Après détection des dommages à l'ADN par différentes protéines (ATM, ATR, DNA-PK, Chk1 et 2), l'activation des protéines p53 et p21 entraîne l'arrêt du cycle cellulaire pour la mise en place des mécanismes de réparation. b. Les quatre principaux systèmes de réparation sont la réparation par excision de base (BER) pour les dégâts simple brin, par jonction des extrémités homologues (NHEJ), par jonction des extrémités (EJ), et recombinaison homologue (HR) (Adapté de Biau et al. 2019 et Kim et al. 2019).



### 3.2.2 Les dégâts sur les membranes biologiques

La stabilité des membranes biologiques est essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire. Les radiations ionisantes ainsi que l'exposition aux ROS générés dans le milieu extracellulaire et intracellulaire vont par exemple entraîner une perturbation de l'intégrité de la membrane plasmique (**figure 47**). Ils peuvent engendrer une peroxydation des lipides, notamment des acides gras polyinsaturés entraînant la formation de dérivés de peroxydes lipidiques comme le 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE). Ils réagissent avec certains groupements chimiques des protéines de la membrane, comme les amines ou les thiols. Les dommages oxydatifs aux phospholipides sont associés à une perméabilisation de la membrane plasmique (Kim et *al.* 2019). Les radiations ionisantes peuvent également modifier l'activité des enzymes cytoplasmiques responsables de l'organisation de la membrane comme les sphingomyélinases. L'activation des sphingomyélinases entraîne une dégradation des sphingolipides, ce qui entraîne une perte de la polarité de la membrane et induit sa déstructuration (Wang et *al.* 2018).



**Figure 47. Principaux effets de la radiothérapie sur les organites.** Les radiations ionisantes et la génération de ROS peuvent provoquer une altération des membranes biologiques, notamment de la membrane plasmique, mais aussi des organites comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le lysosome. Les principaux effets des radiations ionisantes et des ROS sont susceptibles d'engendrer la mort cellulaire quelques soient les atteintes membranaires ou l'organite concerné (Adapté d'après Wang et *al.* 2018, figures obtenues via Medical Servier Art).

### 3.2.3 Les dégâts sur les organites

#### 3.2.3.1 La mitochondrie

Les mitochondries fournissent l'énergie nécessaire au maintien de l'intégrité et des fonctions cellulaires, comme le métabolisme cellulaire ou encore l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose. Les systèmes de réparation de l'ADN mitochondrial peuvent être saturé par l'accumulation de dommages à l'ADN, par la génération excessive de ROS ou l'action directe des radiations ionisantes. Une instabilité

génomique mitochondriale peut mener à une activation de la voie intrinsèque de l'apoptose par libération du cytochrome C (Averbeck et Rodriguez-Lafrasse, 2021) (**figure 48**)

### 3.2.3.2 Le réticulum endoplasmique

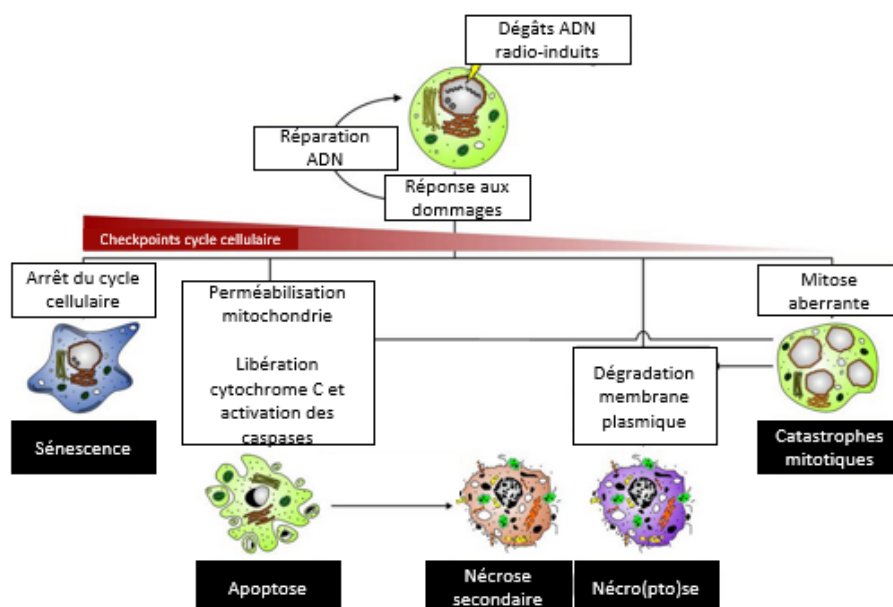
Le réticulum endoplasmique est responsable de la synthèse et des modifications des protéines membranaires et du stockage des ions calcium. Les ROS intracellulaires et les radiations ionisantes peuvent perturber le fonctionnement du processus de modifications post-traductionnelles, comme le repliement des protéines, et entraîner la formation de protéines inadéquates pour les membranes. Le réticulum endoplasmique peut également avoir un contrôle sur le déclenchement de certaines voies de mort cellulaire comme l'autophagie ou l'apoptose (Wang et al. 2018 et Kim et al. 2019) (**figure 48**).

### 3.2.3.3 Le lysosome

Les lysosomes permettent de dégrader les diverses macromolécules biologiques dans l'organisme grâce à l'action de diverses hydrolases. Si la membrane lysosomale est endommagée par les radiations ionisantes et les ROS intracellulaires, les diverses hydrolases du lysosome s'accumulent dans le cytoplasme ce qui peut entraîner une destruction de la cellule (Wang et al. 2018) (**figure 48**).

### 3.2.4 La mortalité cellulaire radio-induite.

La mortalité cellulaire est un processus physiologique contrôlé visant à maintenir l'homéostasie



cellulaire, que ce soit en condition normale ou pathologique. Elle peut également être accidentelle, déclenchée par un stress extérieur (mécanique, physique, chimique). En radiobiologie, l'étude de la mortalité cellulaire est un enjeu crucial (**figure 48**).

**Figure 48. Les différents types de mort cellulaire radio-induites.** Lorsque l'accumulation des dégâts dans la cellule deviennent trop importants, la cellule peut activer différents mécanismes de mortalité cellulaire. Certains de ces mécanismes dépendront de l'activation des checkpoints induisant un arrêt du cycle cellulaire (sénescence) et peut aussi dépendre des dégâts aux organites comme la perméabilisation de la mitochondrie (apoptose). La mortalité cellulaire peut être brutale par perméabilisation de la membrane plasmique (nécrose) ou bien retardée ce qui se traduit par des mitoses aberrantes (catastrophes mitotiques) (Adapté de Lauber et al. 2012)

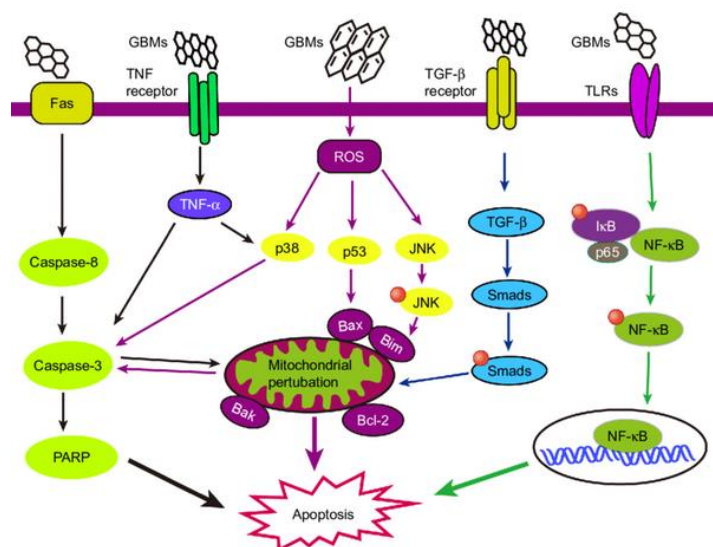
#### 3.2.4.1 Les catastrophes mitotiques

Le dysfonctionnement des points de contrôle du cycle cellulaire post-irradiation, notamment des altérations des protéines *checkpoint* du stade G2 et de la mise en place du fuseau mitotique pour la division cellulaire peut faire entrer prématurément les cellules cancéreuses irradiées en mitose. Ceci contribue à l'apparition de catastrophes mitotiques (Wilson et Bedford, 2010). La catastrophe mitotique résulte de mitoses aberrantes, pouvant produire des cellules aneuploïdes géantes et multinucléées qui restent métaboliquement actives. En effet, le contrôle de la division cellulaire n'est plus en place et ne permet plus de limiter la division anormale des cellules dont l'ADN et les chromosomes sont endommagés par la radiothérapie (Wilson et Bedford, 2010). La catastrophe mitotique ne représenterait pas une forme de mort cellulaire en tant que telle. La cellule cancéreuse irradiée peut ensuite entrer en mort cellulaire programmée appelée mort mitotique (apoptose tardive et généralement intrinsèque) ou bien ne proliférera plus et restera métaboliquement active (sénescence) (Sia et al. 2020).

Les études sur la mort mitotique dans le GBM ont démontré que la radiothérapie est capable d'enclencher la mort mitotique des cellules de GBM (5 Gy, 10% et 15% après 72h et 96h respectivement) et serait corrélée à un retardement de la croissance tumorale *in vivo* de 35 jours (Gordon et al. 2015). L'induction de catastrophes mitotiques dans les cellules de GBM irradiées pourrait également concerner les cellules présentant un potentiel souche. Firat et al. ont montré sur des cultures de cellules de GBM issus de patients, présentant un potentiel souche, que l'irradiation à base de rayons  $\gamma$  à une dose de 5 et 10 Gy induisait une entrée en apoptose de certaines des populations souches isolées après quatre jours post-irradiation. Ces cellules étaient caractérisées par un arrêt du cycle cellulaire au stade G2/M. De plus, les cellules exprimant le marqueur souche CD133 proliféraient plus vite, avec une augmentation du pourcentage de cellules présentant des noyaux fragmentés par rapport aux cellules ne l'exprimant pas (Firat et al. 2011).

#### 3.2.4.2 L'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire contrôlée qui peut être déclenchée selon différentes voies (**figure 49**). Dans de nombreuses publications, les cellules de GBM possèdent une radiorésistance caractérisée par une faible entrée des cellules dans un programme de mort cellulaire programmée. L'entrée en apoptose précoce serait, par exemple, relativement limitée dans les cellules T98G irradiée à une dose de 10 Gy (environ 1% 24h post-irradiation et environ 3% après 72h). Murad et al. expliqueraient ce résultat par l'augmentation du nombre de cellules arrêtées au stade G2/M du cycle cellulaire (multiplié par deux après 24h), une des phases du cycle caractérisée par une possibilité de mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN (Murad et al. 2018). De plus, les auteurs de cette recherche ont constaté que la quantité totale de cellules apoptotiques à 72h est de 40% mais que cette quantité pouvait varier selon la lignée cellulaire et la dose d'irradiation utilisée. Dans l'une des études qu'ils citent, les cellules U251 irradiées à 7 Gy présentant une apoptose représentent 16% de l'ensemble de la mort cellulaire relevée (Murad et al. 2018).



**Figure 49. Les voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite dans les cellules de glioblastome.** L'apoptose est une forme de mort cellulaire contrôlée qui peut être déclenchée par voies extrinsèques et intrinsèques. Les voies intrinsèques peuvent être induites par les voies mitochondriales et de signalisation liées aux MAPK et au TGF- $\beta$ . Ces voies sont activées lorsque les mécanismes de réparation de l'ADN sont dérégulés. Un des acteurs centraux, p53, va stopper la cellule dans son cycle et il y aura un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques. La libération du cytochrome c depuis la mitochondrie va activer la caspase 3, spécifique de la voie intrinsèque, et activera d'autres molécules pro-apoptotiques comme PARP et Bcl-2. La voie extrinsèque est initiée par une signalisation externe liée aux récepteurs de mort (Fas, TNF, TGF- $\beta$ , TLR). Ceci va entraîner l'activation en aval de la caspase 8, Smad, NF- $\kappa$ B qui à leur tour activeront des facteurs pro-apoptotiques, perméabiliseront la mitochondrie et joueront le rôle de facteur de transcription respectivement (D'après Sia et al. 2020 et Ou et al. 2017).

#### 3.2.4.3 La sénescence

La sénescence est caractérisée par un arrêt permanent du cycle cellulaire. Cependant, les cellules sont encore viables et actives sur le plan métabolique, notamment par l'augmentation de l'activité bêta-galactosidase. Le développement d'un phénotype sénescence par les cellules post-irradiation est caractérisé par la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines permettant le maintien de la cellule en sénescence (Sia et al. 2020). Par ailleurs, Jeon et al. ont démontré *in vivo* que des xénogreffes chez la souris de cellules U87 ou Ln229 pré-irradiées à 20 Gy, présentant des caractéristiques de la sénescence, formaient une masse tumorale dont la croissance était quatre fois plus élevée que les xénogreffes de cellules U87 et Ln229 non irradiées (Jeon et al. 2016). Putavet et De Keizer ont récemment décrit la sénescence radio-induite dans le cas des cellules résiduelles péricitumorales de GBM, ce qui pourrait indiquer que la sénescence contribuerait au maintien de l'extension tumorale post-irradiation (Putavet et de Keizer, 2021).

#### 3.2.4.4 La nécrose

La nécrose est une forme non régulée et chaotique de la mort cellulaire, déclenchée par des conditions défavorables telles que des changements extrêmes de pH, les ROS, le déséquilibre métabolique et le déséquilibre ionique au sein de la cellule et de son microenvironnement. La nécrose causée par les radiations ionisantes sont communes dans le GBM (4 à 25% des cas). Le mécanisme exact n'est pas connu mais pourrait mettre en jeu l'activation des protéines membranaires RIP1 et 3 par les cathépsines B et D (complexe I). Ils permettraient la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ .

RIP1 cytosolique pourrait également se lier au récepteur TNFR auquel se lie caspase 8 et FADD (complexe IIb). Ces deux complexes activent le processus de nécrose (Das et *al.* 2015).

### 3.3 LES EFFETS DE LA RADIOTHERAPIE SUR LE CARACTERE INFILTRANT DES CELLULES DE GLIOBLASTOME

Les suivis PET et IRM des GBM après radiochimiothérapie démontrent systématiquement une infiltration des cellules tumorales dans les zones irradiées, au niveau de la masse tumorale et sa périphérie mais aussi dans les marges prises en compte pour l'extension de la tumeur et pour les imprécisions de dépôt de dose (Piroth et *al.* 2016). Les travaux *in vitro* et *in vivo* de Wild-Bode et *al.* ont constaté que les rayons X renforcent le caractère invasif des cellules U87 et Ln229 de GBM (Wild-Bode et *al.* 2001). Moncharmont et *al.*, Falk et *al.* et Wank et *al.* ont compilé un ensemble de données *in vitro* sur des lignées de GBM. Dans la majorité des cas, l'irradiation ayant pour source les rayons X induisait une augmentation de la migration et/ou de l'invasion quelle que soit la dose utilisée. Les phénomènes de récurrence qui se produisent pourraient alors être partiellement favorisés par une augmentation des propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses ayant survécu aux radiations ionisantes (Moncharmont et *al.* 2014, Falk et *al.* 2014, Wank et *al.* 2018).

#### 3.3.1 Influence de la radiothérapie sur la motilité des cellules

##### 3.3.1.1 Altération du déplacement des cellules irradiées

L'altération du déplacement des cellules de GBM irradiées a été mise en évidence *in vitro* par des expérimentations impliquant l'utilisation de chambre *transwell* permettant de quantifier la proportion de cellules migrant individuellement. Steinle et *al.* avaient démontré que l'irradiation à base de rayons X des cellules U87 à une dose de 2 Gy induit une augmentation de la proportion de cellules irradiées migrant à travers les pores d'une chambre *transwell* dès deux heures post-irradiation par rapport aux cellules non traitées (Steinle et *al.* 2011). Zhai et *al.* avaient également constaté une augmentation de la migration des cellules GM2 et UN3 irradiées à une dose de 6 Gy dans des chambres *transwell* sur une période de 2h post-irradiation (Zhai et *al.* 2006).

Cependant, les effets de la radiothérapie pourraient dépendre de la dose d'irradiation ainsi que de la source utilisée. Liu et *al.* ont observé dans des tests de migration en chambre *transwell* que l'irradiation aux rayons X des cellules C6 augmente de manière dose la migration (+30% 2 Gy, +50% 4 Gy et +70% 6 Gy par rapport aux cellules témoins). En comparaison, une irradiation ayant pour source des ions carbonés diminue légèrement la migration des cellules C6 (-10% 2 et 4 Gy par rapport aux cellules témoins, aucun effet à 8 Gy) (Liu et *al.* 2014).

Pour expliquer de tels impacts sur la motilité, il faut s'intéresser aux propriétés de la cellule associées au déplacement cellulaire, c'est-à-dire sa morphologie, ses propriétés biomécaniques et la signalisation moléculaire.

##### 3.3.1.2 Les modifications phénotypiques radio-induites

Dans les tumeurs primaires, l'induction de la TEM entraîne des modifications structurelles pour la progression des cellules, c'est pourquoi certaines recherches se sont intéressées aux impacts de la radiothérapie sur les acteurs de la TEM dans les cellules cancéreuses. Dans de nombreux cancers

notamment le cancer colorectal, l'expression des gènes codant les marqueurs de la TEM est modulée après l'irradiation. L'irradiation à 5 Gy de cellules CaR1 et DLD1 induit une diminution de l'expression en ARNm de l'E-cadhérine (environ 50%) et une augmentation de l'expression en ARNm de la vimentine (facteur 1,5) et des facteurs de transcription Snail, Slug (entre 1,1 et 1,4 fois pour Snail et 3,5 et 4,5 fois pour Slug) qui sont associées à une augmentation de la migration collective 2D (Kawamoto et *al.* 2012).

Dans le cas des gliomes, Meng et *al.* ont évalué les signatures génomiques liées à la TEM sur des tumeurs de patients irradiées de manière conventionnelle. Pour cela, ils ont réalisé une analyse d'enrichissement des gènes à partir des données de 463 patients atteints de GBM de la TCGA. Cette méthode informatique qui évalue les changements d'expression coordonnés pour une voie spécifique, ici la TEM. Parmi les 31 gènes évalués, 8 gènes (ACTN1, CCND1, HCLS1, ITGB5, PFN2, PTPRC, RAB13 et WAS) correspondaient à des molécules du cytosquelette et à des molécules liées aux adhésions exprimées *via* les voies de signalisation des intégrines. Le profil des tumeurs radiorésistantes correspondrait alors à des cellules avec des caractéristiques mésenchymateuses (Meng et *al.* 2014).

### 3.3.1.3 Les modifications biomécaniques radio-induites

Compte tenu des effets de la radiothérapie sur la migration et la TEM, de nombreuses études se sont intéressées aux effets sur le cytosquelette. Dans une récente revue de la littérature rédigée par Panzetta et *al.*, les auteurs ont mis en évidence des effets sur le réseau d'actine associés à l'altération de la migration des cellules cancéreuses (Panzetta et *al.* 2020). 20 jours après irradiation à 3 et 5 Gy des cellules de la lignée cellulaire Mel270, une lignée cellulaire de mélanome uvéal, et BLM, une lignée cellulaire qui provient de métastases d'un mélanome cutané, la migration individuelle des cellules Mel270 est inchangée mais celle des cellules BLM est diminuée. La perte des capacités migratoires des cellules BLM irradiées serait associée à une augmentation du diamètre des fibres d'actines à la périphérie de la cellule mais réduit la quantité de fibres de stress ayant pour conséquence une augmentation de l'élasticité (module de Young 3 fois plus faible par rapport aux cellules Mel270) (Jasinska-Konior et *al.* 2019).

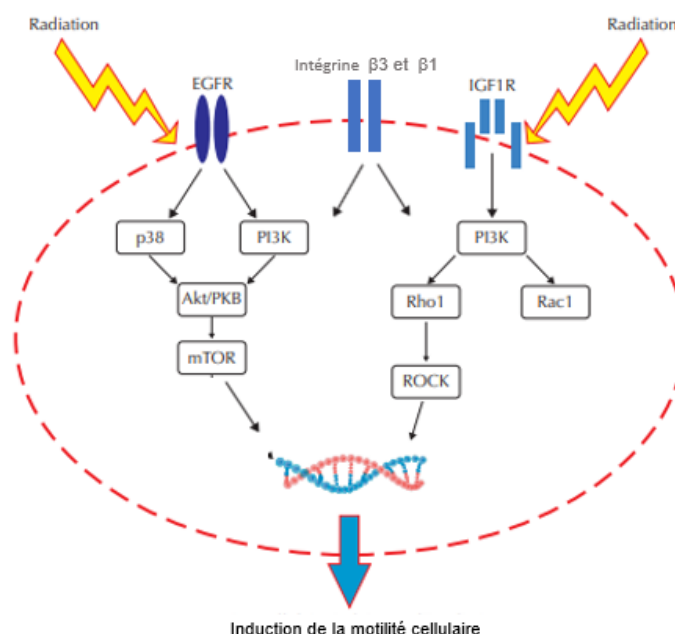
Les données sur l'organisation du cytosquelette d'actine et de la migration des cellules de GBM irradiées sont encore floues et peuvent apparaître très variables selon la lignée cellulaire étudiée voire même en fonction de l'étude. Dans l'étude de Memmel et *al.* sur les cellules de GBM DK-MG (propriétés invasives moins fortes que les lignées U87 et U251) et SG-19 (lignée proche des cellules U251), une irradiation à 2 Gy renforçait la migration collective des deux lignées mais n'affectait pas l'organisation et la constitution du cytosquelette d'actine (Mommel et *al.* 2017). Dans les travaux d'Hohmann et *al.*, les observations du cytosquelette d'actine en microscopie confocale de fluorescence ont mis en évidence que l'irradiation à 2 Gy augmentait la densité globale du cytosquelette d'actine des cellules U87. L'étude de ces auteurs corrélait ainsi la polymérisation du cytosquelette d'actine au renforcement de la motilité (Hohmann et *al.* 2017). Cependant, ils ont également observé que l'irradiation à 2 Gy diminuait la vitesse de migration individuelle des cellules LN229 et perturbait l'organisation des filaments d'actine, ce qui indiquerait que les effets de l'irradiation sur le cytosquelette pourrait être lignée dépendante (Hohmann et *al.* 2017).



La réorganisation du cytosquelette post-irradiation pourrait également se répercuter sur les prolongements cellulaires. Whitehead et *al.* ont constaté qu'après une irradiation à 2 Gy, le cytosquelette des cellules de GBM de la lignée LN229 se réorganisait pour la formation d'invadopodes observés en microscopie de fluorescence (Whitehead et *al.* 2018). L'irradiation peut également avoir un impact sur les points d'accroche des cellules de GBM. Les sous-unités  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  apparaissent surexprimées dans les cellules de GBM U87 et Ln229 et leur expression est augmentée après irradiation à 2 Gy, 5 Gy et 10 Gy et est corrélée à une augmentation de la migration des cellules U87 (facteur 3 pour des coatings à la vitronectine et une irradiation à 2 Gy) (Rieken et *al.* 2011). La promotion de la propagation des cellules de GBM par la radiothérapie pourrait être déclenchée par la potentialisation des points d'ancrage des cellules de GBM. Nguemgo Kouam et *al.* se sont intéressés à la modulation de l'expression des points focaux d'adhérence dans les cellules de GBM U87 et U373 irradiées mais aussi des cellules endothéliales HUVEC irradiées. La co-culture des cellules de GBM aux HUVEC augmentait de 20 à 40% après une irradiation à 4 Gy. Elle était associée à une augmentation de l'expression protéique des points focaux ( $\alpha_4$ , intégrine  $\alpha_5$ , intégrine  $\beta_1$ , phospho-FAK-Y925, phospho-FAK-Y397 et paxilline) dans les cellules HUVEC entre 25% et 200% à 4 Gy 4h post-irradiation et en moyenne de 20% dans les cellules de GBM. Ainsi, l'irradiation pourrait faciliter la traction des cellules de GBM le long des vaisseaux sanguins (Nguemgo Kouam et *al.* 2019).

#### 3.3.1.4 Les modulations de la signalisation liée à la motilité

Les principales voies de signalisation étudiées dans le cadre de la radiothérapie et de la motilité sont celles permettant la mise en place de la polarité cellulaire, de l'adhésion et de la polymérisation du cytosquelette (figure 50).



**Figure 50. Principales voies de signalisation inductrices de la motilité cellulaire post-irradiation.** L'irradiation des cellules de GBM peut impacter des voies de signalisation associées à différents récepteurs permettant l'activation des voies PI3K/Rho1/Rac1 et ROCK mais aussi p38/PI3K/Akt/mTor. Ces voies permettront la polarisation des cellules, l'induction des points focaux et la polymérisation du cytosquelette (Adapté de Memmel et al. 2011, Falk et al. 2014).

### 3.3.2 Impact de la radiothérapie sur les capacités invasives des cellules de glioblastome

L'évaluation des capacités invasives des cellules irradiées de GBM en chambre *transwell* recouverte de *coating* (Matrigel®, fibronectine, etc) est le test standard déployé dans les études réalisées. Wank et *al.* ont démontré que l'irradiation (rayons X) à une dose de 4 Gy augmente l'invasion des cellules U87 et LN229 (50% par rapport au témoin non irradié), mais aussi pour quatre lignées sur sept de cellules de GBM issues de patients (Wank et *al.* 2018). De manière similaire aux données rapportées sur la motilité des cellules de GBM irradiées, l'altération des capacités invasives des cellules de GBM dépendraient de la source d'irradiation et de la lignée étudiée. Dans la même étude, l'irradiation à 4 Gy des cellules de la lignée LN18 induit une diminution de leur capacité invasive d'environ 40%. L'irradiation dont la source provient des particules  $\alpha$  de plus fortes énergies, n'induit pas d'augmentation de l'invasion pour l'ensemble des lignées *in vitro* et issues de patients étudiées (Wank et *al.* 2018).

#### 3.3.2.1 L'activité protéolytique dans les cellules de glioblastome irradiées

Le remodelage de la MECc est une des composantes fondamentales dans l'infiltration des cellules de GBM, c'est pourquoi la dégradation et la modification de sa constitution par la radiothérapie a fait l'objet d'études. Dans le cas des cellules de gliomes, une des premières études sur l'impact de la radiothérapie sur la migration et l'invasion a montré que la radiothérapie à 1 et 3 Gy ne réduisait pas le volume tumoral de xénogreffes cellules 9L chez la souris. Les analyses histologiques des coupes des xénogreffes révélaient également une augmentation de la détection de la MMP2 à 1 et 3 Gy, ce qui suggère que la radiothérapie renforcerait l'activité protéolytique des cellules de GBM (Wild-Bode et *al.* 2001). Zhou et *al.* ont démontré sur cent échantillons de patients que l'expression positive MMP9 et 2 détectée en immunohistochimie serait de mauvais pronostic par rapport aux tumeurs négatives pour MMP9 et 2 (survie sans progression diminuée de 40 mois et 75 mois respectivement). De plus, l'augmentation de l'expression de MMP9 et MMP2 était également significativement corrélée au grade ( $p < 5 \times 10^{-9}$ , corrélation de Spearman) mais aussi à la récurrence ( $p = 4,629 \times 10^{-7}$ , test de Mc Nemar), ce qui pourrait expliquer l'agressivité et la reprise tumorale du GBM (Zhou et *al.* 2019). De plus, les analyses de la survie sans progression ont montré que les patients atteints de GBM présentant une forte expression de MMP14 avaient un pronostic significativement plus défavorable que ceux présentant une faible expression de MMP14 (Zhou et *al.* 2021). L'augmentation de l'activité des MMP soulignerait alors le caractère invasif renforcé des cellules irradiées de GBM.

#### 3.3.2.2 Remaniement de la MEC tumorale post-irradiation

Yoo et *al.* ont cherché à comprendre comment l'irradiation affectait la capacité des cellules de GBM à remanier la composition de la MEC environnante et son impact sur l'invasion. Pour cela, ils ont mis en culture des cellules U87 irradiées à une dose journalière 2 Gy pendant trois jours ou non dans une matrice à base de collagène. Après élimination des cellules dans la MEC, des cellules U87 non traitées ont étéensemencées dans ces matrices conditionnées et révélées grâce à une coloration hématoxyline/éosine (HE). Les colorations HE ont révélé qu'une proportion 2,5 fois plus importante de cellules U87 ont envahi la MEC conditionnée par les cellules irradiées que dans la MEC conditionnées

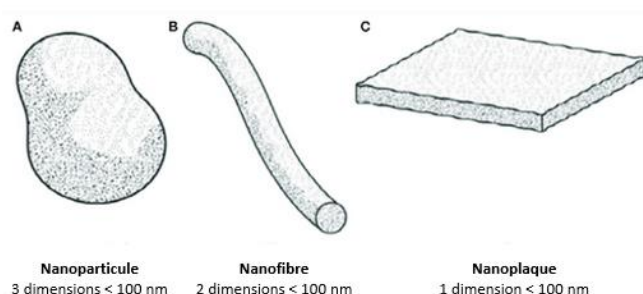
par des cellules non-traitées (Yoo et *al.* 2018). Ainsi, la MECc tumorale modifiée par les cellules irradiées serait un facteur de l'invasion. De manière indirecte, l'irradiation pourrait également influencer la migration des cellules de GBM le long des vaisseaux sanguins par l'induction de la sécrétion en collagène I et en fibronectine par les cellules endothéliales (Andrews et *al.* 2018). Les radiations ionisantes auraient donc des effets multiples sur la composition de la MEC à la fois dans le tissu tumoral, dans le cerveau sain et au niveau de la paroi des vaisseaux.

## 4 PARTIE IV : LES NANOPARTICULES D'OR ET LEUR POTENTIEL ANTI-INVASIF SUR LES GLIOBLASTOMES

### 4.1 LES NANOPARTICULES : UTILISATION EN CANCEROLOGIE

#### 4.1.1 Définition des nanoparticules

Les nanoparticules sont définies par les normes établies par l'Organisation Internationale de normalisation (ISO) dans le domaine des Nanotechnologies. La norme ISO/TS 27687 : 2008 (révisée en 2015 avec la norme ISO/TS 80004-2 : 2015) donne la liste des terminologies et définitions relatives aux nano-objets (nanoparticules, nanofibres et nanoplaque). Les nanoparticules sont des particules dont chaque dimension est comprise entre 1 et 100 nm (**figure 551**).



**Figure 551. Les différents nano-objets.** Les nano-objets sont désignés selon la forme adoptée en fonction de la taille d'une, deux ou trois dimensions. (A) Nanoparticule, (B) Nanofibre (C) Nanoplaque (Adapté d'après les représentations schématisées de la norme ISO 80004-2:20015).

Elles peuvent adopter différentes formes (sphère, bâtonnet, etc) et organisations (particule primaire (isolée), en agglomérat, en agrégat) être élaborées à partir de différents matériaux (lipides, métaux, etc) et présenter des caractéristiques de surface uniques pouvant exercer une influence majeure sur leurs principales propriétés à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules ont un rapport surface / volume élevé, ce qui fait qu'elles possèdent une grande réactivité au niveau physicochimique. Les propriétés des matériaux utilisés pour la confection des nanoparticules (thermique, optique, etc) ont permis aux chercheurs de les envisager pour des utilisations en thérapie, appelée nanomédecine (Lemaire et *al.* 2017).

#### 4.1.2 Développement des nanoparticules en cancérologie

##### 4.1.2.1 Nanomédecine et cancérologie

Les nanoparticules peuvent être utilisées en nanomédecine dans quatre domaines différents : le diagnostic, la délivrance de médicaments, les applications théranostiques, et la médecine régénérative. Elles sont utilisées afin de répondre à des limites thérapeutiques (transport de médicaments à la toxicité élevée, transport à travers les membranes biologiques) ou bien en améliorant le bénéfice thérapeutique (réduire la dose, augmenter la biodisponibilité, libération contrôlée et spécifique) (Soares et *al.* 2018).

Dans le traitement du cancer, les premières nanoparticules élaborées étaient des nanoparticules organiques, des liposomes. Ils ont été développés dans le cadre de la nanovectorisation de médicaments, ou *drug delivery*, permettant dans ce cas de figure d'immobiliser des molécules de chimiothérapie pour faciliter leur acheminement vers la tumeur. Aujourd'hui, ce sont plusieurs dizaines de nanoparticules qui ont été approuvées par la Food and Drugs Administration (FDA) et l'Union

Européenne ou qui sont encore en essais cliniques de phase I et II/III (liposomes, micelles, albumine, polymères, silice, oxydes métalliques, métaux) (Shi et *al.* 2017).

#### 4.1.2.2 Principales propriétés pour l'utilisation des nanoparticules en cancérologie

##### 4.1.2.2.1 Distribution passive des nanoparticules dans le tissu tumoral

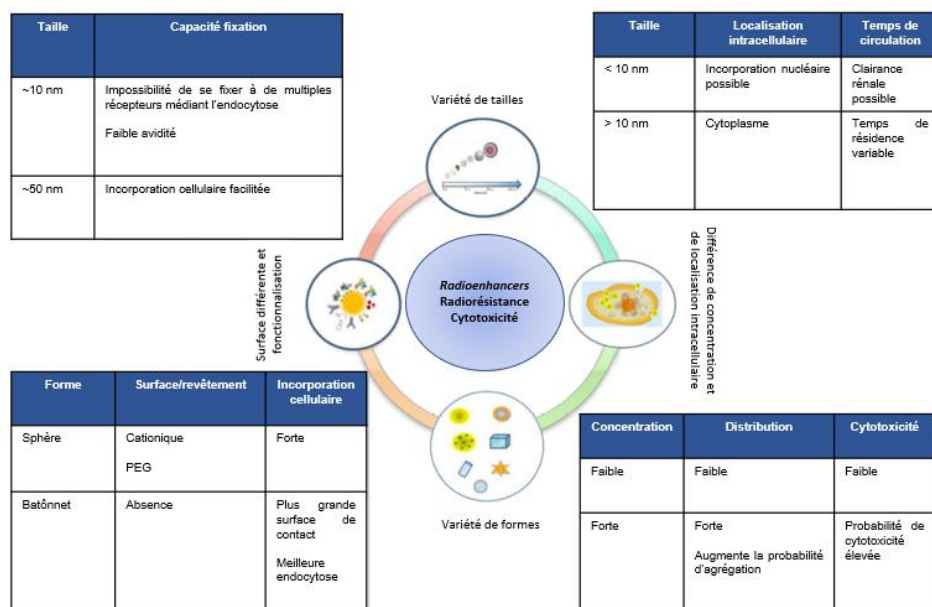
Contrairement aux molécules des médicaments qui traversent l'ensemble des tissus, l'accumulation des nanoparticules dans les tissus est dépendante de la circulation sanguine. En effet, les nanoparticules ne peuvent pas franchir la barrière formée par les jonctions serrées des cellules endothéliales à cause de leur taille. Cette propriété est intéressante dans le cas du tissu tumoral dont le réseau vasculaire est désorganisé, avec un endothélium fenestré (Wolfram et Ferrari, 2019). En outre, l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) est caractérisé par une accumulation accrue de nano-objets, dont les nanoparticules, dans le tissu tumoral. Le réseau vasculaire tumoral présente une couverture réduite de péricytes et moins de jonctions serrées endothéliales, ce qui entraîne des lacunes dans la paroi des vaisseaux et le passage des nanoparticules. De plus, le manque de vaisseaux lymphatiques fonctionnels, les schémas de circulation sanguine anormaux dans le tissu tumoral et des dépôts de MEC dans le réseau tumoral pourrait expliquer la rétention accrue des nanoparticules dans le tissu tumoral (Wolfram et Ferrari, 2019). Cependant, il se pourrait que l'importance de l'effet EPR soit hétérogène selon le patient (angiogénèse, perfusion de la tumeur, inflammation) voire du type de tumeur (Natfji et *al.* 2017).

En plus de l'effet EPR, certains auteurs se sont intéressés aux flux hémodynamiques du tissu tumoral. La vitesse de circulation du sang par rapport au diamètre des vaisseaux sanguins est plus lente dans le cas des vaisseaux tumoraux par rapport aux vaisseaux sains. La forme et la taille des nanoparticules aurait un impact sur le temps rétention des nanoparticules et pour permettre une adhésion des nanoparticules au niveau de la paroi. Plus la particule est de grande taille et s'éloigne d'une forme sphérique (bâtonnet et discoïde), plus elle serait susceptible d'adhérer à l'endothélium tumoral (Kolhar et *al.* 2013 et Mi et *al.* 2016) (**figure 52**).

##### 4.1.2.2.2 Ciblage actif en cancérologie

Le ciblage actif repose sur la conjugaison de ligands à la surface des nanoparticules qui se lieront à des protéines membranaires ou des récepteurs surexprimés à la surface des vaisseaux sanguins tumoraux ou des cellules cancéreuses. Cette stratégie permet de concevoir des vecteurs médicamenteux qui reconnaissent des biomarqueurs associés à des pathologies spécifiques (Wolfram et Ferrari, 2019). S'il existe des études cliniques testant des nanoparticules dont l'utilisation comprend un ciblage actif, il n'y a pas encore d'autorisation de mise sur le marché pour ce type de nanoparticules (Rosenblum et *al.* 2018 et Wolfram et Ferrari, 2019). Plusieurs raisons pourraient expliquer certains échecs du ciblage actif, notamment la détection des ligands comme du non-soi par le système immunitaire et une clairance accrue en raison de la présence de ligands de surface. De plus, les molécules de ciblage augmentent la taille des nanoparticules, ce qui pourrait entraîner une diminution de la pénétration intratumorale. Enfin, les liaisons de forte affinité des ligands de surface des nanoparticules à leur cible entraîneraient

une accumulation locale des nanoparticules sur des sites particuliers, ce qui pourrait limiter une diffusion homogène des nanoparticules dans le tissu tumoral (Wolfram et Ferrari, 2019).



**Figure 52. Importance du design des nanoparticules.** La taille, la forme et la concentration des nanoparticules vont dicter leur internalisation, leur localisation, leur élimination et leur cytotoxicité (Adapté d'après Tremi et al. 2021).

#### 4.1.2.2.3 Surface chimique des nanoparticules

Les nanoparticules présentent deux avantages intrinsèques liés à leur composition : un rapport surface/volume élevé et une chimie de surface abondante. Ces propriétés permettent entre autres adsorption physique de nombreux ligands de surface dans le cas du ciblage mais aussi de nombreuses interactions électrostatiques avec son environnement (Liu et al. 2020). En effet, les nanoparticules sont capables d'interagir avec les membranes biologiques et leur charge de surface influencera leur internalisation dans les cellules et leur localisation dans les organites. Par exemple, Wang et al. avaient démontré sur une série de nanoparticules à base de polymères associés à des lipides PEGylés (associés à du polyéthylène glycol) avec des charges de surface variables que les nanoparticules cationiques pénétraient davantage dans le tissu tumoral (xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires chez la souris) que les nanoparticules anioniques et neutres (Wang et al. 2016). Thevenot et al. ont constaté que des nanoparticules à base d'oxyde de titane, portant des charges négatives, n'entraînaient une cytotoxicité directe et une rupture des membranes observée en microscopie que pour certaines lignées de cellules (Thevenot et al. 2009). La réactivité de la surface chimique, en particulier pour des nanoparticules à base d'ions métalliques et d'oxydes métalliques, peut se traduire par l'expulsion d'ions réactifs ayant un effet cytotoxique sur les cellules cancéreuses (Ostad et al. 2010) ou encore la production de ROS par oxydation de la surface des nanoparticules (Shi et al. 2012).

#### 4.1.3 Utilisation des nanoparticules inorganiques en cancérologie

##### 4.1.3.1 Définition des nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques sont élaborées à partir d'oxyde métalliques ou de métaux. Si les liposomes sont par exemple les nanoparticules de prédilection pour la nanovectorisation de



médicaments, elles sont plus susceptibles à l'hydrolyse, l'oxydation voire à la perte de son intégrité menant à la dispersion du médicament (Pugazhendhi et *al.* 2018).

Les nanoparticules inorganiques ont suscité une attention particulière en raison de leurs propriétés physico-chimiques uniques, qui dépendent du matériau et de la taille. Outre la stabilité, la facilité de synthèse, de modification et d'inertie, les propriétés magnétiques et optiques rendent ces nanoparticules intéressantes pour d'autres applications comme l'imagerie et l'ablation de tissus malins (Bayda et *al.* 2018).

#### 4.1.3.2 Applications développées des nanoparticules inorganiques en cancérologie

Connaissant un véritable essor en médecine et notamment en cancérologie, les nanoparticules à base de métaux ou d'oxydes métalliques font l'objet de nombreuses études pour diverses applications anticancéreuses (Haume et *al.* 2016 et Rosa et *al.* 2017) :

- La nanovectorisation de médicaments ou *drug delivery*. Cette méthode va consister à immobiliser des principes actifs sur les nanoparticules pour faciliter leur acheminement vers la zone cible. Ainsi le but de cette méthode est d'optimiser la délivrance du médicament et de contrôler sa vitesse de libération pour en diminuer sa toxicité. Afin d'améliorer la sélectivité tumorale, il est possible d'effectuer du ciblage actif. Actuellement, quelques nanoparticules organiques ont reçu l'approbation de la FDA (Abraxane®, Doxil®, DaunoXome®) pour leur utilisation en clinique en tant que nanovecteurs. Ce n'est actuellement pas le cas pour les nanoparticules inorganiques (Zhao et *al.* 2020).
- L'imagerie. Certaines nanoparticules comme les nanoparticules superparamagnétiques ou bien le gadolinium possèdent des propriétés qui sont très intéressantes pour l'imagerie IRM. Le gadolinium est un agent de contraste positif qui raccourcit le  $T_1$  des protons environnants et donnent des images IRM plus lumineuses. Les nanoparticules superparamagnétiques sont des agents de contraste négatifs qui raccourcissent le  $T_2$  des protons et donnent des images IRM plus sombres. La modification des temps de relaxation des protons de l'eau environnante à l'intérieur des divers organes permet alors de moduler le contraste dans les images IRM selon l'organe cible (Wu et *al.* 2019). Des nanoparticules inorganiques à base de chélates de gadolinium, AGuIX®, font actuellement l'objet d'une étude clinique de phase 2 pour des applications théranostiques (traitement métastases cérébrales, 100 patients, NCT03818386), notamment pour l'imagerie des métastases par IRM.
- L'hyperthermie. L'hyperthermie est une forme de thérapie anticancéreuse qui consiste à exposer les tissus à une température élevée, généralement jusqu'à 45°C pour endommager ou tuer les cellules cancéreuses. Elle est généralement utilisée en combinaison avec la chimiothérapie et la radiothérapie pour potentialiser la destruction des tumeurs ou pour traiter les tumeurs avancées (Sharma et *al.* 2017). AuroShell®, une nanocoque d'or entourée de silice, fait actuellement l'objet d'une étude clinique pour l'ablation de tissus anormaux de la prostate (60 patients, NCT04240639). Les nanoparticules sont injectées par voie intraveineuse et

s'accumulent dans la tumeur qui est ensuite éclairée par un laser proche infrarouge. Les nanoparticules absorbent l'énergie du laser, qui la convertit ensuite sous forme de chaleur (Rastinehad et *al.* 2019).

La radiothérapie augmentée par les nanoparticules est également un des champs d'application en plein essor, c'est notamment le cas des nanoparticules à base de métaux ou d'oxydes métalliques.

## 4.2 LES EFFETS RADIOPOTENTIALISANTS DES NANOPARTICULES METALLIQUES

### 4.2.1 Intérêt en clinique des nanoparticules métalliques pour la radiopotentialisation

L'amélioration des effets de la radiothérapie en cancérologie via les nanoparticules métalliques ou à base d'oxydes métalliques (mNPs) est à l'heure actuelle au cœur d'essais cliniques. En France, des nanoparticules à base d'oxyde d'hafnium (NBTXR3, Nanobiotix) a obtenu une autorisation de mise sur le marché en Europe pour le traitement des sarcomes des tissus mous. La nanoparticule commence à être testée pour d'autres cancers dans des essais cliniques, notamment les carcinomes à cellules squameuses de la cavité oro-pharyngée (phase I) (Hoffman et *al.* 2021), les adénocarcinomes pancréatiques avancés ou difficilement opérables (phase I, NCT04484909), les tumeurs pulmonaires à non petites cellules inopérables (phase I, NCT04505267) et les adénocarcinomes oesophagiens (phase I, NCT04615013).

La start-up lyonnaise NH TherAguix développe des nanoparticules à base de chélates de gadolinium AGuIX® à visée théranostic pour traiter les métastases cérébrales et améliorer le contraste des imageries IRM pour le suivi de la tumeur. La phase clinique I de l'essai NANO-RAD vient de s'achever et a démontré l'innocuité de la nanoparticule quelles que soient les doses délivrées (15 à 100 mg/kg). De plus, la nanoparticule est sélective et s'accumule bien au niveau de la masse tumorale, ce qui permet une amélioration du contraste en pondération T1 des imageries IRM et une préservation du signal pendant au moins huit jours. Sur les quinze patients inclus dans l'essai, quatorze d'entre eux ont répondu positivement au traitement (diminution du nombre de métastases et de leur diamètre). Cinq d'entre eux étaient encore en vie à douze mois post-traitement par rapport à d'autres suivis cliniques pour des patients similaires (survie globale médiane inférieure à 9,2 semaines) (Verry et *al.* 2021). Un essai clinique de phase 2 sur 100 patients atteints de métastases cérébrales est actuellement en cours (NCT03818386). Cet essai combine l'injection en intraveineuse comme pour l'essai clinique de phase 1 mais a pour but ici d'évaluer la réponse des métastases à l'association des AGuIX à la radiothérapie (rayons X, cerveau entier, 30 Gy en 10 fractions réparties sur 2 à 3 semaines) et la toxicité du traitement.

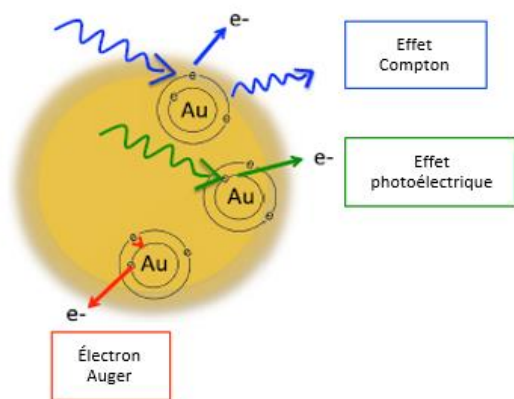
### 4.2.2 Propriétés des nanoparticules métalliques utilisées pour la radiopotentialisation

#### 4.2.2.1 Principales propriétés physiques de l'interaction des nanoparticules métalliques aux radiations ionisantes

La radiopotentialisation est un processus qui consiste à utiliser un agent pour augmenter les effets des radiations ionisantes. Les nanoparticules métalliques possèdent une densité électronique élevée qui leur permettent de fortement absorber les photons X (Liu et *al.* 2018).

La radiopotentialisation par les nanoparticules métalliques est caractérisée par une augmentation du dépôt de la dose physique. Les particules ionisantes incidentes sont capables d'induire une ionisation de l'enveloppe interne des atomes métalliques. La probabilité de génération d'électrons va dépendre du numéro atomique de la nanoparticule et de l'énergie des particules ionisantes incidentes. Plus le numéro atomique est élevé, plus il y aura une absorption des particules ionisantes par le cortège électronique de la nanoparticule et donc une génération d'électrons secondaires.

En radiothérapie conventionnelle (6 à 20 MeV), l'effet Compton prédomine dans les gammes d'énergie des photons X comprises entre 25 keV – 25 MeV contrairement à la création de paires ( $> 1.02$  MeV) et l'effet photoélectrique ( $< 100$  keV). Toutefois, la probabilité de survenue de l'effet Compton est indépendante du numéro atomique du matériau, les interactions entre les radiations ionisantes et les nanoparticules métalliques ont donc peu d'impact. En revanche, la probabilité d'apparition de l'effet photoélectrique augmente fortement pour des nanoparticules métalliques qui ont un numéro atomique élevé ( $Z^3$ ). Autrement dit, le coefficient d'atténuation de masse des photons, qui est proportionnel au numéro atomique de la nanoparticule et à l'énergie des photons incidents ( $E^3$ ), sera plus élevé. Par conséquent, les photoélectrons, les photons secondaires et les électrons Auger émis par les nanoparticules métalliques provoquent une augmentation très localisée de la dose et une ionisation focale des cellules environnantes par le biais des effets photoélectriques. Ces effets sont très intéressants, notamment pour la génération d'électron Auger dont le transfert d'énergie linéaire est très élevé et peut donc être très toxique pour les cellules (Choi et al. 2020) (**figure 53**).



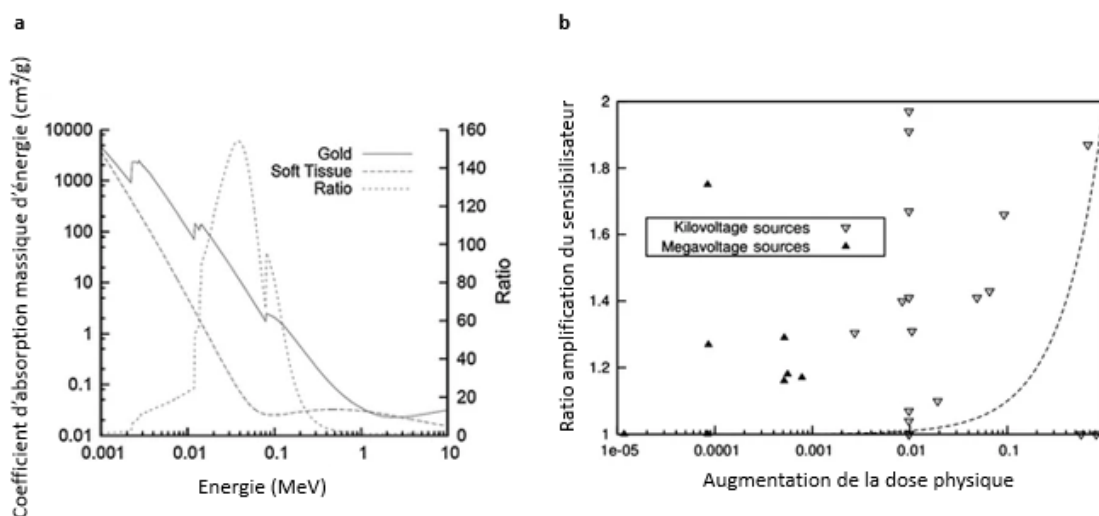
**Figure 53. Principaux effets physiques générés par l'association des nanoparticules aux radiations ionisantes.** L'éjection d'électrons secondaires des atomes d'or par le contact avec les radiations ionisantes est dépendante de l'énergie utilisée, tout comme avec les tissus mous et les molécules d'eau (effet Compton, photoélectrique, électrons Auger). Néanmoins, en raison du numéro atomique élevé de l'atome d'or, les événements surviennent avec une probabilité différente. Le numéro atomique influence peut la survenue de l'effet Compton contrairement à la génération d'électrons Auger et photoélectriques qui est plus élevée et pourraient induire une forte toxicité. La création de paires est très rare en raison des doses utilisées en clinique et n'est pas influencée par la nanoparticule d'or (Adapté de Rosa et al. 2017).

#### 4.2.2.2 Propriétés des nanoparticules d'or pour la radiopotentialisation

L'or (numéro atomique  $Z = 79$ ) est un radiopotentialisateur prometteur car son numéro atomique élevé produit un coefficient d'atténuation de masse élevé par rapport aux tissus mous. Il est 100 à 150 fois supérieur à celui des tissus mous dans la gamme d'énergie des keV. Par conséquent, il existe une probabilité accrue d'interaction photoélectrique à des niveaux d'énergie inférieurs entre les nanoparticules et les photons X par rapport aux tissus mous, ce qui entraîne un dépôt d'énergie plus important au niveau du site cible (**figure 54a**). Si en clinique les énergies utilisées sont supérieures à l'ordre du keV, expérimentalement, sur les cultures cellulaires *in vitro*, il a été montré que le degré de radiosensibilisation est plus important que l'augmentation prédite de la dose physique pour une dose d'irradiation appliquée. La réponse radiobiologique ne serait pas donc entièrement dépendante de la

dose totale délivrée à la cellule dans le cas de l'interaction des nanoparticules d'or à la radiothérapie (**figure 54b**) (Butterworth et al. 2013, Rosa et al. 2017).

Les nanoparticules à base d'or présentent également des propriétés chimiques intéressantes. L'or, à



**Figure 54. Réponses physiques de l'association des nanoparticules d'or à différentes énergies de radiations ionisantes.** (a) Le coefficient de l'énergie massique des photons des tissus mous (points tirés) et de l'or (trait continu) sont différents l'un de l'autre. Le ratio or/tissus mous en fonction de l'énergie des photons est encore plus marqué selon l'énergie (avec un pic à 100 keV), ce qui signifie que l'or va proportionnellement absorbé 150 fois plus d'énergie que les tissus mous. Ceci n'est plus le cas à plus de 500 keV. (b) L'augmentation de la dose physique fait ici référence au rapport entre la dose supplémentaire déposée après ajout des nanoparticules d'or par rapport aux radiations ionisantes seules. Lorsque l'on compare les données provenant d'expériences *in vitro* et sur l'augmentation de la dose prédite basée sur les concentrations d'or et les énergies des rayons X utilisées (ratio amplification du sensibilisateur), on se rend compte *in vitro* d'une augmentation de l'énergie déposée en présence des nanoparticules par rapport aux irradiations seules par rapport aux prédictions (ligne points tirés). (Adapté d'après Butterworth et al. 2013 et Rosa et al. 2017)

l'échelle macroscopique, est un métal chimiquement stable et biocompatible, ce qui pourrait réduire les risques potentiels dans les applications en santé (Liu et al. 2018 et Jeong et al. 2019). Les nanoparticules d'or peuvent être aisément fonctionnalisées, notamment *via* les groupements thiols et amines. Leur production est également facilement modulable, que cela soit pour contrôler leur taille, leur revêtement de surface ou leur forme (Jeong et al. 2019).

### 4.3 EFFETS BIOLOGIQUES ENGENDRES PAR LES NANOPARTICULES METALLIQUES EN ASSOCIATION OU NON A LA RADIATIONOTHERAPIE

#### 4.3.1 Génération de ROS et cytotoxicité par l'association des nanoparticules métalliques à la radiothérapie

L'étude d'Hainfeld et al. s'était intéressée à l'association de la radiothérapie (rayons X, 250 keV) et de nanoparticules d'or de 1,9 nm de diamètre pour traiter des carcinomes mammaires. Ils ont observé *in vivo* chez la souris que le volume des tumeurs uniquement irradiées est cinq fois supérieur à celui des tumeurs irradiées et exposées aux nanoparticules après 24 jours de suivi. La survie globale à un an des souris traitées avec l'association des nanoparticules d'or à la radiothérapie est de 86% contre 50% pour celles uniquement irradiées (Hainfeld et al. 2004). Plusieurs effets biologiques permettraient d'expliquer

de tels effets anti-tumoraux *in vivo*. La production des ROS, l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction des dommages à l'ADN sont les processus les plus étudiés dans la littérature.

La génération des ROS, grâce aux interactions entre les nanoparticules métalliques et les radiations ionisantes, est due à l'augmentation de la dose. Elle génère une ionisation locale plus forte (effet Compton, effet photoélectrique) (Liu, 2013). En plus de ce phénomène propre à la nanoparticules, il semblerait que l'adsorption des molécules d'eau à la surface des nanoparticules est possible. Ce contact direct entre les molécules d'eau et la nanoparticule diminuerait l'énergie nécessaire pour l'ionisation de l'eau (Liu, 2013). Ceci faciliterait la génération d'électrons secondaires et l'ionisation en chaîne qui en découle (Misawa et Takahashi, 2018).

Cette augmentation de la génération de ROS et d'électrons secondaires est très intéressante pour l'induction de dommages à l'ADN. Mirjolet et *al.* avaient montré, pour des cellules U87 exposées à des nanoparticules d'oxyde de titane et irradiées à 2 Gy une diminution de la fraction de survie par rapport aux cellules uniquement irradiées (SF2 0,43 contre 0,6,  $p < 0,05$ ). Cette diminution des capacités clonogéniques étaient associées à une augmentation du nombre de cellules présentant une phosphorylation de la protéine  $\gamma$ -H2AX, qui est induite par la protéine ATM activée lors de la détection des dommages de l'ADN, par rapport aux cellules uniquement irradiées (Mirjolet et *al.* 2013).

De manière intéressante, dans les travaux de Mirjolet, la proportion de cellules U87 exposées aux nanoparticules et irradiées à 2 Gy en phase G2 du cycle cellulaire est légèrement supérieure par rapport aux cellules irradiées (environ +5%, soit 25%) (Mirjolet et *al.* 2013). Dans la littérature, il a été montré que la radiosensibilité des cellules est la plus élevée lors de la phase de division cellulaire G2/M (shen et *al.* 2015), ce qui suggère que les nanoparticules métalliques pourraient potentialiser les effets de la radiothérapie par arrêt du cycle cellulaire au stade G2/M.

#### 4.3.2 Les effets propres des nanoparticules métalliques

Les nanoparticules métalliques, grâce à leur variété de *design* (matériaux, taille, forme, etc), augmentent le nombre d'applications mais soulignent la nécessité de prouver leur innocuité. En effet, il a été démontré que les nanoparticules métalliques peuvent présenter une cytotoxicité, en fonction de la taille et d'autres propriétés physico-chimiques telles que la forme, la concentration ou la composition (Bahadar et al. 2016). La toxicité des mNPs est évaluée la plupart du temps par des tests de réduction au tétrazolium, le test LDH, l'évaluation de l'apoptose, le test des comètes pour la génotoxicité. Cependant, ces tests pourraient être impossibles à utiliser car les mNPs pourraient interférer avec l'activité mitochondriale, ne pas initier la mort cellulaire par apoptose ou avoir une longueur d'onde similaire aux substrats utilisés dans ces tests (Bahadar et al. 2016). Des analyses plus avancées comme l'analyse cellulaire en temps réel (RTCA) ont été développées pour surveiller directement la nanotoxicité par la mesure de l'impédance cellulaire en temps réel. Mais la RTCA ne peut pas distinguer l'adhésion et la plasticité cellulaire de la prolifération et de la mort cellulaire (Moe et al. 2013). Par ailleurs, depuis plus de 10 ans, certains travaux de recherche mettent en évidence que les nanoparticules métalliques pourraient moduler la forme des cellules mais aussi leur motilité.

#### 4.3.2.1 Effets anti-migratoires et anti-invasifs propres des nanoparticules d'or sur les cellules cancéreuses

La capacité des cellules à se mouvoir et infiltrer les tissus va dépendre de la nature de son cytosquelette, la capacité des cellules à interagir avec la MEC environnante. Plusieurs études ont essayé de comprendre à quel niveau de l'infiltration les nanoparticules à base d'or étaient capables d'interférer.

Dans une étude récente menée par Shahhoseini et *al.* en 2019, des lignées cancéreuses de prostate et de poumons DU145 et A549 ont été exposées à des nanoparticules d'or de 15nm à 1mM pendant 24h. Le suivi en temps réel de test de blessure a mis en exergue que les nanoparticules à base d'or diminuaient la migration relative de 25% et la vitesse de 50% au cours des six premières heures de migration mais n'étaient plus significativement différentes après 18h de migration. Cette capacité à moduler précocement la motilité cellulaire pourrait avoir plusieurs origines (Shahhoseini et *al.* 2019).

La plasticité cellulaire et la capacité des cellules à se contracter *via* le cytosquelette d'actine sont essentielles à la mise en mouvement des cellules. En 2014, Pan et *al.* ont mis en évidence une corrélation entre la diminution de la migration de cellules endothéliales HUVEC cultivées dans un milieu de culture utilisé pour des cellules cancéreuses du foie HepG2-CM et exposées aux nanoparticules d'or et une perturbation du cytosquelette d'actine-F (Pan et *al.* 2014). Des observations des fibres d'actine-F par microscopie de fluorescence ont révélé une réduction du nombre de fibres d'actine-F et une perte de l'alignement des fibres au niveau des protrusions cellulaires. Cette perte de structuration du cytosquelette d'actine-F a également été constatée pour des cellules du col de l'utérus HeLa exposées à des nanobâtonnets d'or par microscopie de reconstruction optique stochastique (STORM). Ce type de microscopie a permis d'observer non seulement une perturbation de l'alignement des fibres du cytosquelette, une diminution du diamètre des fibres d'actine mais également une perte des protrusions cellulaires de type lamellipodes et filopodes (Wu et *al.* 2018).

Bien qu'il soit connu que la migration puisse se produire sans l'extension des lamellipodes (Gupton et *al.* 2005), l'intégrité de l'actine-F reste fondamentale pour lors de la motilité car sa destruction au niveau cortical et cytoplasmique bloque à la fois la migration 2D et 3D (Nersesian et *al.* 2018). Il semblerait que les nanoparticules d'or puissent altérer la signalisation moléculaire responsable de la polymérisation de l'actine-F. Kuruppayya et *al.* ont démontré que les cellules de fibrosarcome HT-1080 exposées à des nanoparticules d'or à 120  $\mu$ M présentaient une activation de Rac1 diminuée de 60% par rapport aux cellules non traitées. La perte d'activation de Rac1 a été corrélée à une perte de 80% de la migration individuelle après l'exposition aux nanoparticules d'or ainsi que la perte de l'intégrité de l'actine-F au niveau des protrusions (Kuruppayya et *al.* 2013).

Bien que démontrant des effets opposés sur la migration cellulaire, Grzincic et Murphy en 2015 ont également montré que les cellules MDA-MB-231 exposées aux nanorods d'or présentaient des niveaux d'expression en ARNm plus élevés de RhoA, Rac1 et ROCK. La phosphoprotéomique a également révélé une augmentation de 50 % de la phosphorylation de la caténine pS268-p120 et une modification de la phosphorylation du réseau d'actine (paxilline, zyxine, vinculine, myosine-9, phosphatase de la chaîne légère de la myosine, filamine, cortactine et drebrine) après l'exposition aux nanorods d'or. Ceci suggère un rôle des nanoparticules d'or à la fois sur l'expression protéique des acteurs de la migration et dans la régulation de leur activation.



De plus, les observations par STORM ont révélé une perte des jonctions intercellulaires après exposition aux nanorods d'or. En 2018, Wu et al. ont montré que les cellules HeLa exposées à des nanorods d'or possèderaient également moins de jonctions intercellulaires et serait corrélé à une diminution de la motilité. Dans les jonctions intercellulaires, l'évaluation de l'expression de la N-Cadhérine de la protéine des jonctions serrées ZO-2 montrerait une diminution de l'expression des marqueurs jonctionnels et une expression membranaire discontinue au sein des cellules traitées. Ces résultats suggéreraient que les nanoparticules d'or perturberaient la migration collective en impactant l'expression des protéines des jonctions.

De plus, ces modifications phénotypiques toucheraient aussi la morphologie et les propriétés infiltrantes des cellules elles-mêmes. Dans l'étude de Grzincic et Murphy en 2015, les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 évoluant dans une matrice de collagène I contenant des nanorods d'or présentaient un profil migratoire plus fort et un arrondissement accompagné d'une diminution de l'extension de l'actine-F par rapport au profil basal mésenchymateux. Les cellules arrondies avaient une expression plus élevée de MMP et de Rac1, ce qui suggère que les nanorods d'or incorporées dans le microenvironnement entraîne une modification du phénotype migratoire, ici d'un profil mésenchymateux à un profil amiboïde plus infiltrant (Grzincic et Murphy, 2015).

Les nanoparticules auraient donc des effets sur le cytosquelette à différentes échelles de la cellule : au niveau jonctionnel, membranaire, phénotypique et moléculaire.

#### 4.3.2.2 Effets propres des nanoparticules métalliques sur l'invasion

Lorsque les cellules doivent progresser dans les tissus, que cela soit en contexte physiologique comme l'angiogenèse ou bien en contexte pathologique comme la cancérogenèse, la seule mise en mouvement des cellules ne suffit pas. C'est pourquoi, certaines publications se sont intéressées au phénomène d'invasion en plus de l'altération de la migration par les nanoparticules métalliques. A l'heure actuelle, il existe peu de données dans la littérature qui rapportent les effets des nanoparticules à base d'or, c'est pourquoi les effets sur l'invasion d'autres types de nanoparticules à base d'oxyde métallique ou de métaux ont été considérés ici.

Shin et al. ont démontré que les capacités invasives individuelles des cellules de carcinome de la vessie EJ exposées à des nanoparticules hybrides or et platine (1 :4) diminuent de manière dose-dépendante jusqu'à quatre fois pour une concentration à 0,5  $\mu$ M. L'altération de l'invasion a été associée à une diminution statistiquement significative de l'expression de MMP2 et MMP9 en RTQPCR ainsi que de l'activité de MMP2 et MMP9 en zymographie de deux à cinq fois dose-dépendante (Shin et al. 2018). La diminution de l'activité de MMP2 a également été démontré sur des cellules endothéliales HUVEC exposées au VEGF165 et à des nanoparticules à base de cérium. La perte de l'activité MMP2 semblerait associer à une diminution de la formation de vaisseaux en culture 2D et en 3D dans du Matrigel® (Giri et al. 2013). L'altération des capacités invasives des cellules surviendrait donc quelque soit le matériau des nanoparticules et le contexte physiopathologique et toucherait d'une part les capacités des cellules à dégrader la MEC environnante.

D'autre part, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est une caractéristique de la progression cellulaire, et notamment dans le processus de générations des métastases dans certains types de

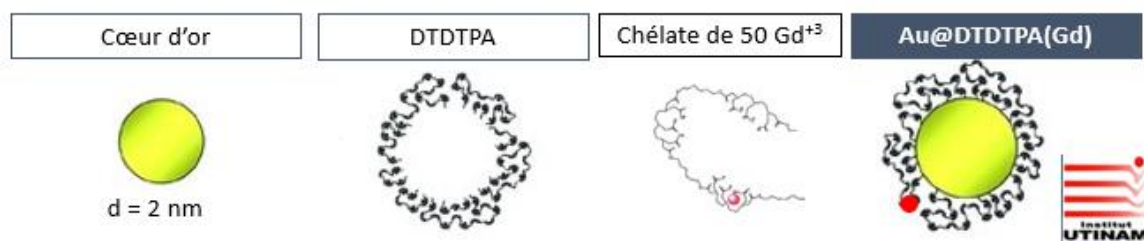
cancer. Tran et al. ont constaté que des nanoparticules à base d'oxyde de zinc diminuaient la capacité d'invasion de cellules cancéreuses mammaires métastatiques MCF7 ayant un profil souche CD44 positive, de manière dose-dépendante. Plusieurs marqueurs de la TEM, comme la perte d'expression de l'E-Cadhérine des jonctions adhérentes et la surexpression des filaments intermédiaires de vimentine sembleraient être altérés par les nanoparticules métalliques (Tran et al. 2016). Dans des lignées de cancer du pancréas PANC-1, AsPC-1 et Mia-PaCa-2 exposées à des nanoparticules d'or, Huai et al. ont constaté une augmentation de l'expression protéique de la E-Cadhérine et une diminution de l'expression protéique de la vimentine. Dans la lignée HPAF-II, les auteurs ont également constaté par ICF que l'E-Cadhérine semblerait préférentiellement exprimer au niveau des jonctions intercellulaires et au niveau membranaire. Ces données suggéreraient que les nanoparticules métalliques seraient capables d'altérer le déroulement du processus de la TEM au cours de la cancérogénèse (Huai et al. 2019).

De plus, Tran et al. avaient corrélié la diminution des capacités invasives des cellules MCF7 exposées aux nanoparticules d'oxyde de zinc à une inhibition de l'expression protéique de Snug et de Snail en Western Blot. Ces facteurs de transcriptions sont connus pour moduler l'expression de certains gènes et notamment la répression de l'expression de l'E-Cadhérine et la surexpression de la vimentine au cours de la cancérogénèse (Wang et al. 2014).

Si le mécanisme d'action au niveau protéique et génomique des nanoparticules métalliques n'est pas encore connu, ces résultats pourraient indiquer qu'elles seraient capables d'entraîner une régulation transcriptionnelle de la TEM assurant sa promotion ou sa répression selon le contexte physiopathologique.

#### 4.4 DEVELOPPEMENT ET UTILISATION DE NANOPARTICULES HYBRIDES D'OR ET DE GADOLINIUM POUR LA RADIOPOTENTIALISATION : LES NANOPARTICULES Au@DTDTPA(Gd)

Depuis quelques années, la conception de nanoparticules à base d'or ne passe pas uniquement par l'utilisation unique d'or mais peut également concerner l'ajout d'autres composés métalliques ou chimiques. L'équipe du Pr Stéphane Roux (Institut UTINAM – UMR 6213, Université de Franche-Comté, CNRS) synthétise des nanoparticules hybrides d'or et de gadolinium Au@DTDTPA(Gd) (**figure 55**)



**Figure 55. Structure de la nanoparticule Au@DTDTPA(Gd).** Les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sont constituées d'un cœur d'or d'environ 2 nm de diamètre et de 50 chélates de gadolinium  $Gd^{3+}$  fixés sur l'or par complexation à des dérivés dithiolés de l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTDTPA). Le diamètre hydrodynamique de la nanoparticule est d'environ 8 nm. Le gadolinium est utilisé en tant qu'agent de contraste IRM (T1) et le numéro atomique élevé du gadolinium ( $Z = 64$ ) et de l'or ( $Z = 79$ ) fait de ces nanoparticules un agent radiopotentialisant intéressant (Adapté de Brust et al. 1995 et de Miladi et al. 2014)

Brièvement, la production de ces nanoparticules passe par une première dissolution de sel d'or  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  dans du méthanol. Du DTDTPA et de l'acide acétique ont été ajoutés à la solution de sel d'or. Une nouvelle étape de dissolution en présence de  $\text{NaBH}_4$  puis dans de l'acide chlorhydrique a ensuite lieu. Après filtration sur une membrane polymère et lavage successif avec de l'acide chlorhydrique de l'eau et de l'éther diéthylique, les ions gadolinium sous forme  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  sont complexés au DTDTPA (Miladi et al. 2014).

Ces nanoparticules hybrides ont été conçues pour des applications théranostiques, à la fois comme agent de contraste IRM et pour ses propriétés radiopotentialisantes. La relaxivité du gadolinium en fait un agent de contraste performant pour accélérer les vitesses de relaxation des protons de l'eau en IRM (pondération T1) (Debouttière et al. 2006). L'ion gadolinium, tout comme l'or, possède une forte densité électronique ( $Z = 64$ ) ce qui a poussé l'équipe du professeur Roux à s'intéresser aux capacités radiosensibilisantes des nanoparticules  $\text{Au@DTDTPA}(\text{Gd})$  pour la radiothérapie guidée par IRM.

*In vivo*, l'injection par voie intraveineuse des nanoparticules couplées à un radiotraceur (technetium 99) chez la souris révèle une distribution majoritairement au niveau du cœur, du foie, des reins et de la rate, Couplées au radiotraceur Indium 111, Alric et al. ont montré que, pour chacun des organes, moins de 10% des nanoparticules injectées sont détectées (de 30min à 72h post-injection). Ceci a été également observé après analyse par ICP-OES de la quantité d'or accumulée dans les organes prélevés chez les animaux (Alric et al. 2013). Les analyses des urines après 30min d'injection des nanoparticules révèlent une excrétion d'environ 10% des nanoparticules totales injectées. 24h à 72h après injection, plus de 60% des nanoparticules injectées sont excrétées par voie urinaire et moins de 5% sont détectées dans les excréments des animaux. Ainsi, ces résultats ont permis de mettre en évidence une bonne élimination des nanoparticules par voie urinaire et une faible accumulation des nanoparticules au niveau des organes, notamment au niveau du foie et de la rate qui contiennent des populations de phagocytes qui sont potentiellement capables de phagocyter les nanoparticules  $\text{Au@DTDTPA}(\text{Gd})$  (Alric et al. 2013).

Dans une étude menée par Hébert et al., l'injection par voie intraveineuse de nanoparticules  $\text{Au@DTDTPA}(\text{Gd})$  chez la souris ayant reçu des xénogreffes de cellules cancéreuses mammaires a permis de mettre en évidence une localisation des nanoparticules dans le tissu tumoral par imagerie IRM. Le temps de demi-vie dans le tissu tumoral était de 22 minutes mais avec une concentration hétérogène au cours du temps des nanoparticules dans le tissu tumoral, selon que les régions du tissu tumoral soient bien perfusées ou non. Après 90 minutes post-injection, la concentration des nanoparticules reste stable dans le tissu tumoral peu perfusé alors que la concentration des nanoparticules dans le tissu tumoral bien perfusé décroît rapidement dès dix minutes post-injection (Hébert et al. 2010). L'association des nanoparticules à une irradiation de 10 Gy (rayons X, 150 kVp, 20 min post-injection) ne modifiait en revanche pas la survie des animaux par rapport à l'irradiation seule (14 jours) mais révélait une diminution des capacités clonogéniques *in vitro* pour des doses 100 fois inférieures à celles utilisées *in vivo* (5  $\mu\text{M}$  contre 5 mM) (Hébert et al. 2010).

L'étude de Miladi et de ses collaborateurs s'est intéressée aux effets radiopotentialisants des nanoparticules  $\text{Au@DTDTPA}(\text{Gd})$  sur les tumeurs cérébrales *in vivo*. Les rats, porteurs de greffes

orthotopiques de cellules de gliosarcome 9L, ont reçu une injection intraveineuse des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à 5 mM (Miladi et *al.* 2014). Les imageries IRM à T1 ont révélé après cinq minutes post-injection que le signal IRM temporelle était plus fort dans la tumeur que dans le tissu cérébral sain (environ 30% de différence), suggérant une accumulation préférentielle des nanoparticules dans le tissu tumoral. De plus, 72h post-injection, les nanoparticules sont en majorité éliminées par excrétion rénale (70%). L'association des nanoparticules à une radiothérapie par microfaisceaux (photons X, énergie moyenne de 90 keV) augmente à la fois la survie moyenne, la médiane de survie et l'espérance de vie des animaux par rapport à une irradiation seule (47,9 jours, 56,5 jours et 251,1 jours respectivement). L'ensemble de ces données ont permis de montrer que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) peuvent être suivies par imagerie IRM dans le cadre du traitement des tumeurs cérébrales et exercent un pouvoir radiosensibilisant sur des tumeurs cérébrales (Miladi et *al.* 2014).

Les travaux *in vivo* de thèse de Héna Paquot se sont basés sur l'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie (photons X, 320 keV, différents protocoles d'irradiation 2 x 5 Gy, 5 x 2 Gy et 10 Gy) et son impact sur les cellules de GBM U87 (Paquot, 2019). Après greffe de sphéroïdes U87 à la surface du cortex de souris *nude*, les travaux ont mis en évidence une action antitumorale du traitement mais pas un bénéfice de l'ajout des nanoparticules aux protocoles d'irradiation. Une approche dite « non-conventionnelle » (les traitements sont réalisés *in vitro* avant implantation du sphéroïde) a cependant mis en évidence un doublement de la survie des animaux par rapport à l'irradiation seule, ce qui suggère un bénéfice thérapeutique de l'association des nanoparticules à la radiothérapie (Paquot, 2019).

# OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le glioblastome (GBM), tumeur cérébrale primaire la plus répandue chez l'adulte, est une tumeur de très mauvais pronostic puisque les patients ont une survie médiane qui n'excède pas quinze mois. Actuellement, la prise en charge des GBM repose sur le protocole de Stupp qui correspond à une exérèse de la tumeur la plus large possible si la tumeur est opérable, suivie de six semaines de radiochimiothérapie concomitante et d'une chimiothérapie adjuvante à base de TMZ. Malgré ce traitement lourd, la récurrence tumorale est systématique survenant le plus souvent dans la zone d'irradiation définie par imagerie IRM. Le caractère infiltrant de la maladie fait que le traitement est encore complexe.

Dans les GBM, les échecs thérapeutiques s'expliquent (i) par la très grande hétérogénéité cellulaire et moléculaire de ces tumeurs, avec notamment l'existence de sous-populations « souches » ou « initiatrices de tumeurs » responsables des récurrences, (ii) et par leur caractère très invasif. En effet, au-delà de la masse tumorale principale détectable à l'IRM et reflétant une forte prolifération, ces tumeurs présentent également une zone infiltrante, difficilement résécable, constituée de cellules tumorales plus ou moins nombreuses, ayant envahi le parenchyme cérébral et qui contribuent activement à l'agressivité des GBM. Évoluant dans un environnement complexe et très protégé (boîte crânienne, barrière hémato-encéphalique, MEC cérébrale et système immunitaire spécifique), les cellules tumorales gliales vont tirer profit des structures existantes telles que les vaisseaux sanguins cérébraux, les faisceaux myélinisés, les méninges, et s'adapter aux contraintes mécaniques, topographiques, biochimiques et biologiques, pour se mouvoir et se frayer un passage afin de permettre la progression tumorale.

L'importance de la radiothérapie externe conventionnelle par rayons X ou  $\gamma$  dans le traitement du GBM en complément de la chirurgie, a été démontrée dès les années 80 (Khan et al. 2016). Néanmoins, ce traitement appliqué au cerveau souffre d'une fenêtre thérapeutique étroite, et la dose totale maximale de radiations que l'on peut délivrer est limitée pour préserver le parenchyme cérébral sain. Le défi est donc d'améliorer l'efficacité antitumorale des radiations ionisantes sans aggraver les risques toxiques sur le cerveau sain. De nombreuses innovations font l'objet de recherches très actives : en particulier, les nouvelles modalités d'irradiation (nouvelles sources telles que les protons ou les ions carbone, les nouveaux protocoles tels que l'hypofractionnement) et différentes stratégies de radiosensibilisation (utilisation d'inhibiteurs contre la réparation de l'ADN, développement de nouveaux protocoles de radiochimiothérapie) sont en cours d'investigation, en parallèle du protocole Stupp, pour améliorer la prise en charge de la maladie sans altérer la qualité de vie des patients. Dans ce contexte, plusieurs travaux se sont intéressés au potentiel des nanoparticules inorganiques, à base de métaux ou d'oxydes métalliques, comme agents radiopotentialisants (ou *radioenhancers*).:- Notamment, différentes études précliniques *in vitro* et *in vivo* ont montré l'intérêt d'associer des nanoparticules d'or ou de gadolinium aux radiations ionisantes pour amplifier les effets cytotoxiques de ces dernières. Notre laboratoire, en particulier, s'intéresse depuis 6 ans à des nanoparticules originales, ultra-petites (<10 nm) et constituées d'un cœur d'or recouvert de chélates de gadolinium (Au@DTDTPA(Gd)) : ces nanoparticules ont été développées par l'équipe du Pr. Stéphane Roux (Institut UTINAM, UMR 6213, Université de Bourgogne-Franche-Comté) dans un but théranostique. Plus précisément, elles ont été conçues pour la radiothérapie guidée par l'IRM. Les travaux débutés au laboratoire consistent à évaluer le potentiel



thérapeutique des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) lorsqu'elles sont associées à la radiothérapie externe conventionnelle par rayons X dans le contexte des tumeurs cérébrales.

Les données de la littérature suggèrent que les nanoparticules inorganiques, notamment à base d'or, possèdent des propriétés anti-migratoires, anti-invasives, et sont capables de perturber les propriétés biomécaniques des cellules saines et cancéreuses. C'est pourquoi, dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à la partie infiltrante des GBM, c'est-à-dire de nous focaliser sur les cellules tumorales gliales capables de migrer et d'envahir le parenchyme cérébral environnant. Nous avons donc étudié l'impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) seules ou en association avec l'irradiation X, sur les capacités invasives des cellules de GBM.

**Après la description détaillée des matériels et méthodes mis en œuvre pour réaliser nos expérimentations, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus en trois parties.**

La première partie présente les résultats des études préliminaires dédiées à la caractérisation des modèles cellulaires U251 et U87 choisis pour nos expérimentations. La caractérisation a porté sur la façon dont les cellules se comportent en culture, c'est-à-dire leur mode de prolifération et leur capacité invasive spontanée. La réponse aux traitements a également fait l'objet d'une évaluation, notamment de la cytotoxicité directe et des capacités invasives des deux lignées. Le travail *ex vivo* et *in vivo* a également donné lieu à la création d'un modèle fluorescent équivalent dont le comportement cellulaire a été comparé à celui des lignées non modifiées.

Dans la seconde partie du travail de thèse, nous avons évalué l'effet des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les capacités migratoires et invasives des cellules U251. Nous avons tenté de décrire au niveau cellulaire et moléculaire les phénomènes et les propriétés biomécaniques directement altérés par l'exposition aux nanoparticules.

Dans la troisième partie du travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'intérêt thérapeutique des Au@DTDTPA(Gd) en association avec la radiothérapie externe conventionnelle par rayons X, et nous avons notamment concentré notre attention sur les cellules capables de s'échapper de la masse tumorale principale pour envahir le tissu adjacent.

# MATERIELS & METHODES

# 1 MATERIEL

## 1.1 LISTE DES COMPOSES ET APPAREILLAGE UTILISES

Nom	Conditionnement	Conservation	Concentration finale	Fournisseur
Acides aminés essentiels	Liquide	-20°C	1% (v/v)	Sigma-Aldrich
Acides aminés non essentiels	Liquide	-20°C	0,5% (v/v)	Sigma-Aldrich
Alcool Chlorhydrique	Liquide	20°C	0,25% (v/v)	Fisher Scientific
Acide hyaluronique	Poudre	-20°C	100µg/mL	Lifecore
Agar bactériologique	Poudre	20°C	0,3% et 0,6% (m/v)	Fisher Scientific
Au@DTDTPA(Gd)	Liquide	4°C	5 mM	Institut UTINAM
B27	Liquide	-20°C	2% (v/v)	Gibco, Life Technologies
Bleu de Coomassie	Poudre	20°C	0,1% (m/v)	Fisher Scientific
DMEM Dulbecco's modified eagle medium	Liquide	4°C	4,5 g/L de D-glucose (sans rouge phénol)	Gibco, Life Technologies
DMEM-F12	Liquide	4°C	3,15 g/L de D-glucose, 2,5 mM de L-glutamine (sans rouge phénol)	Gibco, Life Technologies
EGF	Liquide	-20°C	0,002% (v/v)	Miltenyi Biotec
Eosine	Liquide	20°C		Diapath
Ethanol Pur/96°C/70°C	Liquide	20°C		Fisher Scientific
FGF	Liquide	-20°C	0,002% (v/v)	Miltenyi Biotec

## MATERIELS ET METHODES

Gélatine Porcine	Poudre	-20°C	1% (m/v)	Sigma-Aldrich
HBSS Hank's Balanced Salt Solution	Liquide	4°C		Sigma-Aldrich
Hématoxyline de Harris	Liquide	20°C		Diapath
Insuline	Liquide	-20°C	0,001% (v/v)	Thermo Scientific
Kit Pierce BCA Protein Assay	Liquide	20°C		Thermo Scientific
L-Asparagine	Poudre	-20°C	0,4% (v/v)	Sigma-Aldrich
L-Glutamine	Liquide	-20°C		Sigma-Aldrich
Lentivirus pLV-EF1A- GFP-PGK-Puro	Liquide	-20°C	1.10 <sup>6</sup> TU/puits	Cellomics Technology
Matrigel®	Liquide	-20°C	50% (v/v)	Corning LifeSciences
N2	Liquide	-20°C	1% (v/v)	Gibco, Life Technologies
PBS Phosphate buffered saline	Liquide	4°C		Sigma-Aldrich
Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)	Poudre	20°C	20 mg/mL	Sigma-Aldrich
Pyruvate de sodium	Liquide	-20°C	1,25% (v/v)	Sigma-Aldrich
Streptomycine/Péniciline	Liquide	-20°C	1% (v/v)	Sigma-Aldrich
SVF Sérum veau foetal	Liquide	-20°C	10% (v/v)	Sigma-Aldrich
Tampon décoloration	Liquide	20°C	Méthanol 25% (v/v), Acide acétique 10% (v/v)	Fisher Scientific
Tampon zymographie ph 7.6	Liquide	4°C	Tris/HCl pH 7.6 (50 mM), NaCl (100 mM),	Sigma-Aldrich

## MATERIELS ET METHODES

			CaCl <sub>2</sub> (5 mM), Triton X100 (0,01% (v/v))	
Thiazolyl bleu tetrazolium bromide	Poudre	4°C	1 mg/mL	Acros Organics
Trypsine – EDTA 0,5% (v/v)	Liquide	4°C	1X	Gibco, Life Technologies
Vitamines	Liquide	-20°C	0,4% (v/v)	Sigma-Aldrich

Nom	Expérimentations associées	Fournisseurs
Compteur cellulaire automatique TC20™	Comptage cellulaire et évaluation cytotoxicité directe	Bio Rad, USA
GelCount	Essais clonogéniques Test de bourgeonnement	Oxford Optronix, U.K
Gel Doc XR+	Zymographie	Bio Rad, USA
ImageXpress® Micro Confocal	Immunocytofluorescence, suivi de l'infiltration en culture organotypique, vidéomicroscopie	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Irradiateur XRAD 320 Series PXi Systems	Irradiation	Pxi Systems, USA
Macroscopie de fluorescence AZ100	Suivi infiltration tumorale <i>in vivo</i>	Nikon, JA
Microscopie optique DIAPHOT 300 + caméra Digital sight-DS-Fi1	Observation des cellules cultivées en monocouche et des cellules échappées	Nikon, JA
Multiskan Ascent	Dosage protéique	Thermo Fischer, USA

### 1.2 NANOPARTICULES Au@DTDTPA(Gd)

Les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sont fournies par l'équipe du Professeur Stéphane Roux (Institut UTINAM-UMR 6213 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon). La procédure expérimentale de la fabrication des nanoparticules est décrite dans les articles de Debouttière et *al.* 2006 et Alric et *al.* 2008.

Pour les tests en monocouche et sur sphéroïdes, la solution mère de nanoparticules (50 mM) est diluée dans le milieu de culture complet à une concentration finale de 5 mM.

Les cellules cultivées en monocouche sont mises en contact avec les nanoparticules 48h après leur ensemencement. Le temps d'exposition des cellules aux nanoparticules est de 24h dans l'incubateur. Les sphéroïdes sont exposés aux nanoparticules directement après leur ensemencement en plaques p6.

Après 24h, les cellules et sphéroïdes sont lavés par ajout de solution HBSS puis du milieu de culture complet est rajouté.

#### 1.2.1 Irradiateur

L'irradiation des cellules cultivées en monocouche et des sphéroïdes est effectuée à l'aide d'un irradiateur adapté (XRAD 320 Series PXi Systems, Actemium) situé au CHRU de Nancy Brabois (plateforme Nancyclotep). Cet irradiateur est capable de générer des faisceaux de photons X de faibles et moyennes énergies (5 à 320 kV).

Les cellules cultivées en monocouche sont irradiées à des doses de 2, 4, 5, 6, 8 et 10 Gy selon les tests effectués et les sphéroïdes sont irradiés à des doses uniques de 2, 5 et 10 Gy ou 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy pendant cinq jours.

### 1.3 LES CONDITIONS DE CULTURE CELLULAIRE

Les différentes manipulations en culture cellulaire ont été réalisées sous une hotte à flux laminaire (poste de sécurité microbiologique de type II) avec du matériel stérile et l'ensemble des milieux préchauffés à 37°C.

Pour l'ensemble des expérimentations, les cellulesensemencées dans les différents supports de culture cellulaire ont été placées dans un incubateur thermostaté à 37°C sous atmosphère humide diffusant du CO<sub>2</sub> à 5%.

#### 1.3.1 La lignée cancéreuse U251 MG

La lignée cancéreuse de glioblastome U251 MG (abrégée U251 et autrefois appelée U-373 MG, ECACC 09063001) a été établie à partir d'un glioblastome (astrocytome de grade IV) d'un patient masculin âgé de 75 ans. Il s'agit d'une lignée de cellules cancéreuses adhérentes caractérisée par une morphologie filamenteuse. Ces cellules peuvent être transfectées et possèdent de fortes propriétés invasives.



### 1.3.2 La lignée cancéreuse U87 MG

La lignée cancéreuse de glioblastome U87 MG (abrégée U87) a été établie à partir d'un glioblastome d'un patient masculin d'âge et d'ethnicité inconnus. Il s'agit d'une lignée de cellules cancéreuses adhérentes caractérisée par une morphologie astrocytaire. Ces cellules peuvent être transfectées et sont résistantes à la radiothérapie.

### 1.3.3 Les méthodes de culture cellulaire

Les cellules de la lignée U87, U251, U-251 MG GFP sont cultivées dans du milieu minimum essentiel de Eagle DMEM (Gibco, Life Technologies). Ce milieu, sans rouge phénol et contenant au préalable du D-glucose à une concentration de 4,5 g/L et de la L-Glutamine, est supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal décomplémenté, un mélange d'antibiotiques contenant de la pénicilline et de la streptomycine à 1% (v/v) et de 5% (v/v) de complément.

### 1.3.4 Culture des cellules en monocouche

Les cellules ayant atteint au moins 90% de confluence sont rincées avec 10mL de tampon PBS (Sigma-Aldrich). 2mL de Trypsine + EDTA à 0,05% (v/v) (Gibco, Life Technologies) est ajoutée aux boîtes de culture placées à 37°C. Après vérification du décollement des cellules soit après incubation de 5 minutes à 37°C, l'activité enzymatique de la trypsine est stoppée par ajout de milieu de culture complet. La suspension cellulaire, transférée dans des tubes à centrifuger de 15 mL, est centrifugée pendant 10 minutes à 300g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans du milieu de culture complet. Le dénombrement cellulaire est effectué à partir d'un volume de 450µl de suspension cellulaire par comptage manuel à l'aide d'une chambre de Thoma. L'ajout de 50µl de bleu Trypan permet de déterminer le nombre de cellules mortes. Une fois la concentration cellulaire déterminée, les cellules sont réensemencées dans :

- Des boîtes de culture de 75cm<sup>2</sup> (T75) à  $2.10^4$  cellules/mL pour l'entretien hebdomadaire de la lignée cancéreuse
- Des boîtes de culture 25cm<sup>2</sup> (T25) à une concentration cellulaire à  $4.10^4$  à  $6.10^4$  cellules/mL selon la date de pré-incubation des nanoparticules
- Des plaques de culture 6 puits (p6) à une concentration cellulaire d'environ  $2,5.10^5$  cellules/puits

### 1.3.5 Culture des cellules en trois dimensions (3D) pour la formation de sphéroïdes

Afin de permettre la formation de sphéroïdes, il est nécessaire d'empêcher l'adhérence des cellules à leur support de culture. Pour cela, les cellules sont mises en culture à une concentration cellulaire de  $5.10^5$  (U87) ou  $1.10^6$  (U251) cellules/mL dans des boîtes de culture T75 dont le fond est préalablement recouvert d'un revêtement hydrophobe de Poly(2-hydroxyethyl methacrylate), abrégé poly-HEMA, capable d'empêcher l'adhérence cellulaire. Quatre jours après ensemencement, les sphéroïdes sont transférés dans un spinner. Le milieu de culture du spinner est changé tous les sept jours. Les sphéroïdes sont maintenus en culture pendant dix jours après ensemencement. L'ensemble des étapes est illustré dans le schéma ci-contre.

## 1.4 LES EXPERIMENTATIONS MISES EN PLACE POUR LA CARACTERISATION DE LA RADIOSENSIBILITE, DE LA CYTOTOXICITE DES NANOPARTICULES Au@DTDTPA(Gd) ET DE L'EXPRESSION DE LA GFP PAR NOS MODELES CELLULAIRES

Les expérimentations visant à caractériser la radiosensibilité et la cytotoxicité des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) ont été schématisées pour la visualisation de la cinétique expérimentale (**figure 56**).

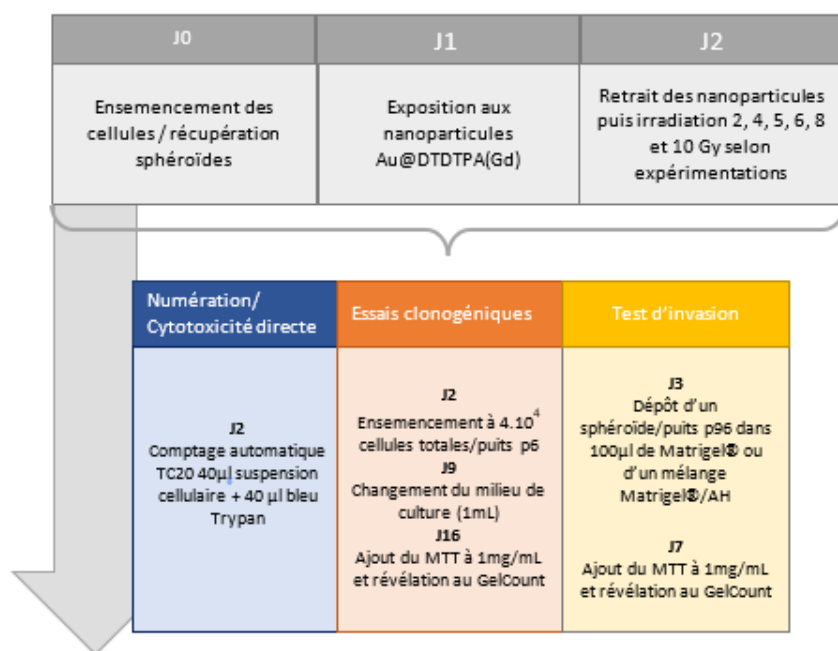


Figure 56. Schématisation de la cinétique de temps des expérimentations mises en place pour la caractérisation de la radiosensibilité et de la cytotoxicité des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les lignées U251 et U87. La numération avec exclusion au bleu de Trypan, les essais clonogéniques et le test de bourgeonnement (test d'invasion) ont été déployés pour cette évaluation.

### 1.4.1 Comptage cellulaire et évaluation de la cytotoxicité directe par test d'exclusion au bleu Trypan

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de culture T25 à une concentration cellulaire de  $4 \cdot 10^4$  cellules/mL pendant 3 jours. Les cellules sont exposées aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à une concentration molaire de 5mM pendant 24 heures. Puis, les cellules sont lavées avec 5mL de HBSS et 6mL de milieu de culture complet a été redéposé dans chaque flasque T25. Les cellules sont ensuite irradiées à des doses de 2, 5 et 10 Gy. 24 heures plus tard, lorsque les cellules ont atteint au moins 90% de confluence, les cellules sont rincées avec 5mL de tampon PBS (Sigma-Aldrich). 1mL de Trypsine + EDTA à 0,05% (v/v) (Gibco, Life Technologies) est ajoutée aux boîtes de culture placées à 37°C. Après vérification du décollement des cellules soit après incubation de 5 minutes à 37°C, l'activité enzymatique de la trypsine est stoppée par ajout de milieu de culture complet. La suspension cellulaire, transférée dans des tubes à centrifuger de 15 mL, est centrifugée pendant 10 minutes à 300g à température ambiante. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans du milieu de culture complet. elles ont été centrifugées à 300G pendant 10 minutes à

température ambiante. Le culot de cellules est resuspendu dans un milieu de culture DMEM complet neuf. Le volume est adapté selon la taille du culot cellulaire. 40  $\mu$ l de suspension cellulaire a été prélevé et mélangé à 40  $\mu$ l de bleu Trypan. Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, 40  $\mu$ l de suspension cellulaire a été prélevé et une partie a été déposée jusqu'à compléter une chambre de lame de comptage pour TC20 (Bio Rad). La taille des cellules analysée par le TC20 est comprise de 8  $\mu$ m à 32  $\mu$ m. Le compteur automatique de cellules donne le pourcentage de cellules viables, le nombre total de cellules par mL et le nombre de cellules viables par mL.

### 1.4.2 Essais clonogéniques

Ce test permet d'évaluer qualitativement et quantitativement la radiosensibilité des cellules, c'est-à-dire leur capacité à former des clones après irradiation. Les cellules de la lignée U251 et U87 sont ensemencées dans des flasques T25 à une concentration cellulaire de  $4 \cdot 10^4$  cellules/mL (environ 70% de confluence) pendant trois jours. Ensuite, les cellules adhérentes sont exposées aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à une concentration molaire de 5mM pendant 24 heures. Puis, les cellules sont lavées avec 5mL de HBSS et 6mL de milieu de culture complet a été redéposé dans chaque flasque T25. Les cellules sont ensuite irradiées à des doses de 2, 4, 6, 8 et 10 Gy.

Après irradiation, le surnageant des flasques T25 est conservé afin de récupérer les éventuelles cellules qui se sont décrochées de leur support au cours de l'irradiation. Les cellules sont trypsinées et ensemencées à une concentration cellulaire de  $4 \cdot 10^4$  cellules totales/puits dans de l'Agar à 0,15% (m/V) contenant du DMEM, du complément et de la Streptavidine/Péniciline. Le mélange Agar 0,15% et suspension cellulaire est ensuite déposé dans des puits de p6 contenant une couche de 1,5mL d'Agar à 0,6% (m/V) contenant du DMEM, du complément et de la Streptavidine/Péniciline. 1mL de milieu de culture complet est déposé au-dessus du mélange Agar 0,15% et suspension cellulaire. Les cellules sont mises à l'incubateur pendant 14 jours avec renouvellement du milieu de culture complet tous les 7 jours.

Au bout de 14 jours et après retrait du milieu de culture complet, les colonies cellulaires ont été colorées par ajout de 1 mL de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide MTT (Acros Organics) à une concentration 1 mg/mL et sont incubées pendant 3 heures avant révélation au lecteur GelCount (Oxford, Optronix).

### 1.4.3 Test d'invasion à partir de sphéroïdes U251 et U87

Les méthodes standards actuelles pour évaluer l'invasion des cellules tumorales *in vitro* sont des essais basés sur les chambres de Boyden ou Transwell chamber. Les suspensions de cellules sont ensemencées sur un filtre muni de pores (8 à 12  $\mu$ m) recouvert d'une couche de molécules de la MEC. Les cellules envahissent ensuite la chambre inférieure en dégradant cette couche et s'y déplacent en réponse à un agent chimio-attracteur. Cependant, ces méthodes ne permettent pas de reproduire le confinement des cellules et sont soumises à de grandes variations expérimentales (Vinci et al. 2015).

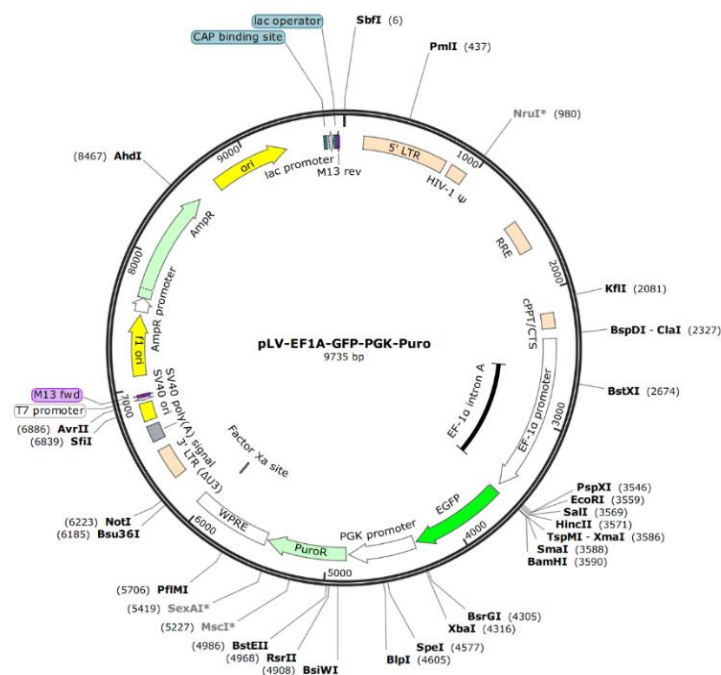
Les sphéroïdes formés à partir des lignées U251 et U87 sont déposés au nombre de quinze par puits de plaque p6 recouverts de polyHEMA. Ensuite, ils sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd)

à une concentration de 5mM pendant 24 heures. Puis, les sphéroïdes sont lavés une fois avec 1mL de HBSS et 2mL de milieu de culture complet est redéposé dans chaque puits. Ils sont ensuite irradiés à des doses de 2, 5 et 10 Gy et sont remis à l'incubateur pendant 24 heures. Puis, les sphéroïdes sont transférés un par un dans des puits de plaque 96 puits et mis en contact avec 100µl de Matrigel® (1 :1 milieu complet). L'acide hyaluronique de poids molécules inférieur à 1000kDa est connue pour augmenter le caractère invasif des glioblastomes. Ainsi, l'ajout de ce glycosaminoglycane dans le Matrigel® permettrait d'obtenir un microenvironnement moléculaire plus en adéquation avec le microenvironnement tumoral. Deux acides hyaluroniques de poids moléculaires faibles (199 kDa et 323 kDa) sont mélangés au Matrigel® pour une concentration finale en acide hyaluronique de 100µg/mL (mélange équimolaire des deux acides hyaluroniques).

Les sphéroïdes sont remis à l'incubateur pendant 4 jours. Le jour de la révélation, les sphéroïdes et les cellules ayant infiltrées le Matrigel® sont colorés par ajout de 50µl de MTT à une concentration de 1 mg/mL et sont remis à incuber pendant 3 heures avant révélation au lecteur GelCount.

#### 1.4.4 Transfection des cellules de la lignée U251 et U87 permettant l'expression de la protéine fluorescente GFP

Afin de réaliser un suivi *in vitro* et *in vivo* des cellules par microscopie de fluorescence, les cellules de la lignée U251 et U87 sont transduites pour permettre l'expression cytoplasmique de la protéine fluorescente GFP. Pour cela, des lentivirus possédant un vecteur (pLV-EF1A-GFP-PGK-Puro, Cellomics Technology) (**figure 57**) contenant le gène codant la protéine fluorescente GFP sont utilisés pour l'infection. L'ensemble de l'infection et des premières étapes de sélection ont été réalisées dans le laboratoire p3 du Biopôle de l'Université de Lorraine par Alicia Château.



**Figure 57. Cartographie génétique du lentivirus pLV-EF1A-GFP-PGK-Puro.** Ce lentivirus de 9735pb possède la séquence codant la protéine fluorescente GFP et une cassette de résistance à la puromycine qui permet la sélection des cellules ayant intégrées le lentivirus.

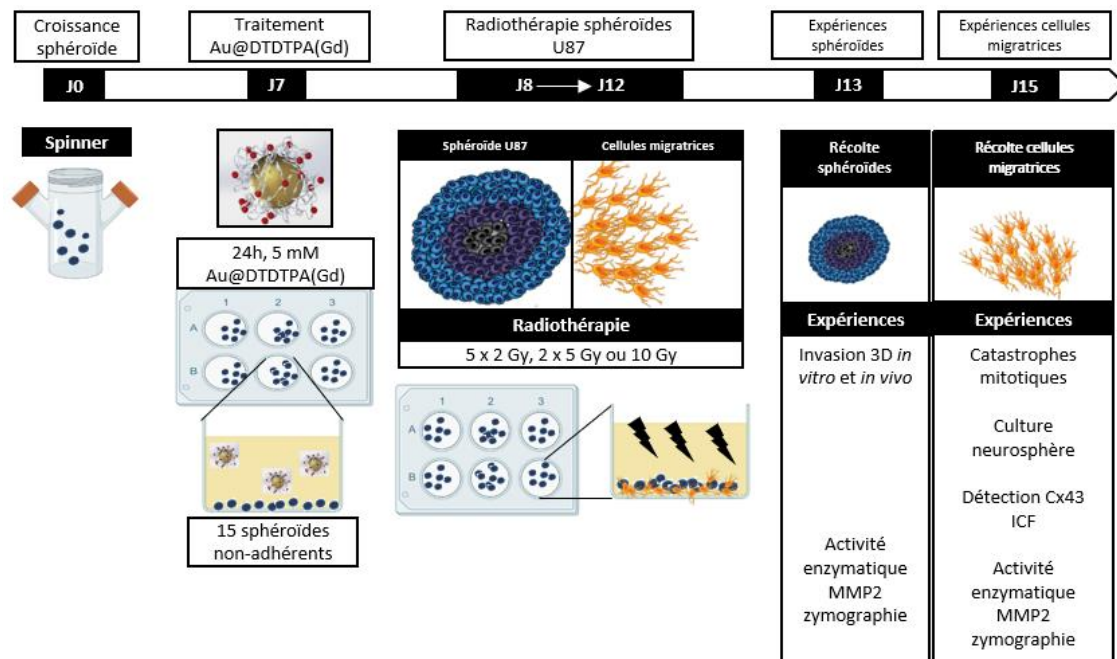
Un jour avant la transduction par les lentivirus, les cellules sont trypsinées et ensemencées dans des plaques p6 à différentes concentrations ( $6.10^4$ ,  $8.10^4$ ,  $10.10^4$ ,  $12.10^4$  et  $25.10^4$  cellules/puits) et placées à l'incubateur. 24h après ensemencement, et selon les recommandations du fournisseur et de la littérature scientifique, l'expérimentation est poursuivie pour une concentration cellulaire de  $12.10^4$  cellules totales/puits. Après retrait du milieu de culture complet, les cellules sont exposées à des concentrations virales de  $1.10^6$  TU/puits (transducing unit). Les cellules sont remises à l'incubateur pendant 48h. Un changement du milieu de culture complet est ensuite réalisé. La sélection des cellules ayant intégrées le vecteur est effectuée par ajout de puromycine à une concentration de  $10\mu\text{g/mL}$  pendant 24h.

## 1.5 LES EXPERIMENTATIONS MISES EN PLACE POUR L'ETUDE DE L'IMPACT DES NANOPARTICULES Au@DTDTPA(Gd) SUR LES PROPRIETES INVASIVES DES CELLULES DE GLIOBLASTOME

L'ensemble du matériel et méthodes pour cette partie des expérimentations est disponible dans la section « Annexes » et sont récapitulées dans l'article publié « *The detrimental invasiveness of glioma cells controlled by gadolinium chelate-coated gold nanoparticles* » (Durand et al. 2021).

## 1.6 LES EXPERIMENTATIONS MISES EN PLACE POUR L'EVALUATION DE L'INTERET THERAPEUTIQUE DE L'ASSOCIATION DES NANOPARTICULES A LA RADIOTHERAPIE SUR LES CELLULES DE GLIOBLASTOME

Les différentes étapes de cette partie du travail de thèse ont été schématisées pour faciliter la visualisation de la cinétique expérimentale (**figure 58**).



**Figure 58.** Schématisation de la cinétique expérimentale pour l'évaluation de l'intérêt thérapeutique de l'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à la radiothérapie sur les cellules échappées U87 et les sphéroïdes U87. Les étapes décrites comprennent la génération des sphéroïdes (J0), les phases de traitement (J7 Au@DTDTA(Gd) et J8 à J12 irradiation) pour lesquelles les cellules commencent à s'échapper des sphéroïdes à partir de la phase d'irradiation, et les phases expérimentales à partir de J13 (sphéroïde) jusque J15 (cellules échappées).

## 1.6.1 Suivi des tests de bourgeonnements des sphéroïdes U87 par vidéomicroscopie

Les sphéroïdes formés à partir de la lignée U87-GFP sont déposés au nombre de quinze par puits de plaque p6 non traités *low attachment*. Ensuite, ils sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à une concentration de 5mM pendant 24 heures (1mL). A ce stade, il n'y a pas de cellules qui s'échappent des sphéroïdes. Puis, les sphéroïdes sont lavés une fois avec 1mL de HBSS et 2mL de milieu de culture complet. Ils sont ensuite irradiés en suivant les protocoles 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10Gy pendant cinq jours. Puis, les sphéroïdes sont transférés un par un dans des puits de plaque 96 puits à fond noir et mis en contact avec 100µl de Matrigel® (1 :1 milieu complet + acide hyaluronique de 100µg/mL). La plaque est ensuite déposée dans l'incubateur intégré dans l'ImageXpress® Micro Confocal, à 37°C sous une atmosphère à 5% en CO<sub>2</sub>. Les acquisitions de la fluorescence du sphéroïde et des cellules invasives sont réalisées toutes les quatre heures avec un objectif Plan APO 10x et les images sont récupérées *via* le logiciel MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

## 1.6.2 Récupération des cellules échappées des sphéroïdes U87

Trois sphéroïdes U87 ont été déposés dans chaque puits de Labtek II 8 puits ou quinze sphéroïdes (U87) en plaque p6 non traités *low-attachment* ont été traités 24 h avec 300 µl à 1 mL de Au@DTDTPA(Gd) à 5 mM respectivement. Ensuite, les sphéroïdes sont rincés avec 300 µl à 1 mL de HBSS, respectivement. 500 µl à 2 mL de milieu complet DMEM respectivement sont ajoutées avant irradiation (5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10Gy pendant cinq jours). Les sphéroïdes sédimentent au fond des puits sans adhérer à leur support pendant cinq jours. Le milieu de culture est renouvelé à J4. A J5, les sphéroïdes sont délicatement retirés et les cellules ayant migré depuis les sphéroïdes vont se multiplier pendant trois jours après la dernière irradiation.

Les comptages cellulaires et l'évaluation de la cytotoxicité par test d'exclusion au bleu Trypan ont été réalisées selon la méthode décrite **à la section 3.1**.

## 1.6.3 Evaluation des catastrophes mitotiques après traitement.

Après récupération des cellules échappées des sphéroïdes U87, les cellules ont été cytocentrifugées à une concentration de  $2,5 \times 10^4$  cellules par lame pendant 1 minutes à 500 rpm (Sakura, AutoSmear CF-12DE). Les cellules ont ensuite été fixées au formol 4% pendant 30 minutes. Les lames ont été rincées à PBS une fois. Les lames ont ensuite été colorées à l'hématoxyline/éosine pour la visualisation des noyaux. La coloration a été réalisée de la manière suivante :

Ethanol Pur	Ethanol 96°C	Ethanol 70°C	Eau distillée	Hématoxyline de Harris	Eau distillée	Alcool chlorhydrique	Eau distillée	Ethanol 70°C	Ethanol 96°C	Ethanol pur	Toluène
5 min	5 min	5 min	5 min	2 min	4 min	5 Sec	4 min	3 min	3 min	5min	5 min

Un montage lame-lamelle a été réalisé en déposant une solution de montage pour coloration histologique (Eukitt®). Les captures d'image des lames ont été obtenues au grossissement x100 à l'aide d'un microscope optique (Nikon, DIAPHOT 300) équipé d'une caméra (Nikon, Digital sight-DS-Fi1). Dix photos par lame ont été prises pour le traitement des données.



### 1.6.4 Immunofluorescence, marquage de la connexine 43 et de l'actine-F sur les cellules échappées des sphéroïdes

Les sphéroïdes U87 ont été ensemencés à raison de trois par puits de Labtek II 8 puits. Les sphéroïdes ont été exposés à 5 mM d'Au@DTDTPA(Gd) pendant 24 h. Les cellules sont ensuite soumises aux différents protocoles d'irradiation (5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10Gy pendant cinq jours). Trois jours après retrait des sphéroïdes, les cellules échappées ont été fixées avec du PFA 4% (v/v) pendant 30 minutes, puis lavées doucement une fois avec du PBS. Les cellules ont subi une perméabilisation douce au Triton-X-100 à 0,1% (v/v) dilué dans du PBS pendant 10 minutes. Les cellules ont été délicatement rincées 5 minutes au PBS. Les cellules ont été saturées dans une solution de BSA à 2% (m/v) diluée dans du PBS pendant une heure. 150 µl d'anticorps primaire anti-connexine 43 (Sigma, C6219) dilué à 1/400 dans une solution de PBS-BSA 2% (p/v) ont été déposés délicatement dans les puits de Labtek II. L'anticorps a été mis à incuber à 4°C sur la nuit. Le lendemain, l'anticorps a été retiré et 3 lavages successifs de 5 minutes au PBS ont été réalisés. La solution contenant l'anticorps secondaire ciblant la partie Fc de l'anticorps primaire a préalablement été mélangée à une solution de phalloïdine conjuguée à l'Alexafluor-488 (Ab176753, Abcam) diluée à 1/1000 dans une solution de PBS-BSA 2% (p/v). L'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 555 (Interchim, FP-SD5000) a été dilué à 1/400 dans une solution de PBS-BSA 2% (p/v). 150 µl du mélange anticorps secondaire/actine-F a été déposé dans les puits de Labtek II pendant une heure dans le noir. Les cellules ont été rincées très délicatement pendant 5 minutes au PBS, 3 fois. Le marquage des noyaux a été réalisé par coloration au Hoechst 33432 (Thermo Scientific, 62249) dilué à 1/1000 dans une solution de PBS pendant 15 minutes. Les cellules ont été rincées une fois au PBS puis une solution contre le photoblanchiment (Ibidi, 50001) a été déposée avant le montage lame-lamelle. La fluorescence de la phalloïdine et de l'anticorps secondaire a été analysée à l'aide d'un appareil ImageXpress® Micro Confocal avec un objectif Plan APO 10x et 20x et le logiciel MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Les acquisitions ont été réalisées en excitant l'Alexafluor 488 et l'Alexafluor 555. La fluorescence émise a été détectée dans la fenêtre de longueur d'onde appropriée. Dix images ont été capturées avec un pas de 0,2 µm z-step.

### 1.6.5 Prélèvement des surnagants des cellules échappées U87 et des sphéroïdes

#### 1.6.5.1 Récupération des surnagants des sphéroïdes

Les sphéroïdes formés à partir de la lignée U87 sont déposés au nombre de quinze par puits de plaque p6 non traitées *low-attachment*. Ensuite, ils sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à une concentration de 5mM pendant 24 heures (1mL). Puis, les sphéroïdes sont lavés une fois avec 1mL de HBSS et 2mL de milieu de culture complet est redéposé dans chaque puits. Ils sont ensuite irradiés en suivant les protocoles 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10Gy pendant cinq jours. Le surnageant des sphéroïdes est retiré et les sphéroïdes sont transférés dans de nouvelles plaque p6 non traitées *low-attachment*. 1mL d'Opti-MEM sans rouge phénol (Reduced Serum Media, Gibco), sans SVF, est ajouté. Les surnageants sont prélevés 16 heures post-irradiation, sur glace, et sont centrifugés à 300G pendant 10 minutes à 4°C pour retirer les débris cellulaires. Ils sont conservés à -20°C.



### 1.6.5.2 Récupération des surnageants des cellules échappées

Après transfert des sphéroïdes dans des nouvelles plaques p6 non traitées *low-attachment*, les plaques contenant les cellules échappées sont conservées. 2 mL de milieu DMEM neuf est ajouté à chaque puits et les cellules échappées prolifèrent pendant trois jours. Au bout du troisième jour, le milieu DMEM est remplacé par 1mL d'Opti-MEM sans rouge phénol (Reduced Serum Media, Gibco), sans SVF. Les surnageants sont prélevés 16 heures après le dépôt de l'opti-MEM, sur glace, et sont centrifugés à 300G pendant 10 minutes à 4°C pour retirer les débris cellulaires. Ils sont conservés à -20°C.

### 1.6.6 Dosage protéique

Le dosage des protéines contenues dans les surnageants cellulaires est réalisé à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Ce kit se base sur la réaction du biuret qui se produit par ajout d'un réactif basique. En effet, une complexation des ions  $\text{Cu}^{2+}$  avec les groupes carbonyles des liaisons peptidiques se produit formant un précipité mauve qu'il est possible de mesurer par colorimétrie à 540 nm.

Pour effectuer ce dosage, une gamme étalonnage basée sur l'albumine bovine (BSA) est réalisée pour des concentrations de 0 à 2000 µg/mL. 20µl de chaque point de la gamme ainsi que 20µl d'échantillons dilués au demi à tester sont déposés dans des puits de plaque p96 en duplicate. Ensuite, 200µl de réactif basique du kit est déposé dans chaque puits. Après homogénéisation sous agitation et à l'abri de la lumière pendant 30 secondes, la plaque p96 est placée à l'incubateur pendant 30 minutes. L'absorbance est mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de spectrométrie Multiskan Ascent (Thermo Fischer).

### 1.6.7 Zymographie

Après dosage protéique des surnageants des sphéroïdes et des cellules échappées U87 à analyser, 12 µg de protéines ont été déposées dans un gel de polyacrylamide à 10% et 1% de gélatine porcine. Les protéines ont migré pendant deux heures à 4°C. La MMP2 a été activée pendant 24 heures à 37°C dans une solution tampon à pH 7,6. Après coloration au Bleu de Coomassie à 0,2% pendant 15min et décoloration pendant 15min à 30min, l'activité MMP a été révélée à l'aide d'un Gel Doc XR+ (Bio Rad).

### 1.6.8 Culture cellulaire neurosphère

Après récupération et comptage des cellules échappées des sphéroïdes U87, les cellules ont étéensemencées à une concentration de  $1 \times 10^5$  cellules par puits dans des plaques 6 puits *low-attachment*. Le milieu de culture utilisé est un milieu DMEM-F12 composé de 0,001% d'insuline (v/v), 1% de pénicilline/Streptomycine (v/v), 2% de réactif B27 (v/v), 1% de réactif N2 (v/v), 0,002% d'EGF (v/v) et de 0,002% de  $\beta$  FGF (v/v). Les cellules ont été placées dans un incubateur thermostaté à 37°C sous atmosphère humide diffusant du  $\text{CO}_2$  à 5% pendant 4 jours. Les neurosphères formées ont été colorées par ajout de 1 mL de MTT à une concentration 1 mg/mL et sont incubées pendant 3 heures avant révélation au lecteur GelCount (Oxford, Optronix).

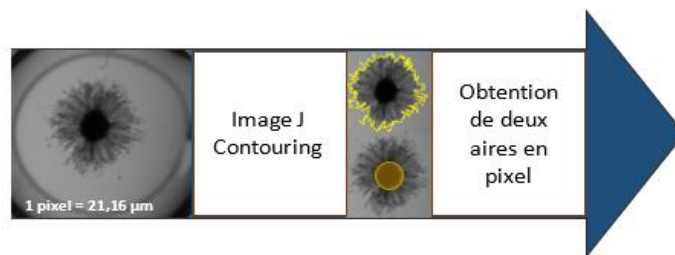
## 1.7 TRAITEMENT ET ANALYSE DES DONNEES

### 1.7.1 Capture et traitement des images des essais clonogéniques

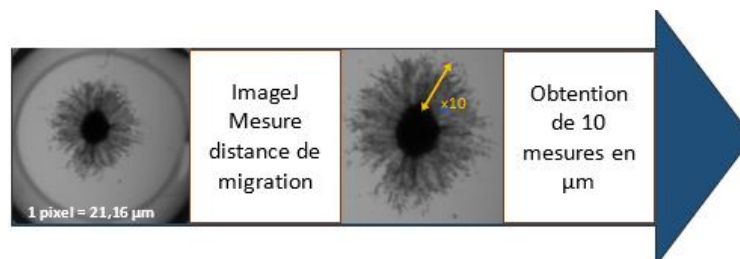
Les photographies des plaques de culture cellulaire utilisées pour les essais clonogéniques sont prises à l'aide du GelCount (résolution 1200 dpi). Le logiciel GelCount est utilisé pour définir le diamètre minimum des colonies cellulaires à prendre en compte dans les comptages des colonies ( $> 50 \mu\text{m}$ ). Les bords des puits ont également été exclus de l'analyse pour éviter la prise en compte des pixels des bords des puits lors du comptage. La Dose Modifying Factor à 2 Gy a été calculée selon la méthode développée dans la thèse de Paul Rétif (Rétif, 2016). Dans notre contexte, ce facteur permet de déterminer de combien la dose d'irradiation peut être réduite en association avec les nanoparticules pour avoir les mêmes effets biologiques que l'irradiation seule.

### 1.7.2 Traitement des données obtenues pour le test d'invasion

Le traitement des données obtenues après invasion est réalisé à l'aide du logiciel Image J et du logiciel GelCount. Dans la littérature scientifique, il n'existe pas de méthodes de mesure de l'invasion standardisées, c'est pourquoi deux méthodes de mesures sur des données non dynamiques sont utilisées (figure 2 et 3).



**Figure 59. Obtention de la surface d'invasion à l'aide du logiciel Image J.** Une fois la prise de photos réalisée à l'aide du GelCount, les contours du sphéroïde sont définis à l'aide du logiciel Image J. Le premier contour a pour limite le front d'invasion du sphéroïde et le deuxième contour définit la masse centrale non invasive du sphéroïde. Deux aires sont ainsi obtenues en pixels qu'il est possible de traduire en surface, en  $\mu\text{m}^2$  ( $1 \text{ pixel} = 2,16\mu\text{m}$ ). L'aire de la partie non invasive est soustraite à l'aire totale permettant d'obtenir l'aire d'invasion, et ainsi la surface d'invasion.



**Figure 60. Obtention de la distance d'invasion à l'aide du logiciel ImageJ.** Une fois la prise de photos réalisée à l'aide du logiciel ImageJ, dix mesures de la distance entre les bords de la masse centrale non invasive et le front d'invasion sont réalisées. A partir de l'échelle obtenue en pixel ( $1 \text{ pixel} = 21,16\mu\text{m}$ ), le logiciel permet d'obtenir directement des mesures en  $\mu\text{m}$ . Les dix mesures sont ensuite moyennées.

### 1.7.3 Capture et traitement des images obtenues pour les catastrophes mitotiques

Les lames contenant les cellules échappées colorées à l'hématoxyline et l'éosine sont observées au microscope optique, au grossissement  $\times 100$ . Dix photos sont prises pour chacune des conditions. Un

comptage du nombre total de cellules présentes sur la photo à l'aide du logiciel ImageJ. Des marqueurs sont ajoutés avec ImageJ pour signifier les cellules ayant plus de deux noyaux. Le pourcentage de catastrophes mitotiques est obtenu en divisant le nombre de cellules à plus de deux noyaux par le nombre de cellules totales x 100.

### **1.7.4 Traitement des données en zymographie**

Les photographies des gels de zymographie obtenues à l'aide du Gel Doc XR+ sont ensuite analysées en utilisant le logiciel ImageJ. Les bandes correspondant à la sécrétion MMP2 sont contourées entre 72 kDa et 62 kDa, en se rapportant au marqueur de taille (bande à 75 kDa). Les bandes correspondant à la MMP2 activées sont contourées à 62 kDa. Le bruit de fond de la membrane est pris en compte en contournant trois parties de la membrane homogène et non digérée par les MMP. La densité de pixels est ensuite calculée par ImageJ, permettant d'obtenir l'intensité de chaque bande MMP2 qui seront ensuite déduites de la moyenne des trois mesures du bruit de fond.

### **1.7.5 Analyse statistique**

Les résultats ont été présentés sous la forme d'histogrammes ou courbes représentatifs de la moyenne des données obtenues. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types obtenus pour les données. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test non paramétrique de Mann et Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7.0. Les valeurs de  $p < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

# RESULTATS & DISCUSSION

# 1 PARTIE I : CARACTERISATION DES MODELES CELLULAIRES ETUDIES : LES LIGNEES U251 ET U87

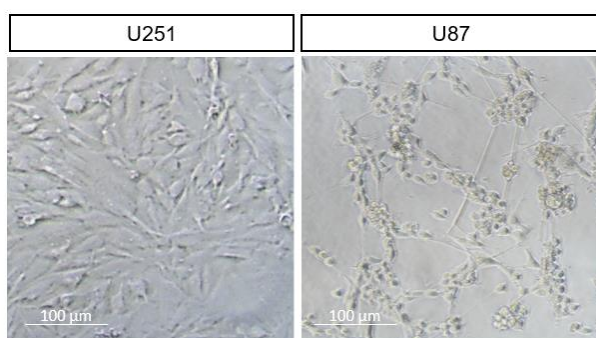
Pour la réalisation de ce projet, nous avons travaillé sur 2 lignées cellulaires de GBM issues de l'ATCC... et qui d'après la littérature, présentent un certain nombre de différences au niveau génotypique (**tableau 3**)

**Tableau 3. Récapitulatif des différences génomiques entre les cellules U87 et U251** (Adapté d'après Clark et al. 2010, Lewis-Tuffin et al. 2010, Torsvik et al. 2014, Li et al. 2017, Song et al. 2017)

Gènes étudiés	U87	U251
P53	Non muté	Perte expression, homozygote
EGFRVIII	Surexprimé	/
CDKN2A et 2B	Déletion	Déletion chr9
PTEN	Perte expression, homozygote	Perte expression, hétérozygote
IDH1	Non muté	Non muté
TERT1	Hausse expression (Substitution promoteur)	Hausse expression (substitution promoteur)
NF1	Diminution expression, heterozygote	Diminution expression
MGMT	Méthylation promoteur	Méthylation promoteur
WNT1	/	Mutation silencieuse
Vimentine	Hausse expression	Hausse expression

## 1.1 MORPHOLOGIE, CROISSANCE ET INVASION.

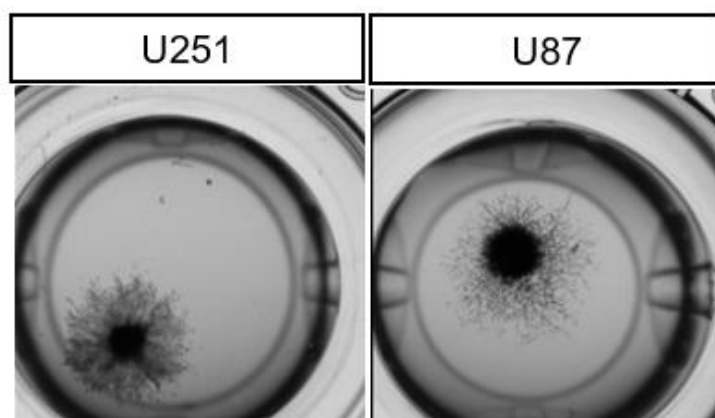
Tout d'abord, lors de la mise en culture monocouche, les cellules U251 prolifèrent en formant progressivement un tapis de cellules jointives, tandis que les cellules U87 restent beaucoup plus dispersées, émettant de longs prolongements, et se mettent à former des îlots 3D à forte densité cellulaire (**figure 61**).



**Figure 61. Observation des cellules U87 et U251 cultivées *in vitro* en monocouche.** Les cellules ont été mises en culture pendant une semaine dans des plaques 6 puits pour la réalisation des photographies à l'aide d'un microscope optique. Les cellules U251 (à gauche) prolifèrent en formant un tapis cellulaire tandis que les cellules U87 forment des îlots et génèrent de longs prolongements interconnectés.

La vitesse de prolifération diffère également entre ces deux lignées. En effet, à densité d'ensemencement équivalente ( $3 \times 10^5$  cellules/boîte de culture T25), le nombre de cellules U251 (en moyenne  $7,6 \times 10^5$  cellules) est deux fois moins élevé que le nombre de cellules U87 (en moyenne  $1,5 \times 10^6$  cellules) après une semaine de culture.

Les cultures cellulaires 3D (sphéroïdes) récapitulent plus précisément la complexité et les interactions cellules-cellules présentes dans les tumeurs. En effet, la prolifération des cellules tumorales au sein du sphéroïde conduit à la formation de gradients de diffusion en nutriments et en gaz ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) jusqu'à la survenue d'une hypoxie et d'une nécrose centrale, et entraîne l'émergence de sous-populations cellulaires plus hétérogènes présentant des comportements cellulaires différents en termes de prolifération, de survie, de migration ou de différenciation (Hirschhaeuser et *al.* 2010). Notamment, lorsque les sphéroïdes sont enchâssés dans une MEC, certaines sous-populations tumorales ont la capacité de s'échapper de celui-ci et de progresser à travers la MEC, imitant le comportement physiopathologique des cellules tumorales infiltrants la MEC (Vinci et *al.* 2015). Ces propriétés sont mises en évidence par le test de bourgeonnement, que nous avons réalisé pour évaluer les propriétés invasives des sphéroïdes U251 et U87. Chaque sphéroïde U87 et U251 sont déposés un à un dans des puits de plaque 96 puits contenant une matrice composée de Matrigel® enrichi en acide hyaluronique puis, les cellules des sphéroïdes envahissent cet environnement matriciel pendant quatre jours. Nous avons constaté que les cellules des sphéroïdes U251 migrent de manière homogène, en formant de long prolongements. Les cellules des sphéroïdes U87 forment un maillage hétérogène, sous forme d'un réseau de cellules interconnectées les unes aux autres. La **figure 62** met en évidence les différences de comportement invasif entre les deux lignées cellulaires : la zone d'invasion paraît très dense sur l'ensemble de la surface pour les sphéroïdes U251, rappelant la formation d'un tapis cellulaire, alors que l'invasion des sphéroïdes U87 s'organise en un réseau peu dense et très étiré composé de cellules moins nombreuses.



**Figure 62. Observation de l'invasion des sphéroïdes U251 et U87.** Les sphéroïdes élaborés à partir des cellules U251 et U87 sont ensemencés dans un mélange Matrigel (1:2) et acide hyaluronique (100  $\mu$ g/mL). L'invasion des sphéroïdes se déroule pendant quatre jours. Les photos ont été réalisées à l'aide du compteur GelCount™ (Oxford Optronix).

Nos résultats préliminaires sont conformes aux données de la littérature. En effet, Diao et *al.* dans un travail récent concernant le comportement des lignées de GBM les plus utilisées, ont observé des différences de prolifération entre les cellules U87 et U251 dans des microchambres 3D contenant du collagène. La prolifération des U87 était supérieure d'un facteur 1,5 par rapport aux cellules U251 tandis que la surface occupée par les cellules U251 était beaucoup plus importante que celle occupée par les cellules U87. Ils ont observé que la vitesse de migration des cellules U87 était plus de trois fois supérieure à celle des cellules U251 et que la lignée U87 adopterait une invasion par clusters alors que la lignée U251 adopterait une invasion par extension dans les cultures 3D *in vitro*. De même, les caractéristiques morphologiques des cellules différaient, les cellules U87 présentant des protrusions trois fois plus longues (en moyenne 90  $\mu$ m vs 30  $\mu$ m) et une longueur maximale quatre fois plus élevée (200  $\mu$ m vs 50  $\mu$ m) que les cellules U251 (Diao et *al.* 2019).



*In vivo*, les différences entre les lignées cellulaires se traduiraient par une infiltration plus importante des cellules U251 dans le parenchyme cérébral par rapport aux cellules U87 alors que la lignée U87 donnerait lieu à une croissance plus importante de la masse tumorale (Jacobs et al. 2011 et Hamilton et al. 2016).

## 1.2 CARACTERISATION DE LA RADIOSENSIBILITE DES DEUX MODELES CELLULAIRES.

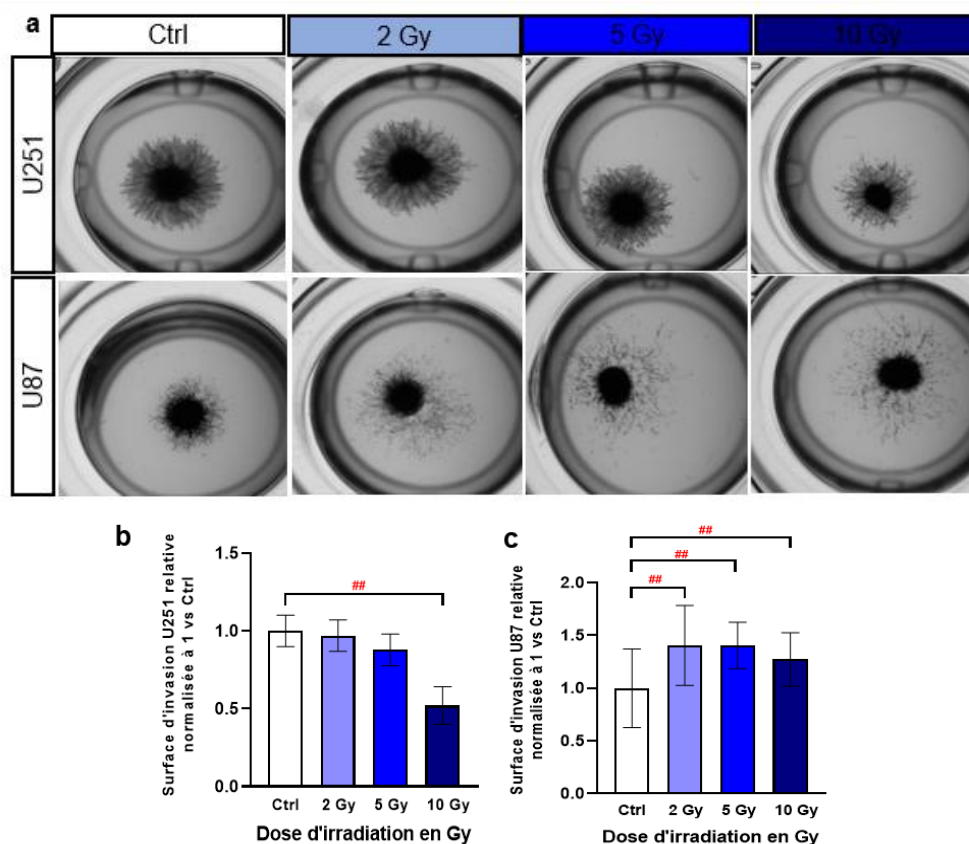
Pour évaluer la réponse à la radiothérapie des cellules de GBM, les essais clonogéniques sont la méthode de choix : ils permettent d'évaluer l'inhibition de la capacité des cellules irradiées à redonner de nouveaux clones, intégrant ainsi les effets anti-prolifératifs, les phénomènes de mort précoce et de mort retardée. Les résultats obtenus sur la lignée U251 montrent que la radiothérapie réduit significativement la fraction de survie : en effet, une dose de 2 Gy réduit de 41% le nombre de colonies U251 formées ( $SF_2 = 59\%$  ;  $p < 0,0001$ ) alors qu'une dose de 10 Gy réduit celui-ci de 80% ( $SF_{10} = 20\%$  ;  $p < 0,0001$ ).

La lignée U87 est beaucoup moins sensible aux effets de l'irradiation puisque le nombre de colonies ne diminue que de 6 % après une dose de 2 Gy ( $SF_2 = 94\%$ ) et de 39% après une dose de 10 Gy ( $SF_{10} = 61\%$ ). Ces résultats sont cohérents avec les résultats d'études antérieures montrant que la lignée U87 est plus radiorésistante que la lignée U251 (Naidu 2010 et Li et al. 2017) .

Par ailleurs, nous avons réalisé des tests de bourgeonnements sur sphéroïdes irradiés : les sphéroïdes ont été traités avec des monodoses de rayons X de 2, 5 ou 10 Gy (**figure 63a**). Sur les sphéroïdes U251, la radiothérapie semble diminuer l'invasion à partir d'une dose de 5 Gy (environ 10%) et cet effet devient statistiquement significatif à 10 Gy (environ 50%,  $p < 0,0001$ ) (**figure 63b**). *A contrario*, nous constatons que la surface d'invasion des sphéroïdes U87 augmente significativement (de 25 à 50 %) dès qu'une irradiation X monodose est appliquée (**figure 63c**). Ces résultats renforcent les différences existant entre les deux modèles cellulaires en termes de radiosensibilité, et suggèrent de surcroît que, l'irradiation X monodose, appliquée à la lignée la plus radiorésistante pourrait jouer un rôle délétère en augmentant le caractère invasif.

Nos résultats, discordants entre les deux lignées, sont représentatifs des contradictions rapportées dans la littérature quant aux effets pro- ou anti-invasifs de la radiothérapie par photons X. Une étude récente incluant différentes lignées cellulaires (LN229, LN18 and U87) et des lignées dérivées de patients (PDX) a globalement montré une stimulation des capacités invasives après une irradiation X de 4 Gy. Seule la lignée LN18 montrait une diminution significative de l'invasion après irradiation (Wank et al. J Neurooncol 2018). Wank et al. ont compilé dans un article de revue une douzaine d'études reflétant l'hétérogénéité de réponse des lignées de glioblastomes traitées par irradiation X (Wank et al. Cancers 2018), avec dans la majorité des cas des effets pro-invasifs (Wild-Bode et al. 2001, De Bacco et al. 2011), et dans certains des effets anti-invasifs (Zhen et al. 2016). Des facteurs tels que la radiosensibilité

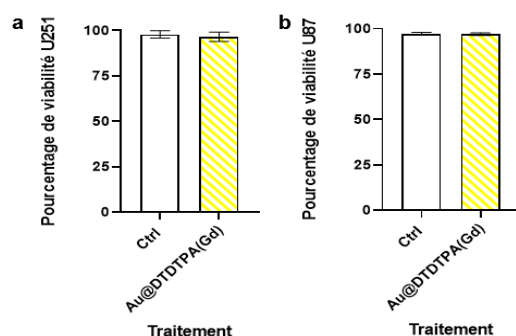
intrinsèque, l'environnement cellulaire ou l'énergie des rayonnements X utilisés pour les expérimentations pourraient expliquer ces contradictions.



**Figure 63. Impact de la radiothérapie sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U251 et U87.** Les sphéroïdes U87 et U251 sont irradiés à des doses de 2, 5 et 10Gy. Les sphéroïdes sont ensemencés dans un mélange de Matrigel® enrichi en acide hyaluronique à 100 µg/mL, 24 heures post-irradiation (a). La surface d'invasion est mesurée pour chaque sphéroïde à l'aide d'image J. Les gradations de bleu correspondent à des irradiations de plus en plus fortes. Les données sont exploitées de manière indépendante ( $n \geq 14$  sphéroïdes pour  $n \geq 3$  expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque sphéroïde U251 (b) et U87 (c). Les barres d'erreurs représentent les écart-types. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### 1.3 CARACTERISATION DES EFFETS DES NANOPARTICULES Au@DTDTPA(Gd)

Dans cette étude préliminaire, nous avons également évalué l'effet direct des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la viabilité immédiate des cellules U251 et U87 ainsi que sur leurs capacités clonogéniques. Nous n'avons pas constaté de diminution de la viabilité immédiate par les nanoparticules, que cela soit pour la lignée U87 ( $97\% \pm 1\%$ ) que la lignée U251 ( $97\% \pm 1,5\%$ ). (figure 64).

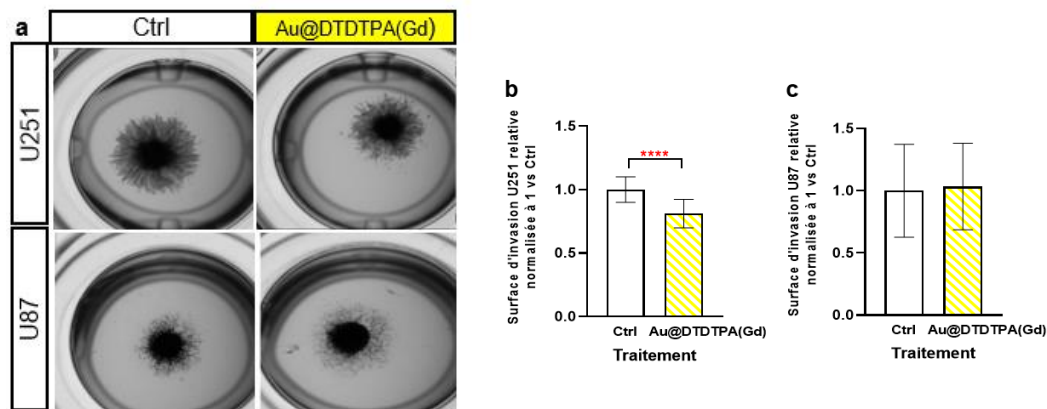


**Figure 64. Effets des nanoparticules sur la cytotoxicité directe des lignées U251 et U87.** Les cellules sont exposées aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) pendant 24h à une concentration de 5 mM puis les cellules sont trypsiniées pour un comptage automatique. Les cellules mortes sont discriminées par test d'exclusion au bleu Trypan, donnant un pourcentage de viabilité pour les cellules U251 (a) et U87 (b). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque pourcentage viabilité. Les barres d'erreurs représentent les écart-types.

Nos résultats montrent que l'exposition des cellules U251 aux nanoparticules à 5 mM pendant 24h entraîne une diminution des capacités clonogéniques de 30% ( $p < 0,0001$ ) au bout de 14 jours alors que les nanoparticules n'ont aucun impact sur la fraction de survie des cellules U87.

Des tests de bourgeonnement ont été réalisés en parallèle pour déterminer l'effet des nanoparticules seules sur les capacités invasives des deux modèles cellulaires (**figure 65a**). L'exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) diminue d'environ 20% la surface d'invasion des sphéroïdes U251 par rapport aux témoins non traités (**figure 65b**) alors qu'elle ne modifie pas la surface d'invasion des sphéroïdes U87 (**figure 65c**).

Dans la littérature, il a déjà été montré à l'aide de tests en chambre de Boyden, que les nanoparticules d'oxyde de fer sont capables d'entraîner une diminution des capacités invasives de la lignée U251, suggérant une sensibilité des cellules U251 aux nanoparticules métalliques (Ren et al. 2018). Même si l'effet inhibiteur n'est pas systématiquement retrouvé, différents travaux antérieurs portant sur des nanoparticules inorganiques de nature diverses ont conclu à un effet majoritairement anti-migratoire tant sur les cellules cancéreuses que sur les cellules saines (Zhou et al. 2014, Tran et al. 2016, Kutwin et al. 2017).



**Figure 65. Effets des nanoparticules sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U251 et U87.** Les sphéroïdes U87 et U251 sont exposés aux nanoparticules à 5 mM pendant 24h. Les sphéroïdes sont ensemencés dans un mélange de Matrigel® enrichi en acide hyaluronique à 100 µg/mL (a). La surface d'invasion est mesurée pour chaque sphéroïde à l'aide d'image J. Les hachures jaunes correspondent aux nanoparticules. Les données sont exploitées de manière indépendante ( $n \geq 14$  sphéroïdes pour  $n \geq 3$  expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque sphéroïde U251 (b) et U87 (c). Les barres d'erreurs représentent les écart-types. \*\*\*\*  $< 0,0001$

L'ensemble de ces caractérisations préliminaires suggère que la lignée U251 est une lignée plus sensible aux traitements (radiothérapie ou nanoparticules) que la lignée U87. Actuellement, il est encore difficile de comprendre pourquoi de telles différences existent entre les lignées cellulaires primaires de GBM. Le statut P53 (muté pour les cellules U251 versus wild-type pour les cellules U87), pourtant central dans la régulation de la tumorigenèse (métabolisme cellulaire, migration, caractère souche, survie, microenvironnement tumoral, réponses inflammatoires et réponse immunitaire), ne permettrait pas d'expliquer le potentiel invasif des cellules (Zhang et al. 2018). La forte prolifération des cellules

U87 pourrait être expliquée par la surexpression du récepteur EGFR par rapport aux cellules U251 dont l'expression n'est pas amplifiée (**tableau 3**).

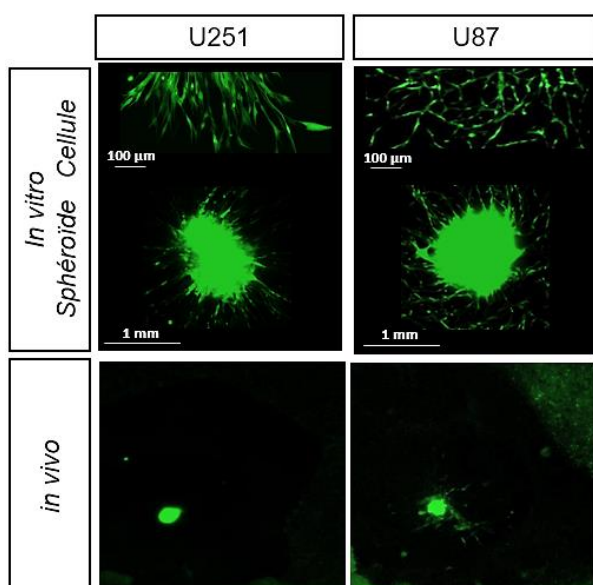
## 1.4 MISE EN PLACE DES MODELES CELLULAIRES EXPRIMANT LA GFP

Pour étudier leur pouvoir migratoire et invasif, nous avons besoin de suivre le déplacement des cellules tumorales gliales dans leur environnement, au cours du temps. Le suivi dynamique des cellules tumorales invasives *in vitro* ou *in vivo* est difficilement réalisable en microscopie optique mais beaucoup plus accessible en microscopie de fluorescence. Le suivi du fluorophore Green Fluorescent Protein (GFP) exprimé par les cellules tumorales est depuis de nombreuses années déployé pour les suivis *in vivo* en raison de la puissance du signal de la GFP et la facilité d'accès aux équipements de microscopie de fluorescence dans les laboratoires. L'expression de la GFP par les cellules tumorales permet non seulement de visualiser chaque cellule individuellement *in vitro* mais encore de réaliser des suivis de croissance tumorale par microscopie intravitale *in vivo* chez la souris. C'est pourquoi, pour la bonne conduite de ce projet, le laboratoire a souhaité mettre en place des lignées cellulaires de GBM exprimant la GFP.

### 1.4.1 Validation de l'expression de la GFP dans les lignées U87 et U251

#### 1.4.1.1 Observation de l'expression de la GFP dans différents types de cultures cellulaires

Les cellules de la lignée U251 et U87 ont été infectées par des lentivirus possédant une cassette (pLV-EF1A-GFP-PGK-Puro, Cellomics Technology) contenant le gène codant la GFP pour permettre l'expression cytoplasmique de la GFP. Comme présenté sur la **figure 66**, l'expression de la GFP a été validée par l'observation microscopique des cellules tumorales en fluorescence en culture 2D monocouche, révélant une répartition homogène dans tout le cytoplasme des cellules analysées. De même, lors de la croissance de sphéroïdes *in vitro*, l'expression de la GFP semble homogène sur l'ensemble de la sphère, validant la stabilité de l'expression malgré l'émergence de sous-populations hétérogènes. *In vivo*, après l'implantation des sphéroïdes U87-GFP ou U251-GFP dans le cortex des souris immunodéficientes, nous avons pu suivre, par microscopie intravitale à travers la fenêtre



**Figure 66. Mise en évidence de l'expression de la protéine fluorescente GFP par les cellules U251 et U87 par microscopie de fluorescence.** Les cellules, transfectées par lentivirus pour l'expression de la protéine GFP, représentent le modèle cellulaire utilisé pour l'ensemble des expérimentations. L'expression de la GFP est suivie par microscopie de fluorescence en culture 2D et 3D *in vitro*. Les sphéroïdes sont ensuite implantés à la surface du cortex cérébral du modèle murin mis en place au sein du laboratoire. Une petite partie du crâne est remplacée par une lamelle de verre permettant d'obtenir un accès au cortex cérébral pour réaliser un suivi à long terme.

crânienne, la progression tumorale (croissance de la masse centrale et dissémination des cellules infiltrantes) des sphéroïdes U251 et U87 pendant plusieurs semaines. Lors de ce suivi, nous n'avons pas observé de perte de fluorescence, ce qui signifie que l'expression de la GFP perdure dans le temps.

#### 1.4.1.2 Analyse de la différence de comportement des deux lignées

*In vivo*, nos observations ont révélé des différences dans les profils de croissance et d'invasion des deux modèles : les sphéroïdes U87-GFP implantés à la surface du cortex donnent lieu à une forte croissance de la masse centrale entourée d'une couronne de cellules infiltrantes très marquée tandis que la croissance de la masse centrale des sphéroïdes U251-GFP est beaucoup plus lente et l'infiltration visible à la surface du cortex est plus diffuse et moins dense. Nos observations semblent en concordance avec les descriptions faites par Jacobs et *al.* à partir de coupe de cerveaux colorées à l'hématoxyline/éosine. Cette équipe a rapporté que les cellules U251 greffées ont plus tendance à infiltrer de manière diffuse tandis que les cellules U87 greffées ont plus tendance à former une masse tumorale croissante et à infiltrer plus localement (Jacobs et *al.* 2011). Cependant, le suivi du sphéroïde dans notre modèle *in vivo* est uniquement de surface, nous ne sommes pas en mesure d'imager en profondeur l'infiltration tumorale pour déterminer la nature de l'infiltration des deux lignées (infiltration le long des vaisseaux, des faisceaux de fibres blanches, etc).

### 1.4.2 Caractérisation de l'expression de la GFP sur le comportement des cellules de glioblastome

#### 1.4.2.1 Effet de la transduction sur la viabilité immédiate et la croissance cellulaire

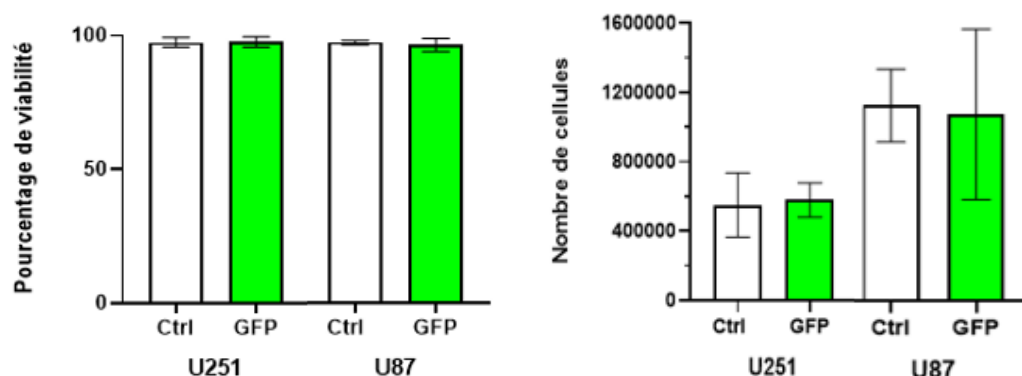
Puisque le lentivirus ne contient pas de séquence permettant une intégration localisée dans le génome des cellules, l'insertion du gène GFP se fait de manière aléatoire, ce qui peut provoquer des modifications du phénotype cellulaire et des processus physiologiques tels que la prolifération et la migration (Gill et Dehnam, 2020). La réalisation d'un séquençage entier du génome des cellules U87 et U251 transduites aurait permis de vérifier que le gène codant la GFP n'était pas localisé dans une région « critique » pour la cellule mais aurait été insuffisant pour mesurer l'impact sur le comportement cellulaire global. Aussi, dans le cadre de notre étude, pour valider l'inocuité de la transduction, nous avons préféré comparer les lignées U251-GFP et U87-GFP avec leur lignée initiale U251 et U87 respectivement, en termes de viabilité cellulaire, de prolifération et d'invasion.

Dans un premier temps, nous avons alors choisi d'évaluer la cytotoxicité immédiate de la transduction avec une numération des cellules et une mesure de la viabilité par test d'exclusion au bleu Trypan, un colorant vital utilisé en routine qui est exclu par les transporteurs exprimés à la surface des cellules viables (Strober et *al.* 2015). Les premiers tests d'exclusion au bleu de trypan ont été réalisés cinq passages après la transduction, pour des cellules cultivées une semaine. Les tests ont montré que la transduction n'impactait ni la prolifération ( $5,5 \times 10^5$  contre  $5,7 \times 10^5$  cellules), ni la viabilité (97% pour les cellules saines et transfectées) des cellules U251 ou des cellules U87 ( $1,08 \times 10^6$  cellules pour une viabilité à 97% contre  $1,04 \times 10^6$  cellules pour une viabilité à 96%) (**figure 67**).

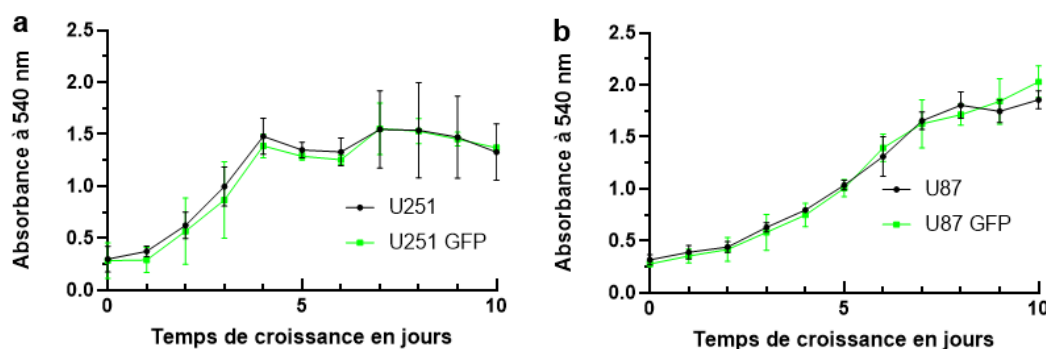
Nous avons évalué la cinétique de croissance des cellules U87 (**figure 68a**) et U251 (**figure 68b**) transduites par l'évaluation de l'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase mitochondriale

(test MTT). Les courbes de croissance obtenues après un suivi de sept jours ont démontré que la transfection n'affectait pas la cinétique de croissance quelle que soit la lignée cellulaire considérée.

Ainsi, ces données confirment que la transduction n'induit pas de cytotoxicité directe entre les deux lignées et que la croissance cellulaire n'est pas affectée. Cependant, ces deux tests ne permettent pas des analyses fonctionnelles : le test MTT ne permet de rendre compte que des aspects métaboliques de la cellule par exemple (Van Merloo et al. 2011).



**Figure 67. Effets de la transduction sur la cytotoxicité directe et le nombre de cellules U251 et U87.** Les cellules exprimant la GFP ou non sont trypsiniées après une semaine de prolifération pour un comptage automatique. Les cellules mortes sont discriminées par test d'exclusion au bleu Trypan, donnant un pourcentage de viabilité pour les cellules U251-GFP, U251 et U87-GFP, U87. Le nombre de cellules a également été calculé. Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque pourcentage viabilité et nombre de cellules ( $n \geq 5$ ). Les barres d'erreurs représentent les écart-types.



**Figure 68. Influence de l'expression de la GFP sur la croissance des cellules U251 et U87.** Les deux lignées sont mises en culture en plaque p96 pendant 10 jours. Chaque jour, une plaque est incubée 30 minutes au MTT et une lecture de l'absorbance est réalisée pour la lignée U251-GFP/U251 (a) et la lignée U87-GFP/U87 (b). Les cinétiques de croissance sont représentées sous la forme de courbe représentative de la moyenne de quatre expérimentations indépendantes. Les barres d'erreurs représentent les écart-types.

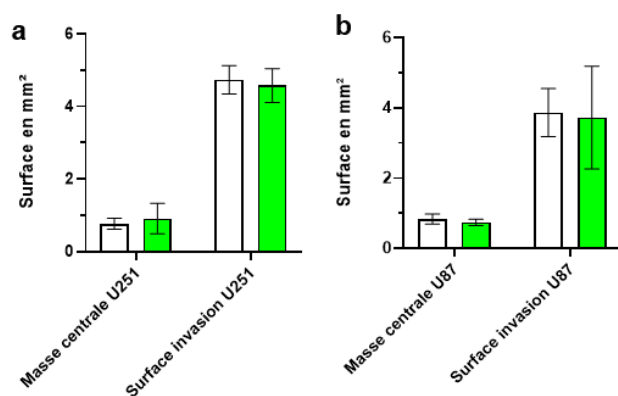
#### 1.4.2.2 Effet de la transduction sur les capacités invasives des sphéroïdes

Nous avons donc réalisé des tests de bourgeonnement pour évaluer l'impact de la transduction sur les propriétés invasives des sphéroïdes U251-GFP et U87-GFP (par rapport aux sphéroïdes U251 et U87, respectivement).



La masse centrale et la surface d'invasion atteignent respectivement 0.76 mm<sup>2</sup> et 4.74 mm<sup>2</sup> pour les sphéroïdes U251 versus 0.90 mm<sup>2</sup> et 4.57 mm<sup>2</sup> pour les sphéroïdes U251-GFP après 4 jours de culture (pas de différence significative) (**figure 69a**). De la même manière, la masse centrale et la surface d'invasion atteignent respectivement 0.78 mm<sup>2</sup> et 3.87 mm<sup>2</sup> pour les sphéroïdes U87 versus 0.74 mm<sup>2</sup> et 3.73 mm<sup>2</sup> pour les sphéroïdes U87-GFP après 4 jours de culture (**figure 69b**).

Ces résultats montrent que, quelle que soit la lignée considérée, la transduction ne modifie pas les propriétés invasives de nos cellules tumorales.



**Figure 69. Effets de l'expression de la GFP sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U251 et U87.** Les sphéroïdes sont ensemencés dans un mélange de Matrigel® enrichi en acide hyaluronique à 100 µg/mL. La surface d'invasion est mesurée pour chaque sphéroïde à l'aide d'image J. Les gradations de bleu correspondent à des irradiations de plus en plus fortes. Les données sont exploitées de manière indépendante ( $n \geq 14$  sphéroïdes pour  $n \geq 3$  expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque sphéroïde U251 (b) et U87 (c). Les barres d'erreurs représentent les écart-types. \*\*\*\*  $p < 0,0001$

## 1.5 Bilan des études préliminaires

La caractérisation de nos modèles cellulaires met en évidence des divergences de comportement entre les deux lignées étudiées. En particulier, les cellules U251 présentent un potentiel invasif plus marqué et une plus grande sensibilité directe à l'action des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd), tandis que les cellules U87 présentent une plus grande radiorésistance. En revanche, l'expression de la GFP n'a pas d'impact significatif sur le comportement cellulaire, quelle que soit la lignée considérée. Au regard de ces résultats, nous avons sélectionné la lignée U251 (exprimant ou non la GFP) pour décrypter aux échelles moléculaires et cellulaires les effets directs des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les capacités migratoires et invasives des cellules de glioblastome. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Nanoscale* en 2021 présentée dans la seconde partie de ce chapitre. Pour évaluer l'intérêt de l'association de la radiothérapie avec les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd), nous avons préféré la lignée U87, qui nous est apparue plus pertinente car plus représentative de la radiorésistance des GBM. Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication scientifique en préparation.



## 2 PARTIE II : EFFETS DES Au@DTDTPA(Gd) SUR LES CAPACITES MIGRATOIRES ET INVASIVES DES CELLULES U251

### 2.1 PUBLICATION N°1 : THE DETRIMENTAL INVASIVENESS OF GLIOMA CELLS CONTROLLED BY GADOLINIUM CHELATE-COATED GOLD NANOPARTICLES (DURAND ET AL. 2021).

#### 2.1.1 Contexte scientifique de l'étude

Le glioblastome est une tumeur dont la progression rapide et la grande agressivité résultent de l'activation de mécanismes d'invasion locale complexes et efficaces. Les cellules tumorales périphériques dégradent localement la MECc normale et resynthétisent une MECc tumorale (qui diffère par sa structure spatiale, la taille des pores, sa rigidité, sa composition moléculaire, etc) propice au déplacement des cellules tumorales. Le but est d'ouvrir des voies de passage pour faciliter la propagation des cellules dans le parenchyme cérébral sain. Le processus d'invasion implique également des changements dans l'architecture de la cellule, et plus spécifiquement la capacité de la cellule à remodeler son cytosquelette pour pouvoir se mouvoir, s'accrocher à son microenvironnement moléculaire et à adapter sa morphologie aux contraintes spatiales de la MECc (Cuddapah et al. 2014).

Dans la littérature, il a été démontré que les nanoparticules à base d'or avaient un impact sur ces différents processus chez différentes cellules cancéreuses, le plus souvent *in vitro* à partir de tests standards de migration (test de blessure 2D) et d'invasion (test 3D en chambre de Boyden). Certains travaux suggéraient également des effets des nanoparticules d'or sur la structuration du cytosquelette (architecture globale du cytosquelette d'actine, fibres de stress d'actine-F, émission des prolongements, etc) (Wu et al. 2018). L'utilisation d'autres nanoparticules à base d'oxyde métalliques comme le dioxyde de titane ou l'oxyde de zinc, modifieraient également les capacités d'adhésion des cellules cancéreuses (Wang et al. 2017) ainsi que les propriétés biomécaniques de la cellule comme la rigidité membranaire (De Matteis et al. 2019) et la topographie globale de la cellule (Pan et al. 2014).

Dans ce contexte, nous avons conduits des travaux originaux consistant à étudier les effets des nanoparticules hybrides à base d'or et de gadolinium (Au@DTDTPA(Gd)), développées initialement pour des applications théranostiques (*in vitro* et *in vivo*), sur le processus d'invasion de cellules de GBM U251 à différents niveaux de la cellule.

**A partir de culture monocouche 2D et de culture de sphéroïdes 3D, nous avons tenté de décrypter les effets des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la capacité des cellules de GBM à dégrader la MEC pour progresser, leur capacité à se mouvoir et les atteintes sur leurs capacités adhésives et biomécaniques.**

#### 2.1.2 Les principaux résultats obtenus

##### 2.1.2.1 Incorporation et distribution des Au@DTDTPA(Gd) dans les cellules U251

L'accumulation et la localisation des nanoparticules dans les cellules est dépendante de leur taille, de leur forme ainsi que de leur revêtement de surface (Huang et al. 2012), c'est pourquoi nous avons quantifié leur concentration dans les cellules par ICP-MS et déterminé leur localisation par microscopie

de fluorescence STED après 24h. L'ICP-MS a mis en évidence une accumulation massive des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) indépendante de leur concentration dans les cellules U251 ( $6.99 \times 10^6 \pm 5.46 \times 10^4$  nanoparticules par cellules pour 5 mM) (**Tableau 4**).

**Tableau 4. Quantification de l'or dans les cellules U251 par analyse ICP-OES.** Les cellules U251 maintenues en culture monocouche ont été exposées pendant 24h à Au@DTDTPA(Gd) à 1 ou 5 mM. Après élimination des nanoparticules, les cellules ont été rincées, détachées, comptées et centrifugées pour obtenir un culot. Les échantillons ont ensuite été minéralisés et ont été traités comme décrit dans la section Matériel et Méthodes.

Au@DTDTPA(Gd) concentration	Quantité d'or ( $\mu\text{g}$ )	Nanoparticules/cellule
1 mM	$0.48 \pm 0.042$	$6.17.10^6 \pm 5.65.10^4$
5 mM	$0.55 \pm 0.037$	$6.99.10^6 \pm 5.46.10^4$

La microscopie STED a montré une accumulation des nanoparticules préférentielle au niveau du cytoplasme sans colocalisation spécifique avec un organe défini. Par ailleurs, de très nombreux signaux de fluorescence punctiformes périnucléaires ont également été détectés, ce qui indique également une localisation périnucléaire des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) (**figure 70**).

Une localisation périnucléaire des nanoparticules a déjà été rapportée dans la littérature pour des nanoparticules sphériques de différents matériaux dont l'or, et dont le diamètre est inférieur à 25 nm. Cette particularité entraînerait des perturbations du fonctionnement de la cellule, notamment en perturbant les propriétés biomécaniques de la membrane nucléaire, ce qui serait susceptible d'affecter la motilité des cellules (Foroozandeh et Aziz, 2018).

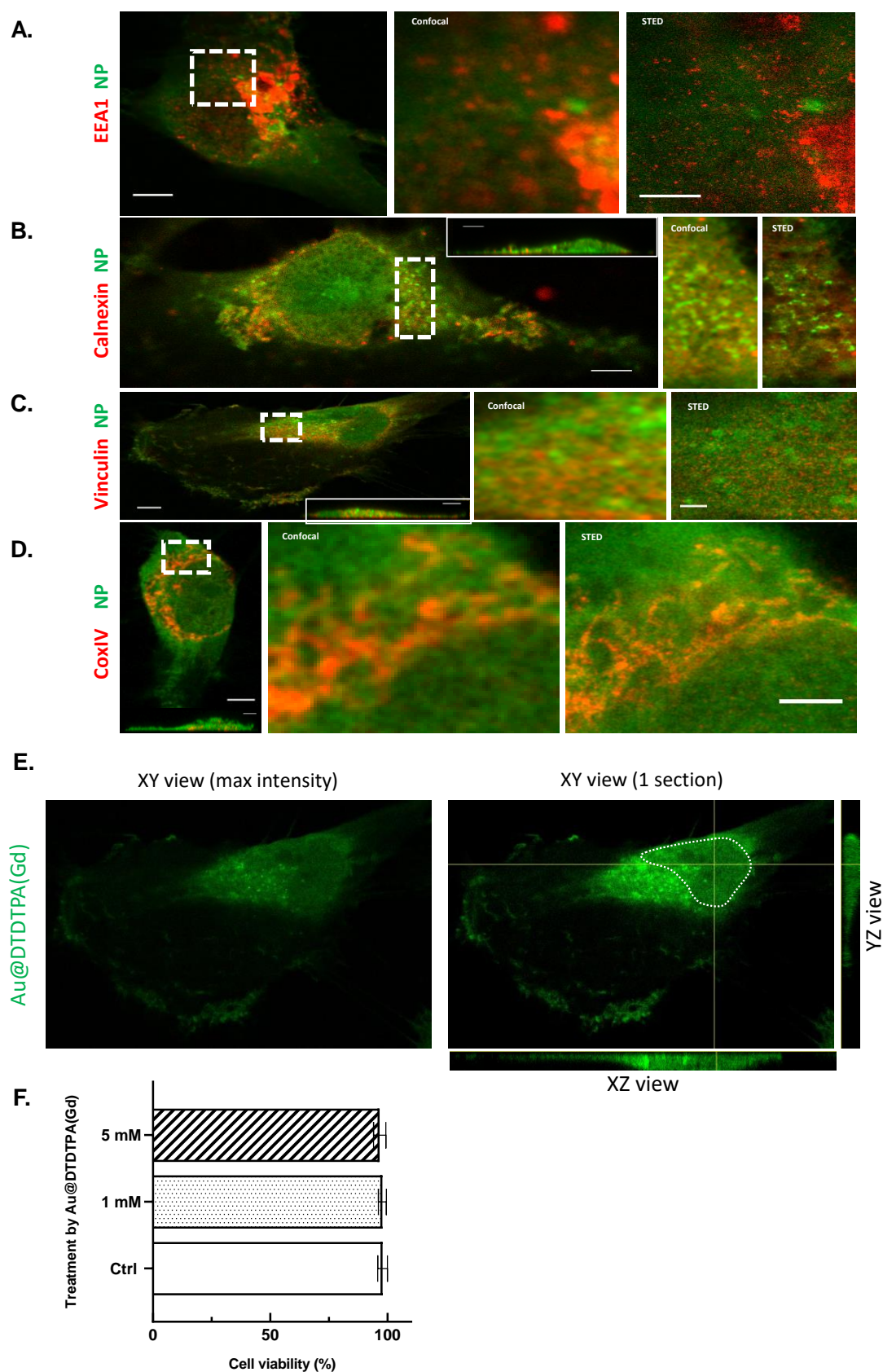
#### 2.1.2.2 Impact des nanoparticules sur les capacités invasives et la motilité des cellules U251

##### 2.1.2.2.1 Effets des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la capacité des cellules U251 à envahir la MEC

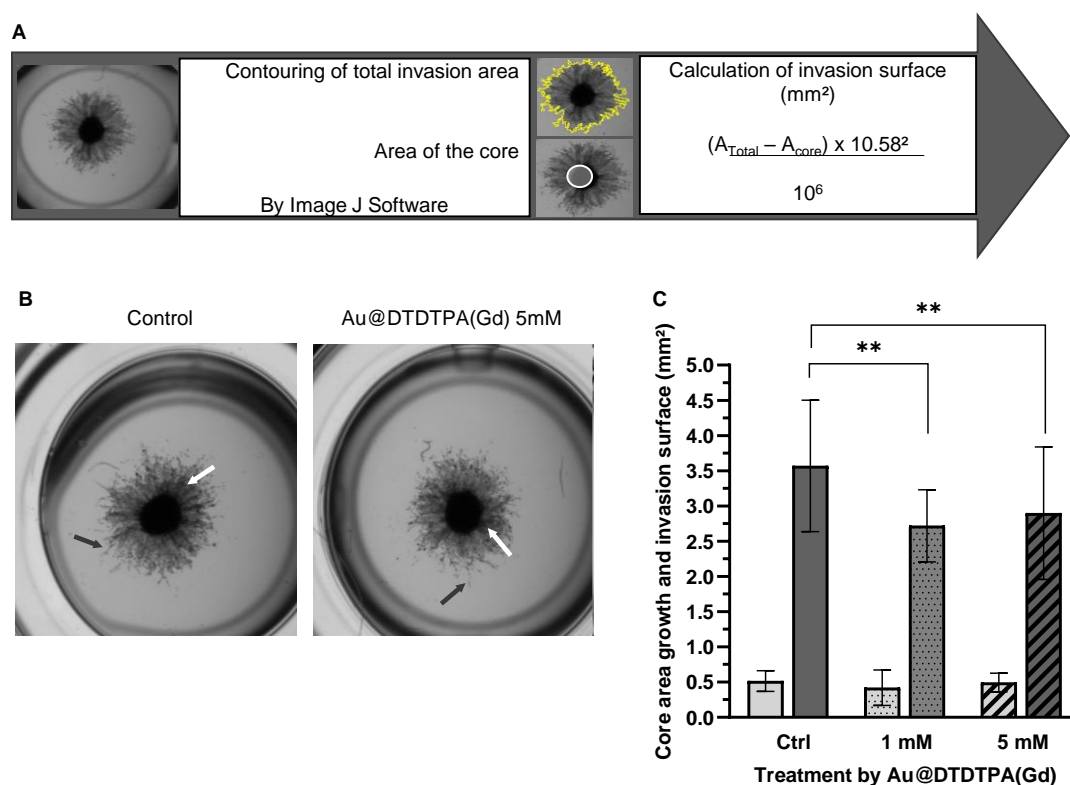
La capacité des cellules cancéreuses à progresser à travers la MEC est le plus souvent étudiée *in vitro* en réalisant des tests d'invasion en chambre de Boyden (Falasca et al. 2011). Cependant, ce test est soumis à une grande variabilité car il dépend du chimiotactisme cellulaire, du *design* des pores et du choix de la MEC. De plus, le test en chambre de Boyden est réalisé sur des cellules individualisées et ne sont en contact avec la MEC qu'à partir de l'ensemencement. Afin de reproduire des conditions plus proches de la physiologie, nous avons évalué l'invasion des cellules de GBM exposées aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) pendant 24h à l'aide d'un test de bourgeonnement. Ce test 3D, basé sur l'ensemencement des sphéroïdes dans une MEC, permet de récapituler certains paramètres observés *in vivo* comme les gradients en gaz et en nutriments et la façon dont les cellules envahissent la MEC depuis la masse (Goertzen et al. 2018).

Dans la littérature, les résultats 2D *in vitro* avaient déjà démontré une diminution des capacités invasives des cellules cancéreuses après exposition aux nanobâtonnets à base d'or (Zhou et al. 2014) mais aussi pour des nanoparticules à base d'autres matériaux comme l'oxyde de cerium (Giri et al. 2013). Dans notre étude, lorsque les sphéroïdes U251 sont exposés préalablement aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) pendant 24h, la croissance de la masse centrale ne change pas par rapport aux sphéroïdes témoins quatre jours post-ensemencement (environ  $0,51 \pm 0,03 \text{ mm}^2$  pour le contrôle,  $0,42$

$\pm 0,08 \text{ mm}^2$  pour 1 mM et  $0,49 \pm 0,03 \text{ mm}^2$  pour 5 mM) (**Figure 71b**). En revanche, l'invasion cellulaire des sphéroïdes diminue de 20-25% en réponse aux nanoparticules, et ceci de manière dose-indépendante (1 mM et 5 mM) (**Figure 71c**).



**Figure 70. Localisation des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) dans les cellules U251.** (A-D) Pour préciser la distribution subcellulaire des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd), des expériences de microscopie confocale et STED ont été réalisées en utilisant des Au@DTDTPA(Gd) marqués à la cyanine3 (fluorescence verte) et des marqueurs de compartiments particuliers (fluorescence rouge) : Les anticorps marqués avec STAR RED étaient dirigés contre (A) EEA1 pour les endosomes, (B) calnexin pour le réticulum endoplasmique rugueux, (C) vinculine pour les complexes d'adhésion focale et (D) CoxIV pour les mitochondries. Panneau de gauche : vue confocale d'une cellule fixe (barre d'échelle 5 µm). Une région délimitée par un rectangle blanc en pointillés a été agrandie pour l'analyse confocale (panneau du milieu) ou STED (panneau de droite) (barre d'échelle 2 µm). (E) Intensité maximale de l'image dans les sections XY, XZ et YZ à travers les noyaux de U251 après exposition à Au@DTDTPA(Gd)-Cy3 (1 mM). La section XY montre une tranche à travers le noyau d'une seule cellule U251 ; la section XZ montre une coupe le long de la ligne jaune horizontale à travers le noyau ; la section YZ montre une coupe le long de la ligne jaune verticale. La ligne pointillée blanche délimite le noyau de la cellule. Le signal de fluorescence vert correspond à Au@DTDTPA(Gd) : seules les nanoparticules qui traversent la coupe donnée sont visibles. Le profil d'intensité du vert indique une forte accumulation des nanoparticules à la périphérie du noyau ainsi que leur présence dans une moindre mesure dans le noyau. (F) Sur la base du test d'exclusion au bleu Trypan et du compteur cellulaire automatisé TC20™, les cellules viables ont été déterminées dans des cultures cellulaires témoins (Ctrl) ou 24 h après exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) (1 mM ou 5 mM). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type (n ≥ 4).



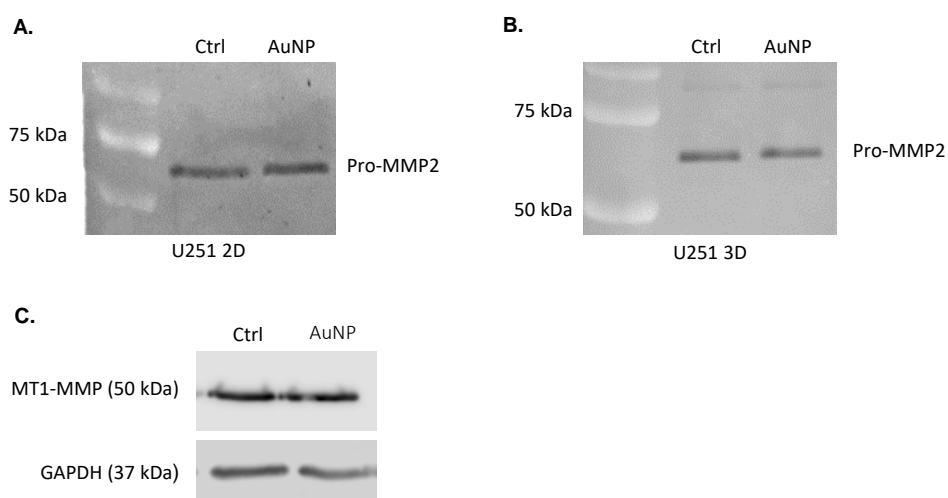
**Figure 71. Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur l'invasivité des cellules U251 selon un test d'invasion 3D.** Des sphéroïdes U251 (~ 450 ± 70 µm de diamètre) ont été exposés à des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) 1- ou 5-mM pendant 24 h. Après l'élimination des nanoparticules, les sphéroïdes ont été ensemencés dans des plaques de culture à 6 puits (un sphéroïde par puits) et chacun a été inclus dans un mélange de Matrigel®, milieu de culture complet enrichi en acide hyaluronique. (A) En utilisant le logiciel ImageJ, la zone totale d'invasion (délimitation manuelle jaune) et la zone centrale (délimitation blanche) ont été déterminées 4 jours après l'ensemencement pour chaque sphéroïde, permettant de calculer la "surface d'invasion" (1 pixel = 10,58 µm). (B) Des images représentatives de l'invasion pour des sphéroïdes non traités ou traités par Au@DTDTPA(Gd) ont montré des zones d'invasion collective (flèches blanches) et individuelle (flèche noire). (C) Les histogrammes représentent la croissance du noyau (mm<sup>2</sup>) et la surface d'invasion (mm<sup>2</sup>) pour les sphéroïdes non traités ou traités au Au@DTDTPA(Gd). Les résultats sont présentés en moyenne ± SD (n ≥ 11 sphéroïdes pour au moins n ≥ 3 expériences indépendantes). \*\*p < 0,01 selon le test U de Mann-Whitney.

Nos observations sont concordantes avec une étude préalable montrant que les nanoparticules à base d'or étaient non seulement capables d'altérer le processus d'invasion *in vitro* sur des cellules cancéreuses mammaires, mais encore de réduire la dissémination métastatique *in vivo*, chez des souris porteuses de xénogreffes MDA-MB231 orthotopiques. Les auteurs ont en effet montré une diminution de 75% du nombre de nodules métastatiques développés au niveau des poumons, douze semaines après injection des cellules cancéreuses mammaires pré-exposées 24h à des nanobâtonnets d'or (Zhou et al. 2014).

Concernant les cellules de GBM douées d'une très grande plasticité, l'infiltration dans la MEC résulte d'une part, du remodelage de la MEC et d'autre part, de leurs capacités à se mouvoir. C'est pourquoi, nous avons évalué les capacités protéolytiques des cellules ainsi que leur motilité post-traitement.

#### 2.1.2.2.2 Evaluation de l'activité protéolytique des cellules U251 exposées aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd)

L'activité protéolytique des cellules de GBM pour la dégradation de la MEC passe par plusieurs enzymes dont les plus étudiées sont les MMP2, MMP9 (sécritée) et MMP14 (transmembranaire). Des publications qui se sont intéressées à l'altération des capacités invasives des nanoparticules métalliques ou à base d'oxydes métalliques ont montré que l'expression en ARNm et l'activité protéolytique des MMP pouvaient être corrélées à une perte des capacités invasives des cellules cancéreuses. Nous avons alors évalué l'activité de la MMP2 sécrétée en zymographie et l'expression protéique de la MMP14 active par Western Blot après exposition des cellules U251 aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) pendant 24h (après avoir démontré l'expression en ARNm de MMP2 et MMP14 par RT-qPCR). Nous avons constaté que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) n'affectaient ni l'activité enzymatique de la MMP2 ni l'expression membranaire de la MMP14 active dans les cellules U251 (figure 72).



**Figure 72. Analyse de l'activité et de l'expression des protéases matricielles sécrétées par les cellules de GBM traitées aux Au@DTDTPA(Gd).** (A et B) Analyse de l'activité de MMP2 par zymographie pour les cellules 251 sur les surnageants de cultures monocouches (A) et de cultures sphéroïdes (B) exposées ou non à 5 mM de Au@DTDTPA(Gd). Des photos représentatives de trois expériences indépendantes sont présentées. (C) Analyse de l'expression de MMP14 (ou MT1-MMP) par Western-Blot pour les cellules U251. La protéine de référence utilisée pour normaliser les résultats est la GAPDH (n = 3 expériences indépendantes).



Si de nombreuses études corrélaient la perte des capacités invasives avec une inhibition de l'activité enzymatique des protéases, certaines recherches ont démontré que l'action des nanoparticules à base de métaux étaient variables sur les systèmes protéolytiques des cellules cancéreuses et saines. Shin et *al.* ont démontré que les nanoparticules hétérométalliques or et platine diminuent l'activité MMP2 et MMP9 des cellules de cancer du rein EJ mais pas HUC, suggérant que les effets pourraient être lignée-dépendante (Shin et *al.* 2018).

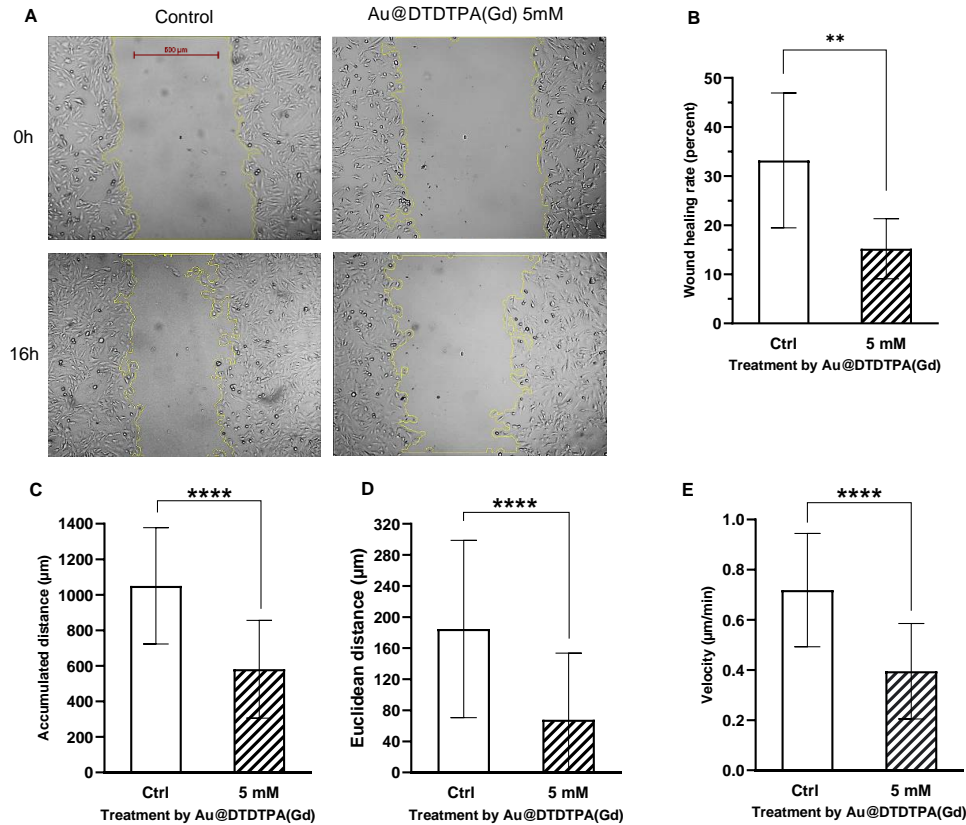
#### 2.1.2.2.3 Evaluation de la motilité des cellules U251 après exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd)

La motilité des cellules de GBM est complexe, incluant des phases de migration individuelle où quelques cellules périphériques se détachent de la masse tumorale centrale pour créer de nouvelles voies de passage, et de migration collective où les cellules de GBM migrent en *cluster*, c'est-à-dire en maintenant des jonctions intercellulaires (Friedl et *al.* 2012). L'évaluation de la migration des cellules U251 post-traitement par le test usuel de migration, le test de blessure, n'est pas suffisant car il ne permet d'évaluer que la migration collective (**figure 73a et b**). Nous avons donc couplé ce test avec des analyses de suivis vidéomicroscopiques de la migration individuelle des cellules U251 exposées ou non aux nanoparticules pendant 24h (**figure 73, c, d et e**).

La majorité des études ont montré que la motilité des cellules cancéreuses exposées aux nanoparticules d'or était négativement impactée. Parmi ces études rapportant une action anti-migratoire, cinq d'entre elles ont rapporté une diminution de la migration collective (évaluée par test de blessure) (Tan et Onur, 2018) et cinq d'entre elles ont rapporté une diminution de la migration individuelle (évaluée par test en chambre *transwell*) (Huai et *al.* 2019).

Le test de blessure que nous avons réalisé a montré que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) diminuent la motilité cellulaire de 50% après 16h de migration. En parallèle, les suivis en vidéomicroscopie réalisés sur les cellules individualisées exposées ou non aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) ont démontré que les nanoparticules diminuaient la vitesse des cellules traitées d'environ 40%, la distance cumulée d'environ 40% ainsi que la distance euclidienne (la longueur du segment reliant deux points) d'environ 40% après 24h de suivi de migration.

La migration individuelle et la migration collective nécessitent le remodelage du cytosquelette, l'adhérence des cellules au support matriciel et une grande capacité à se déformer pour accompagner le mouvement et s'adapter aux contraintes physiques. Potentiellement, chacune de ces différentes étapes pourrait être la cible des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) : c'est pourquoi, nous avons mis en place différentes approches expérimentales pour comprendre comment les nanoparticules interféraient dans le processus de motilité.



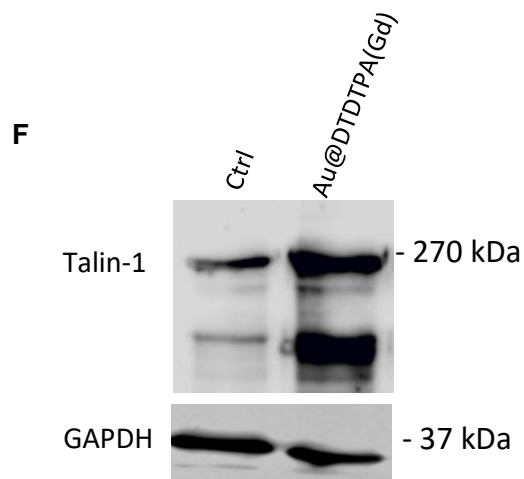
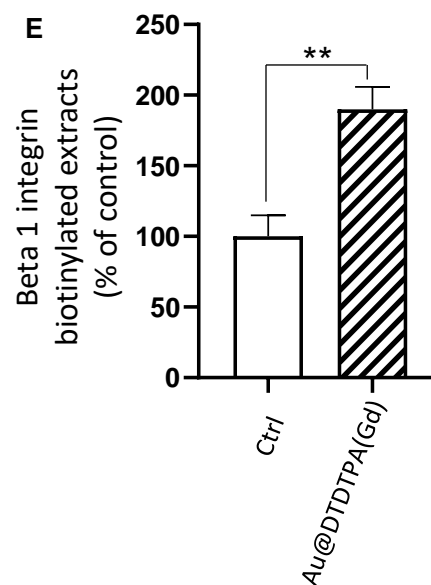
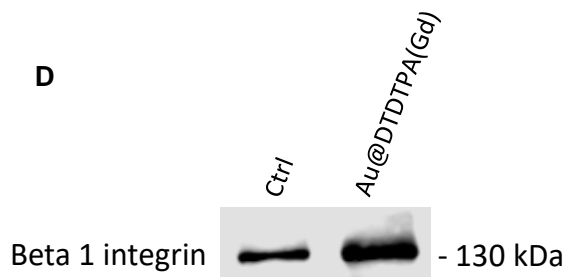
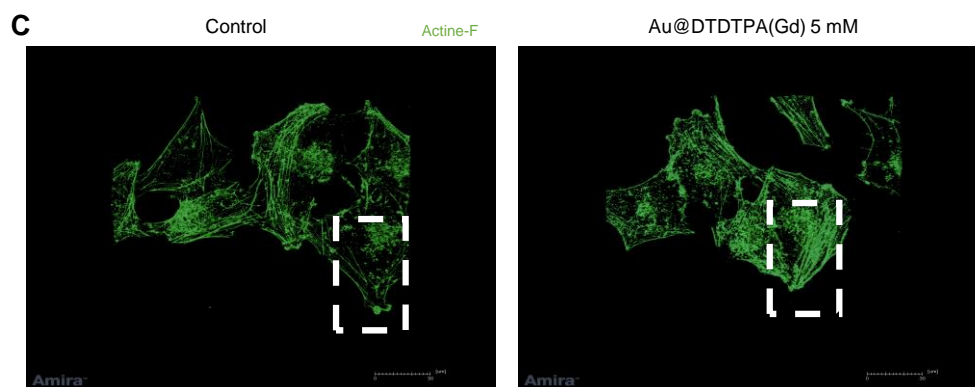
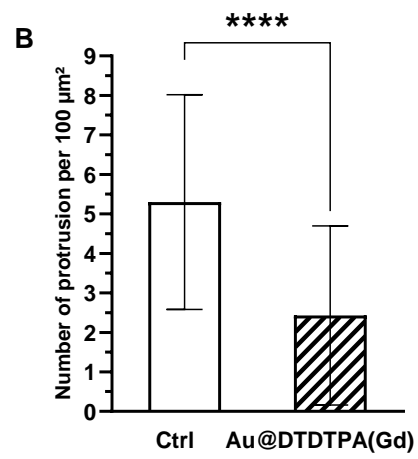
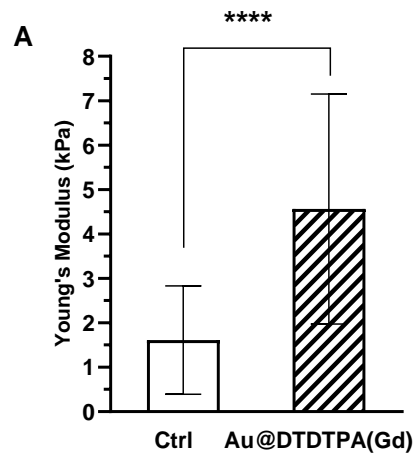
**Figure 73. Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la migration collective et individuelle des cellules U251.** (A et B) La migration collective des cellules de gliome U251 a été évaluée en utilisant des tests de cicatrisation. Dès que les nanoparticules ont été retirées, une rayure a été faite dans la monocouche confluente de cellules U251 et (A) des photographies (grossissement X40) ont été capturées immédiatement et 16 h après la rayure. Les images représentatives montrent le remplissage de l'espace dans les conditions de contrôle (Ctrl) ou après 24 h d'exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) 5 mM. (B) Le plugin "MRI wound healing assay tool" du logiciel ImageJ a été utilisé pour mesurer la surface de la brèche à 0 h et 16 h, et calculer les taux de cicatrisation tels que représentés sur les histogrammes. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SD ( $n = 8$  expériences indépendantes). (C-E) La migration individuelle a été suivie par vidéomicroscopie. Après avoir étéensemencées sur des lamelles recouvertes de fibronectine, 48 cellules non traitées ou traitées aux nanoparticules ont été suivies individuellement pendant 24 h par vidéomicroscopie (objectif de grossissement X20, utilisant un Zeiss Axio Observer). Les histogrammes représentent (C) la distance cumulée (D) la distance euclidienne (E) et la vitesse. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$  et \*\*\*\* $p < 0,0001$  selon le test U de Mann-Whitney.

### 2.1.2.3 Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la morphologie et les propriétés biomécaniques des cellules U251

#### 2.1.2.3.1 Evaluation de la rigidité cellulaire et de la topographie de la cellule post-traitement

La régulation de l'élasticité de la membrane plasmique par les cellules migratrices est une des clés de la mise en mouvement des cellules. La migration/rigidité de la cellule contribue à la migration, à différents niveaux tels que l'avancée du front de migration et la rétraction du pôle arrière de la cellule (Hetmanski et al. 2019). La microscopie de force atomique (AFM) permet d'évaluer la rigidité membranaire des cellules et d'obtenir des informations topographiques (Luo et al. 2016). La quantification de la rigidité cellulaire sous la forme du module d'Young ainsi que l'obtention d'informations sur les structures de la cellule permettent de discriminer les effets d'un traitement sur la cellule par rapport à l'état basal.





**Figure 74. Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la biomécanique et la morphologie cellulaire des cellules U251.** (A-B) Des mesures AFM ont été réalisées pour évaluer la densité de surface des protubérances et les propriétés mécaniques des cellules (caractérisées par le module de Young) des cellules U251 traitées ou non avec Au@DTDTPA(Gd). Un minimum de 50 cellules pour chaque condition a été analysé. (A) Le module d'Young et (B) le nombre de protubérances par 100  $\mu\text{m}^2$  ont été reportés sur des histogrammes. (C) Images z-stack représentatives du cytosquelette de F-actine (Alexa Fluor™ 488 Phalloïdine) obtenues par microscopie confocale. (D-E) Effet des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur l'expression membranaire de l'intégrine Beta 1. (D) Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de cellules U251 biotinylées traitées ou non par des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) 5 mM. L'expression de l'intégrine Beta 1 localisée à la surface des cellules a été analysée par SDS-PAGE à 10% suivi d'un western blotting. (E) L'expression de l'intégrine Beta 1 a été quantifiée par densitométrie et les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes et exprimés en moyenne  $\pm$  SD par rapport au contrôle (100%). (F) Effet des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur l'expression de Talin-1 (taille réelle). Des extraits cellulaires ont été préparés à partir de cellules U251 traitées ou non par des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) 5 mM. L'expression de Talin-1 a été analysée par SDS-PAGE à 10% suivi d'un western blot.

Les analyses AFM ont permis de mettre en évidence que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) multipliait par 3 le module d'Young, traduisant une augmentation de la rigidité membranaire de cellules U251 exposées aux nanoparticules (**figure 74a**). De plus, les analyses AFM ont permis de mettre en évidence une diminution du nombre de protrusions cellulaires d'environ 50% lorsque les cellules U251 sont exposées aux nanoparticules par rapport aux cellules U251 non traitées (**figure 74b**).

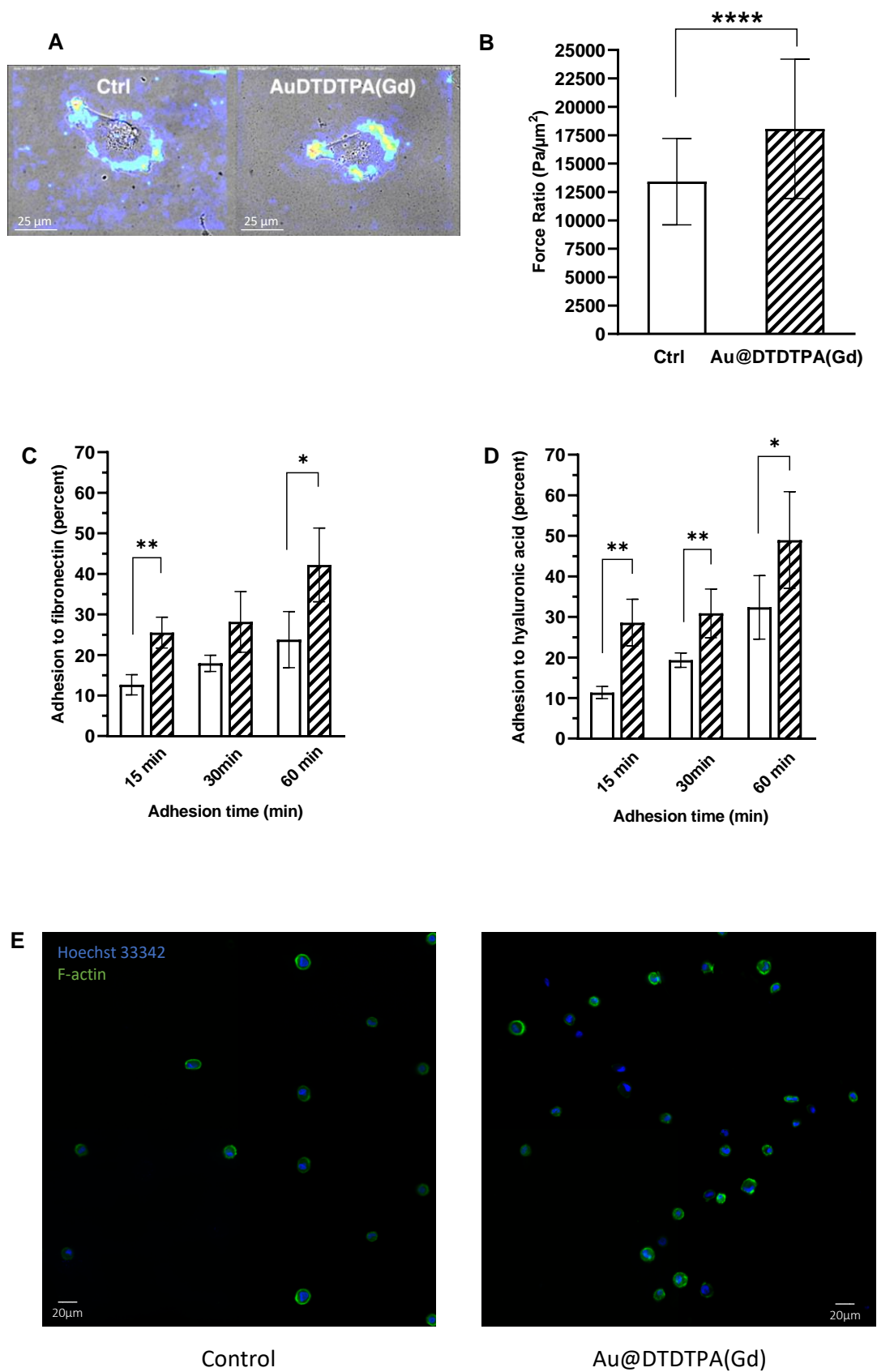
Nos résultats sont concordants avec ceux de Vieira et *al.* rapportant que des nanosphères d'or étaient capables de réduire la migration individuelle de fibroblastes, et ceci était corrélée à une diminution du nombre de protrusions détectés en microscopie de fluorescence. Les travaux de Vieira et *al.* avaient également montré que leurs nanoparticules d'or altéraient l'organisation globale du cytosquelette d'actine des fibroblastes (Vieira et *al.* 2017). Ceci nous a amené à nous demander si les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) modifiaient l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules U251.

#### 2.1.2.3.2 Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur l'architecture du cytosquelette d'actine et les protrusions cellulaires

Au cours de la migration, les filaments d'actine s'organisent en domaines subcellulaires distincts, dont les protrusions de la membrane plasmique permettant les interactions cellule-MEC telles que les points focaux. Ces derniers servent de sites d'ancrage pour de longs prolongements épais d'actine-F, les fibres de stress, assurant la contractilité de la cellule (Schaks et *al.* 2019). Nous avons voulu savoir si les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) modifiaient l'architecture du cytosquelette d'actine, notamment au niveau des protrusions des cellules U251 traitées. Les observations en microscopie confocale de fluorescence ont mis en évidence une nette différence dans le marquage de l'actine entre les cellules non traitées et les cellules Au@DTDTPA(Gd). Alors que seul le cortex d'actine est visible dans les cellules témoins, les cellules exposées aux Au@DTDTPA(Gd) présentent des fibres de stress bien marquées et une actine corticale plus épaisses. Au niveau des protrusions cellulaires, l'actine-F apparaît également plus concentrée dans les cellules traitées par rapport aux cellules témoins (**figure 74c**).

Pour comprendre si ces modifications du cytosquelette d'actine affectent l'adhésion cellulaire, nous avons analysé les forces de tractions déployées par les cellules pour s'accrocher à un support par microscopie de force de traction (TFM). En parallèle, nous avons réalisé un test d'adhésion usuel afin d'obtenir des informations sur l'adhérence globale précoce des cellules (analyse des forces de traction (3h) et test d'adhésion à 15min, 30min et 60min). Nous avons constaté une augmentation des forces d'accroche des cellules U251 exposées aux nanoparticules d'environ 25% par rapport aux cellules non

traitées (**figure 75a et b**) ainsi qu'une augmentation de l'adhérence précoce des cellules U251 exposées aux nanoparticules dès 15min d'adhérence (facteur trois) (**figure 75c, d et e**).



**Figure 75. Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les forces de traction et l'adhésion.** (A) Instantanés représentatifs de l'analyse TFM de cellules uniques avec la force représentée en magnitude des cellules témoins (à gauche) et des cellules traitées par les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) (à droite) superposés avec la segmentation cellulaire utilisée pour l'intégration de la force. (B) Rapport de force (en pN/μm<sup>2</sup>) correspondant à l'intégration des valeurs de force sur la surface obtenue par la segmentation des cellules U251 non traitées et traitées aux nanoparticules et normalisée par la valeur de surface. (C et D) Après 24 h d'exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) 5 mM, les cellules U251 ont été exposées au Hoechst 33342 au 1/1000 pendant 15 minutes. Ensuite, les cellules ont été trypsinées et placées sur des plaques 48 puits recouvertes de (C) fibronectine ou (D) d'acide hyaluronique pendant 15, 30 et 60 minutes. Les intensités de fluorescence (λ<sub>exc</sub>/λ<sub>em</sub> : 350/461nm pour le Hoechst 33342) ont été enregistrées. Les histogrammes représentent le pourcentage de cellules ayant adhéré après 15, 30 et 60 minutes. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SD (n = 7 expériences indépendantes). \*p < 0,05 et \*\*p < 0,01 selon le test U de Mann-Whitney. (E) Des images représentatives des cellules attachées sur la surface recouverte de fibronectine au point temporel 15 min ont été capturées pour les cellules U251 traitées ou non par les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) 5 mM (F-actine- vert, noyau - bleu).

Les adhésions au niveau des protrusions passent par la fixation des intégrines aux molécules de la MEC. Cette liaison induit le recrutement des fibres de stress d'actine aux domaines intracellulaires des intégrines. La fixation des fibres de stress est un processus qui est facilité par une série de protéines cytoplasmiques interagissant entre elles dont la taline fait partie (Ziegler et al. 2008). Nous avons quantifié l'expression protéique membranaire de la sous-unité β1 des intégrines (**figure 74d et e**) et de l'expression protéique de la taline-1 par Western Blot sur les cellules témoins et exposées aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) (**figure 74f**). Nous avons montré que les cellules U251 exposées pendant 24h aux nanoparticules expriment plus fortement la sous-unité β1 des intégrines (environ deux fois plus) et la taline-1 que les cellules U251 non traitées.

Nos résultats obtenus ne sont pas en adéquation aux résultats des études sur l'effet des nanoparticules métalliques sur la migration. Karuppaiya et al. et (nanoparticules d'or, 14 nm, sarcome) et Wu et al. (nanobâtonnets d'or, 25 nm long et 6 nm large, cancer col de l'utérus) ont observé une diminution de la migration associée à une diminution du nombre de fibres d'actine-F (fibres de stress et diminution de leur diamètre dans le cas de Wu et al.) (Karuppaiya et al. 2013, Wu et al. 2018). Wang et al. (Oxyde de zinc, 10 et 30 nm, cancer du sein) et Song et al. (gadolinium, <100 nm, glioblastome) ont tous les deux observé une diminution de la migration en test de blessure associée à une diminution de l'adhésion cellulaire après 15 minutes (Song et al. 2010, Wang et al. 2017). Enfin, Ibrahim et al. (oxyde de titane, 40 nm, os) ont rapporté une augmentation de la migration et de la vitesse des cellules en test de blessure associée à une augmentation de l'expression protéique de la vinculine, une autre protéine adaptatrice des fibres de stress, et une diminution de la phosphorylation Y397 FAK, une protéine majeure des plaques d'adhérence, par Western Blot (Ibrahim et al. 2018).

Prises ensemble, et comparées à nos résultats, ces données indiqueraient que les variations de la migration par les nanoparticules métalliques seraient nanoparticules-dépendantes, ayant des conséquences variables sur l'architecture du cytosquelette d'actine, l'adhésion et sur l'expression des protéines adaptatrices du cytosquelette d'actine.

#### 2.1.2.4 Conclusions principales de l'étude

Pris ensemble, nos résultats ont démontré que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) possèdent des propriétés anti-invasives sur les cellules U251 de GBM, qui sont associées à une inhibition de la motilité cellulaire à la fois individuelle et collective. La perte de la migration serait due à une perturbation de la rigidité cellulaire, une diminution du nombre de protrusions cellulaires et un renforcement du

cytosquelette d'actine-F au niveau des protrusions. Ces événements seraient associés à un renforcement précoce de l'adhésion et une augmentation de l'expression protéique des protéines adaptatrices du cytosquelette et de l'adhésion.

### 2.1.3 Perspectives liées au travail

#### 2.1.3.1 *Etude des interactions des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) avec le cytosquelette d'actine*

##### 2.1.3.1.1 Contexte de la question scientifique

A ce jour, la majorité des résultats publiés dans la littérature suggèrent que les nanoparticules inorganiques provoquent une modification de l'architecture globale du cytosquelette des cellules qui les incorporent (Kashani et Packirisami et *al.* 2021). Nos nanoparticules ont également un impact sur l'architecture du cytosquelette des cellules U251 mais nous n'en connaissons pas la cause.

Des approches en microscopie confocale de fluorescence sur cellules et en microscopie FLIM (Time-correlated single photon counting fluorescence lifetime imaging microscopy) sur les cellules cancéreuses Hela ont permis de démontrer que des nanofeuillets à base de carbone étaient capables de se lier à l'actine-F mais pas à l'actine-G (Holt et *al.* 2012). Wei et *al.* se sont également intéressés à l'interaction des nanoparticules d'argent de 30 nm avec les fibres d'actine-F isolées de cardiomyocytes (Wen et *al.* 2013). Des études expérimentales et des simulations informatiques ont démontré que des nanoparticules d'argent chargées positivement présentaient une affinité plus forte pour des protéines chargées négativement. Les imageries hyperspectrales des fibres d'actine-F isolées des cardiomyocytes combinées à des analyses en TEM (microscopie électronique à transmission) et en spectroscopie UV-Vis ont permis de mettre en évidence que les nanoparticules d'argent formaient une couche sur l'actine-F (Wen et *al.* 2013).

Wen et *al.* ont également observé que les nanoparticules d'argent (potentiel Zéta = -42 mV) sont capables de se lier à l'actine-F isolée. Dans la littérature, il a été observé que la surface de l'actine-F possède une topographie hétérogène, avec une distribution hétérogène de charges électriques et la fixation de protéines adaptatrices (Angelini et *al.* 2006). Des interactions électrostatiques ou nanoparticules/protéines d'autres natures pourraient être possibles. De manière intéressante, les auteurs ont constaté que ces interactions nanoparticules/actine entraînent une modification des structures secondaires de l'actine, avec une diminution de la proportion d'hélices alpha et une hausse de la proportion de feuillets bêta (Wen et *al.* 2013). Cette donnée est d'autant plus intéressante que les filaments du cytosquelette des prolongements cellulaires sont organisées sous forme d'hélices alpha (Lee et Dominguez, 2010).

**A l'image des nanoparticules d'argent de Wen et *al.*, une interaction de nos nanoparticules (potentiel Zéta = -25 mV) avec l'actine-F ne serait pas à exclure. Il serait alors intéressant de comprendre si les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) interagissent avec l'actine-F et en modifient la conformation.**

#### 2.1.3.2 Démarche expérimentale envisagée

Dans un premier temps, l'extraction de l'actine-F, à l'aide de kits commerciaux, des cellules U251 ayant préalablement adhéré permet d'obtenir une actine-F dont l'architecture se rapproche de celle que nous avons étudiée (fibres de stress, émission des protrusions, etc) (Choi et *al.* 2014). Le but serait d'incuber les filaments d'actine isolés avec les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) pour en étudier l'affinité. Pour cela, la mesure du spectre d'absorption de l'actine-F, à l'aide d'un spectromètre UV-Vis, avant et après fixation des nanoparticules permettrait d'obtenir cette information (Wen et *al.* 2013).

La Cryo-microscopie électronique (Cryo-TEM), est une technique de microscopie électronique qui permet d'effectuer des études structurales de complexes macromoléculaires sur des échantillons biologiques de faible épaisseur maintenus à très basse température (congélation à -185°C). Elle pourrait aider à mettre en évidence, si elle existe, l'interaction directe entre les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et l'actine-F (Weber et *al.* 2019).

La spectroscopie par dichroïsme circulaire se base sur les transitions optiques observées en fonction de l'agencement des groupements amides des polypeptides (Greenfield et *al.* 2006). Cette méthode de spectroscopie pourrait permettre d'étudier les interactions Au@DTDTPA(Gd)/actine-F, notamment l'impact des nanoparticules sur la structure secondaire de l'actine-F et ses changements de conformation (hélice alpha, par exemple).

#### 2.1.3.3 Etude des effets des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur le blocage des ions calcium

##### 2.1.3.3.1 Contexte scientifique

Les effets anti-migratoires et anti-invasifs de nos nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les cellules U251 pourraient s'expliquer par une perturbation de la signalisation cellulaire dépendante des ions calcium. En effet, dans les cellules de GBM, les ions calcium sont impliqués à différents niveaux de la cellule, permettant la contraction des fibres de stress de l'actine (co-facteur de la myosine II), l'ouverture de canaux chlorures et potassiques pour les modifications du volume hydrodynamique des cellules migratrices et l'activation de protéines de la signalisation de la migration/invasion comme PKC (Tsai et *al.* 2015 et Leclerc et *al.* 2016).

Particulièrement, les cellules sont liées à la MEC au niveau des points d'adhésion focale par des complexes structuraux reliant les intégrines de la membrane au cytosquelette. La capacité migratoire de la cellule est fonction de la vitesse d'assemblage et de désassemblage des adhésions focales. Les ions Ca<sup>2+</sup> favorisent l'association de FAK avec le complexe d'adhésion focale et augmentent la résidence de la FAK à ces sites par le biais d'une régulation dépendante de la phosphorylation de la protéine kinase II Ca<sup>2+</sup>/calmoduline (CaMKII) (Maklad et *al.* 2019).

Nos nanoparticules possèdent deux tiers de molécules DTDTPA de leur enveloppe organique qui restent libres et qui sont capables de se lier à des ions divalents comme les ions calciums. Ainsi, notre hypothèse est que nos nanoparticules pourraient piéger une partie des ions calcium intracellulaires, ce qui pourraient avoir des conséquences sur les processus de l'invasion dépendante des ions calcium intracellulaires.



#### 2.1.3.3.2 Démarche expérimentale envisagée

Pour étudier la relation entre les caractéristiques physicochimiques des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et le flux de  $\text{Ca}^{2+}$ , plusieurs étapes expérimentales sont nécessaires.

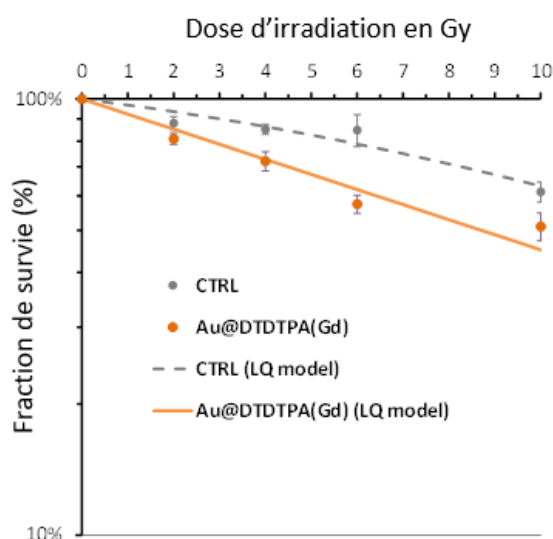
Dans une première étape, il faut évaluer la complexation des ions calcium dans l'enveloppe organique et du remplacement éventuel des ions gadolinium par des ions calcium. Dans un premier temps, la capacité du chélateur DTDTPA à fixer les ions calcium nécessite d'être évaluée avec des nanoparticules sans ions gadolinium dans l'enveloppe organique. Les quantités de calcium immobilisées dans l'enveloppe organique peuvent être déduites du titrage par analyse ICP-AES du filtrat après ultrafiltration des colloïdes. Dans un deuxième temps, des expériences de transmétallation peuvent être réalisées avec les nanoparticules marquées avec des ions de gadolinium pour évaluer la fixation des ions calciums mais aussi la libération indésirable des ions gadolinium et des ions calcium libres. Cette donnée peut être obtenue par titrage colorimétrique (avec de l'orange de xylénol) et par analyse ICP-AES du filtrat après ultrafiltration des colloïdes.

Dans une deuxième étape, il faut quantifier les flux calciques intracellulaires après internalisation des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) dans les cellules de GBM. Les effets de l'enveloppe organique des nanoparticules sur la mobilisation intracellulaire du calcium peuvent être analysés à l'aide de kits de dosage du calcium FLIPR®.

### 3 PARTIE III : INTERET THERAPEUTIQUE DE L'ASSOCIATION DES Au@DTDTPA(Gd) ET DE LA RADIOTHERAPIE SUR LES CELLULES U87

#### 3.1.1 Effets radiosensibilisants des Au@DTDTPA(Gd) sur la lignée U87

Stéphane Roux et al. développent des nanoparticules inorganiques originales Au@DTDTPA(Gd) pour la radiothérapie guidée par l'image. Alors que des résultats intéressants avaient été obtenus *in vivo* avec la MRT permettant une irradiation à très haut débit de dose, notre groupe s'est attaché à évaluer le potentiel de ces nanoparticules avec une irradiation X conventionnelle. Les travaux au laboratoire conduits par Héna Paquot et al. ont eu pour objectif d'évaluer le potentiel radiosensibilisant des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les cellules U87. A partir d'essais clonogéniques (**figure 70**), ils ont démontré que la fraction de survie des cellules U87 exposées 24h à 5 mM des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et irradiées à 2 Gy et 10 Gy induit une diminution de la fraction de survie de 9% et de 14% respectivement par rapport aux cellules U87 irradiées seules 14 jours post-irradiation (**figure 76**).



**Figure 76. Effets des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur la survie des cellules U87 irradiées.** La radiosensibilité des cellules U87 aux nanoparticules a été évaluée par essai clonogénique pendant 14 jours, pour des cellules exposées 24h à 5 mM de nanoparticules et irradiées à 2, 4, 6, 8 ou 10 Gy. Seules les colonies cellulaires ayant un diamètre supérieur à 50  $\mu\text{m}$  sont comptabilisées. Chaque expérimentation est réalisée en triplicatas ( $n > 5$ ). Chaque point des courbes de survie sont représentatifs de la moyenne des données. Les barres d'erreur sont représentatives de l'écart-type.

Choi et al. ont récapitulé plus d'une dizaine d'études sur le pouvoir radiosensibilisant des nanoparticules métalliques sur les cellules de GBM, dont l'or (Choi et al. 2020). Par exemple, Joh et al. ont synthétisé des nanoparticules d'or et de PEG (23 nm de diamètre) et ont montré que les cellules GBM humaines traitées par radiothérapie et par leur nanoparticules d'or présentent un niveau de dommages à l'ADN 1,7 fois plus élevé que les cellules traitées par radiothérapie seule (Joh et al. 2013). Ceci serait concordant avec nos résultats sur la diminution de la survie des cellules U87 suite à notre traitement combiné.

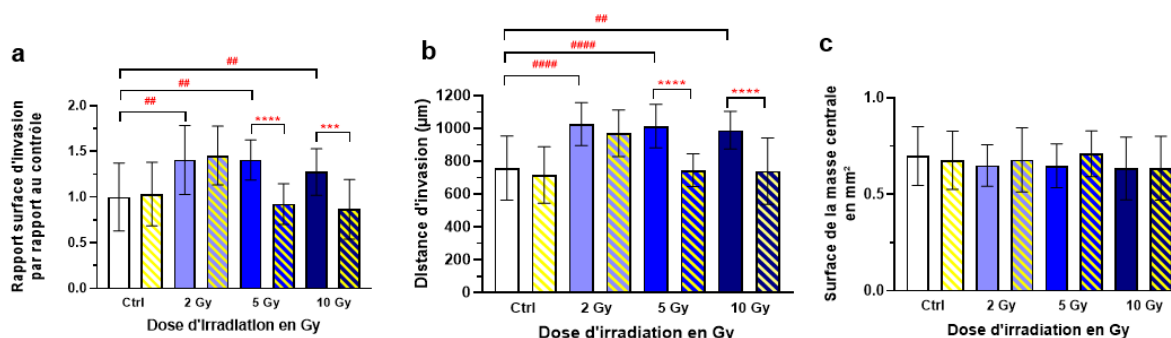
Le ratio de la survie des cellules irradiées (*Dose Modifying Factor*), en présence ou non des nanoparticules est de 0,44, ce qui signifie que les nanoparticules engendrent un effet radiopotentialisant. Ces résultats sont cohérents avec des tests réalisés au laboratoire sur des nanoparticules d'or et PEG commerciales de 5 nm de diamètre (-11% de survie à 2 Gy et -15% à 10 Gy 14 jours post-irradiation par rapport à une irradiation seules pour une *Dose Modifying Factor* de 0,39) (Paquot et al. 2016). De

manière intéressante, les résultats sont plus marqués pour les nanoparticules commerciales de 5 nm par rapport à celles de 20 nm et de 50 nm testées, laissant suggérer un impact de la taille des nanoparticules d'or sur leur effet radiosensibilisant. Dans les travaux que nous avons publié sur les cellules U251 et les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) (Durand et *al.* 2021), nous avons constaté que nos nanoparticules, dont le diamètre hydrodynamique est de 8,2 nm, se localisaient préférentiellement dans le cytoplasme de manière diffuse et au niveau périnucléaire. Les nanoparticules d'or de 5 nm ont également une distribution similaire dans les cellules U87 tandis que les nanoparticules de 20 nm présentent une colocalisation au niveau des lysosomes (Paquot, 2019). Dans la littérature, il a été rapporté qu'une distribution des nanoparticules au niveau des lysosomes pouvaient induire l'autophagie entre autres (Stern et *al.* 2012), ce qui pourrait expliquer des effets radiopotentialisants différents liés à la distribution des nanoparticules.

Conformément à nos observations précédentes (cf partie 1), plusieurs travaux *in vitro* ont décrit une augmentation des capacités invasives des cellules de GBM après irradiation X monodose, et ce, quelle que soit la dose d'irradiation utilisée (Wank et *al.* 2018). En revanche, il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude s'intéressant aux effets de l'association "nanoparticules inorganiques + rayons X" sur l'invasion des cellules de GBM. Sachant que nos nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) présentent une activité anti-migratoire sur la lignée de GBM U251 cultivée en 2D, il nous semblait pertinent d'évaluer l'impact du traitement combiné "nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) + radiothérapie par photons X monodose" sur l'invasion des cellules U87 en utilisant comme précédemment, des tests de bourgeonnement à partir de sphéroïdes U87. Dans notre analyse, nous avons pris en compte l'ensemble de la dynamique de l'extension du sphéroïde comme précédemment décrit (Blacher et *al.* 2014) et nous avons mesuré, en plus de la surface d'invasion, la distance parcourue par les cellules dans la MEC ainsi que la surface du cœur du sphéroïde, qui reflète sa croissance.

Les sphéroïdes U87 témoins présentent une surface d'invasion moyenne de  $3,47 \text{ mm}^2 \pm 0,37 \text{ mm}^2$  (**Figure 77a**) et une distance d'invasion moyenne de  $759 \mu\text{m} \pm 194 \mu\text{m}$  (**figure 77b**). Lorsque les sphéroïdes sont exposées aux nanoparticules seules Au@DTDTPA(Gd) à 5 mM pendant 24 heures, la surface d'invasion ainsi que la distance d'invasion restent identiques. En revanche, la surface d'invasion et la distance d'invasion des sphéroïdes irradiés à 2 Gy, 5 Gy et 10 Gy augmente d'environ 30% ( $4,42 \text{ mm}^2$  à  $4,88 \text{ mm}^2$  et  $984$  à  $1027 \mu\text{m}$ ) par rapport aux témoins. Lorsque l'on combine nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et irradiation à 2 Gy, la surface d'invasion et la distance d'invasion des sphéroïdes restent identiques à celles mesurées pour une irradiation à 2 Gy seule. En revanche, les traitements combinés incluant Au@DTDTPA(Gd) et une irradiation à 5 ou 10 Gy, réduisent la surface d'invasion et la distance d'invasion par rapport à la radiothérapie monodose 5 Gy ( $3,2 \text{ mm}^2$  et  $745 \mu\text{m}$ ) et 10 Gy ( $3,06 \text{ mm}^2$  et  $740 \mu\text{m}$ ) et permettent de revenir à des niveaux d'invasion similaires à ceux mesurés pour les sphéroïdes non traités.

Les quantifications de la surface de la masse centrale après traitement (nanoparticules seules, irradiation seule et traitement combiné) ont mis en évidence une absence de modification de la taille des sphéroïdes par rapport au contrôle (**figure 77c**).



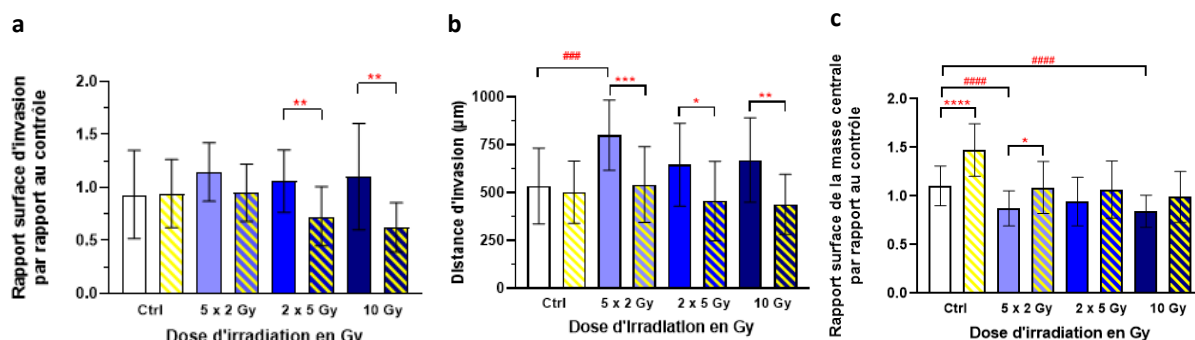
**Figure 77. Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur les capacités invasives des cellules de sphéroïdes U87.** Après retrait des nanoparticules, les sphéroïdes sont irradiés à des doses de 2, 5 et 10 Gy. Les sphéroïdes sont ensemencés dans un mélange de Matrigel® et de milieu de culture complet à une proportion 1:1 (v/v) enrichi en acide hyaluronique à 100 µg/mL, 24 heures post-irradiation. La surface d'invasion (a), la distance d'invasion (b), la surface de la masse centrale (c) sont mesurées pour chaque sphéroïde à l'aide d'image J. Les données sont exploitées de manière indépendante ( $n \geq 14$  sphéroïdes pour  $n \geq 3$  expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque sphéroïde. Les hachures correspondent à l'exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd). Les barres d'erreurs représentent les écart-types. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$

### 3.1.1.1 Radiothérapie fractionnée associée aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) : impact sur l'invasion des sphéroïdes U87

D'après des travaux récents, le fractionnement de la radiothérapie semble affecter la physiopathologie des cellules cancéreuses, notamment leur capacité migratoire mais les résultats des études sont contradictoires. Ainsi, la radiothérapie fractionnée (16 Gy, huit fractions de 2 Gy) augmente la migration et l'invasion de cellules de cancers des poumons, par rapport à une irradiation 16 Gy monodose *in vitro* (Zhang et al. 2018). A l'inverse, pour des tumeurs gliales issues de patients et soumises à une irradiation fractionnée par fraction de 2 Gy, Gliemroth et al. ont observé une diminution de la migration des cellules de GBM : l'inhibition de la migration et de l'invasion était d'autant plus importante que la dose cumulée de rayonnements augmentait (diminution de la migration à 10 Gy (2 Gy par fractionnement) d'environ 50% avec une inhibition quasiment totale de la migration atteinte à 40 Gy (2 Gy par fraction) (Gliemroth et al. 2003).

Par homologie, nous nous sommes interrogés sur le fractionnement de l'irradiation lorsque l'on appliquait notre stratégie thérapeutique associant nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et radiothérapie par photons X. En conservant une dose d'irradiation totale constante de 10 Gy, nous avons comparé les effets du traitement combiné Au@DTDTPA(Gd)/radiothérapie sur les capacités invasives des cellules U87 pour différents schémas d'irradiation, à savoir une irradiation fractionnée conventionnelle (CRT 5 x 2 Gy), un schéma hypofractionné (HRT 2 x 5 Gy) et un schéma monodose de 10 Gy (10RT). Pour ce faire, nous avons réalisé des tests de bourgeonnement sur des sphéroïdes U87 pré-traités aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) pendant 24h et les irradiations avaient lieu à J8, J9, J10, J11 J12 pour le schéma CRT 5 x 2 Gy, à J8 et J11 pour le schéma HRT 2 x 5 Gy et à J8 pour le schéma 10RT. Les sphéroïdes étaient inclus dans la matrice pour le test de bourgeonnement à J13.

Dans ces conditions expérimentales, la surface d'invasion (**figure 78a**) et la distance d'invasion (**figure 78b**) des sphéroïdes U87 témoins atteignaient respectivement  $2,28 \pm 0,87 \text{ mm}^2$  et  $536 \pm 198 \text{ µm}$ . L'exposition des sphéroïdes U87 aux nanoparticules n'a pas d'impact sur la surface d'invasion et la



**Figure 78. Impact des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et du fractionnement de la radiothérapie sur l'invasion des sphéroïdes U87.** Après retrait des nanoparticules, les sphéroïdes sont irradiés à des doses de 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont ensemencés dans un mélange de Matrigel® et de milieu de culture complet à une proportion 1:1 (v/v) enrichi en acide hyaluronique à 100 µg/mL, 24 heures post-irradiation. La surface d'invasion (a), la distance d'invasion (b) et la surface de la masse centrale (c) sont mesurées pour chaque sphéroïde à l'aide d'image J. Les hachures correspondent à l'exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd). Les gradations de bleu représentent les différents protocoles d'irradiation (du plus grand fractionnement au plus petit fractionnement). Les données sont exploitées de manière indépendante (n ≥ 14 sphéroïdes pour n ≥ 3 expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque sphéroïde. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

distance d'invasion. En revanche, nous avons constaté qu'après radiothérapie, quel que soit le protocole d'irradiation considéré, les surfaces d'invasion et les distances d'invasion tendaient à augmenter (les surfaces d'invasion atteignaient 2,42 à 2,62 mm<sup>2</sup>) par rapport aux sphéroïdes témoins. L'augmentation de la distance d'invasion devenait statistiquement significative pour CRT 5 x 2 Gy, 800 ± 183 µm, p < 0,001, soit une augmentation de 30% par rapport au témoin). Lorsque les protocoles d'irradiation HRT 2 x 5 Gy et 10RT étaient associés aux Au@DTDTPA(Gd), nous avons observé une diminution statistiquement significative de la surface d'invasion de 25% et de 45% respectivement par rapport aux protocoles d'irradiation correspondants sans nanoparticule. De manière intéressante, les traitements combinés "Au@DTDTPA(Gd) + HRT" et "Au@DTDTPA(Gd) + 10RT" diminuent significativement la surface d'invasion de 30% et 40% respectivement par rapport aux sphéroïdes Ctrl (**figure 78c**). De même, la distance de migration pour les traitements combinés est significativement diminuée par rapport à l'irradiation seule correspondante.

La surface de la masse centrale des sphéroïdes U87 non traités est de 1,1 ± 0,2 mm<sup>2</sup>. Lorsque les sphéroïdes U87 sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd), nous observons une augmentation de la taille de la masse centrale de 35% (1,47 ± 0,27 mm<sup>2</sup>) par rapport aux sphéroïdes non traités. McEvoy et al. ont mis en évidence *in vitro* sur des sphéroïdes de cellules de cancer du sein que la modulation des jonctions cellulaires contribuait à l'écartement des cellules et avait un impact indirect sur la taille de la masse centrale (McEvoy et al. 2020). Une hypothèse possible à nos résultats serait que les nanoparticules agissent sur les jonctions cellulaires, ce qui induirait des variations de volume des sphéroïdes traités.

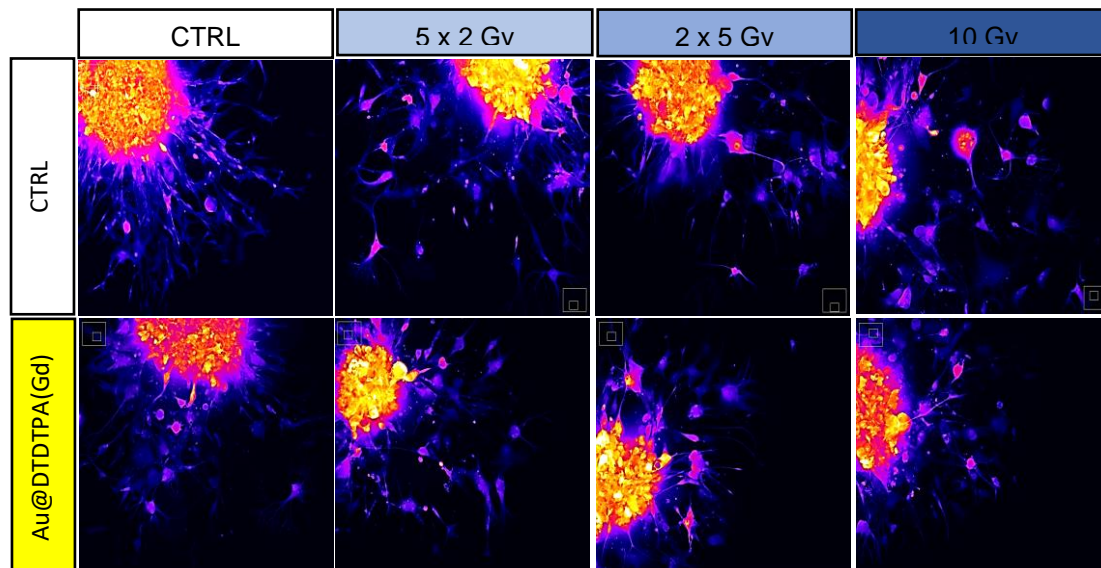
Les protocoles d'irradiation n'induisent pas de modification de la surface de la masse centrale. L'association des nanoparticules au protocole d'irradiation CRT induit une augmentation de 25% de la taille de la masse centrale par rapport aux sphéroïdes irradiés uniquement (+ 0,21 mm<sup>2</sup>), les autres

protocoles d'irradiation associés aux nanoparticules tendent à augmenter la surface de la masse centrale par rapport à l'irradiation seule correspondante (+0,12 à 0,15 mm<sup>2</sup>).

### 3.1.1.2 Impact des traitements sur les cellules invasives U87 échappées des sphéroïdes traités

Pour appréhender la dynamique d'invasion post-traitement, nous avons réalisé des suivis par vidéo-microscopie de fluorescence confocale des tests de bourgeonnement (tels que réalisés précédemment) pendant 4 jours. L'invasion des sphéroïdes non traités est diffuse, avec un grossissement régulier du cœur du sphéroïde. Quelques cellules se détachent du sphéroïde et envahissent la MEC et semblent entraîner dans leur sillage d'autres cellules, ce qui résulte *in fine* en un important réseau de cellules connectées les unes par rapport aux autres et reliées à la masse centrale.

Concernant les sphéroïdes irradiés avec les protocoles CRT, HRT et 10RT, le nombre de cellules progressant dans la MEC semblait moins important, mais la taille des cellules semblait augmentée. A la fin du suivi (point final), les cellules infiltrantes formaient également un réseau interconnecté. Cependant, dans ces groupes, nous avons observé que quelques cellules isolées progressaient plus loin dans la MEC par rapport au groupe CTRL. Dans le groupe « nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) » le suivi a révélé que la progression des cellules échappées n'était pas modifiée mais ces cellules avaient tendance à s'arrondir par rapport au contrôle. Les traitements combinés CRT, HRT et 10RT / Au@DTDTPA(Gd), quant à eux, semblaient diminuer la progression des cellules périphériques, affecter la formation du réseau de cellules interconnectées visible au point final et entraîner un arrondissement des cellules (**figure 79**).



**Figure 79. Suivi de l'invasion des sphéroïdes U87 exposés aux nanoparticules et aux protocoles de radiothérapie par vidéomicroscopie de fluorescence.** Après retrait des nanoparticules, les sphéroïdes sont irradiés à des doses de 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sontensemencés dans un mélange de Matrigel® et de milieu de culture complet à une proportion 1:1 (v/v) enrichi en acide hyaluronique à 100 µg/mL, 24 heures post-irradiation. Le suivi en temps réel de l'invasion des sphéroïdes U87 ont été réalisés à l'aide d'un microscope confocal, dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>, à 37°C pendant quatre jours. Des points tous les quatre heures ont été pris en photo. Les photos ci-jointes sont des photos représentatives de l'invasion à 96h, modifiées par Image J pour afficher des fausses couleurs pour aider à l'analyse. Les données issues de 3 expérimentations indépendantes



### 3.1.1.3 Etude ex vivo et in vivo de l'infiltration tumorale et évaluation de l'effet des traitements

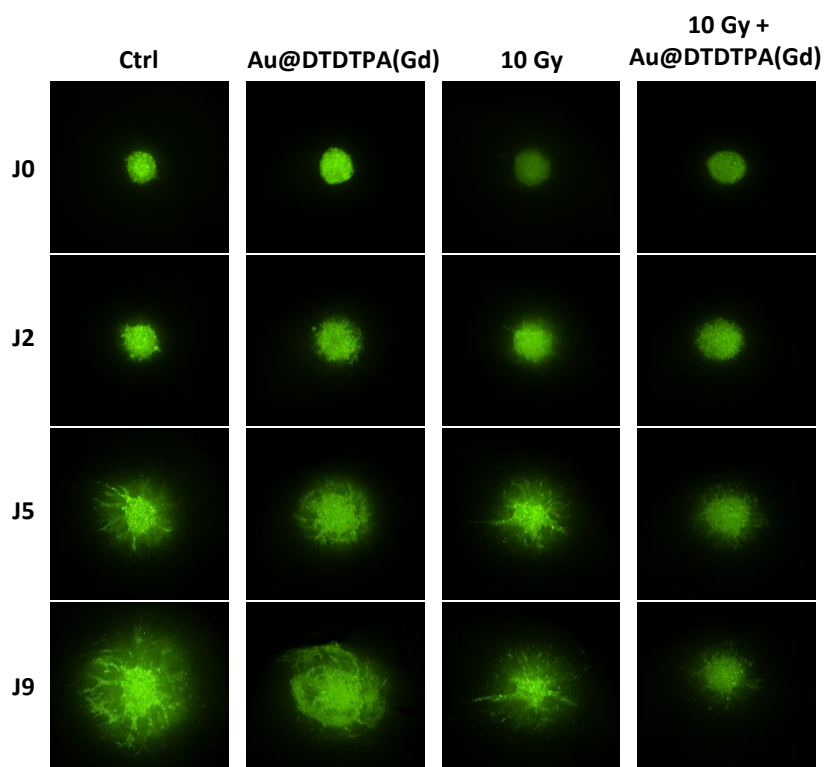
Le test de bourgeonnement nous a permis d'étudier le phénomène d'invasion *in vitro*, en ajoutant plusieurs paramètres par rapport aux tests 2D classiques (test en chambre de Boyden, test de blessure) et sur cellules individuelles. Cependant, ce test présente certaines limites notamment l'absence de la récapitulation du microenvironnement cellulaire cérébral (Hernandez et al. 2009). Etant donné le rôle prépondérant que jouent les communications intercellulaires (directes *via* les jonctions ou indirectes *via* les chimiokines) entre les cellules cancéreuses et les cellules saines (Placone et al. 2015 et Akins et al. 2017), il nous semblait extrêmement important de prendre en compte dans notre travail le microenvironnement cellulaire.

C'est pourquoi, nous avons choisi d'étudier les effets de nos traitements sur deux modèles complémentaires (*ex vivo* et *in vivo*) permettant de récapituler l'ensemble du microenvironnement cérébral tout en nous assurant un bon contrôle des paramètres expérimentaux. Nous avons opté pour un modèle de culture organotypique (modèle *ex vivo*) qui consiste à implanter, dans une coupe de cerveau de souris, un sphéroïde pré-traité ou non (dans notre cas, des sphéroïdes U87-GFP exposés ou non aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) pendant 24h à 5 mM et/ou irradiés à 10 Gy monodose *in vitro*). Cette approche expérimentale a permis de suivre pendant neuf jours la progression tumorale globale (c'est-à-dire la croissance du cœur du sphéroïde U87 ainsi que l'extension de la zone infiltrante) dans un environnement cérébral, grâce à l'observation de la fluorescence émise par GFP en microscopie de fluorescence (Eisemann et al. 2018). En parallèle, nous avons également choisi de suivre par microscopie intravitale, à travers une fenêtre crânienne, la progression des sphéroïdes U87-GFP implantés dans le cortex de souris (modèle *in vivo*) selon la méthode décrite précédemment par Ricard et al. (Ricard et al. 2014). L'avantage de ce modèle *in vivo* est d'autoriser un monitoring pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois et de prendre en considération les répercussions de la progression tumorale sur la survie des animaux.

L'étude sur le modèle *ex vivo* a été conduite par Alicia Chateau (CRAN UMR 7039, Assistante-ingénieure) et l'étude sur le modèle *in vivo* par Justine Jubréaux (CRAN UMR 7039, Assistante-ingénieure) qui s'est appuyée sur les travaux antérieurs menés au laboratoire (post-doctorat de Aurélie Reinhard-Ruch et thèse de Héna Paquot (Paquot, 2019)).

La **figure 80** présente les images de microscopie de fluorescence obtenues pour le suivi des sphéroïdes U87-GFP implantés dans des coupes de cerveaux de souris (modèle *ex vivo*). Neuf jours après implantation des sphéroïdes Ctrl, nous avons observé une forte croissance de la masse centrale des sphéroïdes associée à une zone d'infiltration bien marquée et diffuse. Lorsque les sphéroïdes sont exposées aux nanoparticules pendant 24 heures avant implantation, la croissance du cœur des sphéroïdes ne semble pas impactée par le traitement aux Au@DTDTPA(Gd). La zone d'invasion cellulaire reste très visible mais moins diffuse. L'irradiation à 10 Gy inhibe la croissance de la masse centrale et réduit la surface d'invasion cellulaire par rapport aux sphéroïdes Ctrl mais les sphéroïdes irradiés donnent tout de même naissance à une infiltration diffuse non négligeable. L'association de la radiothérapie 10 Gy monodose aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) a permis non seulement d'inhiber

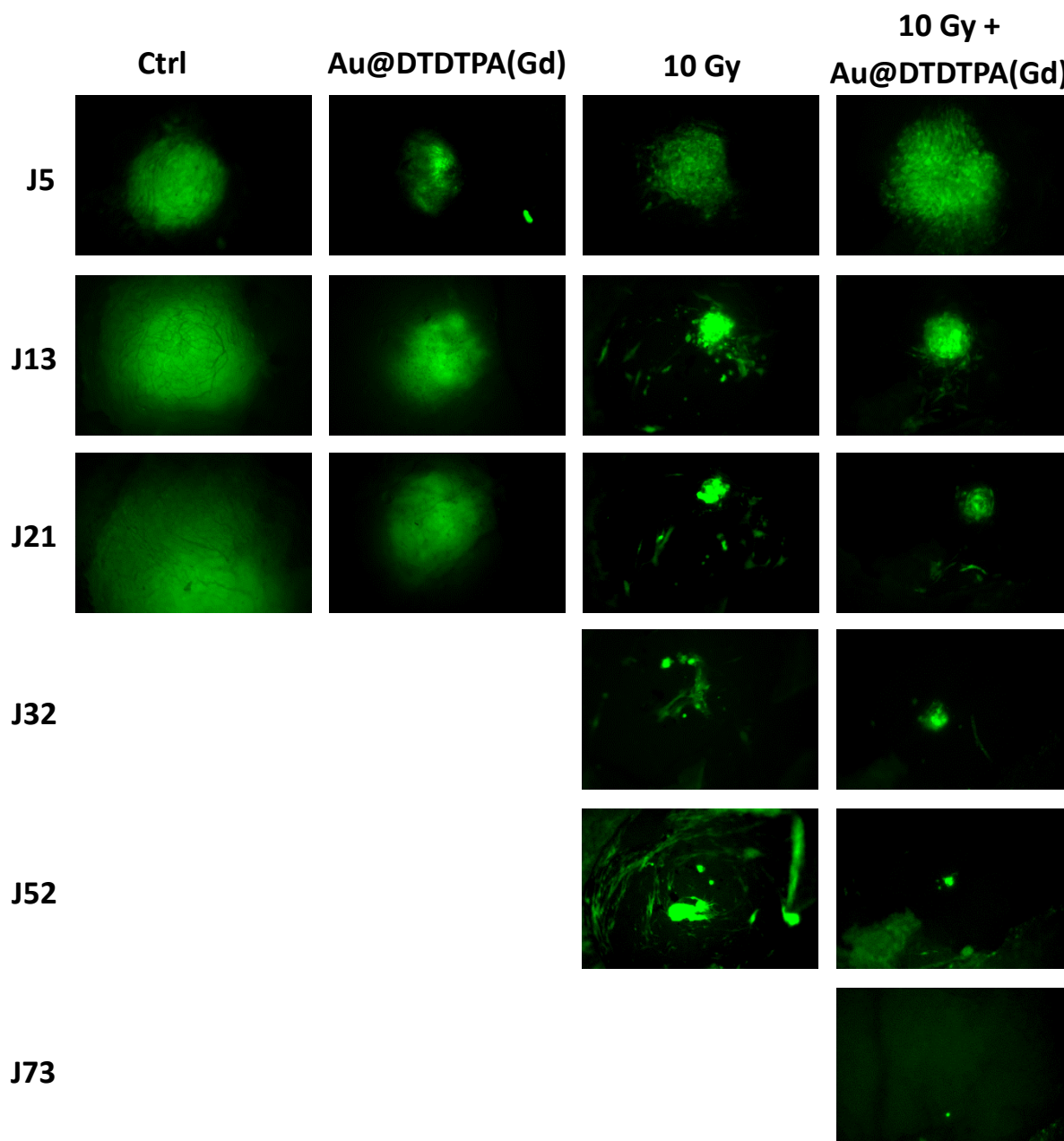
la croissance de la masse centrale mais également de fortement empêcher l'invasion cellulaire périphérique (**figure 80**).



**Figure 80.** Impact de l'association des Au@DTDTPA(Gd) et de l'irradiation à 10 Gy sur les capacités infiltrantes des cellules U87 en culture organotypique. Les sphéroïdes U87 pré-traités ou non à 5mM de nanoparticules pendant 24h puis irradiés ou non à 10 Gy sont déposés à la surface de coupes de cerveau murin. Le suivi de l'infiltration par microscopie confocale de fluorescence a été réalisé pendant un mois. L'expérimentation a été réalisée au moins sur trois coupes de cerveau différentes.

De la même manière, des sphéroïdes traités *in vitro* ont été implantés dans le cortex de souris *nude* et suivis *in vivo* par microscopie intravitale à travers les fenêtres crâniennes (**Figure 81**). Pour les sphéroïdes U87-GFP CTRL, nos observations ont révélé une forte croissance de la masse tumorale mais la zone d'infiltration était très peu visible. La croissance tumorale rapide aboutissait au décès précoce des animaux (en médiane 27 jours). Les résultats obtenus avec les sphéroïdes exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) seules sont très similaires, à savoir une croissance rapide de la masse centrale et peu ou pas d'infiltration visible, conduisant à une survie des souris inférieure à 30 jours. Lorsque les sphéroïdes étaient irradiés à 10 Gy avant implantation dans le cortex, la masse centrale diminuait au cours du temps, attestant d'un effet antitumoral de l'irradiation. Mais des réseaux de cellules infiltrantes se formaient progressivement et devenaient clairement identifiables à partir de J22. Dans ce groupe, les souris survivaient en médiane 75 jours après la greffe. En revanche, lorsque les sphéroïdes étaient exposés aux nanoparticules puis irradiés à 10 Gy avant d'être introduit dans le cerveau des souris, la masse centrale diminuait progressivement jusqu'à disparaître au 70<sup>ème</sup> jour de suivi, et plus aucun signal de fluorescence n'était observé, suggérant que les cellules tumorales avaient

totallement été éradiquées. La survie des souris était dans ce groupe prolongée jusqu'à 135 jours, ce qui correspondait à la fin de l'étude (figure 81).



**Figure 81. Suivi de l'infiltration des sphéroïdes U87 exposés aux nanoparticules et irradiés *in vivo*.** Les sphéroïdes U87 pré-traités ou non à 5mM de nanoparticules pendant 24h puis irradiés ou non à 10 Gy sont déposés à la surface du cortex du cerveau de souris *nude* après incision d'une partie du crâne. Le suivi de l'infiltration des sphéroïdes à la surface du cortex est réalisé à l'aide d'un macroscopie de fluorescence jusqu'à 133 jours. L'expérimentation a été réalisé au moins sur trois souris différentes.

En recoupant les résultats obtenus avec les 3 modèles d'études (*in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*), nous aboutissons aux conclusions suivantes :

- Les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) délivrées seules, même si elles semblent provoquer quelques modifications notamment de la zone infiltrante dans nos modèles *in vitro* et *ex vivo*, ne permettent pas d'agir sur la progression tumorale globale dans notre modèle de

glioblastome. Ces résultats corroborent les observations de Kim et *al.* qui n'ont pas montré *in vivo* d'effet antitumoral pour des nanoparticules d'or (10,6 nm de diamètre) sur des tumeurs sous-cutanées CT26 chez la souris (Kim et *al.* 2012). Mais ces résultats sont contradictoires avec ceux de Arvizo et *al.* : en effet, ces auteurs ont travaillé sur des modèles de cancers ovariens greffés chez la souris et ont rapporté un effet antitumoral pour des nanoparticules d'or de 20 nm, qui réduisaient la croissance tumorale et la formation de métastases (Arvizo et *al.* 2013).

- A la dose totale de 10 Gy, la radiothérapie fractionnée entraîne une régression significative de la masse tumorale centrale mais ne permet pas de contrôler l'infiltration tumorale qui persiste de façon importante.
- L'association de nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) avec la radiothérapie par photons X présente un intérêt majeur non seulement pour limiter la croissance tumorale mais encore pour réduire l'infiltration des cellules tumorales dans le parenchyme cérébral voisin. En effet, tous nos résultats, quel que soit le modèle ou le schéma d'irradiation considéré, montrent un effet inhibiteur fort des traitements combinés "Au@DTDTPA(Gd) + irradiation" sur l'invasion et l'infiltration tumorale. Ces résultats sont très prometteurs car ils fournissent des arguments supplémentaires et complémentaires aux nombreux travaux antérieurs affirmant l'intérêt thérapeutique des stratégies associant les nanoparticules d'or à la radiothérapie (Shrestha et *al.* 2016). A notre connaissance, il n'existe pas d'étude focalisée sur la zone infiltrante. Néanmoins, nos résultats sont concordants avec les effets anti-migratoires décrits dans l'étude Shahhoseini et *al.* : ces auteurs ont en effet observé que la radiothérapie associée aux nanoparticules d'or entraînait une forte inhibition de la migration des cellules cancéreuses de la prostate et des poumons (Shahhoseini et *al.* 2019).

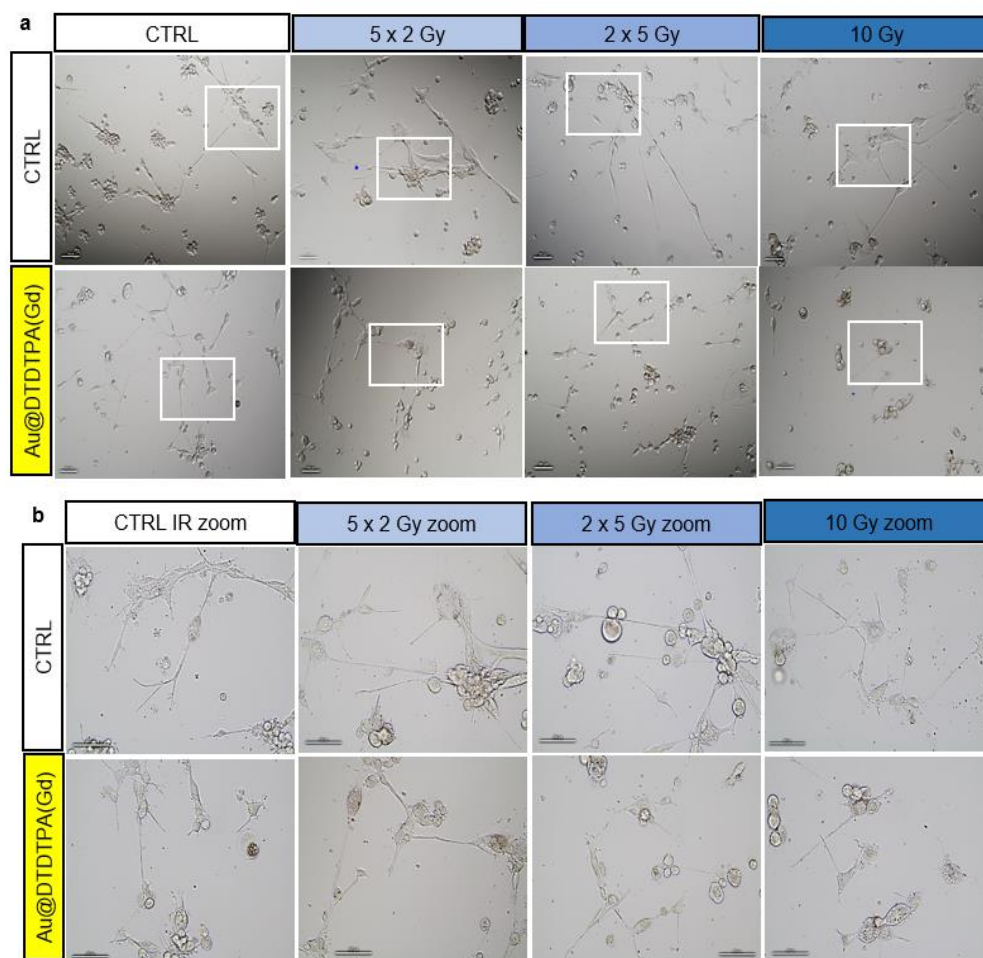
### 3.1.2 Caractérisation morphologiques et fonctionnelles *in vitro* des effets de l'association de la radiothérapie aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sur les cellules échappées de GBM U87

#### 3.1.2.1 Mise en place du modèle cellulaire et premières observations morphologiques post-traitement

Les cellules de GBM qui envahissent la MEC possèdent des propriétés particulières, exerçant une activité protéolytique locale et ayant un comportement particulier (*leader cells*, cellules suiveuses, etc). Certaines populations cellulaires chez le GBM, appelées cellules initiatrices, sont capables d'initier la formation d'une tumeur et sont dotées de fortes capacités invasives et d'une grande résistance aux traitements conventionnels (Rivera et *al.* 2013 et Vollmann-Zwerenz et *al.* 2020)

Dans cette partie, nous nous intéressons uniquement aux cellules qui s'échappent des sphéroïdes U87 au cours du traitement, le but étant d'étudier les mécanismes d'actions de nos traitements sur des cellules au caractère infiltrant à l'échelle cellulaire. Pour cela, les sphéroïdes sont exposés pendant 24h aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à une concentration de 5 mM. Les sphéroïdes sont ensuite irradiés ou non selon les protocoles CRT 2 Gy x 5, HRT 5 Gy x 2 et 10RT 10 Gy. Après la première irradiation, les cellules commencent déjà à s'échapper des sphéroïdes, par conséquent les sphéroïdes

et les cellules échappées subissent l'ensemble des irradiations simultanément. A la fin des irradiations, les sphéroïdes sont retirés et les cellules sont laissés 3 jours afin de leur permettre de récupérer un nombre suffisant de cellules.



**Figure 82. Observation des cellules échappées des sphéroïdes exposés aux nanoparticules et irradiés.** Les sphéroïdes U87 sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à 5 mM pendant 24h. Les sphéroïdes sont ensuite irradiés à des doses de 5 x 2Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont ensuite retirés et les cellules migrant depuis les sphéroïdes prolifèrent pendant trois jours. Des photographies sont prises à l'aide d'un microscope optique au grossissement x40 (a) et x100 (b).

Les cellules échappées n'ayant reçu aucun traitement sont capables de former des amas de cellules et mettent en place des prolongements intercellulaires similaires à ceux observés lors de nos tests d'invasion et lors de la culture 2D des cellules U87. Lorsque les cellules ont été exposées aux différents protocoles d'irradiation, plusieurs modifications notables sont apparues. Premièrement, les cellules ayant migré à partir des sphéroïdes irradiés semblent moins nombreuses que dans le groupe CTRL, certaines cellules présentent une plus grande taille et ont tendance à s'étaler. Parmi les nombreux prolongements intercellulaires formés, certains sont très longs, atteignant des dimensions bien supérieures aux prolongements observés pour les cellules CTRL (plus de 100  $\mu\text{m}$  jusqu'à 500  $\mu\text{m}$ ). De plus, les cellules échappées après irradiation semblent encore capables de former des amas, en particulier pour le protocole HRT et 10RT (**figure 82a et 82b**), même si celles-ci sont moins nombreuses. Lorsque les sphéroïdes U87 sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) seules, le nombre de cellules échappées semble également diminué par rapport au groupe CTRL et elles semblent former



moins de sphères. Parallèlement, le nombre de prolongements intercellulaires formés semble plus faible et nous avons noté un arrondissement de certaines cellules. Dans les groupes associant les nanoparticules et radiothérapie, quel que soit le schéma d'irradiation, les effets inhibiteurs des traitements semblent exacerbés, puisque peu de prolongements intercellulaires et peu de sphères sont visibles et les cellules échappées peu nombreuses sont plutôt arrondies (**figure 82a et 82b**). Ces observations ont été résumées dans le **tableau 5**.

Sambale et *al.* se sont intéressés à la structure de sphéroïdes NIH-3T3 (lignée de fibroblastes) et A549 (lignée de cancer pulmonaire) exposés aux nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO) et dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>). Ils ont observé que les sphéroïdes NIH-3T3 présentaient une structure plus compacte que les témoins après expositions aux nanoparticules ZnO alors que les sphéroïdes A549 formaient des agrégats plus lâches que les CTRL après exposition aux mêmes nanoparticules. L'exposition aux nanoparticules TiO<sub>2</sub> en revanche générait de multiples agrégats de plus petite taille pour les deux lignées étudiées (Sambale et *al.* 2015). Ces résultats, mis en parallèle de nos propres observations, suggèrent que l'exposition de sphéroïdes aux nanoparticules inorganiques provoque une altération de la structure cellulaire tridimensionnelle et donc de l'intégrité des sphéroïdes, en réduisant ou en augmentant la cohésion entre les cellules tumorales, et ce dépendamment de nature des nanoparticules étudiées.

#### 3.1.2.2 *Numération et mesure de la viabilité des cellules échappées post-traitement*

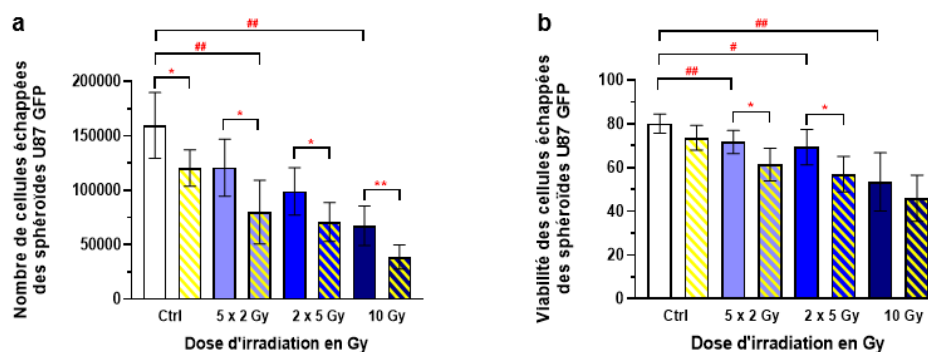
Afin de confirmer nos observations précédentes en microscopie optique, nous avons récupéré les cellules invasives afin d'en réaliser une numération et déterminer l'impact des traitements sur la quantité de cellules échappées. Pour les comptages cellulaires, nous avons réalisé une discrimination des cellules viables et non viables par coloration au bleu de Trypan, ce qui nous a permis de déterminer à la fois le nombre total de cellules échappées et le pourcentage de viabilité associé.

La quantité de cellules invasives récupérées est d'environ  $160000 \pm 30000$  (**figure 83a**). Lorsque les sphéroïdes sont exposés 24h aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd), le nombre de cellules échappées diminue de 40000 (soit une diminution de 25%,  $p < 0,05$ ). Les différents protocoles d'irradiation diminuent aussi le nombre de cellules échappées, mais le fractionnement réduit l'intensité de l'effet inhibiteur (-40000 pour le protocole CRT à -90000 cellules échappées pour le protocole 10RT,  $p < 0,05$  à  $p < 0,01$ ). Le traitement combiné Au@DTDTPA(Gd) + RT réduit systématiquement le nombre de cellules échappées par rapport aux protocoles d'irradiation seuls (-30000 à -40000 cellules échappées). Les mesures de la viabilité cellulaire ont en revanche souligné que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) n'induisent pas de cytotoxicité directe sur les cellules échappant des sphéroïdes traités (CTRL  $80 \pm 4,3\%$  vs Au@DTDTPA(Gd)  $73\% \pm 5,6\%$  de cellules viables) (**figure 83b**). De manière intéressante, la viabilité des cellules échappées des sphéroïdes traités par radiothérapie est diminuée et l'effet cytotoxique dépend du protocole considéré (-8,4% CRT à -46,5% 10RT par rapport aux cellules échappées témoins). Sans surprise, l'irradiation monodose est la plus cytotoxique. Les traitements combinés « nanoparticules + radiothérapie » sont plus cytotoxiques sur les cellules échappées que les traitements par irradiation seule correspondants (environ -10% pour chacun des protocoles, statistiquement significativement pour les protocoles CRT et HRT).



**Tableau 5. Récapitulatif des principales observations sur les cellules échappées post-traitement.** Après observations des cellules U87 migratrices échappées des sphéroïdes traités ou non (figure...), nous avons récapitulé les principales caractéristiques morphologiques observées à partir du regroupement de quatre images : la forme des cellules, la présence et une taille approximative des jonctions intercellulaires.

Condition	Proportion cellules (mosaïcage 4 images)	Forme cellules	Jonctions intercellulaires
CTRL	~ 70 cellules	Allongées ou regroupées en amas	Nombreux prolongements Majoritairement < ou = à 100µm. Relient les cellules entre elles
Au@DTDTPA(Gd)	~ 40 cellules	Arrondies, quelques-unes allongées	Quelques prolongements < ou = 100µm. Relient la plupart des cellules entre elles
5 x 2 Gy	~ 40 cellules	Étalées	Nombreuses jonctions intercellulaires > 100µm.
5 x 2 Gy + Au@DTDTPA(Gd)	Variable (40 < x < 20)	Hétérogène (étalées, arrondies et allongées)	Hétérogène, en fonction de la quantité de cellules. En fonction de la densité, connexions hétérogènes.
2 x 5 Gy	~ 30 cellules	Étalées	Nombreuses jonctions intercellulaires > 100µm
2 x 5 Gy + Au@DTDTPA(Gd)	< 20 cellules	Arrondies et étalées	Peu de jonctions intercellulaires, < 100 µm
10 Gy	Variable (~ 30 cellules)	Étalées, quelques-unes arrondies	Nombreuses jonctions intercellulaires > 100 µm majoritairement
10 Gy + Au@DTDTPA(Gd)	< 20 cellules	Arrondies et quelques-unes étalées	Peu de jonctions intercellulaires, < 100 µm



**Figure 83. Evaluation du nombre de cellules échappées et de la cytotoxicité directe des nanoparticules et de l'irradiation.** Les sphéroïdes U87 sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à 5 mM pendant 24h. Les sphéroïdes sont ensuite irradiés à des doses de 5 x 2Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont ensuite retirés et les cellules migrant depuis les sphéroïdes prolifèrent pendant trois jours. Les cellules échappées sont récupérées pour leur numération (a). La cytotoxicité directe a été déterminée par coloration au bleu Trypan. Les hachures correspondent à l'exposition aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd). Les gradations de bleu représentent les différents protocoles d'irradiation (du plus grand fractionnement au plus petit fractionnement). Les données sont exploitées de manière indépendante (n = 4 expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque comptage. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

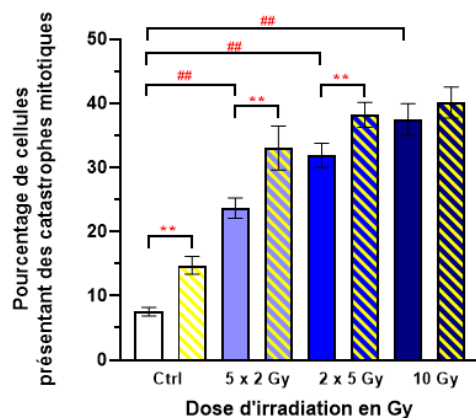
*In fine*, comparativement aux sphéroïdes CTRL non traités, les associations « Au@DTDTPA(Gd) + RT » diminuent de deux à cinq fois le nombre de cellules échappées et seules 60 à 50% d'entre elles restent viables. **Ainsi, ces résultats confirment l'intérêt de nos nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) qui réduisent significativement le nombre de cellules capables de s'échapper des sphéroïdes que ceux-ci soient ou non irradiés. De surcroît, elles amplifient fortement la mortalité cellulaire immédiate induite par les protocoles d'irradiation CRT 5 x 2 Gy et HRT 2 x 5 Gy.**

Ces résultats sont cohérents avec l'effet radiosensibilisant de nos nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) que nous avons rapporté sur les cultures monocouches U87 (**section Partie 3, 1.1**). Les travaux d'Héna Paquot menés au sein du laboratoire s'intéressaient aux différentes formes de mort cellulaire induites par l'association de l'irradiation X avec des nanoparticules d'or pégylées commerciales. Cette étude a permis de montrer que l'exposition des cellules U87 aux nanoparticules avant l'irradiation monodose à 2 ou 10 Gy (72 et 96h post-irradiation) augmentait significativement le taux de catastrophes mitotiques induites (Paquot et al. 2019). La mort mitotique étant un mode de mort fréquemment rencontré dans les cellules de GBM (Vitovcova et al. 2020), il nous a semblé intéressant d'évaluer son implication dans nos conditions expérimentales.

### 3.1.3 Evaluation de l'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur l'induction de catastrophes mitotiques chez les cellules échappées U87

Après récupération par trypsination des cellules échappées 72h post-irradiation, celles-ci ont été fixées et colorées à l'éosine (cytoplasme en rose) et l'hématoxyline (noyau en violet). Des images des cellules ont été acquises en microscopie optique afin de déterminer la proportion de cellules présentant plus de deux noyaux, c'est-à-dire considérées positives pour une catastrophe mitotique. Les cellules échappées

témoins présentent un taux de catastrophes mitotiques s'élevant à 7,5%. Les nanoparticules à elles seules doublent la proportion de cellules échappées en catastrophes mitotiques ( $p < 0,01$ ) par rapport au groupe CTRL. Nous constatons que la radiothérapie, quel que soit le schéma d'irradiation considéré, augmentent la proportion de cellules échappées présentant des catastrophes mitotiques par rapport au groupe CTRL. L'augmentation semble dépendante du fractionnement (CRT 23,7%, HRT 31,9% et 37,5% 10RT,  $p < 0,01$ ). De même, les traitements combinés augmentent la proportion de cellules échappées présentant des catastrophes mitotiques par rapport à la radiothérapie seule (statistiquement significativement pour CRT/Au@DTDTPA(Gd) 33% et HRT/Au@DTDTPA(Gd) 38,2%) (**figure 84**).



**Figure 84. Evaluation de l'induction de catastrophes mitotiques dans les cellules échappées issues de sphéroïdes U87 irradiés et exposés aux nanoparticules.** Les sphéroïdes U87 sont exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à 5 mM pendant 24h. Les sphéroïdes sont ensuite irradiés à des doses de 5 x 2Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont ensuite retirés et les cellules migrant depuis les sphéroïdes prolifèrent pendant trois jours. Les cellules échappées sont récupérées pour la réalisation d'une coloration hématoxyline et éosine pour observer les noyaux. Les lames sont prises en photo à l'aide d'un microscope optique au grossissement (x10) et les cellules présentant plus de deux noyaux sont discriminées à l'aide d'Image J. Les gradations de bleu représentent les différents protocoles d'irradiation (du plus grand fractionnement au plus petit fractionnement). Les données sont exploitées de manière indépendante ( $n = 5$  expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque comptage. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Ainsi nos nanoparticules contribuent à l'apparition de catastrophes mitotiques et renforcent l'apparition des catastrophes mitotiques radio-induites dans les cellules échappées de GBM. De manière intéressante, le traitement combiné HRT/Au@DTDTPA(Gd) atteint un pourcentage de catastrophes mitotiques similaire à celui pour l'irradiation 10 Gy, ce qui signifie que les nanoparticules permettent dans ce cas de figure de diminuer la dose délivrée par fraction pour les mêmes effets. De plus, si l'on met en relation nos résultats obtenus sur la viabilité cellulaire (par exemple pour le traitement combiné HRT/Au@DTDTPA(Gd), 57% de viabilité), il serait possible qu'une certaine proportion des cellules viables présentent des catastrophes et qu'une partie des cellules mortes l'aient été suite aux morts découlant des catastrophes mitotiques.

### 3.1.4 Evaluation de l'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur les capacités protéolytiques des cellules échappées.

Pour pouvoir progresser, les tumeurs gliales de haut grade doivent se créer de l'espace en dégradant la MECc pour pouvoir infiltrer le parenchyme cérébral (Jabłońska-Trypuć et al. 2016).

L'activité protéolytique impliquant les MMPs peut résulter soit des cellules tumorales situées à la périphérie du cœur de la tumeur permettant ainsi une extension de la masse centrale, soit des cellules échappées qui ont besoin de dégrader la matrice pour permettre leur propre migration à travers le parenchyme sain (Alieva et al. 2019). C'est pourquoi, notre analyse de l'activité protéolytique des MMPs,

basée sur la zymographie, s'est concentrée d'une part, sur les surnageants des sphéroïdes considérés dans leur globalité, et d'autre part, sur les surnageants des cellules échappées.

#### 3.1.4.1 *Analyse de la sécrétion et de l'activité protéolytique post-traitement du sphéroïde*

Les zymogrammes obtenus révèlent la présence de deux bandes majoritaires. La bande à 72 kDa est représentative de la pro-MMP2 car il s'agit du poids moléculaire de la protéine non clivée. Il existe cependant des formes partiellement actives qui expliquent la présence de la digestion de la gélatine. La bande à 62 kDa est représentative de la forme clivée de la pro-MMP2, elle représente la forme active qui digère activement la gélatine des gels de zymographies. Nous parlerons alors « MMP2 active ». La somme des bandes pro-MMP2 et MMP2 active sera appelée ici « sécrétion de la MMP2 ». Nous avons également constaté à 92 kDa une bande représentative de la pro-MMP9 dans les zymogrammes des cellules échappées. Cependant, du fait de son intensité proche de celle du bleu de Coomassie du gel, nous n'avons pas pu quantifier la MMP9 active.

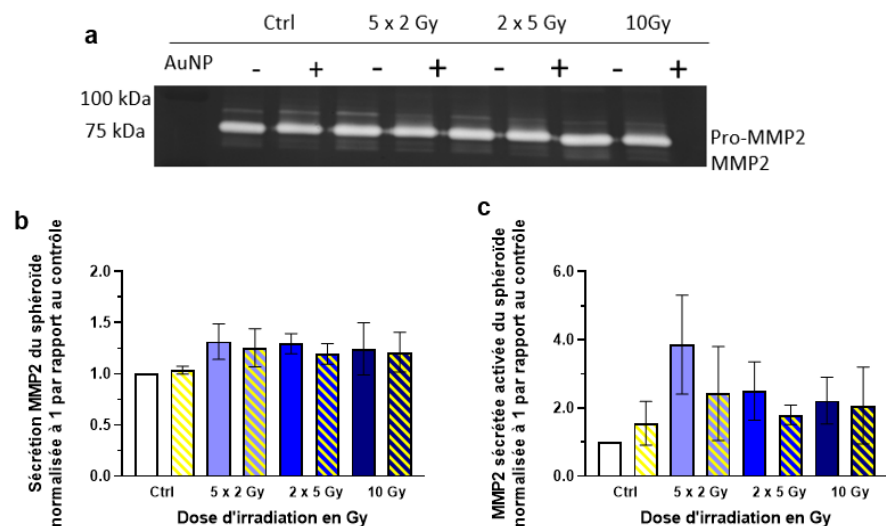
D'après les images des zymogrammes réalisés (**figure 85a**), les sphéroïdes U87 non traités secrètent fortement la MMP2. Quels que soient les traitements réalisés sur les sphéroïdes U87, la sécrétion de la MMP2 semble stable par rapport aux sphéroïdes témoins (**figure 85b**).

D'après les zymogrammes, les sphéroïdes CTRL présentent une forte sécrétion de MMP2 mais la forme MMP2 active reste relativement modérée. Les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) ne semblent pas modifier l'expression des deux formes. Lorsque les sphéroïdes sont irradiés, les différents protocoles d'irradiation tendent à augmenter l'activité MMP2 par rapport aux sphéroïdes Ctrl (facteur 2 à 4). L'association des nanoparticules à la radiothérapie provoquerait une atténuation de l'activité MMP2 par rapport aux protocoles d'irradiation correspondant (seulement pour CRT 5 x 2 Gy et HRT 2 x 5 Gy) (**figure 85c**).

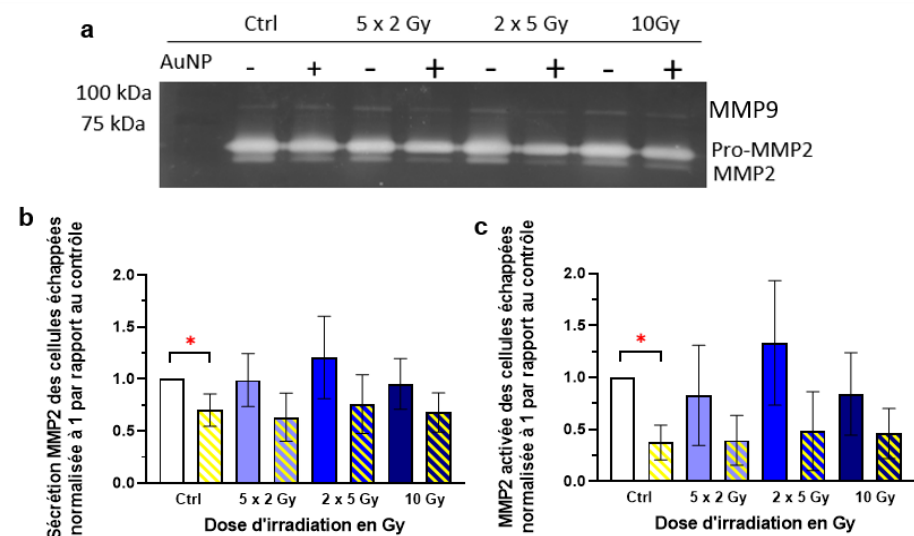
#### 3.1.4.2 *Analyse des capacités protéolytiques des cellules échappées post-traitement*

D'après les images des zymogrammes réalisés (**figure 86a**), les cellules échappées de sphéroïdes non traités secrètent fortement la MMP2. En revanche, les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) induisent une diminution significative de la sécrétion de la MMP2 par rapport aux cellules échappées témoins (-30%  $p < 0,05$ ). Les protocoles d'irradiation ne modifient pas la sécrétion MMP2 des cellules échappées par rapport aux cellules échappées témoins. En revanche, les traitements combinés tendent à diminuer la sécrétion MMP2 par rapport à leur irradiation respective (entre -36, -37% et -28% respectivement pour CRT, HRT et 10RT, statistiquement non significatif) (**figure 86b**).

Lorsque l'on s'intéresse aux bandes correspondant à l'activité MMP2, nous constatons une forte activité pour les cellules échappées témoins. Les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) diminuent l'activité MMP2 (-63%,  $p < 0,05$ ). L'irradiation ne semble pas modifier l'activité MMP2. Pour les traitements combinés, l'activité MMP2 apparaît systématiquement plus faible que pour l'irradiation seule correspondante (-53%, -64% et -45% respectivement pour CRT, HRT et 10RT) (**figure 86c**).



**Figure 85. Impact des Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur l'activité de MMP2 dans les surnageants des sphéroïdes U87.** Les sphéroïdes ont été exposés aux nanoparticules pendant 24h puis irradiés à 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy. Les surnageants ont été récupérés 16h post-irradiation. Les protéines du surnageant ont été quantifiées. 12µg de protéines ont été déposés dans un gel de polyacrylamide à 1% de gélatine. Après digestion enzymatique, les gels ont été colorés au bleu de coomassie puis ont été photographiés (a). (b) Résultats de la zymographie de la sécrétion de MMP2 (c) Résultats de la zymographie de l'activité protéolytique MMP2. Les gradations de bleu représentent les différents protocoles d'irradiation (du plus grand fractionnement au plus petit fractionnement). Les données sont exploitées de manière indépendante (n = 3 expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de zymographie. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types.



**Figure 86. Impact des Au@DTDTPA(Gd) et de la radiothérapie sur l'activité de MMP2 dans les surnageants des cellules échappées des sphéroïdes U87.** Les sphéroïdes ont été exposés aux nanoparticules pendant 24h puis irradiés à 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont retirés puis les cellules échappées sont cultivées trois jours. Les surnageants ont été récupérés à la fin du troisième jour de prolifération. Les protéines du surnageant ont été quantifiées. 12µg de protéines ont été déposés dans un gel de polyacrylamide à 1% de gélatine. Après digestion enzymatique, les gels ont été colorés au bleu de coomassie puis ont été imagés (a). (b) Résultats de la zymographie de la sécrétion de MMP2 (c) Résultats de la zymographie de l'activité protéolytique MMP2. Les gradations de bleu représentent les différents protocoles d'irradiation (du plus grand fractionnement au plus petit fractionnement). Les données sont exploitées de manière indépendante (n = 4 expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de zymographie. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. \* p < 0,05

Ces expérimentations indiquent que nos traitements n'ont pas d'effet significatif sur les propriétés protéolytiques des sphéroïdes considérés dans leur globalité. En revanche, les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) apportent un bénéfice intéressant en diminuant la sécrétion MMP2 et les capacités protéolytiques des cellules échappées et lorsqu'elles sont délivrées seules ou en association avec l'irradiation (protocoles CRT 5 x 2 Gy/Au@DTDTPA(Gd), HRT 2 x 5 Gy/Au@DTDTPA(Gd) et 10RT/Au@DTDTPA(Gd) .

L'augmentation de la sécrétion et de l'activité des MMPs, notamment de MMP2 dans les cellules U87 *in vitro* en 2D, a été rapportée plusieurs fois augmentée après irradiation X (Pei et al. 2015 et Mao et al. 2018). Les effets rapportés étaient cependant dépendants de la dose d'irradiation. En effet, l'étude de Pei et al. a mis en évidence que l'irradiation X induit une augmentation de l'activité MMP2 des cellules U87 qui n'est marquée qu'à partir d'une dose de 6 Gy par rapport à une dose de 2 et 4 Gy (Pei et al. 2015). L'étude de Mao et al. a montré que l'irradiation X induit une légère augmentation de la sécrétion de MMP2 à 2 et 5 Gy et de son activité uniquement à 5 Gy dans les cellules U87 (Mao et al. 2018).

En comparaison avec nos données d'invasion 3D et sur notre modèle *in vitro* 2D/3D en zymographie, nous avons constaté que l'augmentation de l'invasion pour le protocole HRT 2 x 5 Gy est associée à une tendance à l'augmentation de l'activité MMP2 des cellules échappées, ce qui n'est pas le cas pour le protocole 10RT et CRT dont l'activité MMP2 présente une légère diminution. Le protocole d'irradiation déployé pourrait alors expliquer les variations sur nos cellules et non la dose totale comme ce qui a été montré en culture 2D.

De plus, au regard de nos résultats sur la cytotoxicité directe de nos traitements sur les cellules échappées, il n'est pas exclu que les variations de la sécrétion et de l'activité MMP2 soient dûes à la baisse de la viabilité cellulaire, en particulier pour les traitements combinés et l'irradiation à 10 Gy.

### 3.1.5 Impact de nos traitements sur les jonctions intercellulaires des cellules échappées

Si nous avons observé la mise en place des jonctions intercellulaires par les cellules échappées, nous n'en connaissons cependant pas la nature. Les travaux d'Osswald et al. avaient mis en évidence *in vivo* la présence de très longs et fins prolongements dans les cellules de GBM. La présence de ces prolongements était associée à une résistance aux thérapies conventionnelles, aussi bien la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie notamment par augmentation des capacités infiltrantes (Osswald et al. 2016 et Weil et al. 2017). Les auteurs ont caractérisé ces prolongements et ont constaté qu'ils étaient riches en actine-F et exprimaient des marqueurs spécifiques comme GAP-43 responsable de l'émergence des axones et Connexine-43 (Cx43) qui est une protéine des jonctions communicantes (Osswald et al. 2016). Ces prolongements, appelés *tumor microtubes*, permettraient des échanges en ions mais aussi en organites comme les mitochondries pour permettre aux cellules voisines de résister aux thérapies (Osswald et al. 2015).

Au regard de ces données récentes de la littérature, nous nous sommes demandés si les prolongements que nous avons observés pouvaient être des microtubes tumoraux similaires à ceux décrits par Osswald et al. Nous avons donc réalisé des marquages des cellules échappées pour l'actine-F, GAP-43 et Cx43 en immunocytofluorescence. Les marquages GAP43 ne semblaient pas spécifiques aux microtubes et



apparaissaient faibles et diffus au niveau cytoplasmique dans toutes les conditions expérimentales. Une mise au point expérimentale plus approfondie (test de différents lots d'anticorps, variations des protocoles expérimentaux) sera nécessaire pour une future mise au point de cette immunodétection. Nous nous sommes alors concentrés sur les résultats obtenus pour les marquages de l'actine-F et de la Cx43.

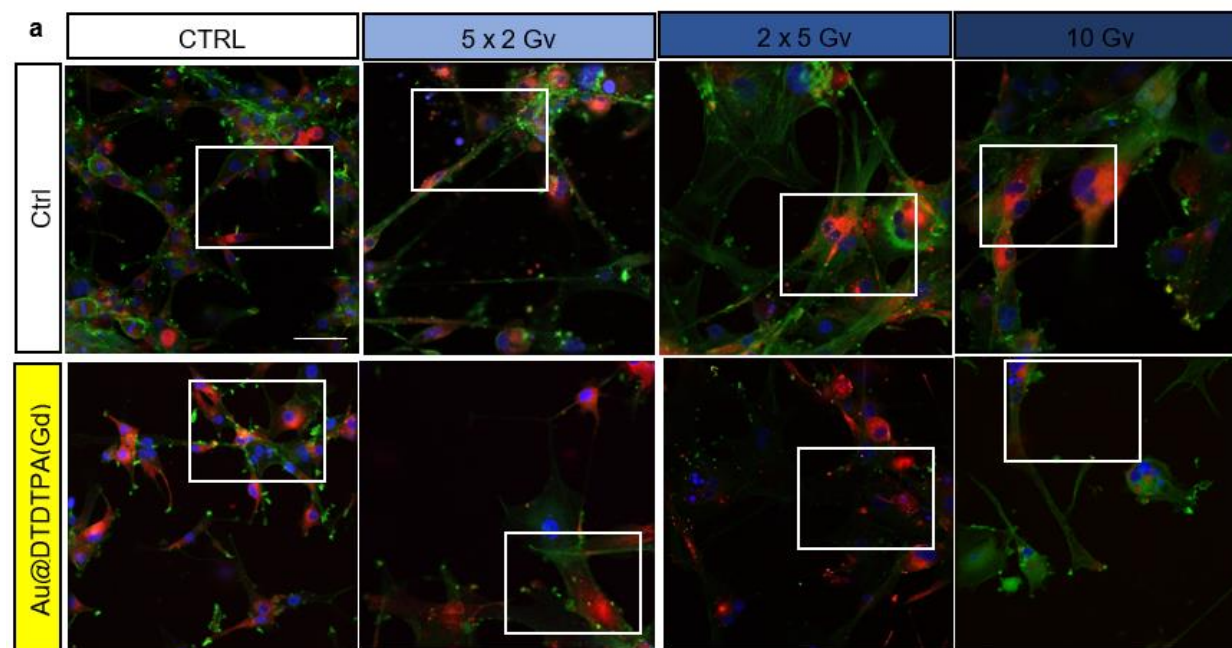
Dans les cellules échappées de sphéroïdes CTRL, nous avons constaté que l'actine-F est fortement concentrée au niveau des protrusions cellulaires qui rappellent la formation de points focaux. Elle est également présente sous forme de longs filaments au niveau des jonctions intercellulaires. Parallèlement, le signal de la Cx43 y apparaît majoritairement diffus au niveau du cytoplasme avec quelques signaux punctiformes localisés au niveau de la base des prolongements ou au centre d'un prolongement intercellulaire (**figure 87a et b**).

Lorsque les cellules échappées sont irradiées nous constatons que, peu importe le protocole d'irradiation, les cellules semblent de plus grande taille avec un cytosquelette d'actine-F bien marqué au niveau des protrusions et des longs prolongements cellulaires. Les cellules forment des jonctions intercellulaires plus longues, avec un diamètre qui semble augmenter par rapport au groupe témoin. Le signal de la Cx43 semble davantage marqué au niveau cytoplasmique et périnucléaire mais il est également très punctiforme au niveau des jonctions intercellulaires (**figure 87a et b**).

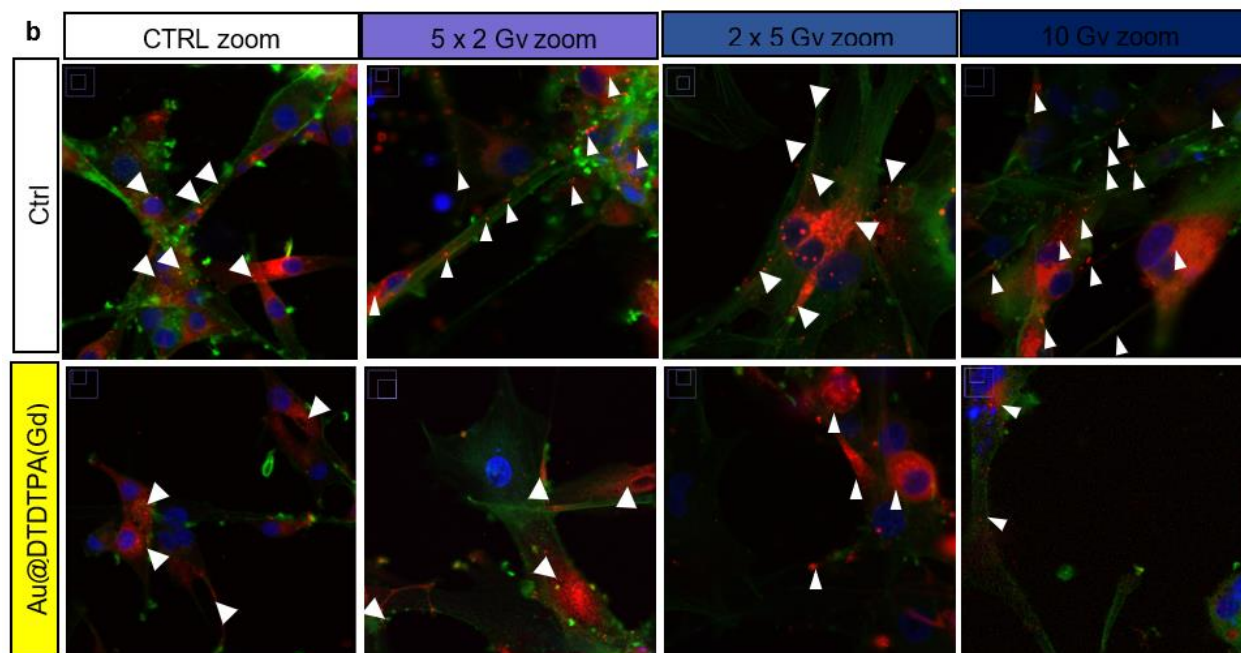
Lorsque nous observons les cellules échappées issues de sphéroïdes exposés aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd), nous constatons que les cellules s'arrondissent davantage, avec une augmentation de la taille pour certaines d'entre elles. Les cellules traitées forment également moins de jonctions intercellulaires par rapport aux cellules échappées témoins. De plus, le signal de la Cx43 est préférentiellement localisé au niveau cytoplasmique et périnucléaire (**figure 87a et b**).

Lorsque les nanoparticules sont associées aux différents protocoles de radiothérapie, le nombre de cellules apparaît fortement diminué. Le cytosquelette d'actine-F semblerait moins bien défini par rapport aux cellules irradiées. De plus, les cellules traitées forment beaucoup moins de jonctions intercellulaires par rapport aux cellules échappées irradiées. Le signal de la Cx43 apparaît exclusivement marqué au niveau cytoplasmique et périnucléaire comparé aux signaux punctiformes détectés pour les cellules irradiées (**figure 87a et b**).

**Ainsi, ces observations nous indiquent que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) auraient un impact sur la formation de jonctions intercellulaires exprimant la Cx43 des cellules échappées et perturbent la morphologie des cellules. Cette perturbation est exacerbée lorsque les nanoparticules sont associées aux différents protocoles de radiothérapie CRT 5 x 2 Gy, HRT 2 x 5 Gy et 10RT 10 Gy. Les traitements combinés inhibent l'induction de la formation des jonctions intercellulaires exprimant la Cx43 et de l'organisation du cytosquelette d'actine au sein de la cellulaire.**



**Figure 87a. Impact des Au@DTDTPA(Gd) et de l'irradiation sur les prolongements cellulaires des cellules échappées.** Trois sphéroïdes ensemencés dans des puits de Labtek 8 puits ont été exposés aux nanoparticules pendant 24h puis irradiés à 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont retirés puis les cellules échappées sont cultivées trois jours. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% et sont marquées pour la connexine 43 (rouge, indiqué avec les flèches blanches), l'actine-F (vert) et les noyaux (bleu). Les lames ont été prises en photo à l'aide d'un microscope confocal de fluorescence au grossissement x20 (a) et des zooms des images ont été récupérées à l'aide d'Image J (b). Les photographies sont représentatives de trois expérimentations indépendantes.



**Figure 87b. Impact des Au@DTDTPA(Gd) et de l'irradiation sur les prolongements cellulaires des cellules échappées.** Trois sphéroïdes ensemencés dans des puits de Labtek 8 puits ont été exposés aux nanoparticules pendant 24h puis irradiés à 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont retirés puis les cellules échappées sont cultivées trois jours. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde 4% et sont marquées pour la connexine 43 (rouge, indiqué avec les flèches blanches), l'actine-F (vert) et les noyaux (bleu). Les lames ont été prises en photo à l'aide d'un microscope confocal de fluorescence au grossissement x20 (a) et des zooms des images ont été récupérées à l'aide d'Image J (b). Les photographies sont représentatives de trois expérimentations indépendantes.

Lors de suivi en temps réel de comportements de cellules de GBM *in vivo*, Weil et *al.* ont également constaté que les cellules irradiées formaient des jonctions intercellulaires similaires aux nôtres. Ils ont également mis en évidence l'expression de l'actine-F, de la Cx43 mais également de la protéine GAP43 dans ces jonctions. L'ensemble de ces marqueurs sont caractéristiques des microtubes. La présence des microtubes entre les cellules irradiées serait associée à la radiorésistance avec une absence de cytotoxicité lorsque les cellules étaient connectées entre elles (Weil et *al.* 2017).

Le statut de la Cx43 dans l'infiltration du GBM reste flou. Une méta-analyse a indiqué qu'un niveau d'expression de la Cx43 plus faible était associé à un plus mauvais pronostic chez les patients (Zhang et *al.* 2019), alors que d'autres publications ont montré que l'expression de la Cx43 entraînait une augmentation de la résistance aux thérapies conventionnelles *via* le transfert de mitochondries (Gielen et *al.* 2013). Aucune de nos observations ne semblent corrélées à ces cas de figures, ce qui suggère que les effets de l'expression et de la localisation de la Cx43 seraient liés. De manière intéressante, Crespin et *al.* ont analysé en Western Blot et en immunohistofluorescence l'expression de la Cx43 dans différents grades de gliomes diffus. L'expression globale de la Cx43 était la plus marquée pour les grades II et III en Western Blot. Cependant, lorsque les immunohistofluorescences ont été réalisées au sein des tumeurs, les auteurs ont constaté une forte hétérogénéité de marquage positif dans les GBM, avec des expressions de surface, voire des expressions aberrantes cytoplasmiques, périnucléaires et nucléaires (Crespin et *al.* 2016). S'il n'est pas encore possible de corréler l'agressivité des cellules avec la localisation exacte de la Cx43, il pourrait s'agir d'un élément d'étude intéressant pour comprendre l'action de nos traitements sur la localisation de la Cx43.

Osswald et *al.* ont également mis en évidence qu'entre les cellules de gliome reliées par des microtubes, des transferts d'IP3, d'ions calcium, des siRNA/miRNA, d'ATP, des acides aminés et du glutathion étaient possibles, tous étant des composés clés dans la migration et la survie des cellules (Osswald et *al.* 2015). Ces données de la littérature suggèrent que les cellules de GBM formant des microtubes s'adaptent métaboliquement à l'irradiation, ce qui pourrait expliquer le maintien de l'invasion diffuse dans nos résultats *in vitro* et *in vivo*.

#### 3.1.5.1 *Perspective d'étude sur la caractérisation de la fonctionnalité des microtubes post-traitement*

Nous avons observé une relocalisation de la Cx43 au niveau cytoplasmique et périnucléaire post-traitement et une perte des microtubes. Nous n'avons pas déterminé si les Cx43 encore présentes dans les jonctions intercellulaires des cellules traitées sont encore fonctionnelles ou non. Nous nous demandons alors si les jonctions communicantes mises en place par les cellules échappées développant des microtubes permettent toujours des transferts de molécules après l'association des nanoparticules Au@DTDТА(Gd) et l'irradiation. Pour étudier la fonctionnalité des jonctions communicantes impliquant la Cx43, il serait possible de visualiser par la technique du Gap-FRAP (technique en microscopie de fluorescence) le transfert entre deux cellules jointes d'une molécule fluorescente telle que le Diacétate de 5(6)-carboxyfluorescéine (CFDA) ou acétoxyméthylester de calcéine (AM). Cette technique a déjà été mise en œuvre au laboratoire par Abbaci et *al.* (Abbaci et *al.* 2007).

### 3.1.6 Caractérisation du potentiel « souche » des cellules échappées post-traitement

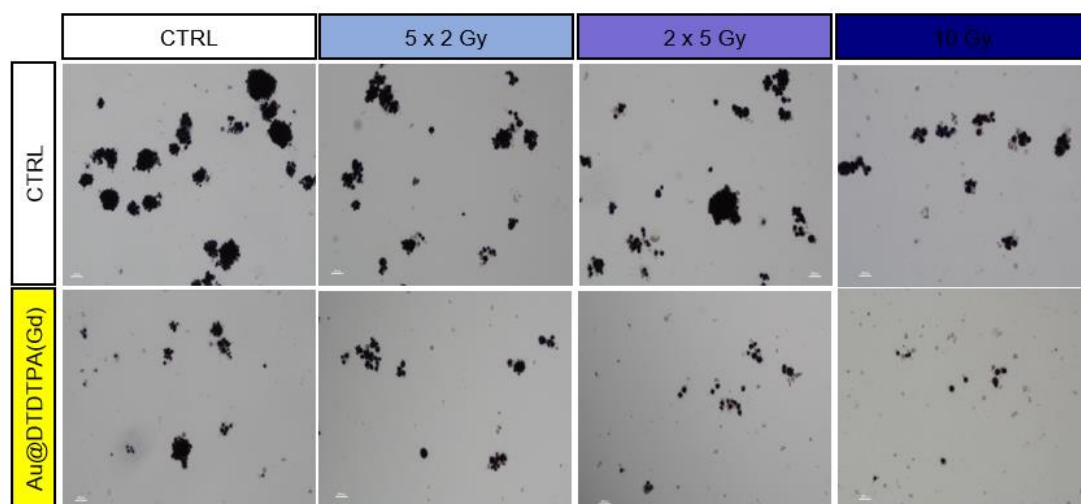
Dans une récente étude menée par Linkous et *al.*, les auteurs ont constaté que les cellules de GBM présentant des caractéristiques souches isolées de la région périvasculaire et remises en culture pour former des organoïdes sont capables de former des microtubes et présentaient une radiorésistance proche de la clinique (Linkous et *al.* 2021). De plus, Sheng et *al.* ont rapporté que les cellules de GBM présentant des caractéristiques souches exprimaient la Cx43 et étaient un des facteurs de résistance aux traitements conventionnels (Sheng et *al.* 2021). Dans nos expérimentations, les cellules échappées des sphéroïdes U87 sont capables de reformer des amas 3D et expriment la Cx43. Nous nous sommes alors demandés si les cellules U87 migrant des sphéroïdes pouvaient présenter des caractéristiques souches, et nous avons tenté d'évaluer l'impact des traitements dans ce contexte.

Les GBM sont composés de différentes sous-populations cellulaires très hétérogènes et parmi celles-ci, les cellules initiatrices de glioblastome, bien que largement minoritaires, constituent une menace particulière car leurs caractéristiques souches font qu'elles contribuent activement à la progression tumorale (croissance et infiltration), à la résistance des GBM face aux traitements ainsi qu'à la survenue des récives (Goffart et *al.* 2013, Lathia et *al.* 2015).

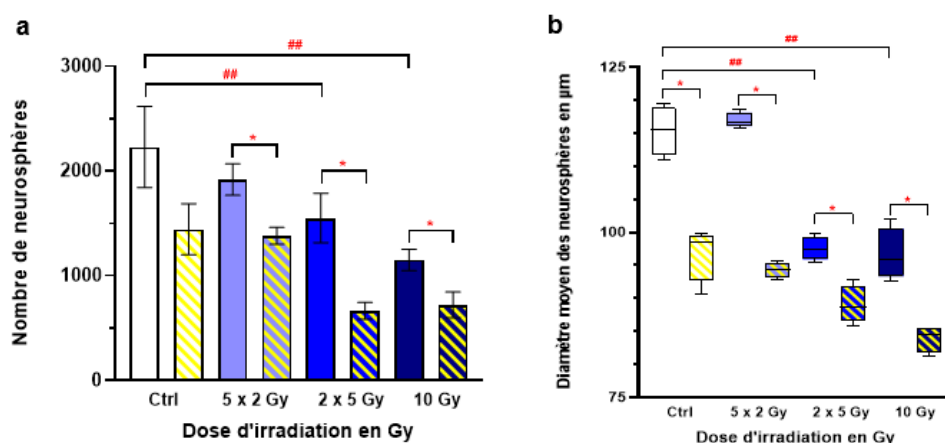
En culture cellulaire *in vitro*, il est possible de mettre en culture les cellules échappées dans un milieu spécialement conçu pour la croissance des tumorsphères (milieu sans sérum et enrichi en facteurs de croissance adéquats : EGF, FGF par exemple), et de sélectionner ainsi uniquement les cellules capables de conduire à la formation de neurosphères en suspension (Zhang et *al.* 2020) (**figure 88**), ce qui suppose qu'elles possèdent un caractère souche.

Après quatre jours de culture, nous avons dénombré à l'aide d'un compteur de colonies, les neurosphères formées en suspension dans le milieu à partir de  $1.10^5$  cellules échappées ensemencées, permettant ainsi de calculer la proportion de cellules présentant un potentiel souche parmi ces cellules. La mesure du diamètre des neurosphères formées a permis également d'évaluer l'impact de nos traitements sur la prolifération cellulaire au sein des sphères.

Dans le groupe témoins, le nombre de sphères s'élève à  $2230 \pm 389$  (**figure 89a**) et leur diamètre moyen était de  $115 \pm 3,7 \mu\text{m}$  (**figure 89b**). L'ajout des nanoparticules induit une tendance à la diminution du nombre de sphères formées ( $1444 \pm 243$ , soit -35%), qui sont également de plus petites tailles ( $-18 \mu\text{m}$ ,  $p < 0,05$ ). Nous avons observé une diminution significative du nombre de sphères quand les cellules échappées avaient été préalablement irradiées avec le protocole HRT et 10RT (1551 et 1151



**Figure 88. Observations des cellules initiatrices traitées et mise en culture en milieu neurosphère.** Les sphéroïdes ont été exposés aux nanoparticules pendant 24h puis irradiés à 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont retirés puis les cellules échappées sont cultivées trois jours. Les cellules échappées sont ensuite cultivées dans un milieu neurosphère pendant 4 jours afin de réaliser une sélection des cellules présentant un potentiel souche (cellules initiatrices). Les cellules iniatrices qui ont proliférées et formées des neurosphères sont colorées avec du MTT pendant 30min. Des prises de photos sont réalisées au GelCount. Ces photographies sont représentatives de trois expérimentations indépendantes.



**Figure 89. Quantification du nombre et du diamètre des cellules initiatrices traitées et mise en culture en milieu neurosphère.** Les sphéroïdes ont été exposés aux nanoparticules pendant 24h puis irradiés à 5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy et 10 Gy sur cinq jours. Les sphéroïdes sont retirés puis les cellules migratrices sont cultivées trois jours. Les cellules migratrices sont ensuite cultivées dans un milieu neurosphère pendant 4 jours afin de réaliser une sélection des cellules présentant un potentiel souche (cellules initiatrices). Les cellules iniatrices qui ont proliférées et formées des neurosphères sont colorées avec du MTT pendant 30min. Des prises de photos sont réalisées au GelCount. Le nombre (a) et le diamètre (b) des neurosphères ont été déterminés à l'aide du logiciel intégré au GelCount. Les gradations de bleu représentent les différents protocoles d'irradiation (du plus grand fractionnement au plus petit fractionnement). Les données sont exploitées de manière indépendante (n = 4 expérimentations). Les données sont représentées sous la forme d'histogrammes représentatifs de la moyenne de chaque comptage. Les barres d'erreurs représentent les écarts-types. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

respectivement, p < 0,01). De plus, la taille des neurosphères diminue dès irradiation avec le protocole HRT et 10RT par rapport aux neurosphères non traitées (-17 et -19 µm respectivement, p < 0,01).



Le nombre de neurosphères diminue dès que l'irradiation est associée aux nanoparticules par rapport aux schémas d'irradiation seuls respectifs (CRT -507, HRT -887 et 10RT -429). Le diamètre des sphères formées est également réduit par rapport aux sphères issues de cellules échappées irradiées (entre -9 et -22  $\mu\text{m}$ ).

**Ainsi, ces données nous indiquent que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) induiraient une diminution de la taille de sphères formées à partir des cellules échappées. Le traitement combiné induit systématiquement une diminution du nombre et de la taille des sphères. Particulièrement, le traitement HRT/Au@DTDTPA(Gd) diminue plus fortement le nombre et la taille des sphéroïdes que l'irradiation à 10 Gy. Au regard des données sur le dénombrement des cellules échappées, environ 1% des cellules échappées traitées avec le protocole HRT/Au@DTDTPA(Gd) présentent des capacités à développer des neurosphères contre 1,7% pour les cellules échappées irradiées à 10 Gy. Nos traitements combinés pourraient impacter ces populations présentant des caractéristiques souches et leur capacité à reformer des sphères.**

#### *3.1.6.1 Perspective immédiate : Caractérisation du caractère souche des cellules initiatrices post-traitement*

Les populations souches dans les cellules de gliomes sont caractérisées par la capacité à l'auto-renouvellement et à former de nouvelles sphères tumorales. Ces conditions ne sont pas les seules caractérisant ces populations. En effet, l'expression de marqueurs souches embryonnaires qui permettent le maintien des capacités d'auto-renouvellement (Hattermann et al. 2016) signe également le caractère souche. Les cellules initiatrices de GBM expriment certains de ces marqueurs tels que CD133, SOX2, Nanog (Munthe et al. 2016) ou encore CD44, Nestin, CD15, Oct4 (Badhuri et al. 2020).

Ainsi, nous voulons savoir si les cellules initiatrices migrant depuis des sphéroïdes exposés aux nanoparticules et irradiés expriment certains marqueurs de cellules souches, et si leur expression est en lien avec les résultats obtenus en culture neurosphère.. En collaboration avec le laboratoire MEDyC de l'université de Reims, nous avons préparé des échantillons de cellules échappées traitées ou non. L'expression des marqueurs souches précédemment énumérés sera analysée par RT-QPCR et/ou *digital droplet* PCR s'il est nécessaire d'augmenter la sensibilité de la PCR (Saxena et al. 2019).

# CONCLUSION & PERSPECTIVES

## 1 CONCLUSION

Les travaux de thèse menés ont permis de démontrer que les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sont capables de perturber les capacités biomécaniques des cellules de GBM mais présentent également un intérêt thérapeutique en association avec la radiothérapie par photons X pour limiter les capacités invasives des cellules de GBM.

Les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) n'entraînent pas de cytotoxicité directe sur la lignée infiltrante U251 mais diminuent significativement leurs capacités invasives *in vitro* lorsqu'elle est cultivée en sphéroïde. L'inhibition de l'invasion n'est pas associée à une diminution de l'activité protéolytique liée à l'expression MMP14 ou à l'activité MMP2, mais est associée à une diminution des capacités des cellules à se déplacer à la fois collectivement et individuellement. L'ensemble de la dynamique de la migration de la cellule exposée aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) est affectée, c'est-à-dire une baisse de sa vitesse et de la régularité de sa trajectoire. Ces résultats sont en cohérence avec les effets anti-migratoires et anti-invasifs des nanoparticules d'or rapportés dans la littérature pour d'autres types de cellules cancéreuses (Shin et al. 2018 et Huai et al. 2019). Ceci est d'autant plus intéressant que les propriétés anti-invasives de nos nanoparticules pourraient présenter un intérêt pour d'autres problématiques en cancérologie notamment sur l'inhibition de la propagation des métastases, voire l'inhibition de leur génération (Gonçalves et al. 2021). De même, les perturbations de la migration et de l'invasion pourraient représenter une nouvelle piste thérapeutique pour le blocage de l'angiogenèse tumorale qui dépend de ces processus (Hardee et Zagzag, 2012).

Les altérations de la motilité causées par les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sont associées à des changements morphologiques marqués par une diminution du nombre de protrusions cellulaires, une augmentation du diamètre et du nombre de fibres de stress au niveau des protrusions, ainsi que d'une rigidification de la membrane plasmique. L'une de nos hypothèses est que nos nanoparticules pourraient se fixer directement à l'actine-F. *In fine*, ceci entraînerait une modification de la conformation de l'actine-F qui pourrait impacter directement la formation des fibres de stress et des protrusions (Holt et al. 2012, Wen et al. 2013). A l'heure actuelle, les données sur les nanoparticules inorganiques et le cytosquelette dans les cellules échappées restent encore floues. Notre étude permettrait de donner de nouvelles pistes d'études pour mieux comprendre les interactions entre les nanoparticules et les structures intracellulaires et leur conséquence sur le fonctionnement et l'intégrité des cellules. Par ailleurs, les propriétés chimiques de nos nanoparticules sont particulièrement intéressantes puisque la présence de sites de chélation libres dans la couche de DTDTPA permettrait la chélation d'ions divalents comme les ions calciums qui sont impliqués notamment dans la polymérisation, la stabilisation et la contraction du cytosquelette d'actine-F (Tsai et al. 2015).

Les modifications biomécaniques induites par les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) sont marquées par une adhérence précoce des cellules et son maintien au cours du temps, ainsi que la hausse des forces d'accroche. Ces forces sont corrélées à une augmentation de l'expression protéique membranaire de la sous-unité  $\beta 1$  des intégrines et de la taline-1, deux protéines essentielles à la mise en place des points focaux d'adhésion.

L'association des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) à la radiothérapie (5 x 2 Gy, 2 x 5 Gy, 10 Gy), en particulier à un protocole d'hypofractionnement (2 x 5 Gy), induit une perte des capacités invasives de la lignée radorésistante U87 *in vitro*, *ex vivo* mais aussi *in vivo*. Ces données représentent un argument supplémentaire quant au bénéfice thérapeutique des nanoparticules inorganiques pour la radiopotentialisation, qui nécessite encore à l'heure actuelle des évaluations pré-cliniques avant d'autoriser le passage aux essais cliniques.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence que l'association des nanoparticules à l'hypofractionnement était aussi performante voire plus performante sur certains aspects que l'irradiation monodose à 10 Gy seule. Ces résultats pourraient alors indiquer que le *design* du protocole d'irradiation peut conditionner les effets anti-invasifs en association avec les nanoparticules Au@DTDTPA(Gd). Il pourrait être intéressant de considérer d'autres techniques de délivrance des radiations ionisantes, notamment la radiothérapie par microfaisceaux qui avait démontré une efficacité *in vivo* en association aux nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) (Miladi et al. 2014). Le choix de source d'irradiation, notamment les ions carbone qui donnent des résultats encourageants sur l'inhibition de l'invasion (Moncharmont et al. 2016) pourrait être considérés, avec le fractionnement de la radiothérapie, dans des études *in vivo* basées sur les effets radiopotentialisants des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd).

La numération et la caractérisation des cellules initiatrices de GBM traitées a permis de mettre en évidence une diminution de la quantité de cellules échappées, une induction de la mortalité cellulaire potentiellement retardée par l'induction de catastrophes mitotiques. Le traitement des cellules initiatrices induit également une diminution de la sécrétion de MMP2 mais également de son activité, ce qui signifie que la proportion réduite de cellules initiatrices ayant migré exercent une activité protéolytique réduite. Le traitement combinatoire induit également des modifications morphologiques significatives renforcées par rapport aux nanoparticules seules, qui sont associées à une perte de l'étalement des cellules et des jonctions communicantes mises en place avec un protocole d'irradiation seul. De manière intéressante, le traitement combinatoire limiterait également le nombre de cellules initiatrices présentant des caractéristiques souches (Hattermann et al. 2016). Nos nanoparticules pourraient ainsi avoir un effet bénéfique contre la reprise et la progression tumorale.

Lorsque nous comparons l'ensemble de nos résultats, nous avons constaté que les effets anti-migratoires et anti-invasifs de nos traitements combinés sont plus marqués *in vitro* ou lorsque les sphéroïdes sont traités séparément *in vitro* pour les tests *ex vivo* et *in vivo* que pour les sphéroïdes traités *in vivo* après implantation. Devant ce différentiel, il n'est pas impossible que la concentration intracellulaire en nanoparticules soient moins favorables pour les sphéroïdes traités *in vivo* mais aussi que la radiothérapie et les nanoparticules agissent sur le microenvironnement de la tumeur.

Ainsi, nos observations ouvrent une nouvelle question sur les effets de nos traitements sur le microenvironnement cérébral et leurs impacts sur la communication cellules saines/cellules tumorales.

## 2 PERSPECTIVES FAISANT SUITE A NOS TRAVAUX SUR LES NANOPARTICULES Au@DTDTPA(Gd) ET LA RADIOTHERAPIE

### 2.1 CONTEXTE SCIENTIFIQUE

De plus en plus de recherches démontrent l'importance de la prise en compte des cellules non tumorales et du microenvironnement moléculaire en plus de la physiologie de la tumeur (hypoxie, inflammation, etc), pour l'étude du processus d'infiltration. Le microenvironnement tumoral englobe les propriétés de la MECc, les facteurs sécrétés dans le milieu, les cellules présentes dans le cerveau (principalement neurones, astrocytes, cellules endothéliales, cellules immunitaires présentes dans le cerveau et la circulation cérébrale) (Manini et *al.* 2018).

En effet, les cellules immunitaires telles que les cellules de la microglie et les TAM sont capables d'encercler ou d'infiltrer la masse tumorale afin de limiter la progression des cellules cancéreuses et d'entraîner une cytotoxicité. Les astrocytes seraient également capables d'encercler la région périphérique de la tumeur et pourraient avoir une conséquence sur le caractère infiltrant ou prolifératif de la masse tumorale (Silver et *al.* 2013). Ces deux types cellulaires sécrètent un certain nombre de facteurs pour faciliter la réaction anti-tumorale. Indirectement, ces facteurs vont modifier le comportement des cellules tumorales qui vont à leur tour sécréter des facteurs pour contrer l'action des cellules du parenchyme cérébral. L'ensemble de la biologie de la cellule tumorale sera modifiée, certains auteurs ayant également relevé des effets indirects favorables à l'infiltration tumorale (Qi et *al.* 2016, Zhang et Zhang, 2015, Placone et *al.* 2016).

Dans ce contexte, nous pouvons nous demander comment la communication entre les cellules de GBM et les cellules de microglie/astrocytes sont impactées par nos traitements et si la composante microenvironnementale traitée affecte la progression tumorale.

### 2.2 QUESTIONS SCIENTIFIQUES SOULEVEES

#### 2.2.1.1 Impact des cellules tumorales traitées sur la microglie et les astrocytes

Les cellules de GBM traitées par nos traitements pourraient avoir un impact sur les astrocytes et les cellules de la microglie. Dans certaines pathologies du système nerveux, notamment les tumeurs cérébrales, les astrocytes sains peuvent subir une « astroglie », c'est-à-dire qu'ils se transforment en astrocytes réactifs (Heiland et *al.* 2019). Par rapport aux astrocytes sains, les astrocytes réactifs sont caractérisés par une hypertrophie et une prolifération accrue liée à l'activation de la voie JAK/STAT. Ils sont aussi marqués par une augmentation de la polymérisation des filaments intermédiaires de nestine, de vimentine et de GFAP (Guan et *al.* 2017). Les cellules de GBM sont également capables de sécréter un certain nombre de facteurs immunosuppresseurs et anti-inflammatoires (IL-10, TGFβ, STAT3, PD-L1) qui modifie le comportement des cellules de la microglie (Verschuere et *al.* 2014).

Dans un premier temps, il faudrait une caractérisation du sécrétome des cellules de GBM échappées issues de sphéroïdes traitées. Des approches par cytokine array et transcriptomique permettraient d'obtenir ces informations.

Dans un second temps, la culture cellulaire des astrocytes et de la microglie en milieu conditionné (c'est-à-dire une mise en culture avec le milieu de culture des cellules échappées traitées ou non), permettrait d'étudier l'impact des sécrétions des cellules échappées irradiées et/ou exposées aux Au@DTDTPA(Gd). Différents tests fonctionnels permettraient d'obtenir des informations sur la physiologie des cellules saines en réponse aux cellules tumorales : leur morphologie (visualisation en microscopie optique), leur capacité migratoire et à répondre au chimiotactisme (test en chambre transwell), leur prolifération (kit EdU), l'induction d'une cytotoxicité (test de viabilité au bleu Trypan et évaluation du cycle cellulaire à l'aide d'un cytomètre en flux), la capacité des cellules de la microglie à phagocyter (kit test phagocytose) et l'expression de marqueurs spécifiques de l'astrogliose (immunocytofluorescence et RTQPCR nestine, vimentine, GFAP) et de l'activation de la microglie (immunocytofluorescence et RTQPCR pour montrer l'expression CD11b, CD45 et Iba1) (Schwabenland et al. 2021).

### *2.2.1.2 Etude des effets des traitements combinés sur les cellules gliales et leur impact sur les cellules échappées*

Les astrocytes et la microglie sont également capables de moduler le comportement des cellules de GBM, notamment lors de l'infiltration. Elles peuvent produire des molécules de la MEC comme le versican ou encore des MMP permettant une modulation locale de la MEC. Elles peuvent également sécréter des facteurs de croissance comme le FGF ou l'EGF ou sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Placone et al. 2015 et Hambardzumyan et al. 2016)

Dans un premier temps, il nous sera nécessaire de caractériser la réponse des astrocytes et des cellules de la microglie à nos traitements (irradiation avec ou sans nanoparticules). Des démarches expérimentales similaires à celles exposées précédemment pourraient être mises en œuvre (évaluation cytotoxicité, prolifération, morphologie, capacités migratoires, expression de marqueurs spécifiques de l'astrogliose ou de l'activation de la microglie, test de phagocytose pour la microglie).

Pour comprendre comment les cellules saines traitées par radiothérapie et les Au@DTDTPA(Gd) agissent sur la migration des cellules de GBM, un système de culture en milieu conditionné analogue à celui décrit précédemment peut être décrit. A ce moment, ce sont les sécrétions des cellules saines traitées qui seront dans un premier temps étudiées par cytokine array et étude transcriptomique.

L'évaluation des capacités migratoires et invasives des cellules de GBM mises en culture en milieu conditionnée peut être réalisée par des approches expérimentales similaires à celles que nous avons déployées dans mes travaux de thèse. La mise en culture de sphéroïdes de GBM avec les milieux conditionnés permettra d'étudier la capacité des cellules à échapper des sphéroïdes. D'une part, en évaluant l'invasion des sphéroïdes (test de bourgeonnement) et d'autre part, en caractérisant la morphologie des cellules (microscopie optique et confocale de fluorescence (marquage cytosquelette d'actine-F)), la quantité de cellules échappées et l'expression de protéases (approche transcriptomique par RTQPCR). Par ailleurs, il serait également intéressant d'évaluer l'état physiologique des cellules échappées mises en culture dans des milieux conditionnés, notamment si certaines caractéristiques comme la prolifération ou l'expression de marqueurs souches sont altérés.



# BIBLIOGRAPHIE

- ADEBERG, Sebastian, HARRABI, Semi Ben, BOUGATF, Nina, BERNHARDT, Denise, MOHR, Angela, RIEBER, Juliane, KOELSCH, Christian, RIEKEN, Stefan and DEBUS, Juergen, 2016. Do Increased Doses to Stem-Cell Niches during Radiation Therapy Improve Glioblastoma Survival? *Stem Cells International*. 2016. Vol. 2016, p. 8793462. DOI 10.1155/2016/8793462.
- AFTAB, Qurratulain, MESNIL, Marc, OJEFUA, Emmanuel, POOLE, Alisha, NOORDENBOS, Jenna, STRALE, Pierre-Olivier, SITKO, Chris, LE, Caitlin, STOYNOV, Nikolay, FOSTER, Leonard J., SIN, Wun-Chey, NAUS, Christian C. and CHEN, Vincent C., 2019. Cx43-Associated Secretome and Interactome Reveal Synergistic Mechanisms for Glioma Migration and MMP3 Activation. *Frontiers in Neuroscience*. 2019. Vol. 13, p. 143. DOI 10.3389/fnins.2019.00143.
- AFTAB, Qurratulain, SIN, Wun-Chey and NAUS, Christian C., 2015. Reduction in gap junction intercellular communication promotes glioma migration. *Oncotarget*. 10 May 2015. Vol. 6, no. 13, p. 11447–11464. DOI 10.18632/oncotarget.3407.
- AGNIHOTRI, Sameer, GAJADHAR, Aaron S., TERNAMIAN, Christian, GORLIA, Thierry, DIESFES, Kristin L., MISCHER, Paul S., KELLY, Joanna, MCGOWN, Gail, THORNCROFT, Mary, CARLSON, Brett L., SARKARIA, Jann N., MARGISON, Geoffrey P., ALDAPE, Kenneth, HAWKINS, Cynthia, HEGI, Monika and GUHA, Abhijit, 2012. Alkylpurine–DNA–N-glycosylase confers resistance to temozolomide in xenograft models of glioblastoma multiforme and is associated with poor survival in patients. *The Journal of Clinical Investigation*. 3 January 2012. Vol. 122, no. 1, p. 253–266. DOI 10.1172/JCI59334.
- AHMED, Syed Ijlal, JAVED, Gohar, LAGHARI, Altaf Ali, BAREEQA, Syeda Beenish, FARRUKH, Saba, ZAHID, Shajeeah, SAMAR, Syeda Sana and AZIZ, Kashif, [no date]. CD133 Expression in Glioblastoma Multiforme: A Literature Review. *Cureus*. Vol. 10, no. 10, p. e3439. DOI 10.7759/cureus.3439.
- AKHMANOVA, Maria, OSIDAK, Egor, DOMOGATSKY, Sergey, RODIN, Sergey and DOMOGATSKAYA, Anna, 2015. Physical, Spatial, and Molecular Aspects of Extracellular Matrix of In Vivo Niches and Artificial Scaffolds Relevant to Stem Cells Research. *Stem Cells International*. 2015. Vol. 2015, p. 167025. DOI 10.1155/2015/167025.
- AKINS, Erin A., AGHI, Manish K. and KUMAR, Sanjay, 2020. Incorporating Tumor-Associated Macrophages into Engineered Models of Glioma. *iScience*. 5 November 2020. Vol. 23, no. 12, p. 101770. DOI 10.1016/j.isci.2020.101770.
- ALCANTARA LLAGUNO, Sheila R and PARADA, Luis F, 2016. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *British Journal of Cancer*. 6 December 2016. Vol. 115, no. 12, p. 1445–1450. DOI 10.1038/bjc.2016.354.
- ALIEVA, Maria, LEIDGENS, Verena, RIEMENSCHNEIDER, Markus J., KLEIN, Christoph A., HAU, Peter and VAN RHEENEN, Jacco, 2019. Intravital imaging of glioma border morphology reveals distinctive cellular dynamics and contribution to tumor cell invasion. *Scientific Reports*. 14 February 2019. Vol. 9, no. 1, p. 2054. DOI 10.1038/s41598-019-38625-4.
- ALIZADEH, Sanaz, SEYEDALIPOUR, Bagher, SHAFIEYAN, Saeed, KHEIME, Abolfazl, MOHAMMADI, Parvaneh and AGHDAMI, Nasser, 2019. Copper nanoparticles promote rapid wound healing in acute full thickness defect via acceleration of skin cell migration, proliferation, and neovascularization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1 October 2019. Vol. 517, no. 4, p. 684–690. DOI 10.1016/j.bbrc.2019.07.110.
- ALRIC, Christophe, MILADI, Imen, KRYZA, David, TALEB, Jacqueline, LUX, François, BAZZI, Rana, BILLOTEY, Claire, JANIER, Marc, PERRIAT, Pascal, ROUX, Stéphane and TILLEMENT, Olivier, 2013. The biodistribution of gold nanoparticles designed for renal clearance. *Nanoscale*. 13 June 2013. Vol. 5, no. 13, p. 5930–5939. DOI 10.1039/C3NR00012E.
- ALRIC C, Taleb J, Le Duc G, Mandon C, Billotey C, Le Meur-Herland A, Brochard T, Vocanson F, Janier M, Perriat P, Roux S, Tillement O. Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging. *J Am Chem Soc*. 2008 May 7;130(18):5908-15. doi: 10.1021/ja078176p. Epub 2008 Apr 12. PMID: 18407638.
- ALTIERI, Roberto, BARBAGALLO, Davide, CERTO, Francesco, BROGGI, Giuseppe, RAGUSA, Marco, DI PIETRO, Cinzia, CALTABIANO, Rosario, MAGRO, Gaetano, PESCHILLO, Simone, PURRELLO, Michele and BARBAGALLO, Giuseppe, 2021. Peritumoral Microenvironment in High-Grade Gliomas: From FLAIRectomy to Microglia–Glioma Cross-Talk. *Brain Sciences*. 6 February 2021. Vol. 11, no. 2, p. 200. DOI 10.3390/brainsci11020200.
- ANDREWS, Rachel N., CAUDELL, David L., METHENY-BARLOW, Linda J., PEIFFER, Ann M., TOOZE, Janet A., BOURLAND, J. Daniel, HAMPSON, Robert E., DEADWYLER, Samuel A. and CLINE, J. Mark, 2018. Fibronectin Produced by Cerebral Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Perivascular Extracellular Matrix in Late-Delayed Radiation-Induced Brain Injury. *Radiation Research*. October 2018. Vol. 190, no. 4, p. 361–373. DOI 10.1667/RR14961.1
- ANDREWS, Rachel N., CAUDELL, David L., METHENY-BARLOW, Linda J., PEIFFER, Ann M., TOOZE, Janet A., BOURLAND, J. Daniel, HAMPSON, Robert E., DEADWYLER, Samuel A. and CLINE, J. Mark, 2018.

- ANGELINI, Thomas, GOLESTANIAN, Ramin, CORIDAN, Robert, BUTLER, John, BERAUD, Alexandre, KRISCH, Michael, SINN, Harald, SCHWEIZER, Kenneth and WONG, Gerard, 2006. Counterions between charged polymers exhibit liquid-like organization and dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1 June 2006. Vol. 103, p. 7962–7. DOI 10.1073/pnas.0601435103.
- ANOCEF, référentiel Glioblastome (Grade IV), 2018. Consulté en ligne le 30/01/22 à 18h49. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiDoM75g9r1AhVGx4UKHcZXALsQFnoECA4QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.anocef.org%2Fdownload.php%3Fmodele%3Danocef\\_referentiel\\_glioblastome2018&usg=AOvVaw3sbZrZVa6ISn09MRQkFSuk](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiDoM75g9r1AhVGx4UKHcZXALsQFnoECA4QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.anocef.org%2Fdownload.php%3Fmodele%3Danocef_referentiel_glioblastome2018&usg=AOvVaw3sbZrZVa6ISn09MRQkFSuk)
- ARENDS, Fabienne and LIELEG, Oliver, 2016. *Biophysical Properties of the Basal Lamina: A Highly Selective Extracellular Matrix* [online]. IntechOpen. [Accessed 24 October 2021]. ISBN 978-953-51-2416-0. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/50443>
- ARMENTO, Angela, EHLERS, Jakob, SCHÖTTERL, Sonja and NAUMANN, Ulrike, 2017. Molecular Mechanisms of Glioma Cell Motility. In: DE VLEESCHOUWER, Steven (ed.), *Glioblastoma* [online]. Brisbane (AU): Codon Publications. [Accessed 14 October 2021]. ISBN 978-0-9944381-2-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470001/>
- ARVANITIS, Costas D., FERRARO, Gino B. and JAIN, Rakesh K., 2020. The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*. January 2020. Vol. 20, no. 1, p. 26–41. DOI 10.1038/s41568-019-0205-x.
- ARVIZO, Rochelle R., SAHA, Sounik, WANG, Enfeng, ROBERTSON, J. David, BHATTACHARYA, Resham et MUKHERJEE, Priyabrata, 2013. Inhibition of tumor growth and metastasis by a self-therapeutic nanoparticle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23 avril 2013. Vol. 110, n° 17, pp. 6700-6705.
- AUDINAT, Étienne and ARNOUX, Isabelle, 2014. La microglie : des cellules immunitaires qui sculptent et contrôlent les synapses neuronales. *médecine/sciences*. 1 February 2014. Vol. 30, no. 02, p. 153–159. DOI 10.1051/medsci/20143002012.
- AVERBECK, Dietrich and RODRIGUEZ-LAFRASSE, Claire, 2021. Role of Mitochondria in Radiation Responses: Epigenetic, Metabolic, and Signaling Impacts. *International Journal of Molecular Sciences*. 13 October 2021. Vol. 22, no. 20, p. 11047. DOI 10.3390/ijms222011047.
- BAHADAR, Haji, MAQBOOL, Faheem, NIAZ, Kamal and ABDOLLAHI, Mohammad, 2016. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iranian Biomedical Journal*. January 2016. Vol. 20, no. 1, p. 1–11. DOI 10.7508/ibj.2016.01.001.
- BAILLY, Clément, VIDAL, Aurelien, BONNEMAIRE, Coralie, KRAEBER-BODÉRE, Françoise, CHÉREL, Michel, PALLARDY, Amandine, ROUSSEAU, Caroline, GARCION, Emmanuel, LACOEUILLE, Franck, HINDRÉ, François, VALABLE, Samuel, BERNAUDIN, Myriam, BODET-MILIN, Caroline and BOURGEOIS, Mickaël, 2019. Potential for Nuclear Medicine Therapy for Glioblastoma
- BAKER, Gregory J., YADAV, Viveka Nand, MOTSCH, Sebastien, KOSCHMANN, Carl, CALINESCU, Anda-Alexandra, MINEHARU, Yohei, CAMELO-PIRAGUA, Sandra Ines, ORRINGER, Daniel, BANNYKH, Serguei, NICHOLS, Wesley S., DECARVALHO, Ana C., MIKKELSEN, Tom, CASTRO, Maria G. and LOWENSTEIN, Pedro R., 2014. Mechanisms of Glioma Formation: Iterative Perivascular Glioma Growth and Invasion Leads to Tumor Progression, VEGF-Independent Vascularization, and Resistance to Antiangiogenic Therapy. *Neoplasia*. 1 July 2014. Vol. 16, no. 7, p. 543–561. DOI 10.1016/j.neo.2014.06.003.
- BALANÍA, Carmen, CAPELLADES, Jaume, PINEDA, Estela, ESTIVAL, Anna, PUIG, Josep, DOMENECH, Sira, VERGER, Eugenia, PUJOL, Teresa, MARTINEZ-GARCÍA, Maria, OLEAGA, Laura, VELARDE, JoseMaria, MESIA, Carlos, FUENTES, Rafael, MARRUECOS, Jordi, DEL BARCO, Sonia, VILLÀ, Salvador, CARRATO, Cristina, GALLEGO, Oscar, GIL-GIL, Miguel, CRAVEN-BARTLE, Jordi, ALAMEDA, Francesc, and GLIOCAT GROUP, 2017.
- BARBAGALLO, Giuseppe M. V., JENKINSON, Michael D. and BRODBELT, Andrew R., 2008. “Recurrent” glioblastoma multiforme, when should we reoperate? *British Journal of Neurosurgery*. June 2008. Vol. 22, no. 3, p. 452–455. DOI 10.1080/02688690802182256.
- BARBARITE, Eric, SICK, Justin T., BERCHMANS, Emmanuel, BREGY, Amade, SHAH, Ashish H., ELSAYYAD, Nagy and KOMOTAR, Ricardo J., 2017. The role of brachytherapy in the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurosurgical Review*. April 2017. Vol. 40, no. 2, p. 195–211. DOI 10.1007/s10143-016-0727-6.
- BARNES, J. Matthew, PRZYBYLA, Laralynne and WEAVER, Valerie M., 2017. Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease. *Journal of Cell Science*. 1 January 2017. Vol. 130, no. 1, p. 71–82. DOI 10.1242/jcs.191742.
- BARROS, Claudia S., FRANCO, Santos J. and MÜLLER, Ulrich, 2011. Extracellular Matrix: Functions in the Nervous System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. January 2011. Vol. 3, no. 1, p. a005108. DOI 10.1101/cshperspect.a005108.

- BARTHEL, Floris P., WESSELING, Pieter and VERHAAK, Roel G. W., 2018. Reconstructing the molecular life history of gliomas. *Acta Neuropathologica*. May 2018. Vol. 135, no. 5, p. 649–670. DOI 10.1007/s00401-018-1842-y.
- BATTAGLIA, Rachel A., DELIC, Samed, HERRMANN, Harald and SNIDER, Natasha T., 2018. Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Research*. 15 November 2018. Vol. 7, p. F1000 Faculty Rev-1796. DOI 10.12688/f1000research.15967.1.
- BAYDA, Samer, HADLA, Mohamad, PALAZZOLO, Stefano, RIELLO, Pietro, CORONA, Giuseppe, TOFFOLI, Giuseppe and RIZZOLIO, Flavio, 2018. Inorganic Nanoparticles for Cancer Therapy: A Transition from Lab to Clinic. *Current Medicinal Chemistry*. 1 October 2018. Vol. 25, no. 34, p. 4269–4303. DOI 10.2174/0929867325666171229141156
- BEHLING, Felix and SCHITTENHELM, Jens, 2019. Oncogenic BRAF Alterations and Their Role in Brain Tumors. *Cancers*. 8 June 2019. Vol. 11, no. 6, p. 794. DOI 10.3390/cancers11060794.
- BEIER, Dagmar, SCHULZ, Joerg B. and BEIER, Christoph P., 2011. Chemoresistance of glioblastoma cancer stem cells--much more complex than expected. *Molecular Cancer*. 11 October 2011. Vol. 10, p. 128. DOI 10.1186/1476-4598-10-128.
- BERTHELOT, L., LAPLAUD, D.A., 2008. Organisation de la réponse immunitaire dans le système nerveux central. *La lettre du Neurologue*. Octobre 2008. Vol. XII. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwivw5vz7tH1AhUBCxoKHTMqDXMQFn\\_oECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.edimark.fr%2Ffront%2Ffrontpost%2Fgetfiles%2F14654.pdf&usg=AOvVaw19pe2CQuc5psrbTggoTxxK](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwivw5vz7tH1AhUBCxoKHTMqDXMQFn_oECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.edimark.fr%2Ffront%2Ffrontpost%2Fgetfiles%2F14654.pdf&usg=AOvVaw19pe2CQuc5psrbTggoTxxK).
- BHADURI, Aparna, DI LULLO, Elizabeth, JUNG, Diane, MÜLLER, Sören, CROUCH, Elizabeth Erin, ESPINOSA, Carmen Sandoval, OZAWA, Tomoko, ALVARADO, Beatriz, SPATAZZA, Julien, CADWELL, Cathryn René, WILKINS, Grace, VELMESHEV, Dmitry, LIU, Siyuan John, MALATESTA, Martina, ANDREWS, Madeline Gail, MOSTAJO-RADJI, Mohammed Andres, HUANG, Eric Jinsheng, NOWAKOWSKI, Tomasz Jan, LIM, Daniel Amos, DIAZ, Aaron, RALEIGH, David Ronan and KRIEGSTEIN, Arnold Richard, 2020. Outer Radial Glia-like Cancer Stem Cells Contribute to Heterogeneity of Glioblastoma. *Cell Stem Cell*. 2 January 2020. Vol. 26, no. 1, p. 48- 63.e6. DOI 10.1016/j.stem.2019.11.015.
- BIAU, Julian, CHAUTARD, Emmanuel, VERRELLE, Pierre and DUTREIX, Marie, 2019. Altering DNA Repair to Improve Radiation Therapy: Specific and Multiple Pathway Targeting. *Frontiers in Oncology*. 10 October 2019. Vol. 9. DOI 10.3389/fonc.2019.01009.
- BLACHER, Silvia, ERPICUM, Charlotte, LENOIR, Bénédicte, PAUPERT, Jenny, MORAES, Gustavo, ORMENESE, Sandra, BULLINGER, Eric and NOEL, Agnès, 2014. Cell Invasion in the Spheroid Sprouting Assay: A Spatial Organisation Analysis Adaptable to Cell Behaviour. *PLOS ONE*. 7 May 2014. Vol. 9, no. 5, p. e97019. DOI 10.1371/journal.pone.0097019
- BLANCHONIN, Laurent, BOUJEMAA-PATERSKI, Rajaa, SYKES, Cécile and PLASTINO, Julie, 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological Reviews*. January 2014. Vol. 94, no. 1, p. 235–263. DOI 10.1152/physrev.00018.2013.
- BONAVIA, Rudy, INDA, Maria-del-Mar, CAVENEE, Webster K. and FURNARI, Frank B., 2011. Heterogeneity Maintenance in Glioblastoma: A Social Network. *Cancer Research*. 15 June 2011. Vol. 71, no. 12, p. 4055–4060. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-0153.
- BRUST, M., FINK, J., BETHELL, D., SCHIFFRIN, D. J. and KIELY, C., 1995. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1 January 1995. No. 16, p. 1655–1656. DOI 10.1039/C39950001655.
- BUTLER, Madison, PONGOR, Lorinc, SU, Yu-Ting, XI, Liqiang, RAFFELD, Mark, QUEZADO, Martha, TREPEL, Jane, ALDAPE, Kenneth, POMMIER, Yves and WU, Jing, 2020. MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma. *Trends in Cancer*. 1 May 2020. Vol. 6, no. 5, p. 380–391. DOI 10.1016/j.trecan.2020.02.010.
- BRUST, M., FINK, J., BETHELL, D., SCHIFFRIN, D. J. and KIELY, C., 1995. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1 January 1995. No. 16, p. 1655–1656. DOI 10.1039/C39950001655
- BUTTERWORTH, Karl T., MCMAHON, Stephen J., CURRELL, Fred J. and PRISE, Kevin M., 2012. Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale*. 21 August 2012. Vol. 4, no. 16, p. 4830–4838. DOI 10.1039/c2nr31227a.
- BUTTERWORTH, Karl T., MCMAHON, Stephen J., TAGGART, Laura E. and PRISE, Kevin M., 2013. Radiosensitization by gold nanoparticles: effective at megavoltage energies and potential role of oxidative stress. *Translational Cancer Research* [online]. September 2013. Vol. 2, no. 4. [Accessed 26 January 2022]. DOI 10.21037/1514. Available from: <https://tcr.amegroups.com/article/view/1514>

- CABRERA, Alvin R., KIRKPATRICK, John P., FIVEASH, John B., SHIH, Helen A., KOAY, Eugene J., LUTZ, Stephen, PETIT, Joshua, CHAO, Samuel T., BROWN, Paul D., VOGELBAUM, Michael, REARDON, David A., CHAKRAVARTI, Arnab, WEN, Patrick Y. and CHANG, Eric, 2016. Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Practical Radiation Oncology*. August 2016. Vol. 6, no. 4, p. 217–225. DOI 10.1016/j.prro.2016.03.007.
- CAO, Ying, TANG, Du, XIANG, Yining, MEN, Li, LIU, Chao, ZHOU, Qin, WU, Jun, HUO, Lei, SONG, Tao, WANG, Ying, LI, Zhazhan, WEI, Rui, SHEN, Liangfang, YANG, Zhen and HONG, Jidong, 2021. Study on the Appropriate Timing of Postoperative Adaptive Radiotherapy for High-Grade Glioma. *Cancer Management and Research*. April 2021. Vol. Volume 13, p. 3561–3572. DOI 10.2147/CMAR.S300094.
- CELÁ, Petra, VESELÁ, Barbora, MATALOVÁ, Eva, VEČEŘA, Zbyněk and BUCHTOVÁ, Marcela, 2014. Embryonic toxicity of nanoparticles. *Cells, Tissues, Organs*. 2014. Vol. 199, no. 1, p. 1–23. DOI 10.1159/000362163.
- CHAICHANA, Kaisorn L., JUSUE-TORRES, Ignacio, NAVARRO-RAMIREZ, Rodrigo, RAZA, Shaan M., PASCUAL-GALLEGO, Maria, IBRAHIM, Aly, HERNANDEZ-HERMANN, Marta, GOMEZ, Luis, YE, Xiaobu, WEINGART, Jon D., OLIVI, Alessandro, BLAKELEY, Jaishri, GALLIA, Gary L., LIM, Michael, BREM, Henry and QUINONES-HINOJOSA, Alfredo, 2014. Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma. *Neuro-Oncology*. January 2014. Vol. 16, no. 1, p. 113–122. DOI 10.1093/neuonc/not137.
- CHAN, Danny T. M., HSIEH, Sonia Y. P., KAM, Michael K. M., CHEUNG, Tom C. Y., NG, Stephanie Chi P. and POON, Wai S., 2016. Pattern of recurrence and factors associated with cerebrospinal fluid dissemination of glioblastoma in Chinese patients. *Surgical Neurology International*. 20 October 2016. Vol. 7, p. 92. DOI 10.4103/2152-7806.192723.
- CHANG, Eric L., YI, Won, ALLEN, Pamela K., LEVIN, Victor A., SAWAYA, Raymond E. and MAOR, Moshe H., 2003. Hypofractionated radiotherapy for elderly or younger low-performance status glioblastoma patients: outcome and prognostic factors. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1 June 2003. Vol. 56, no. 2, p. 519–528. DOI 10.1016/s0360-3016(02)04522-4.
- CHAUDHURI, Ovijit, COOPER-WHITE, Justin, JANMEY, Paul A., MOONEY, David J. and SHENOY, Vivek B., 2020. Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour. *Nature*. August 2020. Vol. 584, no. 7822, p. 535–546. DOI 10.1038/s41586-020-2612-2.
- CHEN, Yi-Hsien, CIMINO, Patrick J., LUO, Jingqin, DAHIYA, Sonika and GUTMANN, David H., 2016. ABCG1 maintains high-grade glioma survival in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 10 March 2016. Vol. 7, no. 17, p. 23416–23424. DOI 10.18632/oncotarget.8030.
- malignant glioma cell survival, and might serve as a future therapeutic target for these deadly brain cancers
- CHEN, Along, LI, Zhenghuan, CHEN, li, LIN, Maosheng, LI, Bin and CHEN, Fei, 2020. The influence of increment of gantry on VMAT plan quality for cervical cancer. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7 January 2020. Vol. 12, p. 1–8. DOI 10.1080/16878507.2019.1707400.
- CHEN, Along, LI, Zhenghuan, CHEN, li, LIN, Maosheng, LI, Bin and CHEN, Fei, 2020. The influence of increment of gantry on VMAT plan quality for cervical cancer. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 7 January 2020. Vol. 12, p. 1–8. DOI 10.1080/16878507.2019.1707400.
- CHENG, Fangling and GUO, Dongsheng, 2019. MET in glioma: signaling pathways and targeted therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 20 June 2019. Vol. 38, no. 1, p. 270. DOI 10.1186/s13046-019-1269-x.
- CHOI, Jinyeong, KIM, Gaeun, CHO, Su Bin and IM, Hyung-Jun, 2020. Radiosensitizing high-Z metal nanoparticles for enhanced radiotherapy of glioblastoma multiforme. *Journal of Nanobiotechnology*. 3 September 2020. Vol. 18, no. 1, p. 122. DOI 10.1186/s12951-020-00684-5.
- CLAES, An, IDEMA, Albert J. and WESSELING, Pieter, 2007. Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathologica*. November 2007. Vol. 114, no. 5, p. 443–458. DOI 10.1007/s00401-007-0293-7.
- CLARK, Michael James, HOMER, Nils, O’CONNOR, Brian D., CHEN, Zugen, ESKIN, Ascia, LEE, Hane, MERRIMAN, Barry and NELSON, Stanley F., 2010. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS genetics*. 29 January 2010. Vol. 6, no. 1, p. e1000832. DOI 10.1371/journal.pgen.1000832.
- CLAVREUL, Anne, SOULARD, Gwénaëlle, LEMÉE, Jean-Michel, RIGOT, Marion, FABBRO-PERAY, Pascale, BAUCHET, Luc, FIGARELLA-BRANGER, Dominique, MENET, Philippe, BOONE, M., CHAUFFERT, B., DESENCLOS, C., HERPE, Y-E., SEVESTRE, H., TEBBAKHA, R., BLANCHET, O., ROUSSEAU, A., BOUILLLOT-EIMER, S., DUBUS, P., LOISEAU, H., LACUT, K., QUINTIN-ROUÉ, I., SEIZEUR, R., BEKAERT, L., BERRO, D-H., CHAPON, F., EMERY, E., ROUSSEAU, N., AHLE, G., HELLER, R., TORTEL, M-C., VOIRIN, J., AUBRIOT-LORTON, M-H., FARAH, W., SCHAEFFER, C., GAY, E., LANTUEJOUL, S., MOSSUZ, P., GHALEH, B., LAHIANI, W.,

- MARNICHE, A., CORNU, Ph., DELATTRE, J-Y., MOKHTARI, K., SANSON, M., NIEL, P., PALLUD, J., VARLET, P., MOKHTARI, K., RICARD, D., YORDANOVA, Y., DI STEPHANO, A-L., HORODYCKID, C., VILLA, C., GELE, P., MAURAGE, C-A., REYNS, N., CAIRE, F., LABROUSSE, F., FERMEAUX, V., FEUILLARD, J., DUCRAY, F., DUFAY, N., GUYOTAT, J., MEYRONET, D., CHINOT, O., DUFOUR, H., GRAILLON, T., METELLUS, P., GOZÉ, C., RIGAU, V., FRENEL, J-B., KERDRAON, O., LOUSSOUARN, D., MOSNIER, J-F., ALMAIRAC, F., BOURG, V., BUREL-VANDENBOS, F., CHIFOREANU, D-C., LE RESTE, P-J., QUILLIEN, V., TURLIN, B., LANGLOIS, O., MARGUET, F., QUILLARD-MURAIN, M., BERGEMER-FOUQUET, A-M., DECOCK-GIRAUDAUD, A., ZEMMOURA, I., and FGB NETWORK, 2019. The French glioblastoma biobank (FGB): a national clinicobiological database. *Journal of Translational Medicine*. 23 April 2019. Vol. 17, no. 1, p. 133. DOI 10.1186/s12967-019-1859-6.
- COLDITZ, Michael J. and JEFFREE, Rosalind L., 2012. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. November 2012. Vol. 19, no. 11, p. 1471–1474. DOI 10.1016/j.jocn.2012.03.009.
- COLLINS, Caitlin and NELSON, W. James, 2015. Running with neighbors: coordinating cell migration and cell-cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*. October 2015. Vol. 36, p. 62–70. DOI 10.1016/j.ceb.2015.07.004.
- COMAS, S., LUGUERA, E., MOLERO, J., BALAÑA, C., ESTIVAL, A., CASTAÑER, S., CARRATO, C., HOSTALOT, C., TEIXIDOR, P. and VILLÀ, S., 2021. Influence of glioblastoma contact with the subventricular zone on survival and recurrence patterns. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*. March 2021. Vol. 23, no. 3, p. 554–564. DOI 10.1007/s12094-020-02448-x.
- CRESPIN, Sophie, FROMONT, Gaëlle, WAGER, Michel, LEVILLAIN, Pierre, CRONIER, Laurent, MONVOISIN, Arnaud, DEFAMIE, Norah and MESNIL, Marc, 2016. Expression of a gap junction protein, connexin43, in a large panel of human gliomas: new insights. *Cancer Medicine*. 15 June 2016. Vol. 5, no. 8, p. 1742–1752. DOI 10.1002/cam4.730
- CUDDAPAH, Vishnu Anand, ROBEL, Stefanie, WATKINS, Stacey and SONTHEIMER, Harald, 2014. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nature reviews. Neuroscience*. July 2014. Vol. 15, no. 7, p. 455–465. DOI 10.1038/nrn3765.
- CUI, M. and GAO, S. X., 2018. The linear-quadratic (LQ) model is inappropriate for high doses per fraction owing to  $\alpha/\beta$  ratio is not a constant: Evidence deduced from radiotherapy outcomes of 16367 prostate cancer patients. *Annals of Oncology*. 1 November 2018. Vol. 29, p. ix69–ix70. DOI 10.1093/annonc/mdy434.007.
- DAIGLE, Kathya, FORTIN, David, MATHIEU, David, SAINT-PIERRE, Arnaud B., PARÉ, François-Michel, DE LA SABLONNIÈRE, Annie and GOFFAUX, Philippe, 2013. Effects of surgical resection on the evolution of quality of life in newly diagnosed patients with glioblastoma: a report on 19 patients surviving to follow-up. *Current Medical Research and Opinion*. October 2013. Vol. 29, no. 10, p. 1307–1313. DOI 10.1185/03007995.2013.823858.
- DAS, Arabinda, MCDONALD, Daniel G., DIXON-MAH, Yaenette N., JACQMIN, Dustin J., SAMANT, Vikram N., VANDERGRIFT, William A., LINDHORST, Scott M., CACHIA, David, VARMA, Abhay K., VANEK, Kenneth N., BANIK, Naren L., JENRETTE, Joseph M., RAIZER, Jeffery J., GIGLIO, Pierre and PATEL, Sunil J., 2016. RIP1 and RIP3 complex regulates radiation-induced programmed necrosis in glioblastoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. June 2016. Vol. 37, no. 6, p. 7525–7534. DOI 10.1007/s13277-015-4621-6.
- DAVIS, Mary Elizabeth, 2016. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clinical journal of oncology nursing*. 1 October 2016. Vol. 20, no. 5, p. S2–S8. DOI 10.1188/16.CJON.S1.2-8.
- DARMANIS, Spyros, SLOAN, Steven A., CROOTE, Derek, MIGNARDI, Marco, CHERNIKOVA, Sophia, SAMGHABABI, Peyman, ZHANG, Ye, NEFF, Norma, KOWARSKY, Mark, CANEDA, Christine, LI, Gordon, CHANG, Steven D., CONNOLLY, Ian David, LI, Yingmei, BARRES, Ben A., GEPHART, Melanie Hayden and QUAKE, Stephen R., 2017. Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. *Cell Reports*. October 2017. Vol. 21, no. 5, p. 1399–1410. DOI 10.1016/j.celrep.2017.10.030
- DE BACCO, Francesca, LURAGHI, Paolo, MEDICO, Enzo, REATO, Gigliola, GIROLAMI, Flavia, PERERA, Timothy, GABRIELE, Pietro, COMOGLIO, Paolo M. and BOCCACCIO, Carla, 2011. Induction of MET by ionizing radiation and its role in radioresistance and invasive growth of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 20 April 2011. Vol. 103, no. 8, p. 645–661. DOI 10.1093/jnci/djr093.
- DE MATTEIS, Valeria, CASCIONE, Mariafrancesca, TOMA, Chiara Cristina, PELLEGRINO, Paolo, RIZZELLO, Loris and RINALDI, Rosaria, 2019. Tailoring Cell Morphomechanical Perturbations Through Metal Oxide Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. December 2019. Vol. 14, no. 1, p. 109. DOI 10.1186/s11671-019-2941-y.
- DE PASCALIS, Chiara and ETIENNE-MANNEVILLE, Sandrine, 2017. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Molecular Biology of the Cell*. 7 July 2017. Vol. 28, no. 14, p. 1833–1846. DOI 10.1091/mbc.E17-03-0134.



- DEBOUTTIÈRE, P.-J., ROUX, S., VOCANSON, F., BILLOTEY, C., BEUF, O., FAVRE-RÉGUILLON, A., LIN, Y., PELLET-ROSTAING, S., LAMARTINE, R., PERRIAT, P. and TILLEMENT, O., 2006. Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. *Advanced Functional Materials*. 2006. Vol. 16, no. 18, p. 2330–2339. DOI 10.1002/adfm.200600242.
- DEJAEGHER, Joost and DE VLEESCHOUWER, Steven, 2017. Recurring Glioblastoma: A Case for Reoperation? In: DE VLEESCHOUWER, Steven (ed.), *Glioblastoma* [online]. Brisbane (AU): Codon Publications. [Accessed 23 August 2021]. ISBN 978-0-9944381-2-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469991/>
- DHERMAIN, Frédéric and BARANI, Igor J., 2016. Complications from radiotherapy. *Handbook of Clinical Neurology*. 2016. Vol. 134, p. 219–234. DOI 10.1016/B978-0-12-802997-8.00013-X.
- DIAO, Wenwen, TONG, Xuezhi, YANG, Cheng, ZHANG, Fengrong, BAO, Chun, CHEN, Hao, LIU, Liyu, LI, Ming, YE, Fangfu, FAN, Qihui, WANG, Jiangfei and OU-YANG, Zhong-Can, 2019. Behaviors of Glioblastoma Cells in in Vitro Microenvironments. *Scientific Reports*. 14 January 2019. Vol. 9, p. 85. DOI 10.1038/s41598-018-36347-7
- DIRKSE, Anne, GOLEBIEWSKA, Anna, BUDER, Thomas, NAZAROV, Petr V., MULLER, Arnaud, POOVATHINGAL, Suresh, BRONS, Nicolaas H. C., LEITE, Sonia, SAUVAGEOT, Nicolas, SARKISIAN, Dzjemma, SEYFRID, Mathieu, FRITAH, Sabrina, STIEBER, Daniel, MICHELUCCI, Alessandro, HERTEL, Frank, HEROLD-MENDE, Christel, AZUAJE, Francisco, SKUPIN, Alexander, BJERKVIG, Rolf, DEUTSCH, Andreas, VOSS-BÖHME, Anja and NICLOU, Simone P., 2019. Stem cell-associated heterogeneity in Glioblastoma results from intrinsic tumor plasticity shaped by the microenvironment. *Nature Communications*. December 2019. Vol. 10, no. 1, p. 1787. DOI 10.1038/s41467-019-09853-z.
- DRACHSLER, M., KLEBER, S., MATEOS, A., VOLK, K., MOHR, N., CHEN, S., CIROVIC, B., TÜTTENBERG, J., GIEFFERS, C., SYKORA, J., WIRTZ, C. R., MUELLER, W., SYNOWITZ, M. and MARTIN-VILLALBA, A., 2016. CD95 maintains stem cell-like and non-classical EMT programs in primary human glioblastoma cells. *Cell Death & Disease*. April 2016. Vol. 7, no. 4, p. e2209–e2209. DOI 10.1038/cddis.2016.102.
- DUBOIS, Luiz Gustavo, CAMPANATI, Loraine, RIGHY, Cassia, D'ANDREA-MEIRA, Isabella, SPOHR, Tania Cristina Leite de Sampaio e, PORTO-CARREIRO, Isabel, PEREIRA, Claudia Maria, BALÇA-SILVA, Joana, KAHN, Suzana Assad, DOSSANTOS, Marcos F., OLIVEIRA, Marcela de Almeida Rabello, XIMENES-DA-SILVA, Adriana, LOPES, Maria Celeste, FAVERET, Eduardo, GASPARETTO, Emerson Leandro and MOURA-NETO, Vivaldo, 2014. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 12 December 2014. Vol. 8, p. 418. DOI 10.3389/fncel.2014.00418.
- DUFORT, Sandrine, APPELBOOM, Geoffrey, VERRY, Camille, BARBIER, Emmanuel L., LUX, François, BRÄUER-KRISCH, Elke, SANCEY, Lucie, CHANG, Steven D., ZHANG, Michael, ROUX, Stéphane, TILLEMENT, Olivier and LE DUC, Géraldine, 2019. Ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticles improve high-grade rat glioma survival. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. September 2019. Vol. 67, p. 215–219. DOI 10.1016/j.jocn.2019.05.065.
- DURAND, Maxime, LELIÈVRE, Elodie, CHATEAU, Alicia, BERQUAND, Alexandre, LAURENT, Gautier, CARL, Philippe, ROUX, Stephane, CHAZÉE, Lise, BAZZI, Rana, EGHIAIAN, Frédéric, JUBRÉAUX, Justine, RONDÉ, Philippe, BARBERI-HEYOB, Muriel, CHASTAGNER, Pascal, DEVY, Jérôme and PINEL, Sophie, 2021. The detrimental invasiveness of glioma cells controlled by gadolinium chelate-coated gold nanoparticles. *Nanoscale*. 13 April 2021. Vol. 13, p. 9236. DOI 10.1039/D0NR08936B.
- ELING, Laura, 2020. *Augmentation du contrôle des tumeurs cérébrales et caractérisation des effets à long terme sur le tissu cérébral sain après exposition à la radiothérapie synchrotron par microfaisceaux chez le rat* [online]. These de doctorat. Université Grenoble Alpes. [Accessed 15 November 2021]. Available from: <http://www.theses.fr/2020GRALS026>
- ELLERT-MIKLASZEWSKA, Aleksandra, POLESZAK, Katarzyna, PASIERBINSKA, Maria and KAMINSKA, Bozena, 2020. Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 30 January 2020. Vol. 21, no. 3, p. 888. DOI 10.3390/ijms21030888.
- ETIENNE-MANNEVILLE, Sandrine, 2013. Microtubules in cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2013. Vol. 29, p. 471–499. DOI 10.1146/annurev-cellbio-101011-155711.
- Extracellular Matrix Microenvironment in Glioma Progression | IntechOpen, [no date]. [online]. [Accessed 15 August 2021]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/22475>
- FALASCA, Marco, RAIMONDI, Claudio and MAFFUCCI, Tania, 2011. Boyden chamber. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2011. Vol. 769, p. 87–95. DOI 10.1007/978-1-61779-207-6\_7
- FALK, Alexander T., MONCHARMONT, Coralie, GUILBERT, Matthieu, GUY, Jean-Baptiste, ALPHONSE, Gersende, TRONE, Jane-Chloé, RIVOIRARD, Romain, GILORMINI, Marion, TOILLON, Robert-Alain, RODRIGUEZ-LAFRASSE, Claire and MAGNÉ, Nicolas, 2014. [Radiation-induces increased tumor cell aggressiveness of tumors of the glioblastomas?]. *Bulletin Du Cancer*. September 2014. Vol. 101, no. 9, p. 876–880. DOI 10.1684/bdc.2014.1946

- FENG, Enshan, SUI, Changbai, WANG, Tongxin and SUN, Gaoling, 2017. Temozolomide with or without Radiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme: A Meta-Analysis. *European Neurology*. 2017. Vol. 77, no. 3–4, p. 201–210. DOI 10.1159/000455842.
- FERNANDES, Catarina, COSTA, Andreia, OSÓRIO, Lúcia, LAGO, Rita Costa, LINHARES, Paulo, CARVALHO, Bruno and CAEIRO, Cláudia, 2017. Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In: DE VLEESCHOUWER, Steven (ed.), *Glioblastoma* [online]. Brisbane (AU): Codon Publications. [Accessed 22 August 2021]. ISBN 978-0-9944381-2-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK469987/>
- FERRER, Valéria Pereira, MOURA NETO, Vivaldo and MENTLEIN, Rolf, 2018. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia*. 2018. Vol. 66, no. 8, p. 1542–1565. DOI 10.1002/glia.23309.
- FERRI, Alessandra, STAGNI, Venturina and BARILÀ, Daniela, 2020. Targeting the DNA Damage Response to Overcome Cancer Drug Resistance in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 11 July 2020. Vol. 21, no. 14, p. E4910. DOI 10.3390/ijms21144910.
- FIRAT, Elke, GAEDICKE, Simone, TSURUMI, Chizuko, ESSER, Norbert, WEYERBROCK, Astrid and NIEDERMANN, Gabriele, 2011. Delayed cell death associated with mitotic catastrophe in  $\gamma$ -irradiated stem-like glioma cells. *Radiation Oncology*. 10 June 2011. Vol. 6, no. 1, p. 71. DOI 10.1186/1748-717X-6-71.
- FLETCHER, Daniel A. and MULLINS, R. Dyche, 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 28 January 2010. Vol. 463, no. 7280, p. 485–492. DOI 10.1038/nature08908.
- FOROOZANDEH, Parisa and AZIZ, Azlan Abdul, 2018. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*. 25 October 2018. Vol. 13, p. 339. DOI 10.1186/s11671-018-2728-6.
- FOSMARK, Sigurd, HELLWEGE, Sofie, DAHLROT, Rikke H., JENSEN, Kristian L., DERAND, Helene, LOHSE, Jesper, SØRENSEN, Mia D., HANSEN, Steinbjørn and KRISTENSEN, Bjarne W., 2017. APNG as a prognostic marker in patients with glioblastoma. HJELMELAND, Anita B. (ed.), *PLOS ONE*. 29 June 2017. Vol. 12, no. 6, p. e0178693. DOI 10.1371/journal.pone.0178693.
- FRIEDL, Peter and MAYOR, Roberto, 2017. Tuning Collective Cell Migration by Cell-Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3 April 2017. Vol. 9, no. 4, p. a029199. DOI 10.1101/cshperspect.a029199.
- FRIEDL, Peter, SAHAI, Erik, WEISS, Stephen and YAMADA, Kenneth M., 2012. New dimensions in cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. November 2012. Vol. 13, no. 11, p. 743–747. DOI 10.1038/nrm3459.
- GANGATHARAN, Girisan, SCHNEIDER-MAUNOURY, Sylvie and BREAU, Marie Anne, 2018. Role of mechanical cues in shaping neuronal morphology and connectivity. *Biology of the Cell*. 2018. Vol. 110, no. 6, p. 125–136. DOI 10.1111/boc.201800003.
- GAO, Xiaofei, ZHANG, Zhaohuan, MASHIMO, Tomoyuki, SHEN, Bo, NYAGILO, James, WANG, Hao, WANG, Yihui, LIU, Zhida, MULGAONKAR, Aditi, HU, Xiao-Ling, PICCIRILLO, Sara G. M., ESKIOCAK, Ugur, DAVÉ, Digant P., QIN, Song, YANG, Yongjie, SUN, Xiankai, FU, Yang-Xin, ZONG, Hui, SUN, Wenzhi, BACHOO, Robert M. and GE, Woo-ping, 2020. Gliomas Interact with Non-glioma Brain Cells via Extracellular Vesicles. *Cell Reports*. 25 February 2020. Vol. 30, no. 8, p. 2489–2500.e5. DOI 10.1016/j.celrep.2020.01.089.
- GARIBALDI, Cristina, JERECZEK-FOSSA, Barbara Alicja, MARVASO, Giulia, DICUONZO, Samantha, ROJAS, Damaris Patricia, CATTANI, Federica, STARZYŃSKA, Anna, CIARDO, Delia, SURGO, Alessia, LEONARDI, Maria Cristina and RICOTTI, Rosalinda, 2017. Recent advances in radiation oncology. *ecancermedicalscience*. 30 November 2017. Vol. 11, p. 785. DOI 10.3332/ecancer.2017.785
- GASPAR, L. E., FISHER, B. J., MACDONALD, D. R., LEBER, D. V., HALPERIN, E. C., SCHOLD, S. C. and CAIRNCROSS, J. G., 1992. Supratentorial malignant glioma: patterns of recurrence and implications for external beam local treatment. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1992. Vol. 24, no. 1, p. 55–57. DOI 10.1016/0360-3016(92)91021-e.
- GERASHCHENKO, Tatiana S., NOVIKOV, Nikita M., KRAKHMAL, Nadezhda V., ZOLOTARYOVA, Sofia Y., ZAVYALOVA, Marina V., CHERDYNTSEVA, Nadezhda V., DENISOV, Evgeny V. and PERELMUTER, Vladimir M., 2019. Markers of Cancer Cell Invasion: Are They Good Enough? *Journal of Clinical Medicine*. 24 July 2019. Vol. 8, no. 8, p. 1092. DOI 10.3390/jcm8081092.
- GIELEN, Paul, AFTAB, Quratulain, MA, Noreen, CHEN, Vincent, HONG, Xiaoting, LOZINSKY, Shannon, NAUS, Christian and SIN, Wun Chey, 2013. Connexin43 confers Temozolomide resistance in human glioma cells by modulating the mitochondrial apoptosis pathway. *Neuropharmacology*. 17 May 2013. Vol. 75. DOI 10.1016/j.neuropharm.2013.05.002.
- GIERYNG, Anna, PSZCZOLKOWSKA, Dominika, WALENTYNOWICZ, Kacper A., RAJAN, Wenson D. and KAMINSKA, Bozena, 2017. Immune microenvironment of gliomas. *Laboratory Investigation*. May 2017. Vol. 97, no. 5, p. 498–518. DOI 10.1038/labinvest.2017.19.

- GILL, B. J., PISAPIA, D. J., MALONE, H. R., GOLDSTEIN, H., LEI, L., SONABEND, A., YUN, J., SAMANAMUD, J., SIMS, J. S., BANU, M., DOVAS, A., TEICH, A. F., SHETH, S. A., MCKHANN, G. M., SISTI, M. B., BRUCE, J. N., SIMS, P. A. and CANOLL, P., 2014. MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 August 2014. Vol. 111, no. 34, p. 12550–12555. DOI 10.1073/pnas.1405839111.
- GILL, Katherine P. and DENHAM, Mark, 2020. Optimized Transgene Delivery Using Third-Generation Lentiviruses. *Current Protocols in Molecular Biology*. December 2020. Vol. 133, no. 1, p. e125. DOI 10.1002/cpmb.125
- GIORDANO, Frank A., 2021. NCT03055208: *Early Stereotactic Gamma Knife Radiosurgery to Residual Tumor After Surgery of Newly Diagnosed Glioblastoma* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03055208>
- GIRI, Shailendra, KARAKOTI, Ajay, GRAHAM, Rondell P., MAGUIRE, Jacie L., REILLY, Christopher M., SEAL, Sudipta, RATTAN, Ramandeep and SHRIDHAR, Viji, 2013. Nanoceria: a rare-earth nanoparticle as a novel anti-angiogenic therapeutic agent in ovarian cancer. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, no. 1, p. e54578. DOI 10.1371/journal.pone.0054578.
- GLIEMROTH, Jan, FEYERABEND, Thomas, GERLACH, Christiane, ARNOLD, Hans and TERZIS, A. Jorge A., 2003. Proliferation, migration, and invasion of human glioma cells exposed to fractionated radiotherapy in vitro. *Neurosurgical Review*. July 2003. Vol. 26, no. 3, p. 198–205. DOI 10.1007/s10143-003-0253-1.
- GOERTZEN, Cameron, EYMAEL, Denise and MAGALHAES, Marco, 2018. Three-Dimensional Quantification of Spheroid Degradation-Dependent Invasion and Invadopodia Formation. *Biological Procedures Online*. 15 October 2018. Vol. 20, p. 20. DOI 10.1186/s12575-018-0085-6.
- GOFFART, Nicolas, KROONEN, Jérôme and ROGISTER, Bernard, 2013. Glioblastoma-Initiating Cells: Relationship with Neural Stem Cells and the Micro-Environment. *Cancers*. 14 August 2013. Vol. 5, no. 3, p. 1049–1071. DOI 10.3390/cancers5031049.
- GONÇALVES, Jenifer Pendiuk, DA CRUZ, Anderson Fraga, DE BARROS, Heloise Ribeiro, BORGES, Beatriz Santana, DE MEDEIROS, Lia Carolina Almeida Soares, SOARES, Maurilio José, SANTOS, Mayara Padovan dos, GRASSI, Marco Tadeu, CHANDRA, Anil, DEL MERCATO, Loretta Laureana, ROSSI, Gustavo Rodrigues, TRINDADE, Edvaldo da Silva, VIDOTTI, Izabel Cristina Riegel and DE OLIVEIRA, Carolina Camargo, 2020. Beyond gold nanoparticles cytotoxicity: potential to impair metastasis hallmarks. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. December 2020. Vol. 157, p. 221–232. DOI 10.1016/j.ejpb.2020.10.019
- GORDON, Ira K., LU, Jie, GRAVES, Christian A., HUNTOON, Kristin, FRERICH, Jason M., HANSON, Ryan H., WANG, Xiaoping, HONG, Christopher S., HO, Winson, FELDMAN, Michael J., IKEJIRI, Barbara, BISHT, Kheem, CHEN, Xiaoyuan S., TANDLE, Anita, YANG, Chunzhang, ARSCOTT, W. Tristram, YE, Donald, HEISS, John D., LONER, Russell R., CAMPHAUSEN, Kevin and ZHUANG, Zhengping, 2015. Protein phosphatase 2A inhibition with LB100 enhances radiation-induced mitotic catastrophe and tumor growth delay in glioblastoma. *Molecular cancer therapeutics*. July 2015. Vol. 14, no. 7, p. 1540–1547. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-14-0614.
- GRECH, Neil, DALLI, Theresia, MIZZI, Sean, MEILAK, Lara, CALLEJA, Neville and ZRINZO, Antoine, 2020. Rising Incidence of Glioblastoma Multiforme in a Well-Defined Population. *Cureus*. Vol. 12, no. 5, p. e8195. DOI 10.7759/cureus.8195.
- GREENFIELD, Norma J., 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature protocols*. 2006. Vol. 1, no. 6, p. 2876–2890. DOI 10.1038/nprot.2006.202.
- GRIGORIEVA, Elvira V., 2020. Radiation Effects on Brain Extracellular Matrix. *Frontiers in Oncology*. 2020. Vol. 10, p. 1932. DOI 10.3389/fonc.2020.576701.
- GRITSENKO, Pavlo G., ATLASY, Nader, DIETEREN, Cindy E.J., NAVIS, Anna C., VENHUIZEN, Jan-Hendrik, VEELKEN, Cornelia, SCHUBERT, Dirk, ACKER-PALMER, Amparo, WESTERMAN, Bart A., WURDINGER, Thomas, LEENDERS, William, WESSELING, Pieter, STUNNENBERG, Hendrik G. and FRIEDL, Peter, 2020. P120-catenin dependent collective brain infiltration by glioma cell networks. *Nature cell biology*. January 2020. Vol. 22, no. 1, p. 97–107. DOI 10.1038/s41556-019-0443-x.
- GRITSENKO, Pavlo, LEENDERS, William and FRIEDL, Peter, 2017. Recapitulating in vivo-like plasticity of glioma cell invasion along blood vessels and in astrocyte-rich stroma. *Histochemistry and Cell Biology*. October 2017. Vol. 148, no. 4, p. 395–406. DOI 10.1007/s00418-017-1604-2.
- GROTZER, M. A., SCHÜLTKE, E., BRÄUER-KRISCH, E. and LAISSUE, J. A., 2015. Microbeam radiation therapy: Clinical perspectives. *Physica Medica*. 1 September 2015. Vol. 31, no. 6, p. 564–567. DOI 10.1016/j.ejmp.2015.02.011.
- GRZINCIC, Elissa M. and MURPHY, Catherine J., 2015. Gold Nanorods Indirectly Promote Migration of Metastatic Human Breast Cancer Cells in Three-Dimensional Cultures. *ACS nano*. 28 July 2015. Vol. 9, no. 7, p. 6801–6816. DOI 10.1021/acsnano.5b03362.

- GUAN, Xiudong, HASAN, Md Nabiul, MANIAR, Shelly, JIA, Wang and SUN, Dandan, 2018. Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. *Molecular Neurobiology*. August 2018. Vol. 55, no. 8, p. 6927–6938. DOI 10.1007/s12035-018-0880-8.
- GUIDI, M, 2019. P14.43 Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations in pediatric high-grade gliomas: the Florentine experience. *Neuro-Oncology*. 6 September 2019. Vol. 21, p. iii76–iii77. DOI 10.1093/neuonc/noz126.278.
- GUIMARÃES, Carlos F., GASPERINI, Luca, MARQUES, Alexandra P. and REIS, Rui L., 2020. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nature Reviews Materials*. May 2020. Vol. 5, no. 5, p. 351–370. DOI 10.1038/s41578-019-0169-1.
- GUNDERSON, Leonard L. and TEPPER, Joel E., 2012. *Clinical Radiation Oncology*. Saunders/Elsevier. ISBN 978-1-4377-1637-5.
- GUPTON, Stephanie L., ANDERSON, Karen L., KOLE, Thomas P., FISCHER, Robert S., PONTI, Aaron, HITCHCOCK-DEGREGORI, Sarah E., DANUSER, Gaudenz, FOWLER, Velia M., WIRTZ, Denis, HANEIN, Dorit and WATERMAN-STORER, Clare M., 2005. Cell migration without a lamellipodium. *The Journal of Cell Biology*. 14 February 2005. Vol. 168, no. 4, p. 619–631. DOI 10.1083/jcb.200406063.
- GZELL, C., BACK, M., WHEELER, H., BAILEY, D. and FOOTE, M., 2017. Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*. January 2017. Vol. 29, no. 1, p. 15–25. DOI 10.1016/j.clon.2016.09.015.
- HADJIPANAYIS, Constantinos G. and STUMMER, Walter, 2019. 5-ALA and FDA approval for glioma surgery. *Journal of Neuro-Oncology*. February 2019. Vol. 141, no. 3, p. 479–486. DOI 10.1007/s11060-019-03098-y.
- HAEGER, Anna, WOLF, Katarina, ZEGERS, Mirjam M. and FRIEDL, Peter, 2015. Collective cell migration: guidance principles and hierarchies. *Trends in Cell Biology*. 1 September 2015. Vol. 25, no. 9, p. 556–566. DOI 10.1016/j.tcb.2015.06.003.
- HAINFELD, James F, SLATKIN, Daniel N and SMILOWITZ, Henry M, 2004. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology*. 21 September 2004. Vol. 49, no. 18, p. N309–N315. DOI 10.1088/0031-9155/49/18/N03.
- HAMBARDZUMYAN, Dolores, GUTMANN, David H. and KETTENMANN, Helmut, 2016. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience*. January 2016. Vol. 19, no. 1, p. 20–27. DOI 10.1038/nn.4185.
- HAMIDI, Hellyeh and IVASKA, Johanna, 2018. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*. September 2018. Vol. 18, no. 9, p. 533–548. DOI 10.1038/s41568-018-0038-z.
- HAMILTON, Lloyd, ASTELL, Katy, VELIKOVA, Gergana and SIEGER, Dirk, 2016. A Zebrafish Live Imaging Model Reveals Differential Responses of Microglia Toward Glioblastoma Cells In Vivo. *Zebrafish*. 25 October 2016. Vol. 13. DOI 10.1089/zeb.2016.1339
- HANAHAN, Douglas and WEINBERG, Robert A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 4 March 2011. Vol. 144, no. 5, p. 646–674. DOI 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- HANDORF, Andrew M, ZHOU, Yaxian, HALANSKI, Matthew A and LI, Wan-Ju, 2015. Tissue Stiffness Dictates Development, Homeostasis, and Disease Progression. *Organogenesis*. 2 January 2015. Vol. 11, no. 1, p. 1–15. DOI 10.1080/15476278.2015.1019687.
- HANIF, Farina, MUZAFFAR, Kanza, PERVEEN, Kahkashan, MALHI, Saima M and SIMJEE, Shabana U, 2017. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*. 2017. Vol. 18, no. 1, p. 3–9. DOI 10.22034/APJCP.2017.18.1.3.
- HARDEE, Matthew E. and ZAGZAG, David, 2012. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *The American Journal of Pathology*. October 2012. Vol. 181, no. 4, p. 1126–1141. DOI 10.1016/j.ajpath.2012.06.030.
- HATOUM, Adam, MOHAMMED, Raihan and ZAKIEH, Omar, 2019. The unique invasiveness of glioblastoma and possible drug targets on extracellular matrix. *Cancer Management and Research*. 25 February 2019. Vol. 11, p. 1843–1855. DOI 10.2147/CMAR.S186142.
- HATTERMANN, Kirsten, FLÜH, Charlotte, ENGEL, Dorothee, MEHDORN, H. Maximilian, SYNOWITZ, Michael, MENTLEIN, Rolf and HELD-FEINDT, Janka, 2016. Stem cell markers in glioma progression and recurrence. *International Journal of Oncology*. 1 November 2016. Vol. 49, no. 5, p. 1899–1910. DOI 10.3892/ijo.2016.3682.
- HAUME, Kaspar, ROSA, Soraia, GRELLLET, Sophie, ŚMIĄTEK, Małgorzata A., BUTTERWORTH, Karl T., SOLOV'YOV, Andrey V., PRISE, Kevin M., GOLDING, Jon and MASON, Nigel J., 2016. Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnology*. 2016. Vol. 7, no. 1, p. 8. DOI 10.1186/s12645-016-0021-x

- HE, Yang and KAINA, Bernd, 2019. Are There Thresholds in Glioblastoma Cell Death Responses Triggered by Temozolomide? *International Journal of Molecular Sciences*. 28 March 2019. Vol. 20, no. 7, p. 1562. DOI 10.3390/ijms20071562.
- HE, Xiangmeng, LIU, Ming, ZHANG, Menglong, SEQUEIROS, Roberto Blanco, XU, Yujun, WANG, Ligang, LIU, Chao, WANG, Qingwen, ZHANG, Kai and LI, Chengli, 2020. A novel three-dimensional template combined with MR-guided 125I brachytherapy for recurrent glioblastoma. *Radiation Oncology*. 8 June 2020. Vol. 15, no. 1, p. 146. DOI 10.1186/s13014-020-01586-4.
- HÉBERT, Etienne M., DEBOUTTIÈRE, Pierre-Jean, LEPAGE, Martin, SANCHE, Léon and HUNTING, Darel J., 2010. Preferential tumour accumulation of gold nanoparticles, visualised by magnetic resonance imaging: Radiosensitisation studies in vivo and in vitro. *International Journal of Radiation Biology*. 1 August 2010. Vol. 86, no. 8, p. 692–700. DOI 10.3109/09553001003746067.
- HENRIK HEILAND, Dieter, RAVI, Vidhya M., BEHRINGER, Simon P., FRENKING, Jan Hendrik, WURM, Julian, JOSEPH, Kevin, GARRELFs, Nicklas W. C., STRÄHLE, Jakob, HEYNCKES, Sabrina, GRAUVOGEL, Jürgen, FRANCO, Pamela, MADER, Irina, SCHNEIDER, Matthias, POTTHOFF, Anna-Laura, DELEV, Daniel, HOFMANN, Ulrich G., FUNG, Christian, BECK, Jürgen, SANKOWSKI, Roman, PRINZ, Marco and SCHNELL, Oliver, 2019. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nature Communications*. 11 June 2019. Vol. 10, no. 1, p. 2541. DOI 10.1038/s41467-019-10493-6.
- HER, Sohyoung, JAFFRAY, David A. and ALLEN, Christine, 2017. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 15 January 2017. Vol. 109, p. 84–101. DOI 10.1016/j.addr.2015.12.012.
- HERNANDEZ, Lorena, SMIRNOVA, Tatiana, WYCKOFF, Jeffrey, CONDEELIS, John and SEGALL, Jeffrey E., 2009. In Vivo Assay for Tumor Cell Invasion. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2009. Vol. 571, p. 227–238. DOI 10.1007/978-1-60761-198-1\_15.
- HERRERA-PEREZ, Marisol, VOYTIK-HARBIN, Sherry L. and RICKUS, Jenna L., 2015. Extracellular Matrix Properties Regulate the Migratory Response of Glioblastoma Stem Cells in Three-Dimensional Culture. *Tissue Engineering. Part A*. 1 October 2015. Vol. 21, no. 19–20, p. 2572–2582. DOI 10.1089/ten.tea.2014.0504.
- HETMANSKI, Joseph H. R., DE BELLY, Henry, BUSNELLI, Ignacio, WARING, Thomas, NAIR, Roshna V., SOKLEVA, Vanesa, DOBRE, Oana, CAMERON, Angus, GAUTHIER, Nils, LAMAZE, Christophe, SWIFT, Joe, DEL CAMPO, Aránzazu, STARBORG, Tobias, ZECH, Tobias, GOETZ, Jacky G., PALUCH, Ewa K., SCHWARTZ, Jean-Marc and CASWELL, Patrick T., 2019. Membrane Tension Orchestrates Rear Retraction in Matrix-Directed Cell Migration. *Developmental Cell*. 18 November 2019. Vol. 51, no. 4, p. 460–475.e10. DOI 10.1016/j.devcel.2019.09.006.
- HIRATA, Eishu, YUKINAGA, Hiroko, KAMIOKA, Yuji, ARAKAWA, Yoshiki, MIYAMOTO, Susumu, OKADA, Takaharu, SAHAI, Erik and MATSUDA, Michiyuki, 2012. In vivo fluorescence resonance energy transfer imaging reveals differential activation of Rho-family GTPases in glioblastoma cell invasion. *Journal of Cell Science*. 15 February 2012. Vol. 125, no. 4, p. 858–868. DOI 10.1242/jcs.089995.
- HIRSCHHAEUSER, Franziska, MENNE, Heike, DITTFELD, Claudia, WEST, Jonathan, MUELLER-KLIESER, Wolfgang and KUNZ-SCHUGHART, Leoni A., 2010. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *Journal of Biotechnology*. 1 July 2010. Vol. 148, no. 1, p. 3–15. DOI 10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
- HOFFMANN, Caroline, CALUGARU, Valentin, BORCOMAN, Edith, MORENO, Victor, CALVO, Emiliano, LIEM, Xavier, SALAS, Sébastien, DOGER, Bernard, JOUFFROY, Thomas, MIRABEL, Xavier, RODRIGUEZ, Jose, CHILLES, Anne, BERNOIS, Katell, DIMITRIU, Mikaela, FAKHRY, Nicolas, HEE KAM, Stéphanie Wong and LE TOURNEAU, Christophe, 2021. Phase I dose-escalation study of NBTXR3 activated by intensity-modulated radiation therapy in elderly patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the oral cavity or oropharynx. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*. March 2021. Vol. 146, p. 135–144. DOI 10.1016/j.ejca.2021.01.007.
- HOHMANN, Tim and DEGHANI, Faramarz, 2019. The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*. April 2019. Vol. 8, no. 4, p. 362. DOI 10.3390/cells8040362.
- HOHMANN, Tim, GRABIEC, Urszula, VOGEL, Carolin, GHADBAN, Chalid, ENSMINGER, Stephan, BACHE, Matthias, VORDERMARK, Dirk and DEGHANI, Faramarz, 2017. The Impact of Non-Lethal Single-Dose Radiation on Tumor Invasion and Cytoskeletal Properties. *International Journal of Molecular Sciences*. 18 September 2017. Vol. 18, no. 9, p. 2001. DOI 10.3390/ijms18092001.
- HOLT, Brian D., SHAMS, Hengameh, HORST, Travis A., BASU, Saurav, RAPE, Andrew D., WANG, Yu-Li, ROHDE, Gustavo K., MOFRAD, Mohammad R. K., ISLAM, Mohammad F. and DAHL, Kris Noel, 2012. Altered Cell Mechanics from the Inside:



- Dispersed Single Wall Carbon Nanotubes Integrate with and Restructure Actin. *Journal of Functional Biomaterials*. June 2012. Vol. 3, no. 2, p. 398–417. DOI 10.3390/jfb3020398.
- HUAI, Yanyan, ZHANG, Yushan, XIONG, Xunhao, DAS, Shamik, BHATTACHARYA, Resham and MUKHERJEE, Priyabrata, 2019. Gold Nanoparticles sensitize pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Cell Stress*. 31 July 2019. Vol. 3, no. 8, p. 267–279. DOI 10.15698/cst2019.08.195.
- HUANG, Ruo-Pan, 2003. Cytokine antibody arrays: a promising tool to identify molecular targets for drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. December 2003. Vol. 6, no. 8, p. 769–775. DOI 10.2174/138620703771826946
- HUANG, Keyang, MA, Huili, LIU, Juan, HUO, Shuaidong, KUMAR, Anil, WEI, Tuo, ZHANG, Xu, JIN, Shubin, GAN, Yaling, WANG, Paul C., HE, Shengtai, ZHANG, Xiaoning and LIANG, Xing-Jie, 2012. Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS nano*. 22 May 2012. Vol. 6, no. 5, p. 4483–4493. DOI 10.1021/nn301282m.
- HUANG, Wen-Juan, CHEN, Wei-Wei and ZHANG, Xia, 2016. Glioblastoma multiforme: Effect of hypoxia and hypoxia inducible factors on therapeutic approaches. *Oncology Letters*. October 2016. Vol. 12, no. 4, p. 2283–2288. DOI 10.3892/ol.2016.4952.
- HUANG, Yujie, HOFFMAN, Caitlin, RAJAPPA, Prajwal, KIM, Joon-Hyung, HU, Wenhao, HUSE, Jason, TANG, Zhongshu, LI, Xuri, WEKSLER, Babette, BROMBERG, Jacqueline, LYDEN, David C. and GREENFIELD, Jeffrey P., 2014. Oligodendrocyte Progenitor Cells Promote Neovascularization in Glioma by Disrupting the Blood–Brain Barrier. *Cancer Research*. 15 February 2014. Vol. 74, no. 4, p. 1011–1021. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-13-1072
- HUANG, Rui-Xue and ZHOU, Ping-Kun, 2020. DNA damage response signaling pathways and targets for radiotherapy sensitization in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 1 May 2020. Vol. 5, no. 1, p. 1–27. DOI 10.1038/s41392-020-0150-x
- IBRAHIM, Mohamed, SCHOELERMANN, Julia, MUSTAFA, Kamal and CIMPAN, Mihaela R., 2018. TiO<sub>2</sub> nanoparticles disrupt cell adhesion and the architecture of cytoskeletal networks of human osteoblast-like cells in a size dependent manner. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. October 2018. Vol. 106, no. 10, p. 2582–2593. DOI 10.1002/jbm.a.36448.
- INSTITUT CLAUDIUS REGAUD, 2021. NCT02866747: A Phase I/II Multicenter Trial Evaluating the Association of Hypofractionated Stereotactic Radiation Therapy and the Anti-Programmed Death-ligand 1 (PD-L1) Durvalumab (Medi4736) for Patients With Recurrent Glioblastoma (STERIMGLI) [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02866747>
- ISER, Isabele C., PEREIRA, Mariana B., LENZ, Guido and WINK, Márcia R., 2017. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition-Like Process in Glioblastoma: An Updated Systematic Review and In Silico Investigation: EMT IN GLIOBLASTOMA. *Medicinal Research Reviews*. March 2017. Vol. 37, no. 2, p. 271–313. DOI 10.1002/med.21408.
- IWADATE, Yasuo, 2016. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression (Review). *Oncology Letters*. 1 March 2016. Vol. 11, no. 3, p. 1615–1620. DOI 10.3892/ol.2016.4113.
- JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, Agata, MATEJCZYK, Marzena and ROSOCHACKI, Stanisław, 2016. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016. Vol. 31, no. sup1, p. 177–183. DOI 10.3109/14756366.2016.1161620.
- JACOBS, Valerie L, VALDES, Pablo A, HICKEY, William F and DE LEO, Joyce A, 2011. Current review of in vivo GBM rodent models: emphasis on the CNS-1 tumour model. *ASN NEURO*. 3 August 2011. Vol. 3, no. 3, p. e00063. DOI 10.1042/AN20110014
- JÄKEL, Sarah and DIMOU, Leda, 2017. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 13 February 2017. Vol. 11, p. 24. DOI 10.3389/fncel.2017.00024.
- JASIŃSKA-KONIOR, Katarzyna, WIECHEĆ, Olga, SARNA, Michał, PANEK, Agnieszka, SWAKOŃ, Jan, MICHALIK, Marta, URBĄŃSKA, Krystyna and ELAS, Martyna, 2019. Increased elasticity of melanoma cells after low-LET proton beam due to actin cytoskeleton rearrangements. *Scientific Reports*. 7 May 2019. Vol. 9, no. 1, p. 7008. DOI 10.1038/s41598-019-43453-7
- JAWABRI, Khalid H. and SHARMA, Sandeep, 2021. Physiology, Cerebral Cortex Functions. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [Accessed 4 October 2021]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538496/>
- JAYAMANNE, Dasantha, WHEELER, Helen, BRAZIER, David, NEWHEY, Allison, KASTELAN, Marina, GUO, Linxin and BACK, Michael, 2018. Predicting patterns of failure in temporal lobe GBMs: possible implications on radiotherapy treatment portals. *Radiation Oncology*. 20 July 2018. Vol. 13, no. 1, p. 133. DOI 10.1186/s13014-018-1078-y.



- JEON, Hee-Young, KIM, Jun-Kyum, HAM, Seok Won, OH, Se-Yeong, KIM, Jaebong, PARK, Jae-Bong, LEE, Jae-Yong, KIM, Sung-Chan and KIM, Hyunggee, 2016. Irradiation induces glioblastoma cell senescence and senescence-associated secretory phenotype. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. May 2016. Vol. 37, no. 5, p. 5857–5867. DOI 10.1007/s13277-015-4439-2.
- JEONG, Hyeon-Ho, CHOI, Eunjin, ELLIS, Elizabeth and LEE, Tung-Chun, 2019. Recent advances in gold nanoparticles for biomedical applications: from hybrid structures to multi-functionality. *Journal of Materials Chemistry B*. 2019. Vol. 7, no. 22, p. 3480–3496. DOI 10.1039/C9TB00557A
- JERAJ, M. and ROBAR, V., 2004. Multileaf collimator in radiotherapy. *Radiology and Oncology*. 2004. Vol. 38, no. 3, p. 235–240
- JIA, Cuihong, KEASEY, Matthew P., MALONE, Hannah M., LOVINS, Chiharu, SANTE, Richard R., RAZSKAZOVSKIY, Vlad and HAGG, Theo, 2019. Vitronectin from brain pericytes promotes adult forebrain neurogenesis by stimulating CNTF. *Experimental Neurology*. February 2019. Vol. 312, p. 20–32. DOI 10.1016/j.expneurol.2018.11.002.
- JIANG, Guo-Liang, 2012. Particle therapy for cancers: a new weapon in radiation therapy. *Frontiers of Medicine*. June 2012. Vol. 6, no. 2, p. 165–172. DOI 10.1007/s11684-012-0196-4.
- JOH, Daniel Y., SUN, Lova, STANGL, Melissa, AL ZAKI, Ajlan, MURTY, Surya, SANTOIEEMMA, Phillip P., DAVIS, James J., BAUMANN, Brian C., ALONSO-BASANTA, Michelle, BHANG, Dongha, KAO, Gary D., TSOURKAS, Andrew and DORSEY, Jay F., 2013. Selective Targeting of Brain Tumors with Gold Nanoparticle-Induced Radiosensitization. CASTRO, Maria G. (ed.), *PLoS ONE*. 30 April 2013. Vol. 8, no. 4, p. e62425. DOI 10.1371/journal.pone.0062425.
- KARUPPAIYA, Palaniyandi, SATHEESHKUMAR, Elumalai, CHAO, Wei-Ting, KAO, Lin-Yi, CHEN, Emily Chin-Fun and TSAY, Hsin-Sheng, 2013. Anti-metastatic activity of biologically synthesized gold nanoparticles on human fibrosarcoma cell line HT-1080. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*. 1 October 2013. Vol. 110, p. 163–170. DOI 10.1016/j.colsurfb.2013.04.037.
- KAMIMURA, Keisuke, 2021. Roles of Glypican and Heparan Sulfate at the Synapses. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*. 2021. Vol. 33, no. 194, p. E85–E90. DOI 10.4052/tigg.2017.1E
- KAWAMOTO, Aya, YOKOE, Takeshi, TANAKA, Koji, SAIGUSA, Susumu, TOIYAMA, Yuji, YASUDA, Hiromi, INOUE, Yasuhiro, MIKI, Chikao and KUSUNOKI, Masato, 2012. Radiation induces epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Oncology Reports*. January 2012. Vol. 27, no. 1, p. 51–57. DOI 10.3892/or.2011.1485.
- KAWAMURA, Yoichiro, TAKOUDA, Jun, YOSHIMOTO, Koji and NAKASHIMA, Kinichi, 2018. New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. *Cell Biology and Toxicology*. 2018. Vol. 34, no. 6, p. 425–440. DOI 10.1007/s10565-017-9420-y.
- KAZMI, Farasat, SOON, Yu Yang, LEONG, Yiat Horng, KOH, Wee Yao and VELLAYAPPAN, Balamurugan, 2019. Re-irradiation for recurrent glioblastoma (GBM): a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neuro-Oncology*. March 2019. Vol. 142, no. 1, p. 79–90. DOI 10.1007/s11060-018-03064-0.
- KENNEY-HERBERT, Emma, AL-MAYHANI, Talal, PICCIRILLO, Sara G. M., FOWLER, Joanna, SPITERI, Inmaculada, JONES, Philip and WATTS, Colin, 2015. CD15 Expression Does Not Identify a Phenotypically or Genetically Distinct Glioblastoma Population. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2015. Vol. 4, no. 7, p. 822–831. DOI 10.5966/sctm.2014-0047.
- KHAKH, Baljit S. and DENEEN, Benjamin, 2019. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annual Review of Neuroscience*. 8 July 2019. Vol. 42, p. 187–207. DOI 10.1146/annurev-neuro-070918-050443.
- KHAN, Luluel, SOLIMAN, Hany, SAHGAL, Arjun, PERRY, James, XU, Wei and TSAO, May N., 2016. External beam radiation dose escalation for high grade glioma. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. 19 August 2016. No. 8, p. CD011475. DOI 10.1002/14651858.CD011475.pub2
- KIM, Wanyeon, LEE, Sungmin, SEO, Danbi, KIM, Dain, KIM, Kyeongmin, KIM, EunGi, KANG, JiHoon, SEONG, Ki Moon, YOUN, HyeSook and YOUN, BuHyun, 2019. Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells*. 18 September 2019. Vol. 8, no. 9, p. 1105. DOI 10.3390/cells8091105.
- KIM, Michelle M., UMEMURA, Yoshie and LEUNG, Denise, 2018. Bevacizumab and Glioblastoma: Past, Present, and Future Directions. *The Cancer Journal*. August 2018. Vol. 24, no. 4, p. 180–186. DOI 10.1097/PPO.0000000000000326.
- KIM, Sang-Soo, PIROLLO, Kathleen F. and CHANG, Esther H., 2015. Isolation and Culturing of Glioma Cancer Stem Cells. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*. 1 June 2015. Vol. 67, p. 23.10.1-23.10.10. DOI 10.1002/0471143030.cb2310s67

- KIM, Yushan and KUMAR, Sanjay, 2014. CD44-mediated Adhesion to Hyaluronic Acid Contributes to Mechanosensing and Invasive Motility. *Molecular cancer research : MCR*. October 2014. Vol. 12, no. 10, p. 1416–1429. DOI 10.1158/1541-7786.MCR-13-0629.
- KIM, Jong-Ki, SEO, Seung-Jun, KIM, Hong-Tae, KIM, Ki-Hong, CHUNG, Myung-Hwan, KIM, Kye-Ryung and YE, Sung-Jun, 2012. Enhanced proton treatment in mouse tumors through proton irradiated nanoradiator effects on metallic nanoparticles. *Physics in Medicine and Biology*. 21 December 2012. Vol. 57, no. 24, p. 8309–8323. DOI 10.1088/0031-9155/57/24/8309.
- KIRTON, Adam, KLOIBER, Reinhard, RIGEL, Jane and WOLFF, Johannes, 2002. Evaluation of pediatric CNS malignancies with <sup>99m</sup>Tc-methoxyisobutylisonitrile SPECT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 1 December 2002. Vol. 43, p. 1438–43.
- KOLHAR, Poornima, ANSELMO, Aaron C., GUPTA, Vivek, PANT, Kapil, PRABHAKARPANDIAN, Balabhaskar, RUOSLAHTI, Erkki and MITRAGOTRI, Samir, 2013. Using shape effects to target antibody-coated nanoparticles to lung and brain endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 25 June 2013. Vol. 110, no. 26, p. 10753–10758. DOI 10.1073/pnas.1308345110.
- KONG, Lin, WU, Jinsong, GAO, Jing, QIU, Xianxin, YANG, Jing, HU, Jiyi, HU, Weixu, MAO, Ying and LU, Jiade J., 2020. Particle radiation therapy in the management of malignant glioma: Early experience at the Shanghai Proton and Heavy Ion Center. *Cancer*. 15 June 2020. Vol. 126, no. 12, p. 2802–2810. DOI 10.1002/cncr.32828.
- KOTINI, Maria, BARRIGA, Elias H., LESLIE, Jonathan, GENTZEL, Marc, RAUSCHENBERGER, Verena, SCHAMBONY, Alexandra and MAYOR, Roberto, 2018. Gap junction protein Connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. *Nature Communications*. 21 September 2018. Vol. 9, no. 1, p. 3846. DOI 10.1038/s41467-018-06368-x.
- KOURTIDIS, Antonis, NGOK, Siu P. and ANASTASIADIS, Panos Z., 2013. p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2013. Vol. 116, p. 409–432. DOI 10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2.
- KRUSER, Tim J, BOSCH, Walter R, BADIYAN, Shahed N, BOVI, Joseph A, GHIA, Amol J, KIM, Michelle M, SOLANKI, Abhishek A., SACHDEV, Sean, TSIEN, Christina, WANG, Tony J C, MEHTA, Minesh P and MCMULLEN, Kevin P, 2019. NRG Brain Tumor Specialists Consensus Guidelines for Glioblastoma Contouring. *Journal of neuro-oncology*. May 2019. Vol. 143, no. 1, p. 157–166. DOI 10.1007/s11060-019-03152-9.
- KROLICKI, Leszek, BRUCHERTSEIFER, Frank, KUNIKOWSKA, Jolanta, KOZIARA, Henryk, KRÓLICKI, Bartosz, JAKUCIŃSKI, Maciej, PAWLAK, Dariusz, APOSTOLIDIS, Christos, MIRZADEH, Saed, ROLA, Rafał, MERLO, Adrian and MORGENSTERN, Alfred, 2018. Prolonged survival in secondary glioblastoma following local injection of targeted alpha therapy with <sup>213</sup>Bi-substance P analogue. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. July 2018. Vol. 45, no. 9, p. 1636–1644. DOI 10.1007/s00259-018-4015-2
- KUNDU, Soumi, XIONG, Anqi, SPYROU, Argyris, WICHER, Grzegorz, MARINESCU, Voichita D., EDQVIST, Per-Henrik D., ZHANG, Lei, ESSAND, Magnus, DIMBERG, Anna, SMITS, Anja, ILAN, Neta, VLODAVSKY, Israel, LI, Jin-Ping and FORSBERG-NILSSON, Karin, 2016. Heparanase Promotes Glioma Progression and Is Inversely Correlated with Patient Survival. *Molecular cancer research : MCR*.
- KUHN, Sarah, GRITTI, Laura, CROOKS, Daniel and DOMBROWSKI, Yvonne, 2019. Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*. 12 November 2019. Vol. 8, no. 11, p. 1424. DOI 10.3390/cells8111424. December 2016. Vol. 14, no. 12, p. 1243–1253. DOI 10.1158/1541-7786.MCR-16-0223.
- KUNOH, Tatsuki, SHIMURA, Tsutomu, KASAI, Tomonari, MATSUMOTO, Syuji, MAHMUD, Hafizah, KHAYRANI, Apriliana Cahya, SENO, Masaharu, KUNOH, Hitoshi and TAKADA, Jun, 2018. Use of DNA-generated gold nanoparticles to radiosensitize and eradicate radioresistant glioma stem cells. *Nanotechnology*. November 2018. Vol. 30, no. 5, p. 055101. DOI 10.1088/1361-6528/aaedd5.
- KUTWIN, Marta, SAWOSZ, Ewa, JAWORSKI, Slawomir, HINZMANN, Mateusz, WIERZBICKI, Mateusz, HOTOWY, Anna, GRODZIK, Marta, WINNICKA, Anna and CHWALIBOG, Andre, 2017. Investigation of platinum nanoparticle properties against U87 glioblastoma multiforme. *Archives of Medical Science*. 2017. Vol. 6, p. 1322–1334. DOI 10.5114/aoms.2016.58925.
- LANIER, M. Hunter, KIM, Taekyung and COOPER, John A., 2015. CARMIL2 is a novel molecular connection between vimentin and actin essential for cell migration and invadopodia formation. *Molecular Biology of the Cell*. 15 December 2015. Vol. 26, no. 25, p. 4577–4588. DOI 10.1091/mbc.E15-08-0552.
- LAM, Doris, ENRIGHT, Heather A., CADENA, Jose, PETERS, Sandra K. G., SALES, Ana Paula, OSBURN, Joanne J., SOSCIA, David A., KULP, Kristen S., WHEELER, Elizabeth K. and FISCHER, Nicholas O., 2019. Tissue-specific extracellular matrix accelerates the

- formation of neural networks and communities in a neuron-glia co-culture on a multi-electrode array. *Scientific Reports*. 11 March 2019. Vol. 9, no. 1, p. 4159. DOI 10.1038/s41598-019-40128-1.
- LÄMMERMANN, Tim and SIXT, Michael, 2009. Mechanical modes of “amoeboid” cell migration. *Current Opinion in Cell Biology*. October 2009. Vol. 21, no. 5, p. 636–644. DOI 10.1016/j.ceb.2009.05.003.
- LARJAVAARA, Suvi, MÄNTYLÄ, Riitta, SALMINEN, Tiina, HAAPASALO, Hannu, RAITANEN, Jani, JÄÄSKELÄINEN, Juha and AUVINEN, Anssi, 2007. Incidence of gliomas by anatomic location. *Neuro-Oncology*. July 2007. Vol. 9, no. 3, p. 319–325. DOI 10.1215/15228517-2007-016.
- LATHIA, Justin D., MACK, Stephen C., MULKEARNS-HUBERT, Erin E., VALENTIM, Claudia L. L. and RICH, Jeremy N., 2015. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development*. 15 June 2015. Vol. 29, no. 12, p. 1203–1217. DOI 10.1101/gad.261982.115.
- LAUBER, Kirsten, ERNST, Anne, ORTH, Michael, HERRMANN, Martin and BELKA, Claus, 2012. Dying cell clearance and its impact on the outcome of tumor radiotherapy. *Frontiers in Oncology*. 11 September 2012. Vol. 2, p. 116. DOI 10.3389/fonc.2012.00116.
- LE MERCIER. 2010. Galectins and Gliomas. Brain Pathology - Wiley Online Library, [no date]. [online]. [Accessed 15 August 2021]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1750-3639.2009.00270.x>
- LECLERC, Catherine, HAEICH, Jacques, AULESTIA, Francisco J., KILHOFFER, Marie-Claude, MILLER, Andrew L., NÉANT, Isabelle, WEBB, Sarah E., SCHAEFFER, Etienne, JUNIER, Marie-Pierre, CHNEIWEISS, Hervé and MOREAU, Marc, 2016. Calcium signaling orchestrates glioblastoma development: Facts and conjunctures. *Biochimica Et Biophysica Acta*. June 2016. Vol. 1863, no. 6 Pt B, p. 1447–1459. DOI 10.1016/j.bbamcr.2016.01.018.
- LEE, Catherine A. A., BANERJEE, Pallavi, WILSON, Brian J., WU, Siyuan, GUO, Qin, BERG, Gretchen, KARPOVA, Svetlana, MISHRA, Ananda, LIAN, John W., TRAN, Johnathan, EMMERICH, Max, MURPHY, George F., FRANK, Markus H. and FRANK, Natasha Y., 2020. Targeting the ABC transporter ABCB5 sensitizes glioblastoma to temozolomide-induced apoptosis through a cell-cycle checkpoint regulation mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 29 May 2020. Vol. 295, no. 22, p. 7774–7788. DOI 10.1074/jbc.RA120.013778.
- LEE, Sang Y., 2016. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes & Diseases*. September 2016. Vol. 3, no. 3, p. 198–210. DOI 10.1016/j.gendis.2016.04.007.
- LEE, Won Hee, WARRINGTON, Junie P., SONNTAG, William E. and LEE, Yong Woo, 2012. Irradiation Alters MMP-2/TIMP-2 System and Collagen Type IV Degradation in Brain. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*. April 2012. Vol. 82, no. 5, p. 1559–1566. DOI 10.1016/j.ijrobp.2010.12.032.
- LEE, Hyun Geun and KIM, Yangjin, 2015. The role of the microenvironment in regulation of CSPG-driven invasive and non-invasive tumor growth in glioblastoma. *Japan Journal of Industrial and Applied*
- LEE, Sung Haeng and DOMINGUEZ, Roberto, 2010. Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells. *Molecules and cells*. April 2010. Vol. 29, no. 4, p. 311–325.
- LEECE, Rebecca, XU, Jordan, OSTROM, Quinn T, CHEN, Yanwen, KRUCHKO, Carol and BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S, 2017. Global incidence of malignant brain and other central nervous system tumors by histology, 2003–2007. *Neuro-Oncology*. October 2017. Vol. 19, no. 11, p. 1553–1564. DOI 10.1093/neuonc/nox091.
- LEISS, Lina, MEGA, Alessandro, OLSSON BONTELL, Thomas, NISTÉR, Monica, SMITS, Anja, CORVIGNO, Sara, RAHMAN, Mohammad Aminur, ENGER, Per Øyvind, MILETIC, Hrvoje and ÖSTMAN, Arne, 2020. Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ /glial fibrillary acidic protein expressing peritumoral astrocytes associate with shorter median overall survival in glioblastoma patients. *Glia*. 2020. Vol. 68, no. 5, p. 979–988. DOI 10.1002/glia.23756.
- LEITE, Diana M., BASKOVIC, Barbara Zvar, CIVITA, Prospero, NETO, Catia, GUMBLETON, Mark and PILKINGTON, Geoffrey J., 2020. A human co-culture cell model incorporating microglia supports glioblastoma growth and migration, and confers resistance to cytotoxics. *The FASEB Journal*. 2020. Vol. 34, no. 1, p. 1710–1727. DOI 10.1096/fj.201901858RR.
- LEMAIRE, Gaelle, 2017. *Elaboration de Nanoparticules hybrides et multiphasées innovantes pour la délivrance de principe actif*. [online]. These de doctorat. Angers. [Accessed 14 December 2021]. Available from: <http://www.theses.fr/2017ANGE0054>
- LEVICAR, Natasa, STROJNIK, Tadej, KOS, Janko, DEWEY, Ricardo A., PILKINGTON, Geoffrey J. and LAH, Tamara T., 2002. Lysosomal enzymes, cathepsins in brain tumour invasion. *Journal of Neuro-Oncology*. May 2002. Vol. 58, no. 1, p. 21–32. DOI 10.1023/a:1015892911420.

- LEWIS-TUFFIN, Laura J., RODRIGUEZ, Fausto, GIANNINI, Caterina, SCHEITHAUER, Bernd, NECELA, Brian M., SARKARIA, Jann N. and ANASTASIADIS, Panos Z., 2010. Misregulated E-cadherin expression associated with an aggressive brain tumor phenotype. *PloS One*. 27 October 2010. Vol. 5, no. 10, p. e13665. DOI 10.1371/journal.pone.0013665
- LEWITZKI, Victor, KLEMENT, Rainer J., KOSMALA, Rebekka, LISOWSKI, Dominik, FLENTJE, Michael and POLAT, Bülent, 2019. Accelerated hyperfractionated radiochemotherapy with temozolomide is equivalent to normofractionated radiochemotherapy in a retrospective analysis of patients with glioblastoma. *Radiation Oncology (London, England)*. 12 December 2019. Vol. 14, no. 1, p. 227. DOI 10.1186/s13014-019-1427-5.
- LI, Rui, CHEN, Xincheng, YOU, Yongping, WANG, Xiefeng, LIU, Yanwei, HU, Qi and YAN, Wei, 2015. Comprehensive portrait of recurrent glioblastoma multiforme in molecular and clinical characteristics. *Oncotarget*. 4 September 2015. Vol. 6, no. 31, p. 30968–30974.
- LI, Xiuying, WEI, Zhenhong, LV, Huiying, WU, Liya, CUI, Yingnan, YAO, Hua, LI, Jing, ZHANG, Hao, YANG, Bai and JIANG, Jinlan, 2019. Iron oxide nanoparticles promote the migration of mesenchymal stem cells to injury sites. *International Journal of Nanomedicine*. 14 January 2019. Vol. 14, p. 573–589. DOI 10.2147/IJN.S184920.
- LI, Hezhen, LEI, Bingxi, XIANG, Wei, WANG, Hai, FENG, Wenfeng, LIU, Yawei and QI, Songtao, 2017. Differences in Protein Expression between the U251 and U87 Cell Lines. *Turkish Neurosurgery*. 2017. Vol. 27, no. 6, p. 894–903. DOI 10.5137/1019-5149.JTN.17746-16.1.
- LI, Jing, WU, Dong-ming, HAN, Rong, YU, Ye, DENG, Shi-hua, LIU, Teng, ZHANG, Ting and XU, Ying, 2020. <p>Low-Dose Radiation Promotes Invasion and Migration of A549 Cells by Activating the CXCL1/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway</p>. *OncoTargets and Therapy*. 29 April 2020. Vol. 13, p. 3619–3629. DOI 10.2147/OTT.S243914.
- LIN, Binwei, GAO, Feng, YANG, Yiwei, WU, Dai, ZHANG, Yu, FENG, Gang, DAI, Tangzhi and DU, Xiaobo, 2021. FLASH Radiotherapy: History and Future. *Frontiers in Oncology*. 2021. Vol. 11, p. 1890. DOI 10.3389/fonc.2021.644400.
- LINKOUS, Amanda, BALAMATSIAS, Demosthenes, SNUDELL, Matija, EDWARDS, Lincoln, MIYAGUCHI, Ken, MILNER, Teresa, REICH, Batsheva, COHEN-GOULD, Leona, STORASKA, Andrew, NAKAYAMA, Yasumi, SCHENKEIN, Emily, SINGHANIA, Richa, CIRIGLIANO, Stefano, MAGDELDIN, Tarig, LIN, Ying, NANJANGUD, Gouri, CHADALAVADA, Kalyani, PISAPIA, David, LISTON, Conor and FINE, Howard A., 2019. Modeling Patient-Derived Glioblastoma with Cerebral Organoids. *Cell Reports*. 19 March 2019. Vol. 26, no. 12, p. 3203–3211.e5. DOI 10.1016/j.celrep.2019.02.063.
- LIU, Yan-Jun, LE BERRE, Maël, LAUTENSCHLAEGER, Franziska, MAIURI, Paolo, CALLAN-JONES, Andrew, HEUZÉ, Mélina, TAKAKI, Tohru, VOITURIEZ, Raphaël and PIEL, Matthieu, 2015. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell*. 12 February 2015. Vol. 160, no. 4, p. 659–672. DOI 10.1016/j.cell.2015.01.007.
- LIU, Chen-Guang, HAN, Ya-Hui, KANKALA, Ranjith Kumar, WANG, Shi-Bin and CHEN, Ai-Zheng, 2020. <p>Subcellular Performance of Nanoparticles in Cancer Therapy</p>. *International Journal of Nanomedicine*. 5 February 2020. Vol. 15, p. 675–704. DOI 10.2147/IJN.S226186.
- prominent outcome and potential affluence of these interdependent subcellular components in cancer therapy are emphasized. Finally, we conclude with perspectives with a focus on the contemporary challenges in their clinical applicability. Keywords: organelle, proton sponge effect, intracellular pathways, cancer therapy, nanocomposites
- LIU, Ruiqiu, 2013. Adsorption and dissociation of H<sub>2</sub>O on Au(111) surface: A DFT study. *Computational and Theoretical Chemistry*. 1 September 2013. Vol. 1019, p. 141–145. DOI 10.1016/j.comptc.2013.07.009.
- LIU, Yang, LIU, Yuanyuan, SUN, Chao, GAN, Lu, ZHANG, Luwei, MAO, Aihong, DU, Yuting, ZHOU, Rong and ZHANG, Hong, 2014. Carbon Ion Radiation Inhibits Glioma and Endothelial Cell Migration Induced by Secreted VEGF. AHMAD, Aamir (ed.), *PLoS ONE*. 3 June 2014. Vol. 9, no. 6, p. e98448. DOI 10.1371/journal.pone.0098448.
- LIVELY, Starlee and SCHLICHTER, Lyanne C, 2013. The microglial activation state regulates migration and roles of matrix-dissolving enzymes for invasion. *Journal of Neuroinflammation*. 21 June 2013. Vol. 10, p. 75. DOI 10.1186/1742-2094-10-75.
- LOEFFLER, J. S., ALEXANDER, E., HOCHBERG, F. H., WEN, P. Y., MORRIS, J. H., SCHOENE, W. C., SIDDON, R. L., MORSE, R. H. and BLACK, P. M., 1990. Clinical patterns of failure following stereotactic interstitial irradiation for malignant gliomas. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. December 1990. Vol. 19, no. 6, p. 1455–1462. DOI 10.1016/0360-3016(90)90358-q.
- LOUIS, David N, PERRY, Arie, WESSELING, Pieter, BRAT, Daniel J, CREE, Ian A, FIGARELLA-BRANGER, Dominique, HAWKINS, Cynthia, NG, H K, PFISTER, Stefan M, REIFENBERGER, Guido, SOFFIETTI, Riccardo, VON DEIMLING, Andreas and ELLISON, David W, 2021. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro-Oncology*. 1 August 2021. Vol. 23, no. 8, p. 1231–1251. DOI 10.1093/neuonc/noab106.

- LOUIS, David N., PERRY, Arie, REIFENBERGER, Guido, VON DEIMLING, Andreas, FIGARELLA-BRANGER, Dominique, CAVENEE, Webster K., OHGAKI, Hiroko, WIESTLER, Otmar D., KLEIHUES, Paul and ELLISON, David W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016. Vol. 131, no. 6, p. 803–820. DOI 10.1007/s00401-016-1545-1.
- LOUIS, David N., OHGAKI, Hiroko, WIESTLER, Otmar D., CAVENEE, Webster K., BURGER, Peter C., JOUVET, Anne, SCHEITHAUER, Bernd W. and KLEIHUES, Paul, 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*. August 2007. Vol. 114, no. 2, p. 97–109. DOI 10.1007/s00401-007-0243-4.
- LU, Jiade J., 2020. NCT04536649: *Proton and Heavy Ion Beam Radiation Versus Photon Beam Radiation for Newly Diagnosed Glioblastoma: A Multi-center Prospective Phase 3 Randomized Control Clinical Trial*. [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04536649>
- LUO, Qing, KUANG, Dongdong, ZHANG, Bingyu and SONG, Guanbin, 2016. Cell stiffness determined by atomic force microscopy and its correlation with cell motility. *Biochimica Et Biophysica Acta*. September 2016. Vol. 1860, no. 9, p. 1953–1960. DOI 10.1016/j.bbagen.2016.06.010.
- LYUTFI, Emran Myumyun, GEORGIEVA, Reneta, STOYANOV, George S. and DZHENKOV, Deyan, 2020. Tumor growth patterns in central nervous system tumors with astrocytic differentiation. *Glioma*. 4 January 2020. Vol. 3, no. 2, p. 67. DOI 10.4103/glioma.glioma\_8\_20.
- MACKINTOSH, Christopher, BUTTERFIELD, Richard, ZHANG, Nan, LORENCE, Julia, ZLOMANCZUK, Piotr, BENDOK, Bernard R., ZIMMERMAN, Richard S., SWANSON, Kristin, PORTER, Alyx and MRUGALA, Maciej M., 2020. Does location matter? Characterisation of the anatomic locations, molecular profiles, and clinical features of gliomas. *Neurologia I Neurochirurgia Polska*. 2020. Vol. 54, no. 5, p. 456–465. DOI 10.5603/PJNNS.a2020.0067.
- MAKLAD, Ahmed, SHARMA, Anjana et AZIMI, Iman, 2019. Calcium Signaling in Brain Cancers: Roles and Therapeutic Targeting. *Cancers*. 26 janvier 2019. Vol. 11, n° 2, pp. E145. DOI 10.3390/cancers11020145.
- MALOUFF, Timothy D., PETERSON, Jennifer L., MAHAJAN, Anita and TRIFILETTI, Daniel M., 2019. Carbon ion radiotherapy in the treatment of gliomas: a review. *Journal of Neuro-Oncology*. 1 November 2019. Vol. 145, no. 2, p. 191–199. DOI 10.1007/s11060-019-03303-y.
- MALRIC, Laure, MONFERRAN, Sylvie, GILHODES, Julia, BOYRIE, Sabrina, DAHAN, Perrine, SKULI, Nicolas, SESEN, Julie, FILLERON, Thomas, KOWALSKI-CHAUVEL, Aline, COHEN-JONATHAN MOYAL, Elizabeth, TOULAS, Christine and LEMARIÉ, Anthony, 2017. Interest of integrins targeting in glioblastoma according to tumor heterogeneity and cancer stem cell paradigm: an update. *Oncotarget*. 21 August 2017. Vol. 8, no. 49, p. 86947–86968. DOI 10.18632/oncotarget.20372.
- MANINI, Ivana, CAPONNETTO, Federica, BARTOLINI, Anna, IUS, Tamara, MARIUZZI, Laura, DI LORETO, Carla, BELTRAMI, Antonio Paolo and CESSSELLI, Daniela, 2018. Role of Microenvironment in Glioma Invasion: What We Learned from In Vitro Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 4 January 2018. Vol. 19, no. 1, p. 147. DOI 10.3390/ijms19010147.
- MAO, Leon, WHITEHEAD, Clarissa A., PARADISO, Lucia, KAYE, Andrew H., MOROKOFF, Andrew P., LUWOR, Rodney B. and STYLLI, Stanley S., 2017. Enhancement of invadopodia activity in glioma cells by sublethal doses of irradiation and temozolomide. *Journal of Neurosurgery*. 17 November 2017. Vol. 129, no. 3, p. 598–610. DOI 10.3171/2017.5.JNS17845.
- MARHUENDA, Emilie, 2018. *Mécanotransduction des cellules souches de glioblastome dans un nouveau modèle de culture tridimensionnel : implication de la MGAT5 dans la perception de l'environnement mécanique* [online]. These de doctorat. Montpellier. [Accessed 15 August 2021]. Available from: <http://www.theses.fr/2018MONTT091>
- MARKO, Nicholas F., WEIL, Robert J., SCHROEDER, Jason L., LANG, Frederick F., SUKI, Dima and SAWAYA, Raymond E., 2014. Extent of resection of glioblastoma revisited: personalized survival modeling facilitates more accurate survival prediction and supports a maximum-safe-resection approach to surgery. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 10 March 2014. Vol. 32, no. 8, p. 774–782. DOI 10.1200/JCO.2013.51.8886.
- MARTINHO, Olga, VILAÇA, Natália, CASTRO, Paulo, AMORIM, Ricardo, FONSECA, Antonio, BALTAZAR, Fátima, REIS, Rui and NEVES, Isabel, 2015. In vitro and in vivo studies of temozolomide loading in zeolite structures as drug delivery systems for glioblastoma. *RSC Adv*. 19 March 2015. Vol. 5. DOI 10.1039/C5RA03871E.
- MAUGERI, Rosario, SCHIERA, Gabriella, DI LIEGRO, Carlo Maria, FRICANO, Anna, IACOPINO, Domenico Gerardo and DI LIEGRO, Italia, 2016. Aquaporins and Brain Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*. 29 June 2016. Vol. 17, no. 7, p. 1029. DOI 10.3390/ijms17071029.



- MCEVOY, Eoin, HAN, Yu Long, GUO, Ming and SHENOY, Vivek B., 2020. Gap junctions amplify spatial variations in cell volume in proliferating tumor spheroids. *Nature Communications*. 1 December 2020. Vol. 11, no. 1, p. 6148. DOI 10.1038/s41467-020-19904-5.
- M.D. ANDERSON CANCER CENTER, 2020. NCT04484909: *Phase I Study of NBTXR3 Activated by Radiotherapy for Locally Advanced or Borderline Resectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 25 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04484909>
- M.D. ANDERSON CANCER CENTER, 2021a. NCT01854554: *A Prospective Phase II Randomized Trial to Compare Intensity Modulated Proton Radiotherapy (IMPT) vs. Intensity Modulated Radiotherapy (IMRT) for Newly Diagnosed Glioblastoma (WHO Grade IV)* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01854554>
- M.D. ANDERSON CANCER CENTER, 2021b. NCT04505267: *Phase I Study of Reirradiation With NBTXR3 for Inoperable Locoregional Recurrent Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 25 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04505267>
- M.D. ANDERSON CANCER CENTER, 2021c. NCT04615013: *A Phase 1 Study of NBTXR3 Activated by Radiotherapy With Concurrent Chemotherapy for Adenocarcinoma of the Esophagus* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 25 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04615013>
- MEHTA, SR, SUHAG, V, SEMWAL, M and SHARMA, N, 2010. Radiotherapy: Basic Concepts and Recent Advances. *Medical Journal, Armed Forces India*. April 2010. Vol. 66, no. 2, p. 158–162. DOI 10.1016/S0377-1237(10)80132-7.
- MEGA, Alessandro, 2020. *Astrocytes in glioblastoma : enhancers of tumor growth, predictors of patient survival and potential therapeutic targets* [online]. Inst för onkologi-patologi / Dept of Oncology-Pathology. [Accessed 31 December 2021]. ISBN 978-91-7831-656-4. Available from: <http://openarchive.ki.se/xmlui/handle/10616/47019>
- MEMMEL, Simon, SISARIO, Dmitri, ZÖLLER, Caren, FIEDLER, Vanessa, KATZER, Astrid, HEIDEN, Robin, BECKER, Nicholas, EING, Lorenz, FERREIRA, Fábio L. R., ZIMMERMANN, Heiko, SAUER, Markus, FLENTJE, Michael, SUKHORUKOV, Vladimir L. and DJUZENOVA, Cholpon S., 2017. Migration pattern, actin cytoskeleton organization and response to PI3K-, mTOR-, and Hsp90-inhibition of glioblastoma cells with different invasive capacities. *Oncotarget*. 5 April 2017. Vol. 8, no. 28, p. 45298–45310. DOI 10.18632/oncotarget.16847. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16847>
- MENG, Jin, LI, Ping, ZHANG, Qing, YANG, Zhangru and FU, Shen, 2014. A radiosensitivity gene signature in predicting glioma prognostic via EMT pathway. *Oncotarget*. 10 June 2014. Vol. 5, no. 13, p. 4683–4693.
- MERCADANTE, Anthony A. and TADI, Prasanna, 2021. Neuroanatomy, Gray Matter. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [Accessed 4 October 2021]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553239/>
- METHODIST HEALTHCARE, 2009. NCT00376103: *A Phase I/II Trial of Maximal Resection, Local Radiation Boost With Concomitant Temozolomide, Followed by External Radiation Therapy With Concomitant Temozolomide for the Treatment of Newly Diagnosed Glioblastoma Multiforme* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00376103>
- METZ, Claudia, DÖGER, Remziye, RIQUELME, Elizabeth, CORTÉS, Priscilla, HOLMES, Christopher, SHAUGHNESSY, Ronan, OYANADEL, Claudia, GRABOWSKI, Catalina, GONZÁLEZ, Alfonso and SOZA, Andrea, 2016. Galectin-8 promotes migration and proliferation and prevents apoptosis in U87 glioblastoma cells. *Biological Research*. 2016. Vol. 49, p. 1–10. DOI 10.1186/s40659-016-0091-6.
- MI, Yu, MU, Chaofeng, WOLFRAM, Joy, DENG, Zaian, HU, Tony Ye, LIU, Xuewu, BLANCO, Elvin, SHEN, Haifa and FERRARI, Mauro, 2016. A micro/nano composite for combination treatment of melanoma lung metastasis. *Advanced healthcare materials*. 20 April 2016. Vol. 5, no. 8, p. 936–946. DOI 10.1002/adhm.201500910.
- MIKKELSEN, Vilde Elisabeth, SOLHEIM, Ole, SALVESEN, Øyvind and TORP, Sverre Helge, 2021. The histological representativeness of glioblastoma tissue samples. *Acta Neurochirurgica*. 1 July 2021. Vol. 163, no. 7, p. 1911–1920. DOI 10.1007/s00701-020-04608-y.
- MILADI, Imen, ALRIC, Christophe, DUFORT, Sandrine, MOWAT, Pierre, DUTOIR, Aurélie, MANDON, Céline, LAURENT, Gautier, BRÄUER-KRISCH, Elke, HERATH, Nirmitha, COLL, Jean-Luc, DUTREIX, Marie, LUX, François, BAZZI, Rana, BILLOTEY, Claire, JANIER, Marc, PERRIAT, Pascal, DUC, Géraldine Le, ROUX, Stéphane and TILLEMENT, Olivier, 2014. The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents. *Small*. 2014. Vol. 10, no. 6, p. 1116–1124. DOI 10.1002/smll.201302303.



- MIRANDA-FILHO, Adalberto, PIÑEROS, Marion, SOERJOMATARAM, Isabelle, DELTOUR, Isabelle and BRAY, Freddie, 2017. Cancers of the brain and CNS: global patterns and trends in incidence. *Neuro-Oncology*. February 2017. Vol. 19, no. 2, p. 270–280. DOI 10.1093/neuonc/now166.
- MIRJOLET, C., PAPA, A.L., CRÉHANGE, G., RAGUIN, O., SEIGNEZ, C., PAUL, C., TRUC, G., MAINGON, P. and MILLOT, N., 2013. The radiosensitization effect of titanate nanotubes as a new tool in radiation therapy for glioblastoma: A proof-of-concept. *Radiotherapy and Oncology*. July 2013. Vol. 108, no. 1, p. 136–142. DOI 10.1016/j.radonc.2013.04.004
- MISAWA, Masaki and TAKAHASHI, Junko, 2011. Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. October 2011. Vol. 7, no. 5, p. 604–614. DOI 10.1016/j.nano.2011.01.014.
- MITTAL, Vivek, 2018. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annual Review of Pathology*. 24 January 2018. Vol. 13, p. 395–412. DOI 10.1146/annurev-pathol-020117-043854.
- MIYATA, Shinji and KITAGAWA, Hiroshi, 2017. Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: Roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*. October 2017. Vol. 1861, no. 10, p. 2420–2434. DOI 10.1016/j.bbagen.2017.06.010.
- MOE, Birget, GABOS, Stephan and LI, Xing-Fang, 2013. Real-time cell-microelectronic sensing of nanoparticle-induced cytotoxic effects. *Analytica Chimica Acta*. 30 July 2013. Vol. 789, p. 83–90. DOI 10.1016/j.aca.2013.06.002.
- MOHIUDDIN, Enaya and WAKIMOTO, Hiroaki, 2021. Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches. *American Journal of Cancer Research*. 2021. Vol. 11, no. 8, p. 3742–3754.
- MONCHARMONT, Coralie, GUY, Jean-Baptiste, WOZNY, Anne-Sophie, GILORMINI, Marion, BATTISTON-MONTAGNE, Priscilla, ARDAIL, Dominique, BEUVE, Michael, ALPHONSE, Gersende, SIMOËNS, Xavier, RANCOULE, Chloé, RODRIGUEZ-LAFRASSE, Claire and MAGNÉ, Nicolas, 2016. Carbon ion irradiation withstands cancer stem cells' migration/invasion process in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *Oncotarget*. Juin 2016. Vol. 7, p. 47738–47749. DOI: 10.18632/oncotarget.10281
- MONCHARMONT, Coralie, LEVY, Antonin, GUY, Jean-Baptiste, FALK, Alexander T., GUILBERT, Matthieu, TRONE, Jane-Chloé, ALPHONSE, Gersende, GILORMINI, Marion, ARDAIL, Dominique, TOILLON, Robert-Alain, RODRIGUEZ-LAFRASSE, Claire and MAGNÉ, Nicolas, 2014. Radiation-enhanced cell migration/invasion process: a review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. November 2014. Vol. 92, no. 2, p. 133–142. DOI 10.1016/j.critrevonc.2014.05.006
- MONSLOW, James, GOVINDARAJU, Priya and PURÉ, Ellen, 2015. Hyaluronan – A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2015. Vol. 6, p. 231. DOI 10.3389/fimmu.2015.00231.
- MONTAY-GRUEL, Pierre, ACHARYA, Munjal M., JORGE, Patrik Gonçalves, PETIT, Benoît, PETRIDIS, Ioannis G., FUCHS, Philippe, LEAVITT, Ron, PETERSSON, Kristoffer, GONDRÉ, Maude, OLLIVIER, Jonathan, MOECKLI, Raphael, BOCHUD, François, BAILAT, Claude, BOURHIS, Jean, GERMOND, Jean-François, LIMOLI, Charles L. and VOZENIN, Marie-Catherine, 2021. Hypofractionated FLASH-RT as an Effective Treatment against Glioblastoma that Reduces Neurocognitive Side Effects in Mice. *Clinical Cancer Research*. 1 February 2021. Vol. 27, no. 3, p. 775–784. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-20-0894.
- MOU, Kejie, CHEN, Mina, MAO, Qing, WANG, Peng, NI, Renyong, XIA, Xiaoqiang and LIU, Yanhui, 2010. AQP-4 in peritumoral edematous tissue is correlated with the degree of glioma and with expression of VEGF and HIF-alpha. *Journal of Neuro-Oncology*. 1 December 2010. Vol. 100, no. 3, p. 375–383. DOI 10.1007/s11060-010-0205-x.
- MROZIK, Krzysztof Marek, BLASCHUK, Orest William, CHEONG, Chee Man, ZANNETTINO, Andrew Christopher William and VANDYKE, Kate, 2018. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer*. 1 October 2018. Vol. 18, no. 1, p. 939. DOI 10.1186/s12885-018-4845-0.
- MÜLLER, Sören, KOHANBASH, Gary, LIU, S. John, ALVARADO, Beatriz, CARRERA, Diego, BHADURI, Aparna, WATCHMAKER, Payal B., YAGNIK, Garima, DI LULLO, Elizabeth, MALATESTA, Martina, AMANKULOR, Nduka M., KRIEGSTEIN, Arnold R., LIM, Daniel A., AGHI, Manish, OKADA, Hideho and DIAZ, Aaron, 2017. Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biology*. 20 December 2017. Vol. 18, p. 234. DOI 10.1186/s13059-017-1362-4.
- MUNTHER, Sune, PETERSON, Stine Asferg, DAHLROT, Rikke Hedegaard, POULSEN, Frantz Rom, HANSEN, Steinbjørn and KRISTENSEN, Bjarne Winther, 2016. Glioma Cells in the Tumor Periphery Have a Stem Cell Phenotype. *PLoS ONE* [online]. 12 May 2016. Vol. 11, no. 5. [Accessed 19 May 2020]. DOI 10.1371/journal.pone.0155106. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4865242/>

- MURAD, Hossam, ALGHAMIAN, Yaman, ALJAPAWA, Abdulmunim and MADANIA, Ammar, 2018. Effects of ionizing radiation on the viability and proliferative behavior of the human glioblastoma T98G cell line. *BMC research notes*. 21 May 2018. Vol. 11, no. 1, p. 330. DOI 10.1186/s13104-018-3438-y
- NAGANO, Makoto, HOSHINO, Daisuke, KOSHIKAWA, Naohiko, AKIZAWA, Toshifumi and SEIKI, Motoharu, 2012. Turnover of focal adhesions and cancer cell migration. *International Journal of Cell Biology*. 2012. Vol. 2012, p. 310616. DOI 10.1155/2012/310616.
- NAIDU, Mamta D., MASON, James M., PICA, Raymond V., FUNG, Hua and PEÑA, Louis A., 2010. Radiation Resistance in Glioma Cells Determined by DNA Damage Repair Activity of Ape1/Ref-1. *Journal of Radiation Research*. 2010. Vol. 51, no. 4, p. 393–404. DOI 10.1269/jrr.09077.
- NANOSPECTRA BIOSCIENCES, INC., 2021. NCT04240639: *A Study of MRI/US Fusion Imaging and Biopsy in Combination With Nanoparticle Directed Focal Therapy for Ablation of Prostate Tissue* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 25 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04240639>
- NATFJI, Az Alddien, RAVISHANKAR, Divyashree, OSBORN, Helen M. I. and GRECO, Francesca, 2017. Parameters Affecting the Enhanced Permeability and Retention Effect: The Need for Patient Selection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. November 2017. Vol. 106, no. 11, p. 3179–3187. DOI 10.1016/j.xphs.2017.06.019
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI), 2009. NCT00045474: *Phase I Brachytherapy Dose Escalating Study Using the Proxima Therapeutics, Inc. GliaSite RTS in Patients With Recurrent Malignant Gliomas* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00045474>
- NEFTEL, Cyril, LAFFY, Julie, FILBIN, Mariella G., HARA, Toshiro, SHORE, Marni E., RAHME, Gilbert J., RICHMAN, Alyssa R., SILVERBUSH, Dana, SHAW, McKenzie L., HEBERT, Christine M., DEWITT, John, GRITSCH, Simon, PEREZ, Elizabeth M., GONZALEZ CASTRO, L. Nicolas, LAN, Xiaoyang, DRUCK, Nicholas, RODMAN, Christopher, DIONNE, Danielle, KAPLAN, Alexander, BERTALAN, Mia S., SMALL, Julia, PELTON, Kristine, BECKER, Sarah, BONAL, Dennis, NGUYEN, Quang-De, SERVIS, Rachel L., FUNG, Jeremy M., MYLVAGANAM, Ravindra, MAYR, Lisa, GOJO, Johannes, HABERLER, Christine, GEYEREGGER, Rene, CZECH, Thomas, SLAVC, Irene, NAHED, Brian V., CURRY, William T., CARTER, Bob S., WAKIMOTO, Hiroaki, BRASTIANOS, Priscilla K., BATCHELOR, Tracy T., STEMMER-RACHAMIMOV, Anat, MARTINEZ-LAGE, Maria, FROSCH, Matthew P., STAMENKOVIC, Ivan, RIGGI, Nicolo, RHEINBAY, Esther, MONJE, Michelle, ROZENBLATT-ROSEN, Orit, CAHILL, Daniel P., PATEL, Anoop P., HUNTER, Tony, VERMA, Inder M., LIGON, Keith L., LOUIS, David N., REGEV, Aviv, BERNSTEIN, Bradley E., TIROSH, Itay and SUVÀ, Mario L., 2019. An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell*. 8 August 2019. Vol. 178, no. 4, p. 835–849.e21. DOI 10.1016/j.cell.2019.06.024.
- NERSESIAN, Sarah, WILLIAMS, Rodette, NEWSTED, Daniel, SHAH, Kavan, YOUNG, Stephanie, EVANS, P. Andrew, ALLINGHAM, John S. and CRAIG, Andrew W., 2018. Effects of Modulating Actin Dynamics on HER2 Cancer Cell Motility and Metastasis. *Scientific Reports*. 22 November 2018. Vol. 8, no. 1, p. 17243. DOI 10.1038/s41598-018-35284-9.
- NEW APPROACHES TO BRAIN TUMOR THERAPY CONSORTIUM, 2013. study/NCT00003574: *A Multi-Center, Open-Label Clinical Study to Evaluate the Safety and Performance of the Proxima GliaSite RTS, a Radiation Delivery System, in Patients With Recurrent Malignant Brain Tumors Undergoing Surgical Resection* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov.
- NGUEMGO KOUAM, Pascaline, BÜHLER, Helmut, HERO, Thomas and ADAMIETZ, Irenäus A., 2019. The increased adhesion of tumor cells to endothelial cells after irradiation can be reduced by FAK-inhibition. *Radiation Oncology*. 4 February 2019. Vol. 14, no. 1, p. 25. DOI 10.1186/s13014-019-1230-3.
- NISHIKAWA, Masahiro, INOUE, Akihiro, OHNISHI, Takanori, KOHNO, Shohei, OHUE, Shiro, MATSUMOTO, Shirabe, SUEHIRO, Satoshi, YAMASHITA, Daisuke, OZAKI, Saya, WATANABE, Hideaki, YANO, Hajime, TAKAHASHI, Hisaaki, KITAZAWA, Riko, TANAKA, Junya and KUNIEDA, Takeharu, 2018. Significance of Glioma Stem-Like Cells in the Tumor Periphery That Express High Levels of CD44 in Tumor Invasion, Early Progression, and Poor Prognosis in Glioblastoma. *Stem Cells International*. 23 August 2018. Vol. 2018, p. 1–15. DOI 10.1155/2018/5387041.
- NØRØXE, Dorte Schou, POULSEN, Hans Skovgaard and LASSEN, Ulrik, 2016. Hallmarks of glioblastoma: a systematic review. *ESMO open*. 2016. Vol. 1, no. 6, p. e000144. DOI 10.1136/esmoopen-2016-000144
- NOVARTIS PHARMACEUTICALS, 2021. NCT05109728: *A Phase Ib Dose Finding Study Assessing Safety and Activity of [177Lu]Lu-DOTA-TATE in Newly Diagnosed Glioblastoma in Combination With Radiotherapy With or Without Temozolomide and in Recurrent Glioblastoma as Single Agent* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05109728>
- NUTMA, Erik, VAN GENT, Démi, AMOR, Sandra and PEFEROEN, Laura A. N., 2020. Astrocyte and Oligodendrocyte Cross-Talk in the Central Nervous System. *Cells*. March 2020. Vol. 9, no. 3, p. 600. DOI 10.3390/cells9030600.

- OHNO, Makoto, MIYAKITA, Yasuji, TAKAHASHI, Masamichi, IGAKI, Hiroshi, MATSUSHITA, Yuko, ICHIMURA, Koichi and NARITA, Yoshitaka, 2019. Survival benefits of hypofractionated radiotherapy combined with temozolomide or temozolomide plus bevacizumab in elderly patients with glioblastoma aged  $\geq 75$  years. *Radiation Oncology*. December 2019. Vol. 14, no. 1, p. 200. DOI 10.1186/s13014-019-1389-7.
- OKOLIE, Onyinyechukwu, BAGO, Juli R., SCHMID, Ralf S., IRVIN, David M., BASH, Ryan E., MILLER, C. Ryan and HINGTGEN, Shawn D., 2016. Reactive astrocytes potentiate tumor aggressiveness in a murine glioma resection and recurrence model. *Neuro-Oncology*. December 2016. Vol. 18, no. 12, p. 1622–1633. DOI 10.1093/neuonc/now117.
- OSORIO, Joseph A. and AGHI, Manish K., 2014. Optimizing glioblastoma resection: intraoperative mapping and beyond. *CNS oncology*. 2014. Vol. 3, no. 5, p. 359–366. DOI 10.2217/cns.14.36.
- OSSWALD, Matthias, JUNG, Erik, SAHM, Felix, SOLECKI, Gergely, VENKATARAMANI, Varun, BLAES, Jonas, WEIL, Sophie, HORSTMANN, Heinz, WIESTLER, Benedikt, SYED, Mustafa, HUANG, Lulu, RATLIFF, Miriam, KARIMIAN JAZI, Kianush, KURZ, Felix T., SCHMENGGER, Torsten, LEMKE, Dieter, GÖMMEL, Miriam, PAULI, Martin, LIAO, Yunxiang, HÄRING, Peter, PUSCH, Stefan, HERL, Verena, STEINHÄUSER, Christian, KRUNIC, Damir, JARAHIAN, Mostafa, MILETIC, Hrvoje, BERGHOFF, Anna S., GRIESBECK, Oliver, KALAMAKIS, Georgios, GARASCHUK, Olga, PREUSSER, Matthias, WEISS, Samuel, LIU, Haikun, HEILAND, Sabine, PLATTEN, Michael, HUBER, Peter E., KUNER, Thomas, VON DEIMLING, Andreas, WICK, Wolfgang and WINKLER, Frank, 2015. Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*. December 2015. Vol. 528, no. 7580, p. 93–98. DOI 10.1038/nature16071.
- OSSWALD, Matthias, SOLECKI, Gergely, WICK, Wolfgang and WINKLER, Frank, 2016. A malignant cellular network in gliomas: potential clinical implications. *Neuro-Oncology*. April 2016. Vol. 18, no. 4, p. 479–485. DOI 10.1093/neuonc/now014.
- OSTAD, Seyed Naser, DEHNAD, Shahrzad, NAZARI, Zeinab Esmail, FINI, Shohreh Tavajohi, MOKHTARI, Narges, SHAKIBAIE, Mojtaba and SHAHVERDI, Ahmad Reza, 2010. Cytotoxic Activities of Silver Nanoparticles and Silver Ions in Parent and Tamoxifen-Resistant T47D Human Breast Cancer Cells and Their Combination Effects with Tamoxifen against Resistant Cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2010. Vol. 2, no. 4, p. 187–196.
- OU, Lingling, LIN, Shaoqiang, SONG, Bin, JIA, Liu, LAI, Renfa and SHAO, Longquan, 2017. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: A review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *International Journal of Nanomedicine*. 1 September 2017. Vol. Volume 12, p. 6633–6646. DOI 10.2147/IJN.S140526
- PALA, Andrej, KARPEL-MASSLER, Georg, WIRTZ, Christian Rainer and HALATSCH, Marc-Eric, 2013. *Epithelial to Mesenchymal Transition and Progression of Glioblastoma* [online]. IntechOpen. [Accessed 25 October 2021]. ISBN 978-953-51-1058-3. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/43921>  
Open access peer-reviewed chapter
- PALADUGU, Manjeera, THAKUR, Archana, LUM, Lawrence G., MITTAL, Sandeep and PARAJULI, Prahlad, 2013. Generation and immunologic functions of Th17 cells in malignant gliomas. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*. January 2013. Vol. 62, no. 1, p. 75–86. DOI 10.1007/s00262-012-1312-7.
- PALLUD, Johan, AUDUREAU, Etienne, NOEL, Georges, CORNS, Robert, LECHAPT-ZALCMAN, Emmanuèle, DUNTZE, Julien, PAVLOV, Vladislav, GUYOTAT, Jacques, HIEU, Phong Dam, LE RESTE, Pierre-Jean, FAILLOT, Thierry, LITRE, Claude-Fabien, DESSE, Nicolas, PETIT, Antoine, EMERY, Evelyne, VOIRIN, Jimmy, PELTIER, Johann, CAIRE, François, VIGNES, Jean-Rodolphe, BARAT, Jean-Luc, LANGLOIS, Olivier, DEZAMIS, Edouard, PARRAGA, Eduardo, ZANELLO, Marc, NADER, Edmond, LEFRANC, Michel, BAUCHET, Luc, DEVAUX, Bertrand, MENEL, Philippe and METELLUS, Philippe, 2015. Long-term results of carmustine wafer implantation for newly diagnosed glioblastomas: a controlled propensity-matched analysis of a French multicenter cohort. *Neuro-Oncology*. December 2015. Vol. 17, no. 12, p. 1609–1619. DOI 10.1093/neuonc/nov126
- PALMER, Joshua D., BHAMIDIPATI, Deepak, SONG, Andrew, ELDREDGE-HINDY, Harriet B., SIGLIN, Joshua, DAN, Tu D., CHAMP, Colin E., ZHANG, Isabella, BAR-AD, Voichita, KIM, Lyndon, GLASS, Jon, EVANS, James J., ANDREWS, David W., WERNER-WASIK, Maria and SHI, Wenying, 2018. Bevacizumab and re-irradiation for recurrent high grade gliomas: does sequence matter? *Journal of Neuro-Oncology*. December 2018. Vol. 140, no. 3, p. 623–628. DOI 10.1007/s11060-018-2989-z.
- PALUCH, Ewa K., ASPALTER, Irene M. and SIXT, Michael, 2016. Focal Adhesion–Independent Cell Migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 6 October 2016. Vol. 32, no. 1, p. 469–490. DOI 10.1146/annurev-cellbio-111315-125341.
- PAN, Yunlong, WU, Qing, LIU, Ruiying, SHAO, Mingtao, PI, Jiang, ZHAO, Xiaoxu and QIN, Li, 2014. Inhibition effects of gold nanoparticles on proliferation and migration in hepatic carcinoma-conditioned HUVECs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 15 January 2014. Vol. 24, no. 2, p. 679–684. DOI 10.1016/j.bmcl.2013.11.045.
- PANZETTA, Valeria, LA VERDE, Giuseppe, PUGLIESE, Mariagabriella, ARTIOLA, Valeria, ARRICHIELLO, Cecilia, MUTO, Paolo, LA COMMARA, Marco, NETTI, Paolo A. and FUSCO, Sabato, 2020. Adhesion and Migration Response to Radiation Therapy of

- Mammary Epithelial and Adenocarcinoma Cells Interacting with Different Stiffness Substrates. *Cancers*. 6 May 2020. Vol. 12, no. 5, p. 1170. DOI 10.3390/cancers12051170.
- PARK CM, PARK MJ, KWAK HJ, LEE HC, KIM MS, LEE SH, PARK IC, RHEE CH, HONG SI. 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 Sep 1;66(17):8511-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4340. PMID: 16951163.
- PAQUOT, Hena, 2019. *Pouvoir radiosensibilisant de nanoparticules hybrides multifonctionnelles pour le traitement des tumeurs cérébrales de haut grade* [online]. Thèse. Université de Lorraine. [Accessed 23 January 2022]. Available from: <http://www.theses.fr/s187433>
- PAQUOT, Hena, DAOUK, Joël, CHATEAU, Alicia, RETIF, Paul, BARBERI-HEYOB, Muriel and PINEL, Sophie, 2019. Radiation-induced mitotic catastrophe enhanced by gold nanoparticles: assessment with a specific automated image processing workflow. *Radiation Research*. July 2019. Vol. 192, no. 1, p. 13–22. DOI 10.1667/RR14962.1.
- PAQUOT, Hena, 2017. In vitro radiosensitizing effects of metal-based hybrid nanoparticles. In: *14ème Colloque Nanohybrides* [online]. 29 May 2017. [Accessed 15 August 2021]. Available from: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01583875>
- PATEL, Anoop P., TIROSH, Itay, TROMBETTA, John J., SHALEK, Alex K., GILLESPIE, Shawn M., WAKIMOTO, Hiroaki, CAHILL, Daniel P., NAHED, Brian V., CURRY, William T., MARTUZA, Robert L., LOUIS, David N., ROZENBLATT-ROSEN, Orit, SUVÀ, Mario L., REGEV, Aviv and BERNSTEIN, Bradley E., 2014. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, N.Y.)*. 20 June 2014. Vol. 344, no. 6190, p. 1396–1401. DOI 10.1126/science.1254257
- PEGLION, Florent, 2012. *Mécanismes moléculaires responsables des propriétés migratoires des gliomes : rôle et dynamique des jonctions adhérentes dans la migration des astrocytes sains et tumoraux* [online]. These de doctorat. Paris 6. [Accessed 15 August 2021]. Available from: <http://www.theses.fr/2012PA066263>
- PEI, Jian, PARK, In-Ho, RYU, Hyang-Hwa, LI, Song-Yuan, LI, Chun-Hao, LIM, Sa-Hoe, WEN, Min, JANG, Woo-Youl and JUNG, Shin, 2015. Sublethal dose of irradiation enhances invasion of malignant glioma cells through p53-MMP 2 pathway in U87MG mouse brain tumor model. *Radiation Oncology*. 6 August 2015. Vol. 10, no. 1, p. 164. DOI 10.1186/s13014-015-0475-8.
- PEREIRA, Rui C., SANTAGIULIANA, Raffaella, CESERACCIU, Luca, BOSO, Daniela P., SCHREFLER, Bernhard A. and DECUZZI, Paolo, 2020. Elucidating the Role of Matrix Porosity and Rigidity in Glioblastoma Type IV Progression. *Applied Sciences*. January 2020. Vol. 10, no. 24, p. 9076. DOI 10.3390/app10249076.
- PEREGRINE PHARMACEUTICALS, 2014. NCT00677716: *Open-label, Dose Confirmation Study of Interstitial 131I-chTNT-1/B MAB (Cotara®) for the Treatment of Glioblastoma Multiforme (GBM) at First Relapse* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00677716>
- PIAO, Yujji, LIANG, Ji, HOLMES, Lindsay, HENRY, Verlene, SULMAN, Erik and DE GROOT, John F., 2013. Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 15 August 2013. Vol. 19, no. 16, p. 4392–4403. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-12-1557.
- PIERCE, Angela M. and KEATING, Amy K., 2014. Creating Anatomically Accurate and Reproducible Intracranial Xenografts of Human Brain Tumors. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 24 September 2014. No. 91, p. 52017. DOI 10.3791/52017.
- PIROTH, Marc D., GALLDIKS, Norbert, PINKAWA, Michael, HOLY, Richard, STOFFELS, Gabriele, ERMERT, Johannes, MOTTAGHY, Felix M., SHAH, N. Jon, LANGEN, Karl-Josef and EBLE, Michael J., 2016. Relapse patterns after radiochemotherapy of glioblastoma with FET PET-guided boost irradiation and simulation to optimize radiation target volume. *Radiation Oncology (London, England)*. 24 June 2016. Vol. 11, p. 87. DOI 10.1186/s13014-016-0665-z.
- PLACONE, Amanda L., QUIÑONES-HINOJOSA, Alfredo and SEARSON, Peter C., 2016. The role of astrocytes in the progression of brain cancer: complicating the picture of the tumor microenvironment. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. January 2016. Vol. 37, no. 1, p. 61–69. DOI 10.1007/s13277-015-4242-0.
- POGODA, Katarzyna, CHIN, LiKang, GEORGES, Penelope C., BYFIELD, FitzRoy J., BUCKI, Robert, KIM, Richard, WEAVER, Michael, WELLS, Rebecca G., MARCINKIEWICZ, Cezary and JANMEY, Paul A., 2014. Compression stiffening of brain and its effect on mechanosensing by glioma cells. *New journal of physics*. July 2014. Vol. 16, p. 075002. DOI 10.1088/1367-2630/16/7/075002.
- POINTER, Kelli B., CLARK, Paul A., SCHROEDER, Alexandra B., SALAMAT, M. Shahriar, ELICEIRI, Kevin W. and KUO, John S., 2017. Association of collagen architecture with glioblastoma patient survival. *Journal of Neurosurgery*. June 2017. Vol. 126, no. 6, p. 1812–1821. DOI 10.3171/2016.6.JNS152797.

- PRAGER, Briana C., BHARGAVA, Shruti, MAHADEV, Vaidehi, HUBERT, Christopher G. and RICH, Jeremy N., 2020. Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends in Cancer*. 1 March 2020. Vol. 6, no. 3, p. 223–235. DOI 10.1016/j.trecan.2020.01.009.
- PUGAZHENDHI, Arivalagan, EDISON, Thomas Nesakumar Jebakumar Immanuel, KARUPPUSAMY, Indira and KATHIRVEL, Brindhadevi, 2018. Inorganic nanoparticles: A potential cancer therapy for human welfare. *International Journal of Pharmaceutics*. 25 March 2018. Vol. 539, no. 1, p. 104–111. DOI 10.1016/j.ijpharm.2018.01.034.
- PUTAVET, Diana A. and DE KEIZER, Peter L. J., 2021. Residual Disease in Glioma Recurrence: A Dangerous Liaison with Senescence. *Cancers*. 29 March 2021. Vol. 13, no. 7, p. 1560. DOI 10.3390/cancers13071560.
- QI, Ling, YU, Hongquan, ZHANG, Yu, ZHAO, Donghai, LV, Peng, ZHONG, Yue and XU, Ye, 2016. IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. *Oncotarget*. 28 September 2016. Vol. 7, no. 44, p. 71673–71685. DOI 10.18632/oncotarget.12317.
- RASTINEHAD, Ardeshir R., ANASTOS, Harry, WAJSWOL, Ethan, WINOKER, Jared S., SFAKIANOS, John P., DOPPALAPUDI, Sai K., CARRICK, Michael R., KNAUER, Cynthia J., TAOULI, Bachir, LEWIS, Sara C., TEWARI, Ashutosh K., SCHWARTZ, Jon A., CANFIELD, Steven E., GEORGE, Arvin K., WEST, Jennifer L. and HALAS, Naomi J., 2019. REIG, Germán, PULGAR, Eduardo and CONCHA, Miguel L., 2014. Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development (Cambridge, England)*. May 2014. Vol. 141, no. 10, p. 1999–2013. DOI 10.1242/dev.101451.
- RAYAN, Amal, ABDEL-KAREEM, Samya, HASAN, Huda, ZAHRAN, Asmaa M. and GAMAL, Doaa A., 2020. Hypofractionated radiation therapy with temozolomide versus standard chemoradiation in patients with glioblastoma multiforme (GBM): A prospective, single institution experience. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy*. November 2020. Vol. 25, no. 6, p. 890–898. DOI 10.1016/j.rpor.2020.08.010.
- REDA, Moataz, BAGLEY, Alexander F., ZAIDAN, Husam Y. and YANTASEE, Wassana, 2020. Augmenting the therapeutic window of radiotherapy: A perspective on molecularly targeted therapies and nanomaterials. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. September 2020. Vol. 150, p. 225–235. DOI 10.1016/j.radonc.2020.06.041.
- REDMOND, Kristin J and MEHTA, Minesh, 2015. Stereotactic Radiosurgery for Glioblastoma. *Cureus*. Vol. 7, no. 12, p. e413. DOI 10.7759/cureus.413.
- REN, Zhongyu, LIANG, Jing, ZHANG, Peng, CHEN, Jianjiao and WEN, Jian, 2019. Inhibition of human glioblastoma cell invasion involves PION@E6 mediated autophagy process. *Cancer Management and Research*. 29 March 2019. Vol. 11, p. 2643–2652. DOI 10.2147/CMAR.S200151
- RENAUD, Justine, THÉRIEN, Hélène-Marie, PLOUFFE, Marilyn and MARTINOLI, Maria, 2015. Neuroinflammation: Dr Jekyll or Mr Hyde? *Medecine sciences : M/S*. 18 November 2015. Vol. 31, p. 979–988. DOI 10.1051/medsci/20153111012.
- RESENDE, Fernando F. B., BAI, Xianshu, DEL BEL, Elaine Aparecida, KIRCHHOFF, Frank, SCHELLER, Anja and TITZE-DE-ALMEIDA, Ricardo, 2016. Evaluation of TgH(CX3CR1-EGFP) mice implanted with mCherry-GL261 cells as an in vivo model for morphometrical analysis of glioma-microglia interaction. *BMC Cancer*. 8 February 2016. Vol. 16, no. 1, p. 72. DOI 10.1186/s12885-016-2118-3.
- RÉTIF, Paul, 2016. Modélisation, simulation et analyse numériques de l'interaction nanoparticules-rayons X : applications à la radiothérapie augmentée [en ligne]. These de doctorat. Université de Lorraine. [Consulté le 17 février 2022]. Disponible à l'adresse : <http://www.theses.fr/2016LORR0023>
- RICH, Jeremy N., 2016. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine*. 8 January 2016. Vol. 95, no. Suppl 1, p. S2–S7. DOI 10.1097/MD.0000000000004764.
- RICH, Jeremy N., 2016. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine* [online]. 8 January 2016. Vol. 95, no. Suppl 1. [Accessed 20 May 2020]. DOI 10.1097/MD.0000000000004764. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5599210/>
- RIDLEY, Anne J., 2011. Life at the Leading Edge. *Cell*. 24 June 2011. Vol. 145, no. 7, p. 1012–1022. DOI 10.1016/j.cell.2011.06.010.
- RIEKEN, Stefan, HABERMEHL, Daniel, WUERTEH, Lena, BRONS, Stephan, MOHR, Angela, LINDEL, Katja, WEBER, Klaus, HABERER, Thomas, DEBUS, Jürgen and COMBS, Stephanie E., 2012. Carbon Ion Irradiation Inhibits Glioma Cell Migration Through Downregulation of Integrin Expression. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 1 May 2012. Vol. 83, no. 1, p. 394–399. DOI 10.1016/j.ijrobp.2011.06.2004.



- RIVERA, Maricruz, SUKHDEO, Kumar and YU, Jennifer, 2013. Ionizing Radiation in Glioblastoma Initiating Cells. *Frontiers in Oncology*. 8 April 2013. Vol. 3, p. 74. DOI 10.3389/fonc.2013.00074.
- ROMA-RODRIGUES, Catarina, RAPOSO, Luís R., CABRAL, Rita, PARADINHA, Fabiana, BAPTISTA, Pedro V. and FERNANDES, Alexandra R., 2017. Tumor Microenvironment Modulation via Gold Nanoparticles Targeting Malicious Exosomes: Implications for Cancer Diagnostics and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 14 January 2017. Vol. 18, no. 1, p. 162. DOI 10.3390/ijms18010162
- ROSA, Soraia, CONNOLLY, Chris, SCHETTINO, Giuseppe, BUTTERWORTH, Karl T. and PRISE, Kevin M., 2017. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnology*. 2 February 2017. Vol. 8, no. 1, p. 2. DOI 10.1186/s12645-017-0026-0.
- ROSENBLUM, Daniel, JOSHI, Nitin, TAO, Wei, KARP, Jeffrey M. and PEER, Dan, 2018. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. *Nature Communications*. 12 April 2018. Vol. 9, no. 1, p. 1410. DOI 10.1038/s41467-018-03705-Y.
- ROSIŃSKA, Sara and GAVARD, Julie, 2021. Tumor Vessels Fuel the Fire in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 17 June 2021. Vol. 22, no. 12, p. 6514. DOI 10.3390/ijms22126514.
- ROUSSOS, Evanthia T., CONDEELIS, John S. and PATSIALOU, Antonia, 2011. Chemotaxis in cancer. *Nature Reviews Cancer*. August 2011. Vol. 11, no. 8, p. 573–587. DOI 10.1038/nrc3078.
- RUBENSTEIN, Brenda M. and KAUFMAN, Laura J., 2008. The Role of Extracellular Matrix in Glioma Invasion: A Cellular Potts Model Approach. *Biophysical Journal*. 15 December 2008. Vol. 95, no. 12, p. 5661–5680. DOI 10.1529/biophysj.108.140624.
- SACKO, Adama, HOU, Miao-Miao, TEMGOUA, Michael, ALKHAFI, Ali, MARANTIDOU, Athina, BELIN, Catherine, MANDONNET, Emmanuel, URSU, Renata, DORIDAM, Jennifer, COMAN, Irène, LEVY-PIEDBOIS, Christine and CARPENTIER, Antoine F., 2015. Evolution of the Karnosky Performance Status throughout life in glioblastoma patients. *Journal of Neuro-Oncology*. May 2015. Vol. 122, no. 3, p. 567–573. DOI 10.1007/s11060-015-1749-6.
- SALAMA, Gayle R., HEIER, Linda A., PATEL, Praneil, RAMAKRISHNA, Rohan, MAGGE, Rajiv and TSIOURIS, Apostolos John, 2018. Diffusion Weighted/Tensor Imaging, Functional MRI and Perfusion Weighted Imaging in Glioblastoma—Foundations and Future. *Frontiers in Neurology*. 22 January 2018. Vol. 8, p. 660. DOI 10.3389/fneur.2017.00660.
- SAMBALE, Franziska, LAVRENTIEVA, Antonina, STAHL, Frank, BLUME, Cornelia, STIESCH, Meike, KASPER, Cornelia, BAHNEMANN, Detlef and SCHEPER, Thomas, 2015. Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *Journal of Biotechnology*. 10 July 2015. Vol. 205, p. 120–129. DOI 10.1016/j.jbiotec.2015.01.001.
- SANCTIS, Vitaliana, BOLZAN, Chiara, D'ARIENZO, Marco, BRACCI, Stefano, FANELLI, Alessandro, COX, M christina, VALERIANI, Maurizio, OSTI, Mattia, MINNITI, Giuseppe, CHIACCHIERARELLI, Laura and ENRICI, Riccardo, 2012. Intensity Modulated Radiotherapy in Early Stage Hodgkin Lymphoma Patients: Is It Better than Three Dimensional Conformal Radiotherapy? *Radiation oncology (London, England)*. 2 August 2012. Vol. 7, p. 129. DOI 10.1186/1748-717X-7-129.
- SARKAR, Susobhan, ZEMP, Franz J., SENGGER, Donna, ROBBINS, Stephen M. and YONG, V. Wee, 2015. ADAM-9 is a novel mediator of tenascin-C-stimulated invasiveness of brain tumor-initiating cells. *Neuro-Oncology*. August 2015. Vol. 17, no. 8, p. 1095–1105. DOI 10.1093/neuonc/nou362
- SARKARIA, Jann N., HU, Leland S., PARNEY, Ian F., PAFUNDI, Deanna H., BRINKMANN, Debra H., LAACK, Nadia N., GIANNINI, Caterina, BURNS, Terence C., KIZILBASH, Sani H., LARAMY, Janice K., SWANSON, Kristin R., KAUFMANN, Timothy J., BROWN, Paul D., AGAR, Nathalie Y. R., GALANIS, Evanthia, BUCKNER, Jan C. and ELMQUIST, William F., 2018. Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology*. 22 January 2018. Vol. 20, no. 2, p. 184–191. DOI 10.1093/neuonc/nox175.
- SASMITA, Andrew, WONG, Ying Pei and LING, Anna, 2018. Biomarkers and therapeutic advances in glioblastoma multiforme. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 1 February 2018. Vol. 14, p. 40–51. DOI 10.1111/ajco.12756.
- SAXENA, Deeksha, SHEIKH, Saad, KAO, Gary, BINDER, Zev A, ALONSO-BASANTA, Michelle, O'ROURKE, Donald M, NASRALLAH, MacLean P and DORSEY, Jay F., 2019. Rapid and ultrasensitive digital PCR (dPCR) profiling of EGFRvIII in tumor cells and tissues. *Neuro-oncology Advances*. 28 November 2019. Vol. 1, no. 1, p. vdz030. DOI 10.1093/noajnl/vdz030.
- SCHAKS, Matthias, GIANNONE, Grégory and ROTTNER, Klemens, 2019. Actin dynamics in cell migration. *Essays in Biochemistry*. October 2019. Vol. 63, no. 5, p. 483–495. DOI 10.1042/EBC20190015.
- SCARINGI, Claudia, AGOLLI, Linda and MINNITI, Giuseppe, 2018. Technical Advances in Radiation Therapy for Brain Tumors. *Anticancer Research*. 1 November 2018. Vol. 38, no. 11, p. 6041–6045. DOI 10.21873/anticancer.12954.



- SCHWABENLAND, Marius, BRÜCK, Wolfgang, PRILLER, Josef, STADELMANN, Christine, LASSMANN, Hans et PRINZ, Marco, 2021. Analyzing microglial phenotypes across neuropathologies: a practical guide. *Acta Neuropathologica*. 1 décembre 2021. Vol. 142, n° 6, pp. 923-936. DOI 10.1007/s00401-021-02370-8.
- SEETHARAMAN, Shailaja and ETIENNE-MANNEVILLE, Sandrine, 2020. Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends in Cell Biology*. 1 September 2020. Vol. 30, no. 9, p. 720–735. DOI 10.1016/j.tcb.2020.06.004.
- SEIFERT, Stefanie and SONTHEIMER, Harald, 2014. Bradykinin enhances invasion of malignant glioma into the brain parenchyma by inducing cells to undergo amoeboid migration. *The Journal of Physiology*. 15 November 2014. Vol. 592, no. Pt 22, p. 5109–5127. DOI 10.1113/jphysiol.2014.274498.
- SHAHHOSEINI, Elham, FELTIS, Bryce N., NAKAYAMA, Masao, PIVA, Terrence J., POUNIOTIS, Dodie, ALGHAMDI, Salem S. and GESO, Moshi, 2019. Combined Effects of Gold Nanoparticles and Ionizing Radiation on Human Prostate and Lung Cancer Cell Migration. *International Journal of Molecular Sciences*. 11 September 2019. Vol. 20, no. 18, p. E4488. DOI 10.3390/ijms20184488.
- SHARMA, Ankush, GOYAL, Amit K. and RATH, Goutam, 2018. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. *Journal of Drug Targeting*. September 2018. Vol. 26, no. 8, p. 617–632. DOI 10.1080/1061186X.2017.1400553.
- SHEN, Han, HAU, Eric, JOSHI, Swapna, DILDA, Pierre J. and MCDONALD, Kerrie L., 2015. Sensitization of Glioblastoma Cells to Irradiation by Modulating the Glucose Metabolism. *Molecular Cancer Therapeutics*. 1 August 2015. Vol. 14, no. 8, p. 1794–1804. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-15-0247.
- SHENG, Zhi, 2021. Connexin 43 peptidic medicine for glioblastoma stem cells. *EBioMedicine* [online]. 1 February 2021. Vol. 64. [Accessed 6 January 2022]. DOI 10.1016/j.ebiom.2020.103205. Available from: [https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964\(20\)30581-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/ebiom/article/PIIS2352-3964(20)30581-8/fulltext)
- SHI, Jinjun, KANTOFF, Philip W., WOOSTER, Richard and FAROKHZAD, Omid C., 2017. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature reviews. Cancer*. January 2017. Vol. 17, no. 1, p. 20–37. DOI 10.1038/nrc.2016.108.
- SHI, Miao, KWON, Hyun Soo, PENG, Zhenmeng, ELDER, Alison and YANG, Hong, 2012. Effects of Surface Chemistry on the Generation of Reactive Oxygen Species by Copper Nanoparticles. *ACS Nano*. 27 March 2012. Vol. 6, no. 3, p. 2157–2164. DOI 10.1021/nn300445d.
- SHIBAMOTO, Yuta, NISHIMURA, Yasumasa, TSUTSUI, Kazushige, SASAI, Keisuke, TAKAHASHI, Masaji and ABE, Mitsuyuki, 1997. Comparison of Accelerated Hyperfractionated Radiotherapy and Conventional Radiotherapy for Supratentorial Malignant Glioma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 1 February 1997. Vol. 27, no. 1, p. 31–36. DOI 10.1093/jjco/27.1.31.
- SIEBZEHRUBEL, Florian A, SILVER, Daniel J, TUGERTIMUR, Bugra, DELEYROLLE, Loic P, SIEBZEHRUBEL, Dorit, SARKISIAN, Matthew R, DEVERS, Kelly G, YACHNIS, Antony T, KUPPER, Marius D, NEAL, Daniel, NABILSI, Nancy H, KLADDE, Michael P, SUSLOV, Oleg, BRABLETZ, Simone, BRABLETZ, Thomas, REYNOLDS, Brent A and STEINDLER, Dennis A, 2013. The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance. *EMBO Molecular Medicine*. August 2013. Vol. 5, no. 8, p. 1196–1212. DOI 10.1002/emmm.201302827.
- SHIN, Seung-Shick, NOH, Dae-Hwa, HWANG, Byungdoo, LEE, Jo-Won, PARK, Sung Lyee, PARK, Sung-Soo, MOON, Bokyoung, KIM, Wun-Jae and MOON, Sung-Kwon, 2018. Inhibitory effect of Au@Pt-NSs on proliferation, migration, and invasion of EJ bladder carcinoma cells: involvement of cell cycle regulators, signaling pathways, and transcription factor-mediated MMP-9 expression. *International Journal of Nanomedicine*. June 2018. Vol. Volume 13, p. 3295–3310. DOI 10.2147/IJN.S158463.
- SHRESTHA, Samana, COOPER, Leon N, ANDREEV, Oleg A., RESHETNYAK, Yana K. and ANTOSH, Michael P., 2016. Gold Nanoparticles for Radiation Enhancement in Vivo. *Jacobs journal of radiation oncology*. April 2016. Vol. 3, no. 1, p. 026.
- SIA, Joseph, SZMYD, Radoslaw, HAU, Eric and GEE, Harriet E., 2020. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 13 February 2020. Vol. 8, p. 41. DOI 10.3389/fcell.2020.00041.
- SILVER DJ, Siebzehrubel FA, SCHILDTS MJ, YACHNIS AT, SMITH GM, SMITH AA, SCHEFFLER B, REYNOLDS BA, SILVER J, STEINDLER DA. Chondroitin sulfate proteoglycans potently inhibit invasion and serve as a central organizer of the brain tumor microenvironment. *J Neurosci*. 2013 Sep 25;33(39):15603-17. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3004-12.2013. PMID: 24068827; PMCID: PMC3782629.
- SIMPSON, J. R., HORTON, J., SCOTT, C., CURRAN, W. J., RUBIN, P., FISCHBACH, J., ISAACSON, S., ROTMAN, M., ASBELL, S. O. and NELSON, J. S., 1993. Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 20 May 1993. Vol. 26, no. 2, p. 239–244. DOI 10.1016/0360-3016(93)90203-8.

- SINGH, Neha, MINER, Alexandra, HENNIS, Lauren and MITTAL, Sandeep, 2020. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resistance* [online]. 2020. [Accessed 1 July 2021]. DOI 10.20517/cdr.2020.79. Available from: <https://cdrjournal.com/article/view/3779>
- SMOLDERS, Joost, HEUTINCK, Kirstin M., FRANSEN, Nina L., REMMERSWAAL, Ester B. M., HOMBRINK, Pleun, TEN BERGE, Ineke J. M., VAN LIER, René A. W., HUITINGA, Inge and HAMANN, Jörg, 2018. Tissue-resident memory T cells populate the human brain. *Nature Communications*. 2 November 2018. Vol. 9, p. 4593. DOI 10.1038/s41467-018-07053-9.
- SOARES, Sara, SOUSA, João, PAIS, Alberto and VITORINO, Carla, 2018. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Frontiers in Chemistry*. 20 August 2018. Vol. 6, p. 360. DOI 10.3389/fchem.2018.00360
- SOHRABI KASHANI, Ahmad and PACKIRISAMY, Muthukumaran, 2021. Cancer-Nano-Interaction: From Cellular Uptake to Mechanobiological Responses. *International Journal of Molecular Sciences*. 3 September 2021. Vol. 22, no. 17, p. 9587. DOI 10.3390/ijms22179587.
- SONG, Chaojun, FAN, Bo and XIAO, Zhengzheng, 2018. Overexpression of ALK4 inhibits cell proliferation and migration through the inactivation of JAK/STAT3 signaling pathway in glioma. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*. February 2018. Vol. 98, p. 440–445. DOI 10.1016/j.biopha.2017.12.039
- SONG, Yan, JIN, Junjiang, LI, Juan, HE, Rui, ZHANG, Mingyi, CHANG, Yanan, CHEN, Kui, WANG, Ying, SUN, Baoyun and XING, Gengmei, 2014. Gd@C82(OH)22 nanoparticles constrain macrophages migration into tumor tissue to prevent metastasis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. June 2014. Vol. 14, no. 6, p. 4022–4028. DOI 10.1166/jnn.2014.8277
- STEINLE, Marc, PALME, Daniela, MISOVIC, Milan, RUDNER, Justine, DITTMANN, Klaus, LUKOWSKI, Robert, RUTH, Peter and HUBER, Stephan M., 2011. Ionizing radiation induces migration of glioblastoma cells by activating BK K(+) channels. *Radiotherapy and Oncology: Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. October 2011. Vol. 101, no. 1, p. 122–126. DOI 10.1016/j.radonc.2011.05.069.
- STÉPHANOU, Angélique and BALLESTA, Annabelle, 2019. pH as a potential therapeutic target to improve temozolomide antitumor efficacy : A mechanistic modeling study. *Pharmacology Research & Perspectives*. January 2019. Vol. 7, no. 1, p. e00454. DOI 10.1002/prp2.454.
- STERN, Stephan T., ADISESHAIAH, Pavan P. et CRIST, Rachael M., 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*. 14 juin 2012. Vol. 9, n° 1, pp. 20. DOI 10.1186/1743-8977-9-20.
- STROBEL, Hannah, BAISCH, Tim, FITZEL, Rahel, SCHILBERG, Katharina, SIEGELIN, Markus D., KARPEL-MASSLER, Georg, DEBATIN, Klaus-Michael and WESTHOFF, Mike-Andrew, 2019. Temozolomide and Other Alkylating Agents in Glioblastoma Therapy. *Biomedicines*. 9 September 2019. Vol. 7, no. 3, p. 69. DOI 10.3390/biomedicines7030069.
- STROBER, Warren, 2015. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*. 2 November 2015. Vol. 111, p. A3.B.1-A3.B.3. DOI 10.1002/0471142735.ima03bs111.
- STUPP, Roger, HEGI, Monika E., MASON, Warren P., VAN DEN BENT, Martin J., TAPHOORN, Martin J. B., JANZER, Robert C., LUDWIN, Samuel K., ALLGEIER, Anouk, FISHER, Barbara, BELANGER, Karl, HAU, Peter, BRANDES, Alba A., GIJTENBEEK, Johanna, MAROSI, Christine, VECHT, Charles J., MOKHTARI, Karima, WESSELING, Pieter, VILLA, Salvador, EISENHAUER, Elizabeth, GORLIA, Thierry, WELLER, Michael, LACOMBE, Denis, CAIRNCROSS, J. Gregory, MIRIMANOFF, René-Olivier, EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER BRAIN TUMOUR AND RADIATION ONCOLOGY GROUPS, and NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP, 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology*. May 2009. Vol. 10, no. 5, p. 459–466. DOI 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- STUPP, Roger, MASON, Warren P., VAN DEN BENT, Martin J., WELLER, Michael, FISHER, Barbara, TAPHOORN, Martin J. B., BELANGER, Karl, BRANDES, Alba A., MAROSI, Christine, BOGDHORN, Ulrich, CURSCHMANN, Jürgen, JANZER, Robert C., LUDWIN, Samuel K., GORLIA, Thierry, ALLGEIER, Anouk, LACOMBE, Denis, CAIRNCROSS, J. Gregory, EISENHAUER, Elizabeth, MIRIMANOFF, René O., EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER BRAIN TUMOR AND RADIOTHERAPY GROUPS, and NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*. 10 March 2005. Vol. 352, no. 10, p. 987–996. DOI 10.1056/NEJMoa043330.
- SUÁREZ-SOLÁ, M. Luisa, GONZÁLEZ-DELGADO, Francisco J., PUEYO-MORLANS, Mercedes, MEDINA-BOLÍVAR, O. Carolina, HERNÁNDEZ-ACOSTA, N. Carolina, GONZÁLEZ-GÓMEZ, Miriam and MEYER, Gundela, 2009. Neurons in the white matter of the adult human neocortex. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2009. Vol. 3, p. 7. DOI 10.3389/neuro.05.007.2009.

- SUN, Bao-Liang, WANG, Li-hua, YANG, Tuo, SUN, Jing-yi, MAO, Lei-lei, YANG, Ming-feng, YUAN, Hui, COLVIN, Robert A. and YANG, Xiao-yi, 2018. Lymphatic drainage system of the brain: A novel target for intervention of neurological diseases. *Progress in Neurobiology*. 1 April 2018. Vol. 163–164, p. 118–143. DOI 10.1016/j.pneurobio.2017.08.007.
- SVITKINA, Tatyana, 2018. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2 January 2018. Vol. 10, no. 1, p. a018267. DOI 10.1101/cshperspect.a018267.
- TAN, Gamze and ONUR, Mehmet Ali, 2018. Cellular localization and biological effects of 20nm-gold nanoparticles: Biological Effects of 20nm-Gold Nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. June 2018. Vol. 106, no. 6, p. 1708–1721. DOI 10.1002/jbm.a.36373.
- TATTER, Stephen B., SHAW, Edward G., ROSENBLUM, Mark L., KARVELIS, Kastytis C., KLEINBERG, Lawrence, WEINGART, Jon, OLSON, Jeffrey J., CROCKER, Ian R., BREM, Steven, PEARLMAN, James L., FISHER, Joy D., CARSON, Kathryn, GROSSMAN, Stuart A., and NEW APPROACHES TO BRAIN TUMOR THERAPY CENTRAL NERVOUS SYSTEM CONSORTIUM, 2003. An inflatable balloon catheter and liquid 125I radiation source (GliaSite Radiation Therapy System) for treatment of recurrent malignant glioma: multicenter safety and feasibility trial. *Journal of Neurosurgery*. August 2003. Vol. 99, no. 2, p. 297–303. DOI 10.3171/jns.2003.99.2.0297.
- TAVIANATOU, Anastasia G., CAON, Ilaria, FRANCHI, Marco, PIPERIGKOU, Zoi, GALESSO, Devis and KARAMANOS, Nikos K., 2019. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *The FEBS Journal*. 2019. Vol. 286, no. 15, p. 2883–2908. DOI 10.1111/febs.14777.
- TELIX INTERNATIONAL PTY LTD, 2021. NCT03849105: A Multi-centre, Open-label, Single-arm, Dose-finding Phase I/II Study to Evaluate Safety, Tolerability, Dosing Schedule, and Preliminary Efficacy of Carrier-added 4-L-[131I]Iodo-phenylalanine (131I-IPA), Administered as Single or Repetitive Injections in Patients With Recurrent Glioblastoma Multiforme (GBM), Concomitantly to 2nd Line External Radiation Therapy (XRT) - IPAX- 1 [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03849105>
- THOMAS, Jean-Léon, JACOB, Laurent and BOISSERAND, Ligia, 2019. Système lymphatique et cerveau. *médecine/sciences*. 1 January 2019. Vol. 35, no. 1, p. 55–61. DOI 10.1051/medsci/2018309.
- THEVENOT, Paul, CHO, Jai, WAVHAL, Dattatray, TIMMONS, Richard B. and TANG, Liping, 2008. SURFACE CHEMISTRY INFLUENCE CANCER KILLING EFFECT OF TiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. September 2008. Vol. 4, no. 3, p. 226–236. DOI 10.1016/j.nano.2008.04.001
- TRAN, Thao Anh, KRISHNAMOORTHY, Karthikeyan, CHO, Somi Kim and KIM, Sang Jae, 2016. Inhibitory Effect of Zinc Sulfide Nanoparticles Towards Breast Cancer Stem Cell Migration and Invasion. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. February 2016. Vol. 12, no. 2, p. 329–336. DOI 10.1166/jbn.2016.2187.
- TREMI, Ioanna, SPYRATOU, Ellas, SOULI, Maria, EFSTATHOPOULOS, Efstathios P., MAKROPOULOU, Mersini, GEORGAKILAS, Alexandros G. and SIHVER, Lembit, 2021. Requirements for Designing an Effective Metallic Nanoparticle (NP)-Boosted Radiation Therapy (RT). *Cancers*. January 2021. Vol. 13, no. 13, p. 3185. DOI 10.3390/cancers13133185
- TREPAT, Xavier, WASSERMAN, Michael R., ANGELINI, Thomas E., MILLET, Emil, WEITZ, David A., BUTLER, James P. and FREDBERG, Jeffrey J., 2009. Physical forces during collective cell migration. *Nature Physics*. June 2009. Vol. 5, no. 6, p. 426–430. DOI 10.1038/nphys1269.
- TRONE, Jane-Chloe, VALLARD, Alexis, SOTTON, Sandrine, BEN MRAD, Majed, JMOUR, Omar, MAGNÉ, Nicolas, POMMIER, Benjamin, LAPORTE, Silvy and OLLIER, Edouard, 2020. Survival after hypofractionation in glioblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Radiation Oncology*. December 2020. Vol. 15, no. 1, p. 145. DOI 10.1186/s13014-020-01584-6
- TSAI, Feng-Chiao, KUO, Guan-Hung, CHANG, Shu-Wei and TSAI, Pei-Ju, 2015. Ca<sup>2+</sup> Signaling in Cytoskeletal Reorganization, Cell Migration, and Cancer Metastasis. *BioMed Research International*. 22 April 2015. Vol. 2015, p. e409245. DOI 10.1155/2015/409245.
- TUCKER, Richard P. and CHIQUET-EHRISMANN, Ruth, 2015. Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1 August 2015. Vol. 65, p. 165–168. DOI 10.1016/j.biocel.2015.06.003
- ULRICH, Theresa A., DE JUAN PARDO, Elena M. and KUMAR, Sanjay, 2009. The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells. *Cancer research*. 15 May 2009. Vol. 69, no. 10, p. 4167–4174. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-08-4859.
- URBAŃSKA, Kaja, SOKOŁOWSKA, Justyna, SZMIDT, Maciej and SYSA, Paweł, 2014. Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary Oncology (Poznan, Poland)*. 2014. Vol. 18, no. 5, p. 307–312. DOI 10.5114/wo.2014.40559.

- UNIVERSITY HOSPITAL, GRENOBLE, 2021. NCT03818386: *Radiotherapy of Multiple Brain Metastases Using AGuIX® Gadolinium-chelated Polysiloxane Based Nanoparticles: a Prospective Randomized Phase II Clinical Trial*. [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 25 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03818386>
- VALDES, Pablo A., BEKELIS, Kimon, HARRIS, Brent T., WILSON, Brian C., LEBLOND, Frederic, KIM, Anthony, SIMMONS, Nathan E., ERKMEN, Kadir, PAULSEN, Keith D. and ROBERTS, David W., 2014. 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Fluorescence in Meningioma: Qualitative and Quantitative Measurements In Vivo. *Neurosurgery*. March 2014. Vol. 10, no. 0 1, p. 74–83. DOI 10.1227/NEU.0000000000000117.
- VAN MEERLOO, Johan, KASPERS, Gertjan J. L. and CLOOS, Jacqueline, 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2011. Vol. 731, p. 237–245. DOI 10.1007/978-1-61779-080-5\_20.
- VANDERWAEREN, Laura, DOK, Rüveyda, VERSTREPEN, Kevin and NUYTS, Sandra, 2021. Clinical Progress in Proton Radiotherapy: Biological Unknowns. *Cancers*. January 2021. Vol. 13, no. 4, p. 604. DOI 10.3390/cancers13040604.
- VARIAN, A SIEMENS HEALTHINEERS COMPANY, 2021. NCT04592887: *Feasibility Study of FLASH Radiotherapy for the Treatment of Symptomatic Bone Metastases* [online]. Clinical trial registration. clinicaltrials.gov. [Accessed 11 January 2022]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04592887>
- VERHAAK, Roel G. W., HOADLEY, Katherine A., PURDOM, Elizabeth, WANG, Victoria, QI, Yuan, WILKERSON, Matthew D., MILLER, C. Ryan, DING, Li, GOLUB, Todd, MESIROV, Jill P., ALEXE, Gabriele, LAWRENCE, Michael, O'KELLY, Michael, TAMAYO, Pablo, WEIR, Barbara A., GABRIEL, Stacey, WINCKLER, Wendy, GUPTA, Supriya, JAKKULA, Lakshmi, FEILER, Heidi S., HODGSON, J. Graeme, JAMES, C. David, SARKARIA, Jann N., BRENNAN, Cameron, KAHN, Ari, SPELLMAN, Paul T., WILSON, Richard K., SPEED, Terence P., GRAY, Joe W., MEYERSON, Matthew, GETZ, Gad, PEROU, Charles M., HAYES, D. Neil, and CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2010. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 19 January 2010. Vol. 17, no. 1, p. 98–110. DOI 10.1016/j.ccr.2009.12.020.
- VERRY, Camille, DUFORT, Sandrine, VILLA, Julie, GAVARD, Marylaure, IRIART, Carole, GRAND, Sylvie, CHARLES, Julie, CHOVELON, Benoit, CRACOWSKI, Jean-Luc, QUESADA, Jean-Louis, MENDOZA, Christophe, SANCEY, Lucie, LEHMANN, Audrey, JOVER, Florence, GIRAUD, Jean-Yves, LUX, François, CRÉMILLIEUX, Yannick, MCMAHON, Stephen, PAUWELS, Petrus J., CAGNEY, Daniel, BERBECO, Ross, AIZER, Ayal, DEUTSCH, Eric, LOEFFLER, Markus, DUC, Géraldine Le, TILLEMENT, Olivier and BALOSSO, Jacques, 2021. Theranostic AGuIX nanoparticles as radiosensitizer: A phase I, dose-escalation study in patients with multiple brain metastases (NANO-RAD trial). *Radiotherapy and Oncology*. 1 July 2021. Vol. 160, p. 159–165. DOI 10.1016/j.radonc.2021.04.021
- VERSCHUERE, Tina, VAN WOENSEL, Matthias, FIEUWS, Steffen, LEFRANC, Florence, MATHIEU, Veronique, KISS, Robert, VAN GOOL, Stefaan W. and DE VLEESCHOUWER, Steven, 2013. Altered galectin-1 serum levels in patients diagnosed with high-grade glioma. *Journal of Neuro-Oncology*. October 2013. Vol. 115, no. 1, p. 9–17. DOI 10.1007/s11060-013-1201-8.
- VIEIRA, Larissa Fernanda de Araújo, LINS, Marvin Paulo, VIANA, Iana Mayane Mendes Nicácio, DOS SANTOS, Jeniffer Estevão, SMANIOTTO, Salete and REIS, Maria Danielma dos Santos, 2017. Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. *Nanoscale Research Letters*. 17 March 2017. Vol. 12, p. 200. DOI 10.1186/s11671-017-1982-3.
- VILCHEZ MERCEDES, Samuel A., BOCCI, Federico, LEVINE, Herbert, ONUCHIC, José N., JOLLY, Mohit Kumar and WONG, Pak Kin, 2021. Decoding leader cells in collective cancer invasion. *Nature Reviews. Cancer*. September 2021. Vol. 21, no. 9, p. 592–604. DOI 10.1038/s41568-021-00376-8.
- VINCI, Maria, BOX, Carol and ECCLES, Suzanne A., 2015. Three-Dimensional (3D) Tumor Spheroid Invasion Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 1 May 2015. No. 99, p. 52686. DOI 10.3791/52686.
- VITOVCOVA, Barbora, SKARKOVA, Veronika, RUDOLF, Kamil and RUDOLF, Emil, 2020. Biology of Glioblastoma Multiforme-Exploration of Mitotic Catastrophe as a Potential Treatment Modality. *International Journal of Molecular Sciences*. 27 July 2020. Vol. 21, no. 15, p. E5324. DOI 10.3390/ijms21155324.
- VOLLMANN-ZWERENZ, Arabel, LEIDGENS, Verena, FELICIELLO, Giancarlo, KLEIN, Christoph A. and HAU, Peter, 2020. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 12 March 2020. Vol. 21, no. 6, p. 1932. DOI 10.3390/ijms21061932.
- WANG, Jiao, LEE, Jung Seok, KIM, Dongin and ZHU, Lin, 2017. Exploration of Zinc Oxide Nanoparticles as a Multitarget and Multifunctional Anticancer Nanomedicine. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 22 November 2017. Vol. 9, no. 46, p. 39971–39984. DOI 10.1021/acsami.7b11219.

- WANG, Zeyu, ZHANG, Hao, XU, Shengchao, LIU, Zhixiong and CHENG, Quan, 2021. The adaptive transition of glioblastoma stem cells and its implications on treatments. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 23 March 2021. Vol. 6, no. 1, p. 1–13. DOI 10.1038/s41392-021-00491-w.
- WANG, Feng, WANG, Yu-Cai, DOU, Shuang, XIONG, Meng-Hua, SUN, Tian-Meng and WANG, Jun, 2011. Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. *ACS nano*. 24 May 2011. Vol. 5, no. 5, p. 3679–3692. DOI 10.1021/nn200007z.
- WANG, Yifan, SHI, Jian, CHAI, Kequn, YING, Xuhua and ZHOU, Binhua P., 2013. The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets*. November 2013. Vol. 13, no. 9, p. 963–972. DOI 10.2174/15680096113136660102.
- WANG, Hong-Xia, ZUO, Zu-Qi, DU, Jin-Zhi, WANG, Yu-Cai, SUN, Rong, CAO, Zhi-Ting, YE, Xiao-Dong, WANG, Ji-Long, LEONG, Kam W. and WANG, Jun, 2016. Surface charge critically affects tumor penetration and therapeutic efficacy of cancer nanomedicines. *Nano Today*. 1 April 2016. Vol. 11, no. 2, p. 133–144. DOI 10.1016/j.nantod.2016.04.008.
- WANG, Jin-song, WANG, Hai-juan and QIAN, Hai-li, 2018. Biological effects of radiation on cancer cells. *Military Medical Research*. 30 June 2018. Vol. 5, p. 20. DOI 10.1186/s40779-018-0167-4.
- WANK, M., SCHILLING, D., REINDL, J., MEYER, B., GEMPT, J., MOTOV, S., ALEXANDER, F., WILKENS, J. J., SCHLEGEL, J., SCHMID, T. E. and COMBS, S. E., 2018. Evaluation of radiation-related invasion in primary patient-derived glioma cells and validation with established cell lines: impact of different radiation qualities with differing LET. *Journal of Neuro-Oncology*. 1 September 2018. Vol. 139, no. 3, p. 583–590. DOI 10.1007/s11060-018-2923-4.
- WANK, Michaela, SCHILLING, Daniela, SCHMID, Thomas E., MEYER, Bernhard, GEMPT, Jens, BARZ, Melanie, SCHLEGEL, Jürgen, LIESCHE, Friederike, KESSEL, Kerstin A., WIESTLER, Benedikt, BETTE, Stefanie, ZIMMER, Claus and COMBS, Stephanie E., 2018. Human Glioma Migration and Infiltration Properties as a Target for Personalized Radiation Medicine. *Cancers*. 20 November 2018. Vol. 10, no. 11, p. 456. DOI 10.3390/cancers10110456.
- WATKINS, Stacey and SONTHEIMER, Harald, 2011. Hydrodynamic Cellular Volume Changes Enable Glioma Cell Invasion. *The Journal of Neuroscience*. 23 November 2011. Vol. 31, no. 47, p. 17250–17259. DOI 10.1523/JNEUROSCI.3938-11.2011.
- WEBER, Miriam, WOJTYNEK, Matthias and MEDALIA, Ohad, 2019. Cellular and Structural Studies of Eukaryotic Cells by Cryo-Electron Tomography. *Cells*. 16 January 2019. Vol. 8, p. 57. DOI 10.3390/cells8010057.
- WEIL, Sophie, OSSWALD, Matthias, SOLECKI, Gergely, GROSCH, Julia, JUNG, Erik, LEMKE, Dieter, RATLIFF, Miriam, HÄNGGI, Daniel, WICK, Wolfgang and WINKLER, Frank, 2017. Tumor microtubules convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas. *Neuro-Oncology*. October 2017. Vol. 19, no. 10, p. 1316–1326. DOI 10.1093/neuonc/nox070.
- WELLER, Michael, CLOUGHESY, Timothy, PERRY, James R. and WICK, Wolfgang, 2013. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet? *Neuro-Oncology*. 1 January 2013. Vol. 15, no. 1, p. 4–27. DOI 10.1093/neuonc/nos273.
- WEN, Patrick Y, WELLER, Michael, LEE, Eudocia Quant, ALEXANDER, Brian M, BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S, BARTHEL, Floris P, BATCHELOR, Tracy T, BINDRA, Ranjit S, CHANG, Susan M, CHIOCCA, E Antonio, CLOUGHESY, Timothy F, DEGROOT, John F, GALANIS, Evanthia, GILBERT, Mark R, HEGI, Monika E, HORBINSKI, Craig, HUANG, Raymond Y, LASSMAN, Andrew B, LE RHUN, Emilie, LIM, Michael, MEHTA, Minesh P, MELLINGHOFF, Ingo K, MINNITI, Giuseppe, NATHANSON, David, PLATTEN, Michael, PREUSSER, Matthias, ROTH, Patrick, SANSON, Marc, SCHIFF, David, SHORT, Susan C, TAPHOORN, Martin J B, TONN, Joerg-Christian, TSANG, Jonathan, VERHAAK, Roel G W, VON DEIMLING, Andreas, WICK, Wolfgang, ZADEH, Gelareh, REARDON, David A, ALDAPE, Kenneth D and VAN DEN BENT, Martin J, 2020. Glioblastoma in adults: a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology*. August 2020. Vol. 22, no. 8, p. 1073–1113. DOI 10.1093/neuonc/noaa106.
- WEN, Yimei, GEITNER, Nicholas K., CHEN, Ran, DING, Feng, CHEN, Pengyu, ANDORFER, Rachel E., GOVINDAN, Praveen Nedumpully and KE, Pu Chun, 2013. Binding of cytoskeletal proteins with silver nanoparticles. *RSC Advances*. 21 October 2013. Vol. 3, no. 44, p. 22002–22007. DOI 10.1039/C3RA43281E.
- WHITEHEAD, Clarissa A., NGUYEN, Hong P.T., MOROKOFF, Andrew P., LUWOR, Rodney B., PARADISO, Lucia, KAYE, Andrew H., MANTAMADIOTIS, Theo and STYLLI, Stanley S., 2018. Inhibition of Radiation and Temozolomide-Induced Invadopodia Activity in Glioma Cells Using FDA-Approved Drugs. *Translational Oncology*. December 2018. Vol. 11, no. 6, p. 1406–1418. DOI 10.1016/j.tranon.2018.08.012.
- WICK, Wolfgang, KRENDYUKOV, Andriy, JUNGE, Klaus, HÖGER, Thomas and FRICKE, Harald, 2019. Longitudinal analysis of quality of life following treatment with Asunercept plus reirradiation versus reirradiation in progressive glioblastoma patients. *Journal of Neuro-Oncology*. 1 December 2019. Vol. 145, no. 3, p. 531–540. DOI 10.1007/s11060-019-03320-x.



- WICK, W., BRANDES, AA., GORLIA, T., BENDSZUS, M., SAHM, F., TAAL, W., TAPHOORN, M., DOMONT, J., IDBAIH, A., CAMPONE, M., CLEMENT, P.M., STUPP, R., FABBRO, M., DUBOIS, F., BAIS, C., MUSMECI, D., PLATTEN, M., WELLER, M., GOLFINOPOULOS, V. and VAN DEN BENT, M., 2015. LB-05PHASE III TRIAL EXPLORING THE COMBINATION OF BEVACIZUMAB AND LOMUSTINE IN PATIENTS WITH FIRST RECURRENCE OF A GLIOBLASTOMA: THE EORTC 26101 TRIAL. *Neuro-Oncology*. 1 November 2015. Vol. 17, no. suppl\_5, p. v1–v1. DOI 10.1093/neuonc/nov306.
- WICK, Wolfgang, GORLIA, Thierry, BENDSZUS, Martin, TAPHOORN, Martin, SAHM, Felix, HARTING, Inga, BRANDES, Alba A., TAAL, Walter, DOMONT, Julien, IDBAIH, Ahmed, CAMPONE, Mario, CLEMENT, Paul M., STUPP, Roger, FABBRO, Michel, LE RHUN, Emilie, DUBOIS, Francois, WELLER, Michael, VON DEIMLING, Andreas, GOLFINOPOULOS, Vassilis, BROMBERG, Jacqueline C., PLATTEN, Michael, KLEIN, Martin and VAN DEN BENT, Martin J., 2017. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1707358> [online]. 15 November 2017.
- WIEWRODT, Dorothee, NAGEL, Georg, DREIMÜLLER, Nadine, HUNDSBERGER, Thomas, PERNECZKY, Axel and KAINA, Bernd, 2008. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *International Journal of Cancer*. 2008. Vol. 122, no. 6, p. 1391–1399. DOI 10.1002/ijc.23219.
- WIJAYA, Juwina, FUKUDA, Yu and SCHUETZ, John D., 2017. Obstacles to Brain Tumor Therapy: Key ABC Transporters. *International Journal of Molecular Sciences*. 27 November 2017. Vol. 18, no. 12, p. 2544. DOI 10.3390/ijms18122544.
- WILD-BODE, C., WELLER, M., RIMNER, A., DICHGANS, J. and WICK, W., 2001. Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer Research*. 15 March 2001. Vol. 61, no. 6, p. 2744–2750.
- WILDEBOER, Dirk, NAUS, Silvia, AMY SANG, Qing-Xiang, BARTSCH, Jörg W. and PAGENSTECHE, Axel, 2006. Metalloproteinase disintegrins ADAM8 and ADAM19 are highly regulated in human primary brain tumors and their expression levels and activities are associated with invasiveness. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. May 2006. Vol. 65, no. 5, p. 516–527. DOI 10.1097/01.jnen.0000229240.51490.d3.
- WILSON, Paul F. and BEDFORD, Joel S., 2010. 1 - Radiobiologic Principles. In: HOPPE, Richard T., PHILLIPS, Theodore Locke and ROACH, Mack (eds.), *Leibel and Phillips Textbook of Radiation Oncology (Third Edition)* [online]. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 3–30. [Accessed 13 January 2022]. ISBN 978-1-4160-5897-7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416058977000019>
- WIRANOWSKA, Marzenna and PLAAS, Anna, 2008. Cytokines and Extracellular Matrix Remodeling in the Central Nervous System. *NeuroImmune Biology*. 31 December 2008. Vol. 6. DOI 10.1016/S1567-7443(07)10009-0.
- WIRANOWSKA, Marzenna and ROJANI, Mumtaz V., 2011. *Extracellular Matrix Microenvironment in Glioma Progression* [online]. IntechOpen. [Accessed 1 September 2021]. ISBN 978-953-307-379-8. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/22475>
- WISDOM, Katrina M., ADEBOWALE, Kolade, CHANG, Julie, LEE, Joanna Y., NAM, Sungmin, DESAI, Rajiv, ROSSEN, Ninna Struck, RAFAT, Marjan, WEST, Robert B., HODGSON, Louis and CHAUDHURI, Ovijit, 2018. Matrix mechanical plasticity regulates cancer cell migration through confining microenvironments. *Nature Communications*. 8 October 2018. Vol. 9, no. 1, p. 4144. DOI 10.1038/s41467-018-06641-z.
- WOEHRER, Adelheid, BAUCHET, Luc and BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S., 2014. Glioblastoma survival: has it improved? Evidence from population-based studies. *Current Opinion in Neurology*. December 2014. Vol. 27, no. 6, p. 666–674. DOI 10.1097/WCO.0000000000000144.
- WOLF, Kayla J., SHUKLA, Poojan, SPRINGER, Kelsey, LEE, Stacey, COOMBES, Jason D., CHOY, Caleb J., KENNY, Samuel J., XU, Ke and KUMAR, Sanjay, 2020. A mode of cell adhesion and migration facilitated by CD44-dependent microtentacles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 May 2020. Vol. 117, no. 21, p. 11432–11443. DOI 10.1073/pnas.1914294117.
- WOLFRAM, Joy and FERRARI, Mauro, 2019. Clinical Cancer Nanomedicine. *Nano Today*. April 2019. Vol. 25, p. 85–98. DOI 10.1016/j.nantod.2019.02.005.
- WU, Xinying, TAN, Yanbin, MAO, Hui and ZHANG, Minming, 2010. Toxic effects of iron oxide nanoparticles on human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Nanomedicine*. 9 August 2010. Vol. 5, p. 385–399. DOI 10.2147/ijn.s10458.
- WU, Adam, WEI, Jun, KONG, Ling-Yuan, WANG, Yongtao, PRIEBE, Waldemar, QIAO, Wei, SAWAYA, Raymond and HEIMBERGER, Amy B., 2010. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro-Oncology*. November 2010. Vol. 12, no. 11, p. 1113–1125. DOI 10.1093/neuonc/noq082.
- WU, Yue, ALI, Moustafa R. K., DONG, Bin, HAN, Tiegang, CHEN, Kuangcai, CHEN, Jin, TANG, Yan, FANG, Ning, WANG, Fangjun and EL-SAYED, Mostafa A., 2018. Gold Nanorod Photothermal Therapy Alters Cell Junctions and Actin Network in Inhibiting Cancer Cell Collective Migration. *ACS nano*. 25 September 2018. Vol. 12, no. 9, p. 9279–9290. DOI 10.1021/acsnano.8b04128.



- XIA, Shuli, LAL, Bachchu, TUNG, Brian, WANG, Shervin, GOODWIN, C. Rory and LATERRA, John, 2016. Tumor microenvironment tenascin-C promotes glioblastoma invasion and negatively regulates tumor proliferation. *Neuro-Oncology*. April 2016. Vol. 18, no. 4, p. 507–517. DOI 10.1093/neuonc/nov171.
- XU, Hui, RAHIMPOUR, Shervin, NESVICK, Cody L., ZHANG, Xu, MA, Jingyun, ZHANG, Min, ZHANG, Ge, WANG, Li, YANG, Chunzhang, HONG, Christopher S., GERMANWALA, Anand V., ELDER, J. Bradley, RAY-CHAUDHURY, Abhik, YAO, Yu, GILBERT, Mark R., LONER, Russell R., HEISS, John D., BRADY, Roscoe O., MAO, Ying, QIN, Jianhua and ZHUANG, Zhengping, 2015. Activation of hypoxia signaling induces phenotypic transformation of glioma cells: implications for bevacizumab antiangiogenic therapy. *Oncotarget*. 14 March 2015. Vol. 6, no. 14, p. 11882–11893. DOI 10.18632/oncotarget.3592.
- YAO, Maojin, LI, Shu, WU, Xiaojun, DIAO, Shuo, ZHANG, Guoxin, HE, Hua, BIAN, Liuguan and LU, Yicheng, 2018. Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cellular & Molecular Immunology*. August 2018. Vol. 15, no. 8, p. 737–739. DOI 10.1038/cmi.2017.159.
- Bandiera\_abtest: aCg\_type: Nature Research Journalsnumber: 8Primary\_atype: Research Highlightspublisher: Nature Publishing Group
- YOO, Ki-Chun, SUH, Yongjoon, AN, Yoojeong, LEE, Hae-June, JEONG, Ye Ji, UDDIN, Nizam, CUI, Yan-Hong, ROH, Tae-Hoon, SHIM, Jin-Kyoung, CHANG, Jong Hee, PARK, Jong Bae, KIM, Min-Jung, KIM, In-Gyu, KANG, Seok-Gu and LEE, Su-Jae, 2018. Proinvasive extracellular matrix remodeling in tumor microenvironment in response to radiation. *Oncogene*. June 2018. Vol. 37, no. 24, p. 3317–3328. DOI 10.1038/s41388-018-0199-y.
- YOSHII, Yoshihiko, SUGIMOTO, Koichi and FUJIWARA, Kyoko, 2011. Progressive enlargement of a mass lesion in late cerebral radionecrosis. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. June 2011. Vol. 18, no. 6, p. 853–855. DOI 10.1016/j.jocn.2010.08.041.
- ZAER, Hamed, GLUD, Andreas Nørgaard, SCHNEIDER, Bret M., LUKACOVA, Slávka, VANG HANSEN, Kim, ADLER, John R., HØYER, Morten, JENSEN, Morten Bjørn, HANSEN, Rune, HOFFMANN, Lone, WORM, Esben Schjødt, SØRENSEN, Jens Chr. Hedemann and ORLOWSKI, Dariusz, 2020. Radionecrosis and cellular changes in small volume stereotactic brain radiosurgery in a porcine model. *Scientific Reports*. 1 October 2020. Vol. 10, p. 16223. DOI 10.1038/s41598-020-72876-w. small volume radiosurgery at different dose levels induced vascular, as well as neuronal cell changes and glial cell remodeling.
- ZEMAN, E., SCHREIBER, E. and TEPPER, J., 2014. Basics of Radiation Therapy. In: . 2014.
- ZHAI, Gary G., MALHOTRA, Rajeev, DELANEY, Meaghan, LATHAM, Douglas, NESTLER, Ulf, ZHANG, Min, MUKHERJEE, Neelanjana, SONG, Qinhui, ROBE, Pierre and CHAKRAVARTI, Arnab, 2006. Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *Journal of Neuro-Oncology*. February 2006. Vol. 76, no. 3, p. 227–237. DOI 10.1007/s11060-005-6499-4.
- ZHAO, Mengnan, VAN STRATEN, Demian, BROEKMAN, Marika L.D., PRÉAT, Véronique and SCHIFFELERS, Raymond M., 2020. Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma. *Theranostics*. 1 January 2020. Vol. 10, no. 3, p. 1355–1372. DOI 10.7150/thno.38147.
- ZHANG, Haibo, WAN, Chao, HUANG, Jing, YANG, Chensu, QIN, You, LU, Yanwei, MA, Jia, WU, Bian, XU, Shuangbing, WU, Gang and YANG, Kunyu, 2018. In Vitro Radiobiological Advantages of Hypofractionation Compared with Conventional Fractionation: Early-Passage NSCLC Cells are Less Aggressive after Hypofractionation. *Radiation Research*. September 2018. Vol. 190, no. 6, p. 584–595. DOI 10.1667/RR14951.1
- ZHANG, Ying, DUBE, Collin, GIBERT, Myron, CRUICKSHANKS, Nichola, WANG, Baomin, COUGHLAN, Maeve, YANG, Yanzhi, SETIADY, Initha, DEVEAU, Ciana, SAOUD, Karim, GRELO, Cassandra, OXFORD, Madison, YUAN, Fang and ABOUNADER, Roger, 2018. The p53 Pathway in Glioblastoma. *Cancers*. September 2018. Vol. 10, no. 9, p. 297. DOI 10.3390/cancers10090297.
- ZHANG, Yahong, ZHOU, Zhao-Hua, BUGGE, Thomas H. and WAHL, Larry M., 2007. Urokinase-type plasminogen activator stimulation of monocyte matrix metalloproteinase-1 production is mediated by plasmin-dependent signaling through annexin A2 and inhibited by inactive plasmin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 1 September 2007. Vol. 179, no. 5, p. 3297–3304. DOI 10.4049/jimmunol.179.5.3297.
- ZHANG, Chao, LIU, Cheng-fen, CHEN, An-bin, YAO, Zhong, LI, Wei-guo, XU, Shu-jun and MA, Xiang-yu, 2019. Prognostic and Clinic Pathological Value of Cx43 Expression in Glioma: A Meta-Analysis. *Frontiers in Oncology*. 12 November 2019. Vol. 9, p. 1209. DOI 10.3389/fonc.2019.01209.
- ZHANG, Lei, YU, Hongwei, YUAN, Yuhui, YU, John S., LOU, Zhenkun, XUE, Yixue and LIU, Yunhui, 2020. The necessity for standardization of glioma stem cell culture: a systematic review. *Stem Cell Research & Therapy*. 26 February 2020. Vol. 11, no. 1, p. 84. DOI 10.1186/s13287-020-01589-8.


- ZHANG, Lei and ZHANG, Yan, 2015. Tunneling nanotubes between rat primary astrocytes and C6 glioma cells alter proliferation potential of glioma cells. *Neuroscience Bulletin*. 26 April 2015. Vol. 31, no. 3, p. 371–378. DOI 10.1007/s12264-014-1522-4.
- ZHEN, Limin, LI, Jian, ZHANG, Mingran and YANG, Kun, 2016. MiR-10b decreases sensitivity of glioblastoma cells to radiation by targeting AKT. *Journal of Biological Research (Thessalonike, Greece)*. December 2016. Vol. 23, p. 14. DOI 10.1186/s40709-016-0051-x.
- ZHONG, Jessie, PAUL, Andre, KELLIE, Stewart J. and O'NEILL, Geraldine M., 2010. Mesenchymal Migration as a Therapeutic Target in Glioblastoma. *Journal of Oncology*. 2010. Vol. 2010, p. 430142. DOI 10.1155/2010/430142.
- ZHOU, Teng, YU, Meifang, ZHANG, Bo, WANG, Liming, WU, Xiaochun, ZHOU, Hejiang, DU, Yipeng, HAO, Junfeng, TU, Yaping, CHEN, Chunying and WEI, Taotao, 2014. Inhibition of Cancer Cell Migration by Gold Nanorods: Molecular Mechanisms and Implications for Cancer Therapy. *Advanced Functional Materials*. November 2014. Vol. 24, no. 44, p. 6922–6932. DOI 10.1002/adfm.201401642
- ZHOU, Wei, YU, Xuejuan, SUN, Shuang, ZHANG, Xuehai, YANG, Wenjing, ZHANG, Junpeng, ZHANG, Xin and JIANG, Zheng, 2019. Increased expression of MMP-2 and MMP-9 indicates poor prognosis in glioma recurrence. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 October 2019. Vol. 118, p. 109369. DOI 10.1016/j.biopha.2019.109369.
- ZHOU, Yuchuan, LIU, Hongxia, ZHENG, Wang, CHEN, Qianping, HU, Songling, PAN, Yan, BAI, Yang, ZHANG, Jianghong and SHAO, Chunlin, 2021. MMP14 Contributes to HDAC Inhibition-Induced Radiosensitization of Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*. 27 September 2021. Vol. 22, no. 19, p. 10403. DOI 10.3390/ijms221910403
- ZIEGLER, Wolfgang H., GINGRAS, Alex R., CRITCHLEY, David R. and EMSLEY, Jonas, 2008. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Biochemical Society Transactions*. 20 March 2008. Vol. 36, no. 2, p. 235–239. DOI 10.1042/BST0360235

# ANNEXES



Cite this: *Nanoscale*, 2021, **13**, 9236

# The detrimental invasiveness of glioma cells controlled by gadolinium chelate-coated gold nanoparticles†

Maxime Durand,<sup>a</sup> Elodie Lelievre,<sup>b</sup> Alicia Chateau,<sup>‡a</sup> Alexandre Berquand,<sup>‡c</sup> Gautier Laurent,<sup>d</sup> Philippe Carl,<sup>e</sup> Stéphane Roux,<sup>d</sup> Lise Chazee,<sup>b</sup> Rana Bazzi,<sup>d</sup> Frederic Eghiaian,<sup>f</sup> Justine Jubreaux,<sup>a</sup> Philippe Ronde,<sup>e</sup> Muriel Barberi-Heyob,<sup>a</sup> Pascal Chastagner,<sup>a</sup> Jérôme Devy<sup>\*‡b</sup> and Sophie Pinel <sup>\*‡a</sup>

Glioblastoma are characterized by an invasive phenotype, which is thought to be responsible for recurrences and the short overall survival of patients. In the last decade, the promising potential of ultrasmall gadolinium chelate-coated gold nanoparticles (namely Au@DTDTPA(Gd)) was evidenced for image-guided radiotherapy in brain tumors. Considering the threat posed by invasiveness properties of glioma cells, we were interested in further investigating the biological effects of Au@DTDTPA(Gd) by examining their impact on GBM cell migration and invasion. In our work, exposure of U251 glioma cells to Au@DTDTPA(Gd) led to high accumulation of gold nanoparticles, that were mainly diffusely distributed in the cytoplasm of the tumor cells. Experiments pointed out a significant decrease in glioma cell invasiveness when exposed to nanoparticles. As the proteolysis activities were not directly affected by the intracytoplasmic accumulation of Au@DTDTPA(Gd), the anti-invasive effect cannot be attributed to matrix remodeling impairment. Rather, Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles affected the intrinsic biomechanical properties of U251 glioma cells, such as cell stiffness, adhesion and generated traction forces, and significantly reduced the formation of protrusions, thus exerting an inhibitory effect on their migration capacities. Consistently, analysis of talin-1 expression and membrane expression of beta 1 integrin evoke the stabilization of focal adhesion plaques in the presence of nanoparticles. Taken together, our results highlight the interest in Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles for the therapeutic management of astrocytic tumors, not only as a radio-enhancing agent but also by reducing the invasive potential of glioma cells.

Received 17th December 2020,

Accepted 21st March 2021

DOI: 10.1039/d0nr08936b

[rsc.li/nanoscale](http://rsc.li/nanoscale)

## Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most aggressive, deadliest, and most common brain malignancy in adults. GBM is characterized by an invasive phenotype, which enables tumor cells to infiltrate into the surrounding brain tissue. GBM tumor cells invade a healthy brain and migrate along Scherer's structures,

including pre-existing blood vessels, white matter tracts and the subarachnoid space. The high migratory capability of these tumor cells is thought to be responsible for the short overall survival of GBM patients, since infiltrative cells always remain following cytoreductive surgery and lead to recurrence. Unfortunately, several experimental converging clues suggest that migration/invasion abilities of glioblastoma cells could be enhanced by therapeutic intervention such as surgical excision or irradiation.<sup>1</sup>

In a recent review, we presented how the rapid development of nanomedicine for cancer applications opens up new perspectives for GBM therapy and imaging-guided treatments. Among promising innovations, many preclinical studies are ongoing to investigate the potential of gold nanoparticles as a drug delivery system, to enhance external beam radiotherapy or to induce photothermal ablation.<sup>2</sup> The lack of significant cell toxicity in a wide concentration range may explain the craze for the use of gold nanoparticles (AuNPs) in cancer therapies. In this therapeutic context, gold nanoparticles with a dia-

<sup>a</sup>Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France.

E-mail: [sophie.pinel@univ-lorraine.fr](mailto:sophie.pinel@univ-lorraine.fr)

<sup>b</sup>Université de Reims-Champagne-Ardenne, UMR CNRS/URCA 7369, MEDyC,

F-51100 Reims, France. E-mail: [jerome.devy@univ-reims.fr](mailto:jerome.devy@univ-reims.fr)

<sup>c</sup>Université de Reims-Champagne-Ardenne, EA 4682, F-51100 Reims, France

<sup>d</sup>Université Bourgogne Franche-Comté, UMR CNRS 6213-UBFC, UTINAM, F-25000 Besançon, France

<sup>e</sup>Université de Strasbourg, CNRS UMR 7021 – Strasbourg, France

<sup>f</sup>Abberior Instruments GmbH, F-13008 Marseille, France

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0nr08936b

‡These authors contributed equally.



meter smaller than 10 nm should be preferred because (i) they can be eliminated by renal clearance which is a pre-requisite for the *in vivo* application of non-biodegradable nanoparticles<sup>3</sup> and (ii) they are more efficient than large nanoparticles for enhancing the radiation dose effect.<sup>4</sup> In accordance with these prerequisites, Roux's research group has developed ultrasmall polyaminocarboxylate-coated gold nanoparticles, namely Au@DTDTPA, that exhibit a promising potential for image-guided radiotherapy for brain tumors. Au@DTDTPA nanoparticles behave as positive contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) and as radiotracers for nuclear imaging (planar scintigraphy and single photon emission computed tomography (SPECT)) when they are labeled with Gd<sup>3+</sup> and <sup>99m</sup>Tc<sup>4+</sup> or <sup>111</sup>In<sup>3+</sup> ions, respectively. After intravenous injection, authors showed that these nanoparticles are removed from the body mainly by renal excretion. Furthermore, X-ray irradiation 5–10 minutes after intravenous administration of Au@DTDTPA(Gd) increased the life span of rats bearing brain tumor by a factor 2 in comparison with animals treated only by radiotherapy.<sup>5</sup>

Despite the lack of major toxicity of gold nanoparticles, some articles have reported that AuNP internalization by cells can affect cell proliferation, migration and invasion, and alter metabolic activity and reprogram secretome. For example, Pernodet *et al.* found that actin stress fibers disappeared and properties such as cell spreading, cell adhesion, and cell growth were altered dramatically as a result of intracellular gold nanoparticle presence in human dermal fibroblasts.<sup>6</sup> Similarly, gold nanoparticles seem to be able to reduce tumor growth and metastasis.<sup>7,8</sup>

Knowing that migrating cells remain a major threat for glioblastoma-bearing patients, these recent data about AuNPs led us to further investigate the potential of Au@DTDTPA(Gd) and to examine their effects on GBM cell migration and invasion. Glioma cell invasion is a complex multi-step biological process that is regulated by an integrated network of biochemical and biomechanical events, involving many changes in morphological and adhesion properties and microenvironment remodeling. In this context, different *in vitro* approaches such as 3D spheroid tumor invasion assays, scratch assay and cell tracking by time-lapse video microscopy, traction force microscopy or atomic force microscopy, allowed us to obtain more insight into migration/invasion properties of glioblastoma cells when exposed to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles.

## Results and discussion

### Au@DTDTPA(Gd) nanoparticle uptake and consequences on cell viability and proliferation

In the past two decades, many studies have demonstrated that cellular uptake depends on the nanoparticle size, shape and coating.<sup>9–11</sup> The cellular accumulation of gold nanoparticles was time- and concentration-dependent until a steady-state<sup>9–11</sup> and quantitative and qualitative distribution appeared as a key parameter that affects direct cytotoxicity and therapeutic

activity such as radiosensitizing potential.<sup>12,13</sup> Hence, the first step aimed at quantifying intracellular gold after glioma cell exposition to Au@DTDTPA(Gd) and evaluating consequences on cell viability and proliferation.

Elemental Au quantification by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) revealed that after 24 h of exposure, the quantity of Au accumulated in U251 cells was similar regardless of the concentration of nanoparticles used (1 and 5 mM). The number of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles taken up reached about  $6 \times 10^5$  to  $7 \times 10^5$  per cells (Table 1). STED microscopy experiments were conducted using cyanine 3-labeled Au@DTDTPA(Gd) and markers of particular compartments (*i.e.* antibodies directed against EEA1 for endosomes, calnexin for rough endoplasmic reticulum, vinculin for focal adhesion complexes and CoxIV for mitochondria (Fig. 1A–D)), to know the precise subcellular distribution of nanoparticles. Nanoparticles clearly accumulate in the cytoplasm in a diffuse pattern, while fluorescence is also observable in punctate structures at the periphery of the nucleus (Fig. 1E). Surprisingly, we did not notice small or large clusters of nanoparticles in cytoplasmic vesicles such as endosomes or in focal adhesion complexes. The ultrasmall size of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles and the lack of endosome/lysosome-confined intracellular clusters render nanoparticles undetectable by the usually used transmission emission microscopy. Similarly, Huang *et al.* have synthesized 2 nm, 6 nm and 15 nm-sized gold nanospheres and used tiopronin, a pharmaceutical drug including a thiol group, as a stabilizing agent. The authors quantified  $5 \times 10^5$  to  $5 \times 10^6$  nanoparticles per cell in a breast cancer monolayer model and they showed that the 2 and 6 nm AuNPs mostly localized in the cytoplasm without any aggregation and also about 15% were able to enter the nucleus.<sup>11</sup> Afterwards, Boyoglu *et al.* confirmed that 3 nm and 10 nm AuNPs are efficient at entering the cytoplasm and nucleus of Hep-2 cells.<sup>14</sup>

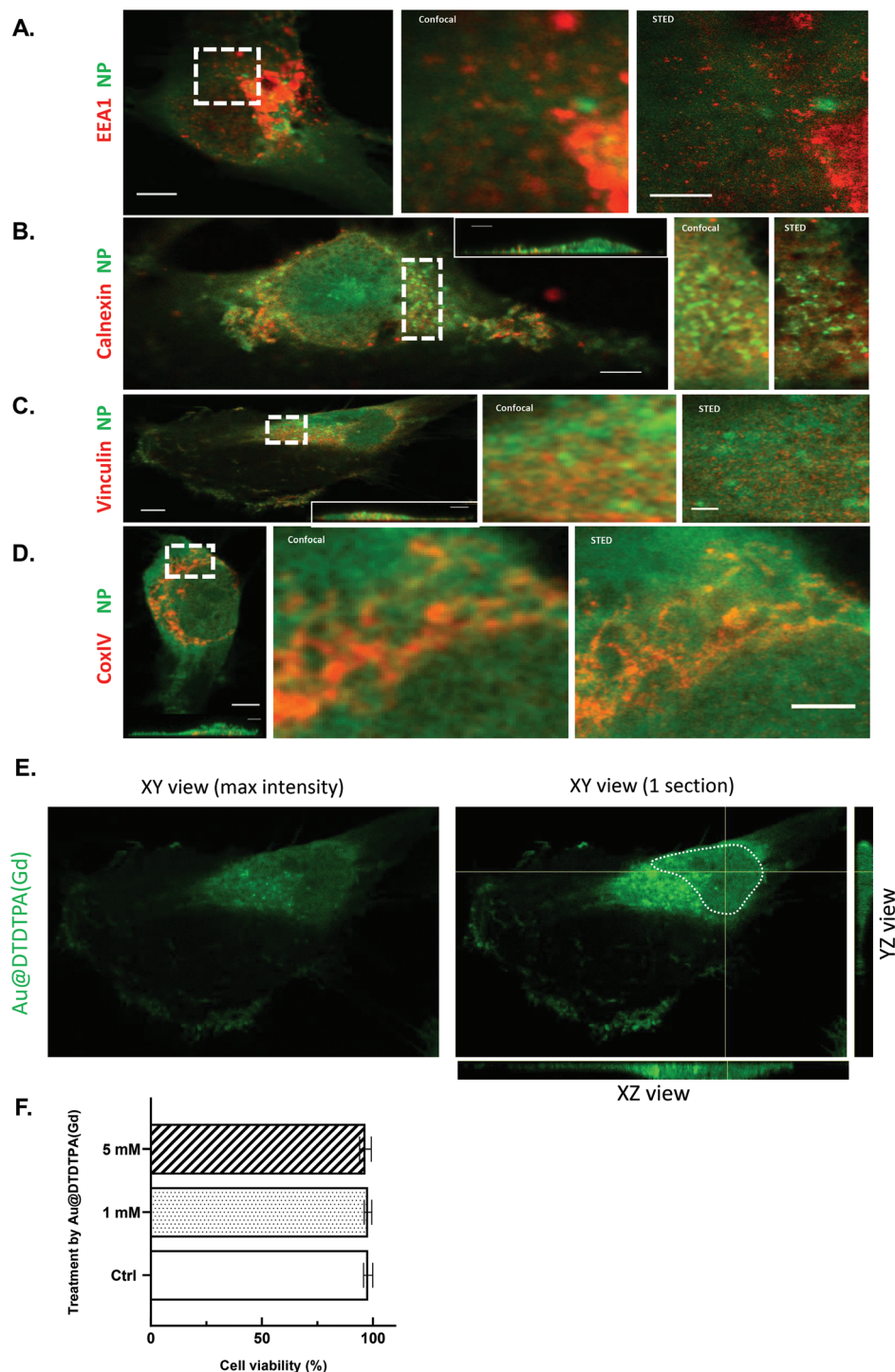
Even if gold materials are generally considered to be bio-inert, nontoxic and biocompatible, nanoscale gold particles may have much higher bioactivity due to their increased “surface area to volume ratio” that can result in direct cytotoxicity. Induction of apoptosis, cell cycle delay or generation of reactive oxygen species were described as potential cytotoxic effects of gold nanoparticles, according to their physico-chemical properties.<sup>15,16</sup>

**Table 1** Quantification of gold in the U251 cells based on ICP-OES analysis. U251 cells maintained as monolayer culture were exposed for 24 h to Au@DTDTPA(Gd) at 1 or 5 mM. After nanoparticles removal, the cells were rinsed, detached, counted and centrifuged to obtain a pellet. Samples were then mineralized and proceeded as described in Experimental section

Au@DTDTPA(Gd) concentration	Gold quantity (μg)	Nanoparticles per cell
1 mM	0.48 ± 0.042	$6.17 \times 10^6 \pm 5.65 \times 10^4$
5 mM	0.55 ± 0.037	$6.99 \times 10^6 \pm 5.46 \times 10^4$







**Fig. 1** Localization of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles in U251 cells. (A–D) To know precisely subcellular distribution of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles, confocal and STED microscopy experiments were conducted using cyanine3-labeled Au@DTDTPA(Gd) (green fluorescence) and markers of particular compartments (red fluorescence): antibodies labelled with STAR RED were directed against (A) EEA1 for endosomes, (B) calnexin for rough endoplasmic reticulum, (C) vinculin for focal adhesion complexes and (D) CoxIV for mitochondria. **Left panel:** confocal overview of a fixed cell (scale bar 5 μm). A region delineated by dotted white rectangle is the zoomed in confocal (**middle panel**) and STED (**right panel**) image (scale bar 2 μm). (E) Maximal image intensity in XY, XZ, and YZ sections through the U251 nuclei after Au@DTDTPA(Gd)-Cy3 exposure (1 mM). XY section shows one slice through the nucleus of a single U251 cell; the XZ section shows a cut along the horizontal yellow line through the nucleus; the YZ section shows a cut along the vertical yellow line through the nucleus. The white dotted line delineates the nucleus of the cell. The green fluorescence signal corresponds to Au@DTDTPA(Gd): only the nanoparticles that cross the given cut are visible. The green intensity profile indicates a strong accumulation of nanoparticles at the periphery of the nucleus as well as their presence to a lesser extent in the nucleus. (F) Based on trypan blue exclusion assay and a TC20™ automated cell counter, viable cells were determined in control cell cultures (Ctrl) or 24 h after exposure to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles (1 mM or 5 mM). Results are presented as mean ± SD (n ≥ 4).





With 97% cell viability following a 24 h exposure, no direct toxic effects were noticed on U251 cells despite the strong internalization of nanoparticles in cancer cells (Fig. 1F). When the global behavior of U251 glioma cells was followed for 70 h with a cell-impedance measurement system (xCELLigence real-time cell analysis system), no alteration was noticed for nanoparticle-treated cells (data not shown). Using flow cytometry, we also investigated the influence of gold nanoparticles on cell cycle distribution and the proliferation index (*i.e.* percent S phase + percent G2/M phase) was calculated as previously described.<sup>17</sup> Sixteen hours after the removal of Au@DTDTPA (Gd) nanoparticles, the proliferation index of U251 glioma cells treated with gold nanoparticles was unchanged as compared to untreated cells (ESI S11†).

Collectively, our results indicate that the concentrations of the Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles used in this study are lower than those affecting the viability and proliferation of U251 glioblastoma cells.

### Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles reduced the invasion abilities of glioma cells

Both in patients and *in vitro* models, glioblastoma cells are well-known to exhibit a highly invasive behavior leading to diffuse infiltration of the surrounding.<sup>18</sup> To explore and decipher the mechanisms developed by invading cells in glioblastoma, the invasive behavior of the U251 cell line was extensively studied using a variety of methods and materials to mimic the *in vivo* microenvironment (2D or 3D extracellular matrix, organotypic slice). Multicellular tumor spheroids embedded in a 3D matrix represent invaluable tools to analyze cell invasion and to mimic the cancer microenvironment.<sup>19,20</sup> We have investigated the impact of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on invasive capacities of U251 cells. For this purpose, U251 spheroids were exposed to 1 and 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles for 24 h and then, embedded in a matrix mixing Matrigel® and hyaluronic acid. As recently published, we have previously confirmed that Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles were able to diffuse and be distributed throughout the spheroids, reaching the center of the tumor.<sup>21</sup> Fig. 2 shows representative images of U251 spheroids in their 3D matrix 4 days post-seeding. While the dark areas correspond to spheroids' cores including necrotic, quiescent and proliferative cells, we can notice the cells on the edge that radially extend into the matrix (Fig. 2A). Some of them seem to move individually (black arrows) while other organized in clusters (denser areas), suggesting collective cell motion (white arrows) (Fig. 2B). To assess the effect of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on U251 invasiveness, spheroid initial/end sizes and invasiveness areas were determined. With or without exposure to nanoparticles, the central core similarly grew during the culture to reach the mean final size of  $0.516 \pm 0.028 \text{ mm}^2$ ,  $0.420 \pm 0.076 \text{ mm}^2$  and  $0.494 \text{ mm}^2 \pm 0.026 \text{ mm}^2$  for untreated-, 1 mM and 5 mM nanoparticle-treated spheroids, respectively. As shown in Fig. 2C, the invasion capacities of the U251 cells pretreated with Au@DTDTPA(Gd) were approximately 20–25% lower than those of the control cells: invasion distances and invasion

areas reached respectively,  $820 \pm 16 \mu\text{m}$  and  $3.570 \pm 0.135 \text{ mm}^2$  for untreated control spheroids;  $644 \pm 14 \mu\text{m}$  and  $2.719 \pm 0.154 \text{ mm}^2$  for 1 mM nanoparticle-treated spheroids ( $p < 0.005$  vs. Ctrl);  $678 \pm 21 \mu\text{m}$  and  $2.899 \pm 0.147 \text{ mm}^2$  for 5 mM nanoparticle-treated spheroids ( $p < 0.005$  vs. Ctrl). Thus, 3D invasion assays revealed a significant inhibitory effect of our ultra-small gold nanoparticles on invasive capacities of U251. Inhibitory effects were previously described by Zhou *et al.* for breast, prostate and melanoma cancer cells exposed to gold nanorods using transwell invasion assays.<sup>22</sup> Similarly, Au@Pt nanoseeds have been shown to reduce the invasiveness of kidney cancer cells in Boyden chambers.<sup>23</sup>

To overcome the structural restraints of brain tissue organization, invading glioma cells need remarkable plasticity and proteolytic activity allowing them to move through the brain parenchyma, along the blood vessels and white matter tracks.<sup>24</sup> In this context, we were interested in studying the impact of Au@DTDTPA(Gd) uptake in the first step, on proteolysis abilities of U251 cells and in the second step, on intrinsic cell plasticity and motility.

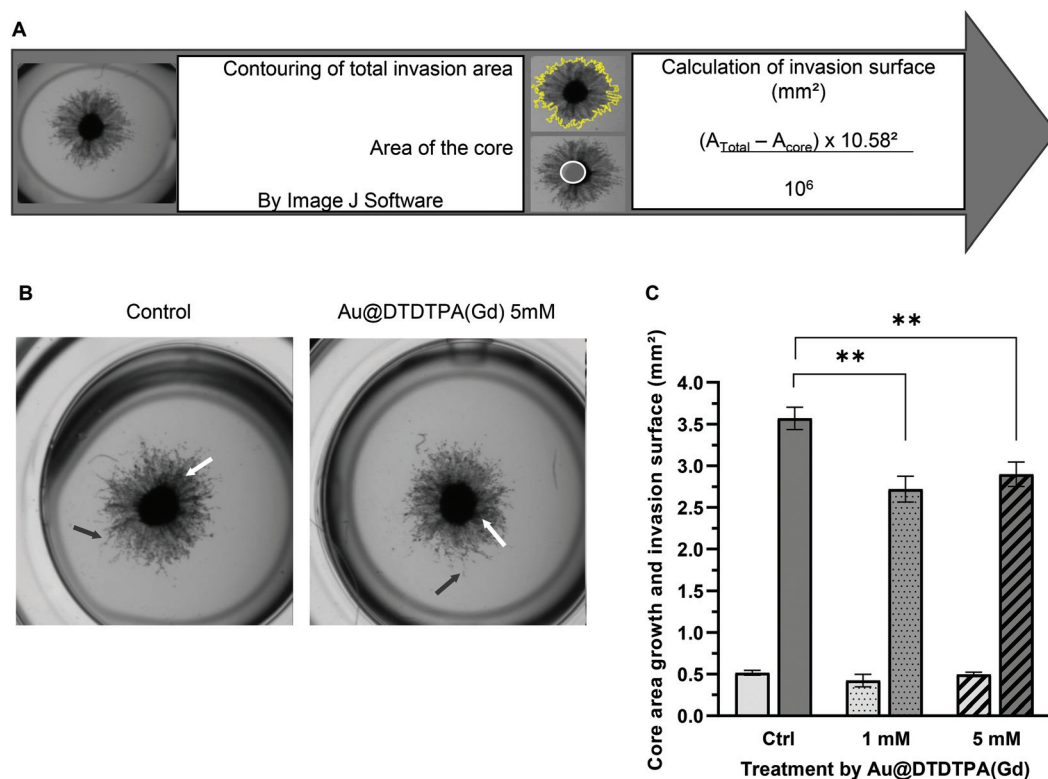
### Impact of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticle uptake on proteolytic activity and on glioma cell motility

Matrix metalloproteinases (MMPs) like serine proteases urokinase plasminogen activators constitute the main groups of proteases capable of degrading extracellular matrix proteins (fibronectin, type IV-collagen, proteoglycan, etc) and are involved in GBM growth and dissemination. A strong correlation exists between elevated levels of urokinase plasminogen activators (uPA) and MMPs with cancer progression, metastasis and shortened patient survival.<sup>25</sup>

Concerning the MMP family, gelatinases MMP-2 and MMP-9 and the membrane-type MT1-MMP are found to be expressed by glioma cells and already described for their contribution in tumor progression.<sup>26</sup> Moreover, a previous study has demonstrated the downregulation of MMP-2 and -9 expression after the exposure of papillary thyroid carcinoma cells to 10 nm AuNPs at a dose of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>27</sup> Thus, we explored the effects of Au@DTDTPA(Gd) on metalloprotease expression and activity. RT-qPCR analysis indicated that U251 cells expressed MT1-MMP and MMP-2, but not MMP-9. Exposure to Au@DTDTPA(Gd) induced a slight but not significant decrease in MT1-MMP and MMP2 mRNA levels. Using the gelatin zymography method, we focused on proteolytic activity of gelatinases. In accordance with others,<sup>28</sup> we did not detect any gelatinolytic activity of MMP-2 nor MMP-9 in conditioned media of U251 cells, even in untreated samples. MT1-MMP analysis was performed by using a biotinylation approach in order to recover only active MT1-MMP at the cell membrane. Proteolytic activity of MT1-MMP was found in untreated U251 at the same level as after Au@DTDTPA(Gd) nanoparticle uptake (ESI S12†).

Thus, the MMPs do not seem to be involved in the reduced invasive capabilities of U251 cells treated with NPs. The plasminogen/plasmin system is another system well described for its involvement in the extracellular matrix degradation during





**Fig. 2** Impact of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on U251 invasiveness based on 3D invasion assay. U251 spheroids ( $\sim 450 \pm 70 \mu\text{m}$  in diameter) were exposed to 1 or 5 mM Au@DTDTPA(Gd) for 24 h. After nanoparticle removal, the spheroids were seeded in 6-well culture plates (one spheroid per well) and each one was embedded in a mixture of Matrigel®, complete culture medium enriched with hyaluronic acid. (A) Using ImageJ software, the total area of invasion (manual yellow delineation) and the core area (white delineation) were determined 4 days after seeding for each spheroid, allowing calculation of the “invasion surface” (1 pixel =  $10.58 \mu\text{m}$ ). (B) Representative images of invasion for untreated- or Au@DTDTPA(Gd)-treated spheroids showed areas of collective (white arrows) and individual (black arrows) invasion. (C) Histograms represent the core growth (left histograms) and the invasion surface (right histograms) for untreated- or Au@DTDTPA(Gd)-treated spheroids. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 11$  spheroids for at least  $n \geq 3$  independent experiments). \*\* $p < 0.01$  according to the Mann–Whitney  $U$  test.

GBM progression.<sup>29</sup> Notably, the serine protease urokinase plasminogen system (uPA, uPAR) participates actively in ECM restructuring through plasmin and MMPs activation. Our preliminary analyses using RTqPCR on cell lysates and proteome arrays on conditioned media did not show noteworthy influence of NPs on the plasminogen/plasmin system (data not shown).

While the reduced abilities of invasion of U251 after Au@DTDTPA(Gd) endocytosis cannot be directly explained by the interference of the nanoparticles with the proteolysis processes, we questioned whether the nanoparticles can affect the migration capabilities of glioma cells. Glioblastoma cells show a versatile repertoire of migration modes, allowing them to adapt their strategies in response to changing environmental conditions. Indeed, these tumor cells can exhibit individual (amoeboid or mesenchymal) or collective migration modes, depending on the local properties of the extracellular matrix.<sup>30</sup> In this regard, different tests were carried out to evaluate the effects of Au@DTDTPA(Gd) on migration capacities of U251 cells.

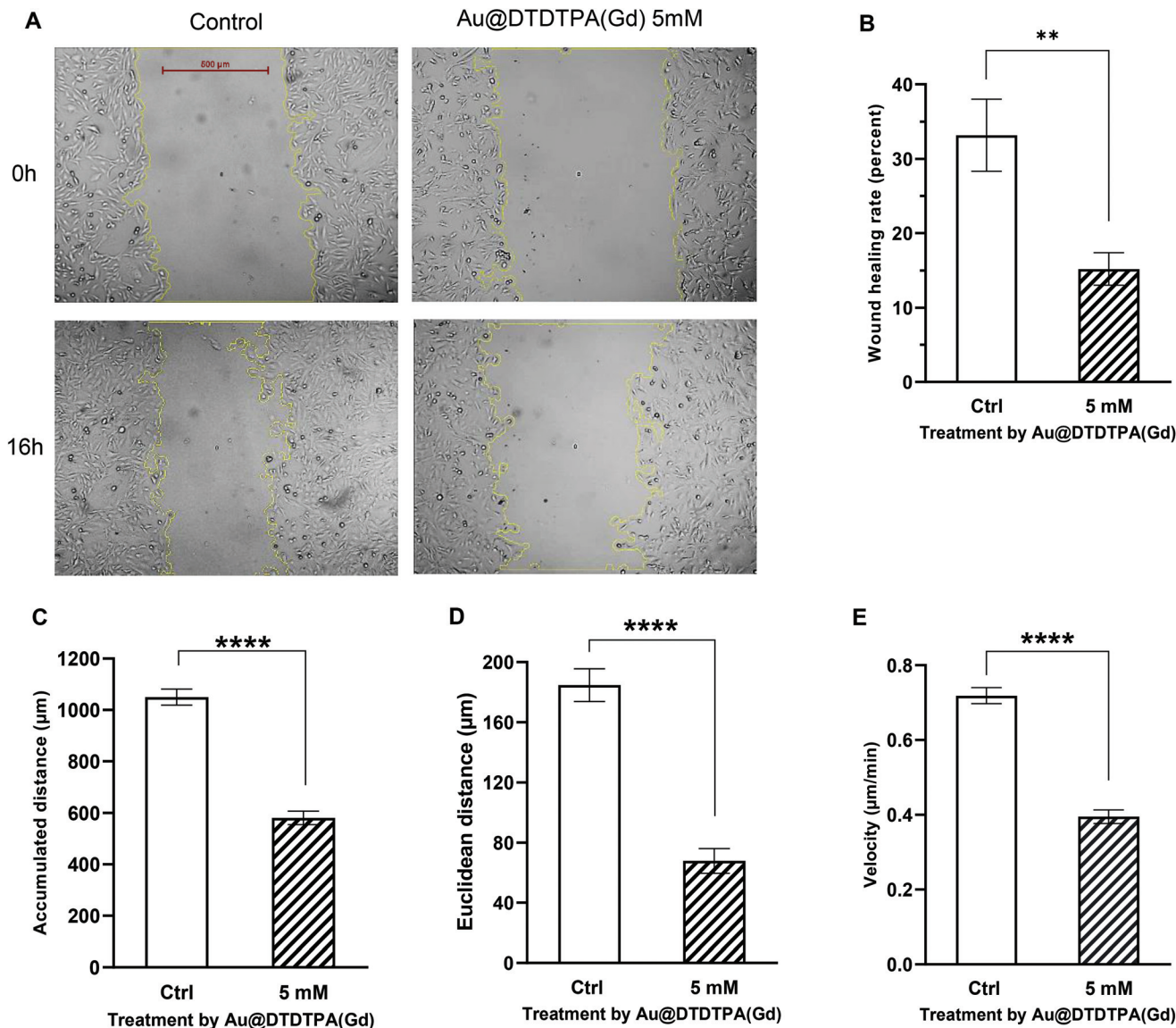
A scratch assay which is considered as the standard *in vitro* technique was firstly performed for probing collective cell

migration in two dimensions.<sup>31</sup> Images were captured immediately (0 h) and 16 h after the scratch and surface of the healing wound was determined using imageJ software (Fig. 3A). At the end point of the experiment, the healing area reached 33% for the control. After exposure to nanoparticles, the recovery of the wounded area was only 15%, *i.e.* 2 times less than that in the control samples (Fig. 3B).

Then, time-lapse video microscopy and cell tracking experiments were performed on monodisperse cells to estimate cell velocity and directionality. While traditional methods rely on Boyden chamber migration assays to measure individual migration in response to chemotactic signals, we preferred time-lapse video microscopy because it allows the measurement of individual migration parameters and the visualization of morphological changes that cell undergoes during migration.<sup>32</sup> In untreated U251 cells, movies revealed a repeated sequential polarized apparition of enlarged lamellipodia associated with cell polarity and directional displacement of cells with typical mesenchymal morphologies (Movie 1† left).

Looking at each cell individually, exposition to Au@DTDTPA(Gd) seems to interfere with cell polarity estab-





**Fig. 3** Impact of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on collective and individual migration of U251 cells. (A and B) Collective migration of U251 glioma cells was assessed using wound healing assays. As soon as the nanoparticles were removed, a scratch was made into the confluent monolayer of U251 cells and (A) photographs at  $\times 40$  magnification were captured immediately and 16 h after scratching. Representative images show the gap filling under control conditions (Ctrl) or after 24 h of exposure to 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles (scale bar 800  $\mu\text{m}$ ). (B) The plugin "MRI wound healing assay tool" from ImageJ software was used to measure the gap area at 0 h and 16 h, and calculate the wound healing rates as plotted on histograms. The results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 8$  independent experiments). (C–E) Individual migration was monitored by video microscopy. After seeding on fibronectin-coated coverslip, 48 untreated or nanoparticle-treated cells were individually tracked for 24 h by video microscopy ( $\times 20$  magnification objective, using a Zeiss Axio Observer). Histograms represent (C) accumulated distance (D) Euclidean distance (E) and velocity. Results are presented as mean  $\pm$  SD. \*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  according to the Mann–Whitney  $U$  test.

ishment, as we observed a fast turnover of lamellipodia in any direction that leads to both reduced directional displacement and reduced apparent velocity (Movie 1† right). Indeed, cell tracking quantification revealed that U251 cells seeded onto fibronectin exhibit a velocity of  $0.72 \pm 0.02 \mu\text{m min}^{-1}$  and the traveled distance reached  $1050 \pm 31 \mu\text{m}$  per 24 h. U251 cell motility rates were significantly altered after nanoparticle endocytosis, because U251 cell velocity was decreased by 43% ( $0.39 \pm 0.02 \mu\text{m min}^{-1}$ ), the traveled distance by 45% ( $581 \pm$

$26 \mu\text{m}$  per 24 h) and directional cell migration (Euclidean distance) by 65% compared to untreated cells (Fig. 3C–E).

Together, these results indicate that Au@DTDTPA(Gd) can exert a significant inhibitory effect on both collective and individual migration of U251 cells. Our specific observations for the Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles can probably be generalized to most of the gold nanoobjects. Indeed, several previous studies using wound healing assay or a transwell chamber have reported that gold nanospheres and gold nanorods,





regardless of their size, their concentration or the cell lines used, could reduce tumor cell migration. For example, Zhou *et al.* showed decreased chemotactic responses in a transwell chamber when breast, prostate or skin cancer cells were exposed to gold nanorods.<sup>22</sup> More recently, Li *et al.* performed wound healing assays and demonstrated that gold nanospheres reduced liver cancer cell migration.<sup>33</sup> Similarly, time-lapse video microscopy of wound healing of lung and prostate cancer cells has shown that gold nanospheres affect early cell migration (6 h) with decreased gap filling.<sup>34</sup>

#### Au@DTDTPA(Gd) nanoparticle uptake affects the intrinsic biomechanical properties of glioma cells and cell-ECM interactions

From a biomechanical standpoint, tumor cell motion in case of mesenchymal migration requires cell deformation and active generation of traction force on the underlying extracellular matrix to pull the cell forward. Cell deformation is directly dependent on the stiffness properties and the transition to a motile phenotype is characterized by changes in focal adhesion and cytoskeletal dynamics. Previous studies have reported a correlation between cell stiffness and metastatic potential of cancer cells<sup>7</sup> and that cancer cells are softer than normal cells.<sup>35</sup> Then, we investigated the impact of Au@DTDTPA(Gd) on the deformability and stiffness of U251 by using AFM-indentation measurements and by Young's modulus determination. In this case, an isolated cell was taken out of a cell culture on fibronectin coated coverslip and AFM measurements were realized in areas outside the nucleus, where the cell height was at least 3 times superior to the indentation depth in order to calculate Young's modulus. Young's modulus was found to be remarkably stable on control cells with values equal to  $1.61 \pm 0.17$  kPa. After Au@DTDTPA(Gd) uptake, Young's modulus dramatically increased to reach  $4.56 \pm 2.58$  kPa on fibronectin (Fig. 4A). Moreover, it is well documented that cell migration is dependent on lamellipodial protrusions.<sup>36</sup> Using AFM error images, we have analyzed the number of membrane protrusions and demonstrated that treatment with Au@DTDTPA(Gd) induced a decrease of about 50% in the protrusion number ( $5.30 \pm 0.39$  protrusions per  $100 \mu\text{m}^2$  for the control samples *vs.*  $2.43 \pm 0.31$  protrusions per  $100 \mu\text{m}^2$  for the treated cells) (Fig. 4B). All these results highlighted the potential of NPs to diminish the capacities of U251 cells to displace.

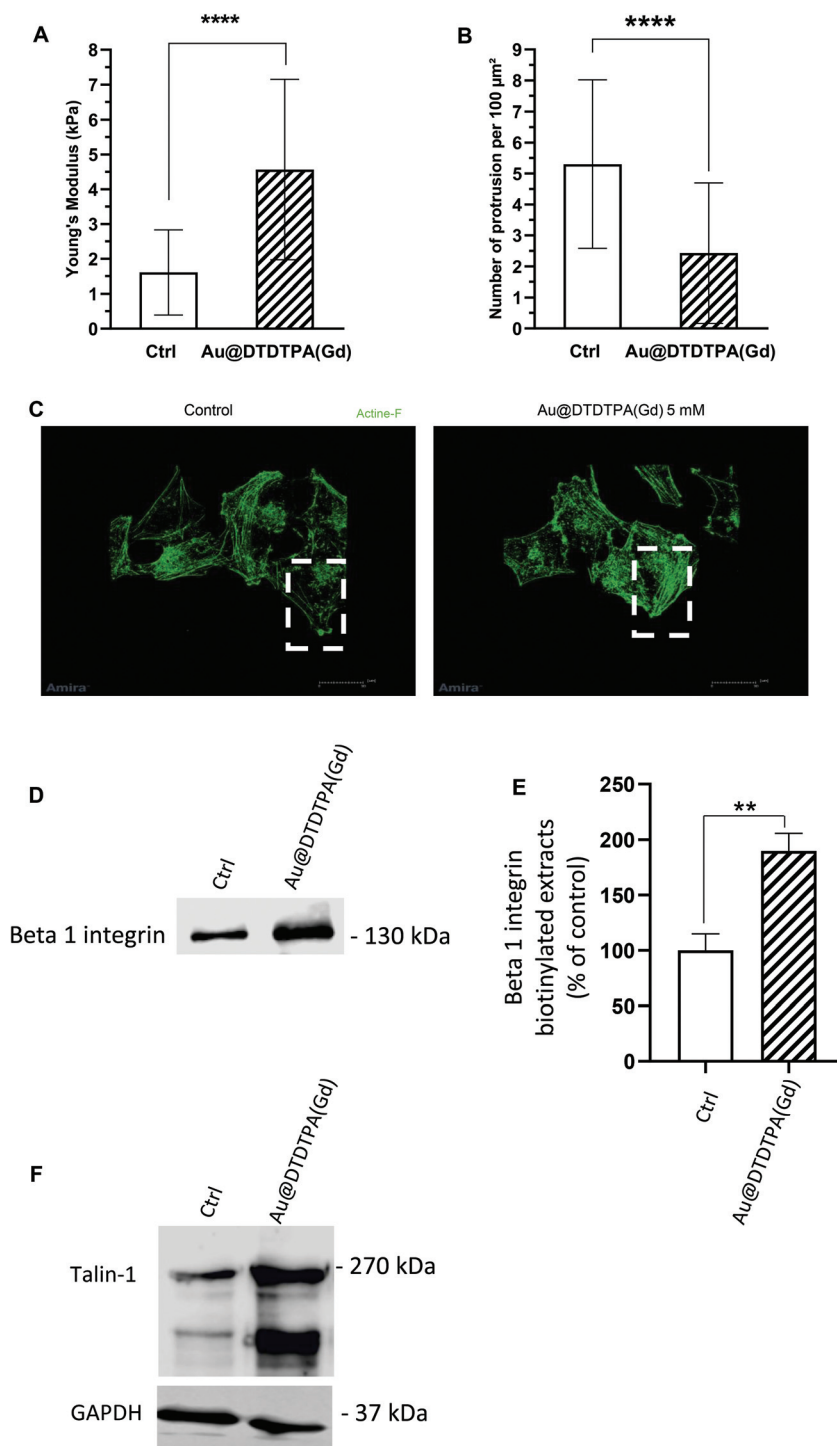
In order to explain and correlate the increase in Young's modulus and the decrease in the migration capabilities of U251 cells after Au@DTDTPA(Gd) treatment, fluorescently labeled phalloidin has been used to study actin cytoskeleton organization by confocal microscopy. ESI S13† shows the 3D isosurface reconstruction of cells using 2 different thresholds for untreated control cells or nanoparticle-treated cells. At the lowest threshold (Fig. 4C), a clear difference appears in the actin labeling between untreated and Au@DTDTPA(Gd)-treated cells. While only the actin cortex is visible in control cells, the Au@DTDTPA(Gd)-treated cells exhibit well-developed intracellular stress fibers and a thicker actin cortex. Adhesion

structures appear clearly at the edge of U251 cells and more actin patches with the highest threshold value (framed areas) are present in nanoparticle-treated cells. Our observations corroborate previously published studies that reported changes in F-actin fiber organization when cells were exposed to inorganic nanoparticles.<sup>37</sup> More recently, Mulens-Arias *et al.* showed that AuNPs disturbed the adhesive structures and affected focal adhesion dynamics, in particular, characterized by an increase or a decrease in mature focal adhesion in the first 2 h following exposure according to the type of cells studied (mesenchymal stem cells or endothelial cells, respectively). Nevertheless, the effects appear to be dependent on the nanoparticle core size and cell type.<sup>38</sup> Consistently, we conducted further molecular investigations to determine how Au@DTDTPA(Gd) interferes with the actin cytoskeletal system. Thus, we studied by immunoblotting the membrane expression of beta 1 integrin in biotinylated extracts (Fig. 4D and E) and expression of Talin-1 (Fig. 4F). While no difference in the total beta 1 integrin expression was noticed between untreated- and nanoparticle-treated cells, membrane expression of beta 1 integrin was doubled when U251 cells were exposed to 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles. In parallel, Talin-1 expression, an ubiquitous cytosolic protein that is found in high concentrations in focal adhesions, was markedly increased in Au@DTDTPA(Gd)-treated cells. These results evoke the stabilization of focal adhesion plaques in the presence of nanoparticles, confirming the disturbance of focal adhesion dynamics.<sup>39</sup>

To adhere and migrate, cells generate traction forces through the cytoskeleton.<sup>40</sup> So, using time-lapse traction force microscopy (TFM), we examined the differences in traction forces generated by U251 cells pre-exposed or not to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles (Movie 2†). Traction force microscopy yields a spatial image of the stress exerted by the cells on elastic gel substrates. As a cell attaches to the surface of the substrate, it deforms the substrate proportionally to the applied mechanical force and these elastic deformations can be followed by video microscopy and described quantitatively with high precision.<sup>41</sup> Under moderate stiffness mimicking conditions in healthy and tumor brain tissues ( $E = 5$  to  $15$  kPa),<sup>42</sup> measurements of cellular force indicate that after 24 h of exposure to Au@DTDTPA(Gd), U251 glioma cells exhibit stronger traction stresses compared to the non-exposed cells (Fig. 5A and B) with the force ratios reaching  $13\,410 \pm 381$  Pa  $\mu\text{m}^{-2}$  and  $18\,056 \pm 616$  Pa  $\mu\text{m}^{-2}$  ( $p = 0.0047$ ), respectively. These data confirm that nanoparticles accumulated in the cell cytoplasm induce changes in force generation and corroborate previous data showing higher levels of cell traction force for TR146 epithelial cells that have been exposed to  $\text{TiO}_2$  or  $\text{SiO}_2$  nanoparticles while migrating collectively.<sup>43</sup>

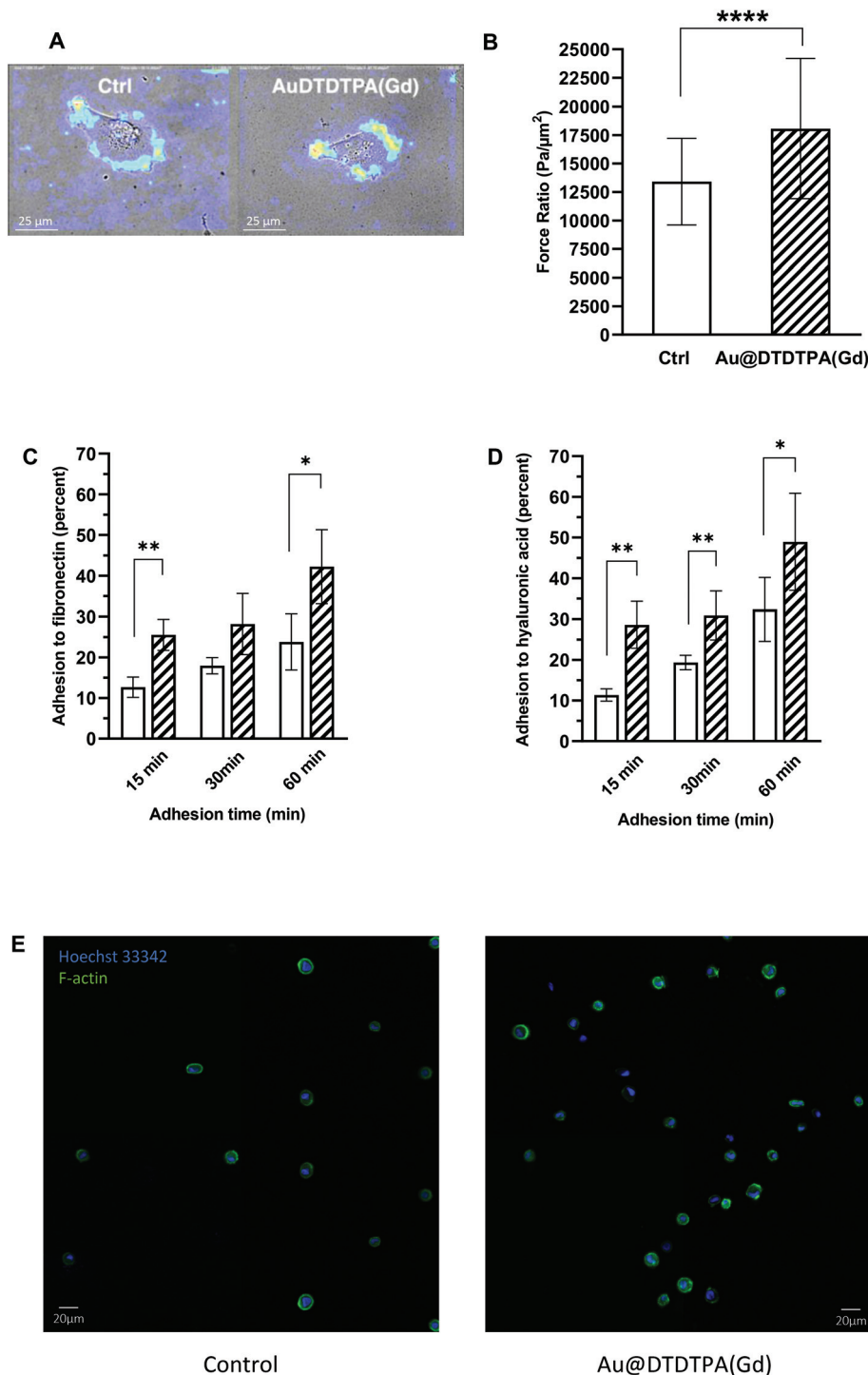
In order to reinforce the results obtained on cytoskeleton, stiffness and TFM, we finally focused our investigations on the direct adhesion properties of U251 cells by using cell adhesion assay performed at 3 time points (15, 30 and 60 min) on a fibronectin or hyaluronic acid coating. As expected, in the control group, the percentage of attached cells increased over time, with a maximum reaching 24.8% and 27.8% for U251





**Fig. 4** Impact of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on biomechanical properties and cell morphology of U251 cells. (A–B) AFM measurements were performed to assess the surface density of protrusions and the cell mechanical properties (characterized by Young's modulus) of U251 cells treated or not with Au@DTDTPA(Gd). A minimum of 50 cells for each condition were analyzed. (A) Young's modulus and (B) number of protrusions per 100  $\mu\text{m}^2$  were plotted on histograms. (C) Representative z-stack images of the F-actin cytoskeleton (Alexa Fluor™ 488 Phalloidin) obtained by confocal microscopy. (D–E) Effect of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on the membrane Beta 1 integrin expression. (D) Cell extracts were prepared from U251 biotinylated cells treated or not with 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles. Expression of Beta 1 integrin localized at the cell surface was analysed by 10% SDS-PAGE followed by western blotting. (E) Expression of Beta 1 integrin was quantified by densitometry and results are representative of three independent experiments and expressed as mean  $\pm$  SD relative to the control (100%). (F) Effect of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on Talin-1 (full size) expression. Cell extracts were prepared from U251 cells treated or not with 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles. Expression of Talin-1 was analysed by 10% SDS-PAGE followed by western blotting.





**Fig. 5** Impact of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on traction forces and adhesion. (A) Representative snapshots of TFM analysis of single cells with the force represented as magnitude of control cells (left) and Au@DTDTPA(Gd) nanoparticle-treated cells (right) superimposed with the cell segmentation used for force integration. (B) Force ratio (in pN  $\mu\text{m}^{-2}$ ) corresponding to the integration of the force values over the surface obtained by the segmentation of untreated- and nanoparticle-treated U251 cells and normalized by the surface value. (C and D) After 24 h of exposure to 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles, U251 cells were exposed to Hoechst 33342 at 1/1000 during 15 minutes. Then, the cells were trypsinated and plated on 48 wells plates coated with (C) fibronectin or (D) hyaluronic acid during 15, 30 and 60 minutes. Fluorescence intensities ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ : 350/461 nm for Hoechst 33342) were recorded. Histograms represent the percentage of cells that have adhered after 15, 30 and 60 minutes. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n = 7$  independent experiments). \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  according to the Mann–Whitney  $U$  test. (E) Representative images of attached cells on fibronectin-coated surface at the time point 15 min were captured for U251 cells treated or not with 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles (F-actin – green, cell nuclei – blue).





plated on fibronectin and hyaluronic acid, respectively (Fig. 5C and D). Regardless of the coating and the time points, pretreatment with Au@DTDTPA(Gd) conferred a significantly higher ability to adhere to the substrate. After 15 min of cell incubation with the matrix coating,  $25.5 \pm 1.7\%$  of U251 cells treated with nanoparticles bind to fibronectin, compared to only  $12.6 \pm 1.0\%$  of control cells ( $p = 0.0043$ ). For U251 cells exposed to nanoparticles, adhesion at 60 min reached  $42.2 \pm 4.1\%$  compared to  $23.8 \pm 3.1\%$  for control cells ( $p = 0.0159$ ). According to the images captured after 15 minutes (Fig. 5E), the cytoskeleton appeared more developed for the Au@DTDTPA(Gd)-treated cells than for the control cells, which may explain the earlier and more important adhesion for the treated cells.

Taken together, our experiments demonstrated that Au@DTDTPA(Gd) uptake is able to counteract the migration capabilities of U251 glioma cells. These effects occur through an alteration of the intrinsic biomechanical behavior of cells that were characterized by an increase of Young's modulus, a reorganization of the actin cytoskeleton and adhesion structures, and higher traction forces. All these data are consistent with enhanced anchorage of the cells after treatment with Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles that likely explain the diminished capacities of collective and individual migration. Such effects of metal-based nanoparticles on cell motility seem to be generalized as some of them have already been observed for other inorganic nanoparticles and other cell types.<sup>22,33,38,43</sup> Our experiments have gone further as 3D invasion assays demonstrated that reduced motility of glioma cells also occur in a confined environment, reducing glioma invasive potential. Underlying mechanisms remain unclear and ongoing experiments are now devoted to decipher at the molecular level the action of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on glioma cells.

Furthermore, Winckler's group has recently demonstrated that glioma cells emit thin ultralong membrane protrusions (called as tumor microtubes) which help them to invade and colonize healthy brain tissue and form a complex network that conveys resistance to standard tumor treatment modalities such as radiotherapy.<sup>44,45</sup> In light of this recent knowledge, our results showing that Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles can significantly affect the protrusion number emitted by cells appear particularly promising.

## Experimental section

### Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles and ICP-OES dosage of gold

The synthesis and characterization of the Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles were described earlier<sup>46,47</sup> (ESI S14†).

For a typical preparation of these gold nanoparticles,  $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (200 mg,  $51 \times 10^{-5}$  mol) was placed in a 250 mL round-bottom flask and was dissolved with methanol (60 mL). In another flask, DTDTPA (256 mg,  $50 \times 10^{-5}$  mol), water (40 mL) and acetic acid (2 mL) were mixed. This solution containing DTDTPA was added to the gold salt solution under stirring. The mixture turned from yellow to orange.  $\text{NaBH}_4$

(195 mg,  $515 \times 10^{-5}$  mol) dissolved in water (13.2 mL) was added to the gold-DTDTPA solution under stirring at room temperature. At the beginning of  $\text{NaBH}_4$  addition, the solution first became dark brown then a black flocculate appeared. The vigorous stirring was maintained for 1 h before adding aqueous hydrochloric acid solution (2 mL, 1 M). After the partial removal of the solvent under reduced pressure the precipitate was retained on the polymer membrane and washed thoroughly and successively with 0.1 M hydrochloric acid, water and acetone. The resulting black powder was dried (up to 200 mg of dry powder of Au@DTDTPA) and dispersed in aqueous solution of sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$  0.01 M) with a final concentration of 50 mM gold.

The functionalization of Au@DTDTPA nanoparticles by organic dyes (aminated cyanine 3,  $\text{Cy3-NH}_2$ ) was inspired from the grafting of aminated cyanine-5.<sup>21</sup> A solution of Au@DTDTPA (9 mL, 50 mM in gold) was adjusted to pH 5. For the activation of the carboxylic groups, EDC (397 mg) and NHS (477 mg) in deionized water (6.48 mL) were added to the colloid under stirring at room temperature. The agitation was maintained for 90 min. Afterwards, the pH of the solution was adjusted at pH 7.5 and  $\text{Cy3-NH}_2$  was added to the aqueous suspension of Au@DTDTPA nanoparticles. The solution was stirred for 15 minutes at room temperature and for 12 h at 4 °C.

After the reaction with  $\text{Cy3-NH}_2$ , the nanoparticles were purified by dialysis against an acidic medium (pH 5, Molecular Weight Cut-Off (MWCO): 6 kDa). The dialysis bath was changed four times (6 h, 20 h, 26 h, and 40 h after the immersion of a dialysis tube in acid aqueous solution) until it became colorless. After purification by dialysis, gold nanoparticles were concentrated by centrifugation using centrifugal concentrators (Vivaspin®, MWCO: 10 kDa) until a gold concentration of 50 mM.

Whatever the type of nanoparticles (Au@DTDTPA or fluorescent Au@DTDTPA nanoparticles), the labeling with gadolinium ions is performed through the addition of  $\text{GdCl}_3$  to colloidal solution under stirring at room temperature. For a final gold concentration of 45–50 mM, the gadolinium concentration is 5 mM.

The titrations of gold in colloids and in the cells were performed by ICP-OES analysis. The samples were first mineralized in ultrapure aqua regia to a final concentration of at least  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  in gold. An ICP-OES (710 ES Varian/Agilent) with an axial torch with a concentric nebulizer and cyclonic spray chamber was used. The parameters fixed during the measurement were: power of 1.2 kW with argon auxiliary of 1.5 L  $\text{min}^{-1}$  and nebulizer pressure of 200 kPa. The emission lines used to measure the gold concentration were 268 nm, 243 nm and 208 nm. The efficacy of the atomization is about 60% for gold. An ionizing buffer was employed for the measurements.

### Cell culture

The human primary glioblastoma cell line U-251MG (Uppsala, Sweden) was obtained from American Type Culture Collection and was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium



(DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.4% L-asparagine, 0.36% L-serine, 1% L-glutamine, 1% essential amino acids, 0.5% non-essential amino acids, 0.4% vitamins, 1.25% sodium pyruvate, and 1% penicillin-streptomycin. The cells were maintained in monolayers in a tissue culture incubator at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> 95% air atmosphere, and were subcultured twice a week. DMEM, amino acids, vitamins, and antibiotics were purchased from Gibco/Life Technologies (France), while other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).

Cell counting was performed using a TC20™ automated cell counter (Bio-Rad, France) and viability assessment was performed using Trypan blue exclusion assay that allows the detection of live (unstained) and dead (stained) cells.

### 3D invasion assays

To generate U251 spheroids,  $1 \times 10^6$  cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> flasks previously coated with hydrophobic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) to prevent cell adhesion. Four days later, U251 spheroids are harvested and placed in a spinner culture flask with magnetic stirring for 10 days for growing. Then the spheroid suspension was filtered through 380 and 520 µm nylon mesh filters that allowed collecting spheroids of homogeneous size (~400–500 µm). These spheroids were then cultured in 6-well plates coated with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) in the presence or absence of 5 mM Au@DTDTPA(Gd) for 24 h. After treatment, each spheroid was placed into individual wells of a 96-well plate and then embedded with 100 µL of a mixture of Matrigel® and hyaluronic acid (100 µg mL<sup>-1</sup>). The spheroids were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 4 days, allowing invasion and migration processes to take place. After staining with thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT 1 mg mL<sup>-1</sup>), invasion of viable cells was imaged using the GelCount® system (Oxford Optronix, UK). The mean area (in µm<sup>2</sup>) and the mean distance (in µm) of invasion from at least 34 independent spheroids (6 independent experiments) were quantified using Image J and GelCount® Software. Initial and final surface (in µm<sup>2</sup>) of at least 19 independent spheroids (3 independent experiments) were quantified using Image J.

### Wound healing assay

U251 glioblastoma cells were seeded at a concentration of  $2.5 \times 10^5$  cells per well in a 6-well plate containing Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and incubated for 24 h at 37 °C under a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After attachment of the cells to the plate, the cells were treated with 5 mM Au@DTDTPA (Gd) nanoparticles for 24 h. When the nanoparticles were removed, a scratch was created into the confluent monolayer of U251 cells using a sterile p1000 pipet tip. The cells were then replaced into the incubator for 16 h. Three representative images of each scratch area were captured at 0 h (just after scratching cells) and 16 h after incubation using a transmitted-light microscope (Nikon DIAPHOT 300 equipped with digital camera Nikon Digital sight-DS-Fi1) (40× magnification).

The plugin "MRI Wound Healing Tool" from ImageJ helped us to determine the area of the gaps for each image. As an indicator of the collective migration ability, the wound healing rate was calculated as follows:  $(\text{Area}_{0\text{ h}} - \text{Area}_{16\text{ h}})/\text{Area}_{0\text{ h}} \times 100$ .

### Cell tracking by time-lapse video microscopy imaging

U251 cells ( $1 \times 10^4$ ) seeded on a fibronectin-coated 24-well plate were allowed to attach to the substrate and treated with 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles during 24 h. Before imaging, cells were treated with 1 µg mL<sup>-1</sup> mitomycin C for 2 h to inhibit cell proliferation. The cells were then PBS-washed and fresh medium was added. The cells were maintained at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in a temperature-controlled chamber (PECON) and then observed under a 20× magnification objective during 24 h using a Zeiss Axio Observer (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Data were acquired using the MetaMorph software (Roper Scientific). Cell velocity, distance and directional persistence analyses were computed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). For each condition, 48 randomly chosen cells have been tracked.

### Atomic force microscopy imaging

Prior to AFM analyses,  $5 \times 10^5$  U251 cells were seeded onto 50 mm Willco-dish® pre-coated with 10 µg mL<sup>-1</sup> fibronectin. On the next day, the cells were treated with 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles during 24 h. The cells were washed with PBS before adding 2 mL of medium. Then, AFM measurements were performed with a BioScope Catalyst™ (Bruker, Billerica, USA) mounted on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan) and operated in the PFQNM mode to acquire topographical and mechanical images of live cells. This mode has proved itself to allow higher resolution at a faster acquisition speed (similar to tapping mode imaging) than the classical Force-Volume measurements. Preliminary experiments have been conducted using SCANASYST-AIR probes (Bruker, Billerica, USA) having a nominal spring constant of 0.4 N m<sup>-1</sup> and a resonance frequency of ~70 kHz but generally speaking, the cantilever was too stiff for this type of cells. This prompted us to utilize PFQNM-LC-A-CAL probes (Bruker, Billerica, USA), having a nominal spring constant of 0.1 N m<sup>-1</sup> and a resonance frequency of ~45 kHz, the tips being calibrated as previously described. The tip geometry ("ace of spades" pyramidal shape, with a tip height of 17 µm and an apex diameter of approximately 130 nm) is designed on purpose to minimize the viscous drag during imaging in liquids. For PFQNM experiments, we used a PeakForce frequency of 0.25 kHz in order to maximize the contact time between the tip and the sample (and also collect more than one force curve per pixel), and a PeakForce amplitude of 1 µm to optimize tracking since the cells are quite high (up to 7 µm). Images were captured in the culture medium at a resolution of 256 or 128 pixels per line, at 37 °C using a Perfusing Stage Incubator (Bruker, Billerica, USA). The Petri dish was put on the baseplate when the temperature set point was reached and stabilized over time (a



Lakeshore temperature controller was used). Young's modulus, step height, surface and volume measurements were calculated using NanoscopeAnalysis (Bruker, Billerica, USA). In the present study, only the surface density of protrusions and the cells mechanical properties were considered. With respect to Young's modulus calculations, for each type of cells, 10 different cell dishes coming from the same culture were analyzed one after the other (each dish has never been handled more than 3 h) and the experiments were triplicated to draw a reliable conclusion. Overall, a minimum of 50 cells for each condition (with and without NP incubation) were analyzed. Considering both the indentation depth of the tip given by the deformation channel and the cell height given by the cross sections achieved on height images at the same locations, Young's modulus was exclusively calculated in areas where the cell height was at least 3 times superior to the indentation depth, in order to avoid any influence of the substrate on the measured values. Thus, perinuclear areas were avoided. The Sneddon model was used to estimate the interaction between the tip and the substrate. In order to avoid mechanical stress to the cells, the loading force was adjusted between a few tens up to a few hundreds of piconewtons. The force curves were extracted from the chosen area from the PFQNM images using the Peak Force Capture option of the Nanoscope software. For the topographical AFM measurements (more in particular the cell protrusions), a minimum of 50 images were processed for each condition.

### Immunocytofluorescence

U251 cells were plated at the density  $5 \times 10^3$  cells per well in 8-well Labtek II coated with  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of fibronectin for one day. The cells were exposed to 5 mM Au@DTDTPA(Gd) for 24 h. The cells were fixed with PFA 4% for 30 min, then gently washed three times with PBS. To visualize F-actin distribution, slides were incubated for 45 min with Alexafluor-488-conjugated phalloidin (Ab176753, Abcam) diluted 1/1000 in PBS with 2% (w/v) BSA. The cells were then washed three times with PBS. Immunofluorescence-labeled cell preparations were analyzed using a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope with the 63 $\times$  oil-immersion objective zoom 1 $\times$  and Zeiss operating system (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland). Acquisitions were performed by exciting Alexafluor 488 with Argon laser. Emitted fluorescence was detected through the appropriate wavelength window. Twenty images were captured with a 0.25  $\mu\text{m}$  z-step.

### Confocal and STED microscopy

Confocal and STED microscopy on immunostained U251 cells were performed using the STEDYCON (Abberior Instruments GmbH). Confocal microscopy was performed under pulsed excitation of Cy3 and Abberior STAR RED at 561 nm and 640 nm respectively, on samples mounted on a Abberior mount liquid antifade (Abberior GmbH). STED depletion was performed using a pulsed 775 nm laser source. Image processing and analysis were performed using Image J.

Due to the high concentration of metallic nanoparticles in cells, STED observation could occasionally prove to be very difficult and the use of high STED laser powers was precluded.<sup>48</sup> However, we managed to obtain comparison of STED and confocal on cells or cell regions at resolution of <80 nm (and down to 50 nm) (Fig. 1).

### Proteins extraction and western-blot analysis

*Whole-cell extracts* were prepared as previously described.<sup>49</sup> Briefly, whole-cell extracts were prepared by scraping cells in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, and proteinase inhibitor cocktail).

*Cell surface protein isolation* was performed as previously described.<sup>49</sup> After washing, the cell surface proteins were biotinylated with PBS containing  $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  of EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotin (ThermoFisher) for 30 min at 4 °C. After three washes, the cells were incubated with 100 mM glycine for 30 min at 4 °C in order to limit nonspecific binding. The cells were washed three times in ice-cold lysis buffer before protein extraction. Solubilized biotinylated proteins were then affinity purified using 40  $\mu\text{L}$  of monomeric avidin-agarose beads (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) incubated with 120  $\mu\text{g}$  of biotinylated proteins. Incubation was performed overnight at 4 °C under gentle orbital agitation (5 rpm), and then followed by five washes in lysis buffer.

The protein concentrations in whole-cell extracts and membrane extracts were quantified by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Marne-la-Vallée, France). Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell GmbH, Mantes la Ville, France), and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. Immunoreactive bands were revealed using an ECL Plus chemiluminescence kit from Amersham Biosciences (Orsay, France). GAPDH was used as a control to ensure equal loading.

### Traction force microscopy

TFM requires three distinct procedures: (1) cells are plated on an elastic substrate containing fiducial markers allowing the quantification of gel deformation visually, for instance fluorescent beads or quantum dots. (2) A discrete gel displacement caused by adherent cells is calculated by tracking fluorescent beads movements. The most common techniques for tracking are particle image velocimetry (PIV) and particle tracking velocimetry (PTV). (3) Finally, the traction force field  $f$  is calculated from the displacement field by making use of a mechanical model of the elastic substrate.<sup>50</sup>

Polyacrylamide gel coated coverslips were prepared at a 17 kPa modulus as previously described,<sup>51</sup> using the following specific conditions:  $1.5 \times 10^5$  U251 cells were then seeded before adding 1 mM Au@DTDTPA(Gd)-Cy3 during 24 h.

The cells were washed twice and then observed under a 63 $\times$  objective using a Zeiss Axio Observer (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) and a CoolSNAP HQ (Roper Scientific, France) camera. Image acquisitions were performed every 5 min during





3 hours and beads displacement was analyzed using the JEasyTFM plugin running under ImageJ.

### Cell adhesion assay

$6 \times 10^4$  U251 cells per mL were plated in  $25 \text{ cm}^2$  flasks for 3 days. Then, tumor cells were treated with 5 mM Au@DTDTPA(Gd) for 24 h. In parallel, 48-well plates were pre-treated with  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of fibronectin or with  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  hyaluronic acid in HBSS for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  and then dried overnight at  $4^\circ\text{C}$ . Control or treated tumor cells were then stained with 1 mL Hoechst 33342 ( $20 \mu\text{M}$  in HBSS, Thermo Scientific, 62249) for 30 min at  $37^\circ\text{C}$  and harvested.  $1 \times 10^5$  stained cells per well were added on the pre-coated P48 plates. After 15, 30, and 60 min of incubation at  $37^\circ\text{C}$  under a humidified 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere, the cells were gently washed once with HBSS.

*Measurement of attached cells after 15, 30, and 60 min.* Washed cells were lysed with DMSO 100%. Quantification of fluorescence intensity of cell lysates ( $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ : 350 nm/461 nm) with a Tecan Infinite 200 microplate reader (Infinite M200 pro, Tecan<sup>TM</sup>) allowed assessing the attached cells for 7 independent experiments, each condition was realized in duplicate. To quantify the fluorescence at 0 min,  $1 \times 10^5$  stained cells were transferred in 1.5 mL Eppendorf tubes, then centrifuged at 300G during 10 min at  $20^\circ\text{C}$ . The supernatants were removed, and then the stained cells were lysed with DMSO 100%.

*F-actin cytoskeleton of attached cells after 15 min.* Au@DTDTPA(Gd) treatment and cell adhesion assay were conducted as previously described using Lab-Tek<sup>TM</sup> II Chamber Slide<sup>TM</sup> 8 wells coated with  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  of fibronectin.  $5 \times 10^4$  stained U251 cells were plated and after 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere, the cells were gently washed once with HBSS. The cells were fixed with PFA 4% during 30 min, and then gently washed once with PBS. F-Actin staining was performed using Alexafluor-488-conjugated phalloidin (Ab176753, Abcam) diluted 1/1000 in PBS with 2% (w/v) BSA. Phalloidin fluorescence was analyzed using an ImageXpress<sup>®</sup> Micro Confocal device with 10× Plan APO objective and MetaXpress Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Acquisitions were performed by exciting Alexafluor 488. Emitted fluorescence was detected through the appropriate wavelength window. Ten images were captured with a  $1 \mu\text{m}$  z-step.

### Statistical analysis

The Mann–Whitney *U* test was used to compare untreated and treated groups. A *P*-value less than 0.05 was considered as statistically significant.

## Conclusion

Over the last decade, Roux *et al.* have developed the Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles, *i.e.* original ultrasmall nanoparticles composed of a gold core and dithiolated polyamino-carboxylate shell doped with  $\sim 50$  gadolinium ions, and demonstrated their relevance and their potential for MRI-

guided radiation therapy.<sup>46,47</sup> In particular, preclinical experiments demonstrated that Au@DTDTPA(Gd) could be of interest for the management of brain tumor.<sup>5</sup>

In the present work, exposure of U251 glioma cells to Au@DTDTPA(Gd) led to high accumulation of gold nanoparticles, that were mainly diffusely distributed in the cytoplasm of the tumor cells. Our results showed no direct *in vitro* cytotoxicity, and U251 cell proliferation was not altered. By contrast, our experiments pointed out a noticeable decrease in glioma cell invasiveness when tumor cells were exposed to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles. As the proteolysis activities were not directly affected by the intracytoplasmic accumulation of nanoparticles under our experimental conditions, the anti-invasive effect cannot be attributed to a matrix remodeling impairment. Instead, Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles affected the intrinsic biomechanical properties of U251 glioma cells, such as cell stiffness, adhesion and generated traction forces, and significantly reduced the formation of protrusions, thus exerting an inhibitory effect on their migration capacities.

While initially developed for combining with radiation therapy, the Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles could have huge interest for therapeutic management of astrocytic tumors, not only as a radio-enhancing agent but also by reducing invasive potential of glioma cells. Indeed, it is well-established that migrating/invasive glioblastoma cells preserve their stem-like properties with maintained tumorigenic potential<sup>52</sup> which makes anti-invasive strategies become a priority.<sup>53,54</sup>

## Conflicts of interest

The authors declare no competing financial interests.

## Author contributions

M. Durand, E. Lelievre, A. Chateau, L. Chazee & J. Jubreaux: *in vitro* biological experiments and data analysis. A. Berquand: AFM experiments and data analysis. G. Laurent, S. Roux & R. Bazzi: synthesis and characterization of nanoparticles. F. Eghiaian: STED microscopy experiments and data analysis. P. Carl & P. Ronde: traction force microscopy experiments and data analysis. M. Barberi-Heyob & P. Chastagner: scientific & clinical discussion. J. Devy & S. Pinel: project management and coordination, data analysis and manuscript redaction.

## Acknowledgements

This work was supported by the research funds of (i) the Cancéropole Est, Régions Grand Est and Bourgogne-Franche-Comté, (ii) Ligue Contre le Cancer CCIR-GE, and (iii) the CPER. We would like to thank Adrien Dos Santos for his help for the graphical abstract. The authors thank Dr Christine Terryn of the PICT platform for technical assistance in imaging.



## References

- 1 M. Alieva, V. Leidgens, M. J. Riemenschneider, C. A. Klein, P. Hau and J. van Rheenen, Intravital Imaging of Glioma Border Morphology Reveals Distinctive Cellular Dynamics and Contribution to Tumor Cell Invasion, *Sci. Rep.*, 2019, **9**, 2054, DOI: 10.1038/s41598-019-38625-4.
- 2 S. Pinel, N. Thomas, C. Boura and M. Barberi-Heyob, Approaches to Physical Stimulation of Metallic Nanoparticles for Glioblastoma Treatment, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2019, **138**, 344–357, DOI: 10.1016/j.addr.2018.10.013.
- 3 C. Alric, I. Miladi, D. Kryza, J. Taleb, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, S. Roux and O. Tillement, The Biodistribution of Gold Nanoparticles Designed for Renal Clearance, *Nanoscale*, 2013, **5**(13), 5930–5939, DOI: 10.1039/C3NR00012E.
- 4 S. J. McMahon, W. B. Hyland, M. F. Muir, J. A. Coulter, S. Jain, K. T. Butterworth, G. Schettino, G. R. Dickson, A. R. Hounsell, J. M. O'Sullivan, K. M. Prise, D. G. Hirst and F. J. Currell, Biological Consequences of Nanoscale Energy Deposition near Irradiated Heavy Atom Nanoparticles, *Sci. Rep.*, 2011, **1**, 18, DOI: 10.1038/srep00018.
- 5 I. Miladi, C. Alric, S. Dufort, P. Mowat, A. Dutour, C. Mandon, G. Laurent, E. Bräuer-Krisch, N. Herath, J.-L. Coll, M. Dutreix, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, G. L. Duc, S. Roux and O. Tillement, The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents, *Small*, 2014, **10**(6), 1116–1124, DOI: 10.1002/smll.201302303.
- 6 N. Pernodet, X. Fang, Y. Sun, A. Bakhtina, A. Ramakrishnan, J. Sokolov, A. Ulman and M. Rafailovich, Adverse Effects of Citrate/Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts, *Small*, 2006, **2**(6), 766–773, DOI: 10.1002/smll.200500492.
- 7 R. R. Arvizo, S. Saha, E. Wang, J. D. Robertson, R. Bhattacharya and P. Mukherjee, Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by a Self-Therapeutic Nanoparticle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**(17), 6700–6705, DOI: 10.1073/pnas.1214547110.
- 8 W. Li, X. Li, S. Liu, W. Yang, F. Pan, X.-Y. Yang, B. Du, L. Qin and Y. Pan, Gold Nanoparticles Attenuate Metastasis by Tumor Vasculature Normalization and Epithelial–Mesenchymal Transition Inhibition, *Int. J. Nanomed.*, 2017, **12**, 3509, DOI: 10.2147/IJN.S128802.
- 9 B. D. Chithrani, A. A. Ghazani and W. C. W. Chan, Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells, *Nano Lett.*, 2006, **6**(4), 662–668, DOI: 10.1021/nl052396o.
- 10 B. D. Chithrani and W. C. W. Chan, Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes, *Nano Lett.*, 2007, **7**(6), 1542–1550, DOI: 10.1021/nl070363y.
- 11 K. Huang, H. Ma, J. Liu, S. Huo, A. Kumar, T. Wei, X. Zhang, S. Jin, Y. Gan, P. C. Wang, S. He, X. Zhang and X.-J. Liang, Size-Dependent Localization and Penetration of Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Cells, Multicellular Spheroids, and Tumors in Vivo, *ACS Nano*, 2012, **6**(5), 4483, DOI: 10.1021/nn301282m.
- 12 W. Jiang, B. Y. S. Kim, J. T. Rutka and W. C. W. Chan, Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent, *Nat. Nanotechnol.*, 2008, **3**(3), 145–150, DOI: 10.1038/nnano.2008.30.
- 13 D. B. Chithrani, S. Jelveh, F. Jalali, M. van Prooijen, C. Allen, R. G. Bristow, R. P. Hill and D. A. Jaffray, Gold Nanoparticles as Radiation Sensitizers in Cancer Therapy, *Radiat. Res.*, 2010, **173**(6), 719–728, DOI: 10.1667/RR1984.1.
- 14 C. Boyoglu, Q. He, G. Willing, S. Boyoglu-Barnum, V. A. Dennis, S. Pillai and S. R. Singh, Microscopic Studies of Various Sizes of Gold Nanoparticles and Their Cellular Localizations <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/123838/> (accessed Sep 21, 2020). DOI: 10.1155/2013/123838.
- 15 S.-M. Chuang, Y.-H. Lee, R.-Y. Liang, G.-D. Roam, Z.-M. Zeng, H.-F. Tu, S.-K. Wang and P. J. Chueh, Extensive Evaluations of the Cytotoxic Effects of Gold Nanoparticles, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 2013, **1830**(10), 4960–4973, DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.06.025.
- 16 Q. Xia, J. Huang, Q. Feng, X. Chen, X. Liu, X. Li, T. Zhang, S. Xiao, H. Li, Z. Zhong and K. Xiao, Size- and Cell Type-Dependent Cellular Uptake, Cytotoxicity and in Vivo Distribution of Gold Nanoparticles, *Int. J. Nanomed.*, 2019, **14**, 6957, DOI: 10.2147/IJN.S214008.
- 17 Y. Hou, K. Cai, J. Li, X. Chen, M. Lai, Y. Hu, Z. Luo, X. Ding and D. Xu, Effects of Titanium Nanoparticles on Adhesion, Migration, Proliferation, and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells, *Int. J. Nanomed.*, 2013, **8**, 3619, DOI: 10.2147/IJN.S38992.
- 18 A. Fayzullin, C. J. Sandberg, M. Spreadbury, B. M. Saberniak, Z. Grieg, E. Skaga, I. A. Langmoen and E. O. Vik-Mo, Phenotypic and Expressional Heterogeneity in the Invasive Glioma Cells, *Transl. Oncol.*, 2019, **12**(1), 122, DOI: 10.1016/j.tranon.2018.09.014.
- 19 M. Vinci, C. Box and S. A. Eccles, Three-Dimensional (3D) Tumor Spheroid Invasion Assay, *J. Vis. Exp.*, 2015, **99**, e52686, DOI: 10.3791/52686.
- 20 K. M. Tevis, Y. L. Colson and M. W. Grinstaff, Embedded Spheroids as Models of the Cancer Microenvironment, *Adv. Biosyst.*, 2017, **1**(10), 1700083, DOI: 10.1002/adbi.201700083.
- 21 G. Jiménez Sánchez, P. Maury, L. Stefancikova, O. Campion, G. Laurent, A. Chateau, F. Bouraleh Hoch, F. Boschetti, F. Denat, S. Pinel, J. Devy, E. Porcel, S. Lacombe, R. Bazzi and S. Roux, Fluorescent Radiosensitizing Gold Nanoparticles, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**(18), 4618, DOI: 10.3390/ijms20184618.
- 22 T. Zhou, M. Yu, B. Zhang, L. Wang, X. Wu, H. Zhou, Y. Du, J. Hao, Y. Tu, C. Chen and T. Wei, Inhibition of Cancer Cell Migration by Gold Nanorods: Molecular Mechanisms and Implications for Cancer Therapy, *Adv. Funct. Mater.*, 2014, **24**(44), 6922–6932, DOI: 10.1002/adfm.201401642.



- 23 S.-S. Shin, D.-H. Noh, B. Hwang, J.-W. Lee, S. L. Park, S.-S. Park, B. Moon, W.-J. Kim and S.-K. Moon, Inhibitory Effect of Au@Pt-NSs on Proliferation, Migration, and Invasion of EJ Bladder Carcinoma Cells: Involvement of Cell Cycle Regulators, Signaling Pathways, and Transcription Factor-Mediated MMP-9 Expression, *Int. J. Nanomed.*, 2018, **13**, 3295, DOI: 10.2147/IJN.S158463.
- 24 V. A. Cuddapah, S. Robel, S. Watkins and H. Sontheimer, A Neurocentric Perspective on Glioma Invasion, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2014, **15**(7), 455, DOI: 10.1038/nrn3765.
- 25 M. W. Roomi, T. Kalinovsky, A. Niedzwiecki and M. Rath, Modulation of UPA, MMPs and Their Inhibitors by a Novel Nutrient Mixture in Human Glioblastoma Cell Lines, *Int. J. Oncol.*, 2014, **45**(2), 887–894, DOI: 10.3892/ijo.2014.2465.
- 26 P. A. Forsyth, H. Wong, T. D. Laing, N. B. Rewcastle, D. G. Morris, H. Muzik, K. J. Leco, R. N. Johnston, P. M. A. Brasher, G. Sutherland and D. R. Edwards, Gelatinase-A (MMP-2), Gelatinase-B (MMP-9) and Membrane Type Matrix Metalloproteinase-1 (MT1-MMP) Are Involved in Different Aspects of the Pathophysiology of Malignant Gliomas, *Br. J. Cancer*, 1999, **79**(11–12), 1828, DOI: 10.1038/sj.bjc.6990291.
- 27 F. Liu, D. Ma, W. Chen, X. Chen, Y. Qian, Y. Zhao, T. Hu, R. Yin, Y. Zhu, Y. Zhang, Y. Zhang and W. Zhao, Gold Nanoparticles Suppressed Proliferation, Migration, and Invasion in Papillary Thyroid Carcinoma Cells via Downregulation of CCT3 <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2019/1687340/> (accessed Sep 21, 2020). DOI: 10.1155/2019/1687340.
- 28 C. Hagemann, J. Anacker, R.-I. Ernestus and G. H. Vince, A Complete Compilation of Matrix Metalloproteinase Expression in Human Malignant Gliomas, *World J. Cancer Res*, 2012, **3**(5), 67, DOI: 10.5306/wjco.v3.i5.67.
- 29 J. S. Rao, Molecular Mechanisms of Glioma Invasiveness: The Role of Proteases, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**(7), 489–501, DOI: 10.1038/nrc1121.
- 30 P. Friedl and K. Wolf, Tumour-Cell Invasion and Migration: Diversity and Escape Mechanisms, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**(5), 362–374, DOI: 10.1038/nrc1075.
- 31 J. E. N. Jonkman, J. A. Cathcart, F. Xu, M. E. Bartolini, J. E. Amon, K. M. Stevens and P. Colarusso, An Introduction to the Wound Healing Assay Using Live-Cell Microscopy, *Cell Adh. Migr.*, 2014, **8**(5), 440–451, DOI: 10.4161/cam.36224.
- 32 P. Jain, R. A. Worthylake and S. K. Alahari, Quantitative Analysis of Random Migration of Cells Using Time-Lapse Video Microscopy, *J. Vis. Exp.*, 2012, **63**, e3585, DOI: 10.3791/3585.
- 33 L. Li, W. Zhang, V. D. D. Seshadri and G. Cao, Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles from Marsdenia Tenacissima and Its Anticancer Activity of Liver Cancer HepG2 Cells, *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.*, 2019, **47**(1), 3029–3036, DOI: 10.1080/21691401.2019.1642902.
- 34 E. Shahhoseini, B. N. Feltis, M. Nakayama, T. J. Piva, D. Pouniotis, S. S. Alghamdi and M. Geso, Combined Effects of Gold Nanoparticles and Ionizing Radiation on Human Prostate and Lung Cancer Cell Migration, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**(18), 4488, DOI: 10.3390/ijms20184488.
- 35 J. Xu, N. Galvanetto, J. Nie, Y. Yang and V. Torre, Rac1 Promotes Cell Motility by Controlling Cell Mechanics in Human Glioblastoma, *Cancer*, 2020, **12**(6), 1667, DOI: 10.3390/cancers12061667.
- 36 B. Pontes, P. Monzo, L. Gole, A.-L. Le Roux, A. J. Kosmalska, Z. Y. Tam, W. Luo, S. Kan, V. Viasnoff, P. Roca-Cusachs, L. Tucker-Kellogg and N. C. Gauthier, Membrane Tension Controls Adhesion Positioning at the Leading Edge of Cells, *J. Cell Biol.*, 2017, **216**(9), 2959–2977, DOI: 10.1083/jcb.201611117.
- 37 D. Septiadi, F. Crippa, T. L. Moore, B. Rothen-Rutishauser and A. Petri-Fink, Nanoparticle–Cell Interaction: A Cell Mechanics Perspective, *Adv. Mater.*, 2018, **30**(19), 1704463, DOI: 10.1002/adma.201704463.
- 38 V. Mulens-Arias, A. Balfourier, A. Nicolás-Boluda, F. Carn and F. Gazeau, Disturbance of Adhesomes by Gold Nanoparticles Reveals a Size- and Cell Type-Bias, *Biomater. Sci.*, 2018, **7**(1), 389–408, DOI: 10.1039/C8BM01267A.
- 39 K.-P. Fang, J.-L. Zhang, Y.-H. Ren and Y.-B. Qian, Talin-1 Correlates with Reduced Invasion and Migration in Human Hepatocellular Carcinoma Cells, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2014, **15**(6), 2655–2661, DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.6.2655.
- 40 C. M. Kraning-Rush, J. P. Califano and C. A. Reinhart-King, Cellular Traction Stresses Increase with Increasing Metastatic Potential, *PLoS One*, 2012, **7**(2), e32572, DOI: 10.1371/journal.pone.0032572.
- 41 S. V. Plotnikov, B. Sabass, U. S. Schwarz and C. M. Waterman, High-Resolution Traction Force Microscopy, *Methods Cell Biol.*, 2014, **123**, 367–394, DOI: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00020-3.
- 42 K. Tanner, Perspective: The Role of Mechanobiology in the Etiology of Brain Metastasis, *APL Bioeng.*, 2018, **2**(3), 031801, DOI: 10.1063/1.5024394.
- 43 C. Y. Tay, P. Cai, M. I. Setyawati, W. Fang, L. P. Tan, C. H. L. Hong, X. Chen and D. T. Leong, Nanoparticles Strengthen Intracellular Tension and Retard Cellular Migration, *Nano Lett.*, 2014, **14**(1), 83–88, DOI: 10.1021/nl4032549.
- 44 M. Osswald, E. Jung, F. Sahm, G. Solecki, V. Venkataramani, J. Blaes, S. Weil, H. Horstmann, B. Wiestler, M. Syed, L. Huang, M. Ratliff, K. Karimian Jazi, F. T. Kurz, T. Schmenger, D. Lemke, M. Gömmel, M. Pauli, Y. Liao, P. Häring, S. Pusch, V. Herl, C. Steinhäuser, D. Krunic, M. Jarahian, H. Miletic, A. S. Berghoff, O. Griesbeck, G. Kalamakis, O. Garaschuk, M. Preusser, S. Weiss, H. Liu, S. Heiland, M. Platten, P. E. Huber, T. Kuner, A. von Deimling, W. Wick and F. Winkler, Brain Tumour Cells Interconnect to a Functional and Resistant Network, *Nature*, 2015, **528**(7580), 93–98, DOI: 10.1038/nature16071.
- 45 S. Weil, M. Osswald, G. Solecki, J. Grosch, E. Jung, D. Lemke, M. Ratliff, D. Hänggi, W. Wick and F. Winkler,





- Tumor Microtubes Convey Resistance to Surgical Lesions and Chemotherapy in Gliomas, *Neuro-Oncology*, 2017, **19**(10), 1316–1326, DOI: 10.1093/neuonc/nox070.
- 46 P.-J. Debouttière, S. Roux, F. Vocanson, C. Billotey, O. Beuf, A. Favre-Réguillon, Y. Lin, S. Pellet-Rostaing, R. Lamartine, P. Perriat and O. Tillement, Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, *Adv. Funct. Mater.*, 2006, **16**(18), 2330–2339, DOI: 10.1002/adfm.200600242.
  - 47 C. Alric, J. Taleb, G. Le Duc, C. Mandon, C. Billotey, A. Le Meur-Herland, T. Brochard, F. Vocanson, M. Janier, P. Perriat, S. Roux and O. Tillement, Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-Ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**(18), 5908–5915, DOI: 10.1021/ja078176p.
  - 48 J.-G. Schloetel, J. Heine, A. F. Cowman and M. Pasternak, Guided STED Nanoscopy Enables Super-Resolution Imaging of Blood Stage Malaria Parasites, *Sci. Rep.*, 2019, **9**(1), 4674, DOI: 10.1038/s41598-019-40718-z.
  - 49 L. Theret, A. Jeanne, B. Langlois, C. Hachet, M. David, M. Khrestchatisky, J. Devy, E. Hervé, S. Almagro and S. Dedieu, Identification of LRP-1 as an Endocytosis and Recycling Receptor for  $\beta$ 1-Integrin in Thyroid Cancer Cells, *Oncotarget*, 2017, **8**(45), 78614–78632, DOI: 10.18632/oncotarget.20201.
  - 50 Y. Huang, C. Schell, T. B. Huber, A. N. Şimşek, N. Hersch, R. Merkel, G. Gompper and B. Sabass, Traction Force Microscopy with Optimized Regularization and Automated Bayesian Parameter Selection for Comparing Cells, *Sci. Rep.*, 2019, **9**(1), 539, DOI: 10.1038/s41598-018-36896-x.
  - 51 T. Yeung, P. C. Georges, L. A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver and P. A. Janmey, Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure, and Adhesion, *Cell Motil.*, 2005, **60**(1), 24–34, DOI: 10.1002/cm.20041.
  - 52 S. Munthe, M. D. Sørensen, M. Thomassen, M. Burton, T. A. Kruse, J. D. Lathia, F. R. Poulsen and B. W. Kristensen, Migrating Glioma Cells Express Stem Cell Markers and Give Rise to New Tumors upon Xenografting, *J. Neuro-Oncol.*, 2016, **130**(1), 53–62, DOI: 10.1007/s11060-016-2221-y.
  - 53 M. L. Broekman, S. L. N. Maas, E. R. Abels, T. R. Mempel, A. M. Krichevsky and X. O. Breakefield, Multidimensional Communication in the Microenvirons of Glioblastoma, *Nat. Rev. Neurol.*, 2018, **14**(8), 482–495, DOI: 10.1038/s41582-018-0025-8.
  - 54 A. Vollmann-Zwerenz, V. Leidgens, G. Feliciello, C. A. Klein and P. Hau, Tumor Cell Invasion in Glioblastoma, *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, **21**(6), 1932, DOI: 10.3390/ijms21061932.



# Biomaterials

## Radiosensitization with gadolinium chelate-coated gold nanoparticles prevents aggressiveness and recurrence in glioblastoma.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	jbmt60643
<b>Article Type:</b>	FLA Original Research
<b>Keywords:</b>	Gold nanoparticles, Radiotherapy, Brain tumor, tumor cell invasion, tumor recurrence
<b>Corresponding Author:</b>	Sophie Pinel, M.Pharm Ph.D Universite de Lorraine FRANCE
<b>First Author:</b>	Maxime durand, Ph.D
<b>Order of Authors:</b>	Maxime durand, Ph.D Alicia Chateau, M.Sc Justine Jubreaux, B.Sc Jérôme Devy, Ph.D Héna Paquot, Ph.D Gautier Laurent, Ph.D Rana Bazzi, Ph.D Stéphane Roux, Ph.D Nicolas Richet, Ph.D Aurélie Reinhard-Ruch, Ph.D Pascal Chastagner, M.D Ph.D Sophie Pinel, M.Pharm Ph.D
<b>Abstract:</b>	<p>This study aimed to evaluate the radiosensitising potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles when combined with conventional external X-ray irradiation (RT) to treat GBM. Using complementary biological models, the impact of treatments including Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles and/or RT (10 Gy single dose; 5 x 2 Gy or 2 x 5 Gy) on U87 glioma cells was evaluated. The main tumor mass and the area of tumor extension were considered.</p> <p>In vitro clonogenic assays showed that Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles exerted a radiosensitising effect on U87 cells, and the combined treatment "RT 2 x 5 Gy + Au@DTDTPA(Gd)" appeared beneficial in vivo compared to RT alone. Invasion assays showed that irradiation alone tended to increase invasion distance, while the combined treatments were able to significantly reduce tumor invasion. Monitoring of U87-GFP tumor progression using organotypic cultures or intracerebral grafts confirmed the anti-invasive effect of Au@DTDTPA(Gd) on irradiated spheroids. Most importantly, the combination of Au@DTDTPA(Gd) with irradiation drastically reduced the number, the viability and the aggressiveness of tumor cells able to escape from U87 spheroids. Notably, the combined treatments significantly reduced the proportion of escaped cells with stem-like features, that could lead to recurrence. Hence, Au@DTDTPA(Gd)-enhanced radiotherapy opens up interesting perspectives for glioblastoma treatment.</p>



Sophie PINEL, Associated Professor  
Département BioSiS  
Campus Brabois Santé  
9 avenue de la Forêt de Haye BP 184  
54500 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex  
FRANCE  
[sophie.pinel@univ-lorraine.fr](mailto:sophie.pinel@univ-lorraine.fr)

Nancy, 14th April, 2022

Dear Editor,

Enclosed, please find a manuscript entitled “**Radiosensitization with gadolinium chelate-coated gold nanoparticles prevents aggressiveness and recurrence in glioblastoma**” by Maxime Durand, Alicia Chateau, Justine Jubréaux et al. which we would like to be considered for publication in *BIOMATERIALS*.

In accordance with your journal’s scope, the present study deals with original biomaterials, namely ultrasmall gadolinium chelate-coated gold nanoparticles, to improve conventional X-rays radiotherapy, for the treatment of brain tumors. To evaluate the radiosensitizing potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles, our work explores for the first time the infiltrative component of the tumor in addition to the tumor mass. Our findings are particularly interesting because they reveal that the attractive potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles goes beyond their role of « physical radiation dose enhancer». Indeed, exposure to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles prior to irradiation reduced the aggressiveness of glioblastoma cells, notably by decreasing the number and viability of invasive/infiltrating tumor cells, and altering their ability to give rise new tumor spheres, reflecting tumor recurrence. The strength of our work is to rely on various complementary biological models for our demonstrations. The publication of these results is of the utmost importance as they provide additional evidence in favor of the use of our gold nanoparticles in the treatment of brain tumors.

This study has not been previously submitted in any language anywhere and it is not under simultaneous consideration by another journal.

Thanking you for the consideration you will give to this manuscript.

Yours sincerely,

Sophie PINEL

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'S. Pinel', is placed below the printed name.



UNIVERSITÉ  
DE LORRAINE

CRAN UMR 7039

CAMPUS SCIENCES - BP 70239 - 54506 Vandœuvre-lès-Nancy - Cedex  
Tél. : + 33 (0)383684419 - Fax : + 33 (0)383684437  
E-mail : [cran-secretariat@univ-lorraine.fr](mailto:cran-secretariat@univ-lorraine.fr) - Web : [www.cran.univ-lorraine.fr](http://www.cran.univ-lorraine.fr)

## TITLE

**RADIOSENSITIZATION WITH GADOLINIUM CHELATE-COATED GOLD NANOPARTICLES PREVENTS AGGRESSIVENESS AND RECURRENCE IN GLIOBLASTOMA.**

## Authors

Maxime DURAND<sup>1</sup>, Alicia CHATEAU<sup>1\*</sup>, Justine JUBREAU<sup>1\*</sup>, Jérôme DEVY<sup>2</sup>, Héna PAQUOT<sup>1</sup>, Gautier LAURENT<sup>3</sup>, Rana BAZZI<sup>3</sup>, Stéphane ROUX<sup>3</sup>, Nicolas RICHT<sup>4</sup>, Aurélie REINHARD-RUCH<sup>1</sup>, Pascal CHASTAGNER<sup>1,5</sup>, Sophie PINEL<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup>Université de Reims-Champagne-Ardenne, UMR CNRS/URCA 7369, MEDyC, F-51100 Reims, France

<sup>3</sup>Université Bourgogne Franche-Comté, UMR 6213 CNRS-UBFC, UTINAM, F-25000 Besançon, France

<sup>4</sup>Université de Reims-Champagne-Ardenne, Plateau Technique Mobile de Cytométrie Environnementale MOBICYTE Mobicycle, F-51100 Reims, France

<sup>5</sup>CHRU de Nancy, Hôpital d'enfants - Brabois, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

\*These authors contributed equally

## †Corresponding authors

Sophie Pinel: [sophie.pinel@univ-lorraine.fr](mailto:sophie.pinel@univ-lorraine.fr)

## Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

## Author contributions

M. DURAND & A. CHATEAU: *in vitro* biological experiments and data analysis.

J. JUBREAU, H. PAQUOT & A. REINHARD-RUCH: *in vivo* experiments.

G. LAURENT, R. BAZZI & S. ROUX: Synthesis and characterization of nanoparticles.

J. DEVY: scientific discussions and experimental data analysis.

N. RICHT: RNA extraction, gene expression & data analysis

P. CHASTAGNER & S. PINEL: project management and coordination, data analysis and manuscript redaction.

[Click here to view linked References](#)

## TITLE

**RADIOSENSITIZATION WITH GADOLINIUM CHELATE-COATED GOLD NANOPARTICLES PREVENTS AGGRESSIVENESS AND RECURRENCE IN GLIOBLASTOMA.**

## Authors

Maxime DURAND<sup>1</sup>, Alicia CHATEAU<sup>1\*</sup>, Justine JUBREAU<sup>1\*</sup>, Jérôme DEVY<sup>2</sup>, Héma PAQUOT<sup>1</sup>, Gautier LAURENT<sup>3</sup>, Rana BAZZI<sup>3</sup>, Stéphane ROUX<sup>3</sup>, Nicolas RICHET<sup>4</sup>, Aurélie REINHARD-RUCH<sup>1</sup>, Pascal CHASTAGNER<sup>1,5</sup>, Sophie PINEL<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Université de Lorraine, CNRS, CRAN, F-54000 Nancy, France

<sup>2</sup>Université de Reims-Champagne-Ardenne, UMR CNRS/URCA 7369, MEDyC, F-51100 Reims, France

<sup>3</sup>Université Bourgogne Franche-Comté, UMR 6213 CNRS-UBFC, UTINAM, F-25000 Besançon, France

<sup>4</sup>Université de Reims-Champagne-Ardenne, Plateau Technique Mobile de Cytométrie Environnementale MOBICYTE Mobicyte, F-51100 Reims, France

<sup>5</sup>CHRU de Nancy, Hôpital d'enfants - Brabois, F-54500 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

\*These authors contributed equally

## †Corresponding authors

Sophie Pinel: [sophie.pinel@univ-lorraine.fr](mailto:sophie.pinel@univ-lorraine.fr)

## Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

## Author contributions

M. DURAND & A. CHATEAU: *in vitro* biological experiments and data analysis.

J. JUBREAU, H. PAQUOT & A. REINHARD-RUCH: *in vivo* experiments.

G. LAURENT, R. BAZZI & S. ROUX: Synthesis and characterization of nanoparticles.

J. DEVY: scientific discussions and experimental data analysis.

N. RICHET: RNA extraction, gene expression & data analysis

P. CHASTAGNER & S. PINEL: project management and coordination, data analysis and manuscript redaction.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the radiosensitising potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles when combined with conventional external X-ray irradiation (RT) to treat GBM. Using complementary biological models, the impact of treatments including Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles and/or RT (10 Gy single dose; 5 x 2 Gy or 2 x 5 Gy) on U87 glioma cells was evaluated. The main tumor mass and the area of tumor extension were considered.

*In vitro* clonogenic assays showed that Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles exerted a radiosensitising effect on U87 cells, and the combined treatment “RT 2 x 5 Gy + Au@DTDTPA(Gd)” appeared beneficial *in vivo* compared to RT alone. Invasion assays showed that irradiation alone tended to increase invasion distance, while the combined treatments were able to significantly reduce tumor invasion. Monitoring of U87-GFP tumor progression using organotypic cultures or intracerebral grafts confirmed the anti-invasive effect of Au@DTDTPA(Gd) on irradiated spheroids. Most importantly, the combination of Au@DTDTPA(Gd) with irradiation drastically reduced the number, the viability and the aggressiveness of tumor cells able to escape from U87 spheroids. Notably, the combined treatments significantly reduced the proportion of escaped cells with stem-like features, that could lead to recurrence. Hence, Au@DTDTPA(Gd)-enhanced radiotherapy opens up interesting perspectives for glioblastoma treatment.

## KEYWORDS

Gold nanoparticles, Radiotherapy, Brain tumor, tumor cell invasion, tumor recurrence



## INTRODUCTION

Glioblastoma (GBM), the most common and aggressive brain malignancy in adults, is treated using a multimodal treatment including maximal safe surgical resection to the extent feasible, followed by radiation therapy with concomitant and adjuvant temozolomide-based chemotherapy. The major obstacle to a cure is diffuse invasion. Indeed, GBM is characterized by an invasive phenotype, which enables tumor cells to invade healthy brain and migrate along existing brain structures, including blood vessels, white matter tracts and meninges<sup>1</sup>. The highly migratory capability of these tumor cells is thought to be responsible for the short overall survival of GBM patients, since infiltrative cells escape treatments, notably from cytoreductive surgery, and may lead to recurrence. More worrying, several experimental converging clues suggest that migration/invasion abilities of glioblastoma cells could be enhanced by conventional irradiation<sup>2</sup>. For example, Wank et al. have reported that 8 out of 10 glioblastoma cell lines (7 patient-derived primary GBM and 3 established cell lines) exhibited increased invasiveness after low-LET photon irradiation<sup>3</sup>. Although the underlying mechanisms remain unclear, ionizing radiation can trigger direct and indirect cellular reprogramming, promoting invasive behavior<sup>2,4</sup>.

Over the past decades, major research efforts have been made to develop radiosensitizers in order to improve tumor cells death whilst minimizing side effects in normal tissue, relying on different mechanisms of sensitization<sup>5,6</sup> (e.g. targeting tumor hypoxia, modulation of cell signalling, targeting DNA repair...). Among the more recent innovations, hafnium-based nanoparticles have recently been approved in Europe as radioenhancers for the treatment of locally advanced soft tissue sarcoma ([NBTXR3](#), [Hensify®](#), [Nanobiotix](#)) and several other metal-based nanoparticles are under investigation to treat radioresistant cancer including brain tumors<sup>7</sup>. Indeed, high atomic element (Z) nanomaterials such as gold (Z=79) and gadolinium (Z=64) have gained widespread attention as dose enhancer in radiotherapy, due to their strong attenuation of photons, and ability to increase the local deposition of radiation<sup>8–12</sup>. Although the radiosensitization effect of metal-based nanomaterials was initially attributed to this physical mechanism, an increasing number of studies challenge this mechanistic hypothesis and evidence the importance of chemical and biological contributions<sup>13</sup>. In particular, metal-based nanoparticles can favor the production of reactive oxygen species into cell, induce DNA double strand breaks formation<sup>14</sup> or affect cell adhesion<sup>15</sup> or invasion<sup>16</sup>.

In this context, Roux *et al.* have developed the Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles, which are ultrasmall polyaminocarboxylate-coated gold nanoparticles, then labelled with Gd<sup>3+</sup> ions<sup>17</sup>. These nanoparticles exhibit a promising potential for MRI-guided radiotherapy<sup>18</sup>. Indeed, previous work has shown that Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles behaved as positive contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI) and were able to improve the radioresponse of an intracranial 9L gliosarcoma model when the xenograft-bearing rats were treated with microbeam radiotherapy (MRT). MRT is a novel radiotherapy method based

on a spatial fractionation of synchrotron-generated X-ray beams, allowing to deliver high-dose of irradiation at a very high rate with high-precision.

For further investigation, the present study aims at evaluating the radiosensitizing potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles when combined with more commonly used X-ray irradiation and closer to clinical treatments. Given the risk of radiation-induced invasiveness, we have not only explored the effects of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on the main tumor mass but also focused on the area of tumor extension. To answer this question, we have implemented complementary biological models (2D or 3D cell cultures, organotypic brain slice culture, orthotopic xenografts under chronic cranial windows...) and assessed the impact of combined treatments Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles + RT on tumor progression considering various irradiation regimens. In an original way, we were interested in tumor cells able to escape from the main tumor mass and infiltrate the healthy tissue in the context of irradiated tumors.

## MATERIALS AND METHODS

### *Cell culture*

The human primary glioblastoma cell line U87 (ATCC® HTB-14™, LGC Standard, France) was grown in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.4% L-asparagine, 0.36% L-serine, 1% L-glutamine, 1% essential amino acids, 0.5% non-essential amino acids, 0.4% vitamins, 1.25% sodium pyruvate, and 1% penicillin–streptomycin. Cells were maintained in monolayers in a tissue culture incubator at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub> 95% air atmosphere and were subcultured twice a week. DMEM, amino acids, vitamins, and antibiotics were purchased from Gibco/Life Technologies (France), while other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Cell counting was performed using a TC20™ automated cell counter (Bio-Rad, France) and viability assessment was determined using Trypan blue exclusion assay.

### *Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles*

Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles were synthesized and characterized as previously described in our published work<sup>19</sup>. For a typical preparation of gold nanoparticles, HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O (200 mg, 51x10<sup>-5</sup> mol) was placed in a 250 mL round-bottom flask and was dissolved with methanol (60 mL). In another flask, DTDTPA (256 mg, 50x10<sup>-5</sup> mol), water (40 mL) and acetic acid (2 mL) were mixed. This solution containing DTDTPA was added to the gold salt solution under stirring. The mixture turned from yellow to orange. NaBH<sub>4</sub> (195 mg, 515x10<sup>-5</sup> mole) dissolved in water (13.2 mL) was added to the solution containing gold salt and DTDTPA under stirring at room temperature. At the beginning of the NaBH<sub>4</sub> addition, the solution first became dark brown then a black flocculate appeared. The vigorous stirring was maintained for 1h before adding aqueous hydrochloric acid solution (2 mL, 1 M). After the partial removal of the solvent under reduced pressure the precipitate was retained on the polymer membrane and washed thoroughly and successively with 0.1 M hydrochloric acid, water and acetone. The resulting black powder was dried (up to 200 mg of dry powder of Au@DTDTPA) and dispersed in aqueous solution of sodium hydroxide (NaOH 0.01 M) to have a final concentration of 50 mM in gold.

The labeling by gadolinium ions is performed through the addition of GdCl<sub>3</sub> to colloidal solution under stirring at room temperature. For a final gold concentration of 45 – 50 mM, the gadolinium concentration is 5 mM.

### *Radiotherapy*

Radiotherapy treatments were delivered using an X-Rad 320 (Precision X-Ray, USA) pre-clinical cabinet irradiator devoted to the irradiation of cell cultures and small animals in research. *In vitro* irradiation was performed using 160 kV energy X photon beams while *in vivo* irradiation used 320 kV energy X photon beams. The dose rate was 2 Gy/min. Various radiotherapy schedules were applied. For clonogenic assays,

2D cell cultures were irradiated at 2, 4, 6, or 10 Gy monodose. Irradiated spheroids received a total dose of 10 Gy, delivered either as a single dose of 2, 5 or 10 Gy at T8 or 5 fractions of 2 Gy (one fraction per day at T8, T9, T10, T11, T12) or 2 fractions of 5 Gy (at T8 and T11).

#### *Clonogenic assays*

As previously described<sup>20</sup>,  $1 \times 10^5$  U87 cells were plated in 25 cm<sup>2</sup> culture dish. Seventy-two hours after seeding, cells were incubated without or with Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles (5 mM for 24h), washed twice with HBSS and then irradiated at different doses (0, 2, 4, 6, 10 Gy) in fresh culture medium. A total of  $10^4$  cells were plated in soft-agar in 6-well plates and incubated for 12 days à 37°C 5% CO<sub>2</sub>. For improved contrast, surviving colonies were stained with 1 ml of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] solution (1 mg/ml) and counted using GelCount™ device (Oxford Optronix, Abingdon, UK). Only colonies containing at least 50 cells were considered. Measurements were performed in triplicate, experiments were repeated five times. Results of clonogenic assays were plotted as survival curves showing the fraction of surviving cells as a function of the dose of ionizing radiation. The experimental data were fitted to a linear quadratic model, according to the equation  $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$  (with SF being the Survival Fraction, D the dose of radiations in Gy and  $\alpha$ ,  $\beta$  radiobiological curve fitting factors, respectively). Dose modifying factor (DMF) was calculated for an isoeffect corresponding to SF = 75%.

#### *Experimental process for obtaining spheroids culture and escaped/invading cells.*

**Suppl. Meth. 1** summarizes the experimental process used to generate U87 or U87-GFP spheroids and escaped/invading cells. Briefly,  $5 \times 10^5$  cells were plated in 75 cm<sup>2</sup> flasks previously coated with hydrophobic poly(2-hydroxyethyl methacrylate) to prevent cell adhesion. Three days later, small cell clusters were harvested and placed in a spinner culture flask (T0) with magnetic stirring for 7 days to allow the spheroids to grow. On the seventh day (T7), the spheroid suspension was filtered through 380 and 520  $\mu$ m nylon mesh filters in order to collect spheroids of homogeneous size (~400–500  $\mu$ m). After filtration, spheroids were seeded (i) in low-attachment 6-well plates to limit cell adhesion at a rate of 15 spheroids per well for most of experiments or (ii) in Labtek II™ 8 wells at a rate of 3 spheroids per well for immunocytochemistry. For the nanoparticles-treated groups, the spheroids were exposed to 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles for 24 hours. At T8, the culture medium containing Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles was removed and, after gentle washing with HBSS, replaced with fresh culture medium. For the radiotherapy-receiving groups, the spheroids were treated on T8 or between T8 and T12 according to the irradiation schedule delivered (single dose vs fractionated irradiation). Meanwhile, under all conditions, many tumor cells escaped from the main tumor mass and adhered to the bottom of the flasks: we defined these as "escaped cells" or "invading cells". For most of experiments, the spheroids were

1  
2  
3  
4 harvested at T13, while the “invading cells” were left in culture for a further 48 hours. At T15, the escaped  
5 cells were photographed using a transmitted light microscope (Nikon DIAPHOT 300 equipped with a Nikon  
6 Digital sight-DS-Fi1 camera; 40X magnification) before being harvested by trypsinization (trypsin with  
7 0.05% EDTA ( $\text{v/v}$ )) for further assays.  
8  
9

### 10 11 12 *Effect of treatments on spheroids' size* 13

14 After filtration, spheroids ( $\sim 400\text{--}500\text{ }\mu\text{m}$ ) were exposed to 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles for 24  
15 hours. At T8, after gentle washing with HBSS, the spheroids received a 10 Gy monodose of X-ray radiation.  
16 Subsequently, the U87 spheroids were transferred and seeded individually into 96-well plates, previously  
17 coated with hydrophobic poly(2-hydroxyethyl methacrylate). On the day of seeding and 8 days later, each  
18 spheroid was imaged with the GelCount™ device allowing us to determine the volume of spheroids.  
19  
20  
21

### 22 23 *Conventional 3D invasion assays* 24

25 Conventional 3D invasion assays have been carried out to determine the impact of radiotherapy on  
26 invasiveness properties of tumors, in presence or absence of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles. The  
27 influence of the X-photon dose and the influence of the fractionation regimen were assessed ([Suppl Meth.](#)  
28 [1](#)). To evaluate the “dose effect”, irradiated U87 spheroids received a single dose of 2 Gy, 5 Gy or 10 Gy at  
29 T8 and untreated or treated spheroids were harvested, just after treatment. To evaluate the “fractionation  
30 effect”, we compared 3 schedules of irradiation at the total dose of 10 Gy: between T8 and T12, U87  
31 spheroids were irradiated either at 10 Gy-monodose, with 2 fractions of 5 Gy (2 X 5 Gy) or with 5 fractions  
32 of 2 Gy (5 X 2 Gy) and untreated or treated U87 spheroids were recovered at T13. Conventional 3D invasion  
33 assays were performed and analysed as previously described<sup>19</sup> ([Suppl Meth. 2](#)). Briefly, each spheroid was  
34 placed into individual well of 96-well plate and then embedded with 100  $\mu\text{L}$  of a mix of Matrigel® and  
35 hyaluronic acid (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Spheroids were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 4  
36 days, allowing invasion and migration processes to take place. For improved contrast, viable cells of the  
37 tumor core and invasion area were stained with thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT 1 mg/mL).  
38 Invasion was imaged using the GelCount® device (Oxford Optronix, UK) and quantified with ImageJ  
39 software: the total area of invasion (manual yellow delineation) and the core area (white delineation) as  
40 well as the invasion distance ( $\mu\text{m}$ ) were determined.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

### 51 *Organotypic brain slice cultures* 52

53 The model of organotypic brain slice culture was adapted from the previously published protocols<sup>21</sup>. Six–  
54 eight-week-old nude mice were euthanized and the brain was isolated. After removing the cerebellum  
55 with a scalpel, the brain was transferred to the vibratome (Leica VT1200 S) platform and immediately fixed  
56 to this device by applying a drop of superglue. The device was adjusted and the brain was placed facing  
57 the blade, in order to obtain 400  $\mu\text{m}$  thick coronal slices with a maximal speed of 0.2 mm/s. At least 6 slices  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

from each brain were collected and each one was positioned on interface-style Millicell culture inserts (Millipore, France) in 6 well culture plates containing 1 mL of sterile slice culture medium. The brain slice medium is composed of 50% DMEM, 25% HBSS, 25% heat-inactivated horse serum, 1 mM L- glutamine, 100 U/ml penicillin/streptomycin. Brain slices were incubated at 37°C and the culture medium was changed from the bottom of each well every 2 days. Brain slices were prepared 48h before tumor implantation. At T8, the brain slices were breached with a 21G hypodermic needle and untreated or treated U87-GFP spheroids were deposited into the breaches using a pipet (defining the day of spheroid implantation Di). The organotypic brain slices cultures were maintained for at least 12 days.

### *Mitotic catastrophe detection*

After harvesting, counting, and assessing the viability of escaped cells from U87 spheroids (at T15), cells were cytocentrifuged at a concentration of  $2.5 \times 10^4$  cells per slide for 1 minute at 500 rpm (Sakura, AutoSmear CF-12DE). The cells were then fixed in 10% neutral buffered formalin for 30 minutes. The slides were rinsed with PBS once. The slides were then stained with hematoxylin/eosin for visualization of nuclei. A mounting solution was deposited on the slides for histological staining preservation (Eukitt®). Snapshots of the slides were obtained at x10 magnification using an optical microscope (Nikon, DIAPHOT 300) equipped with a camera (Nikon, Digital sight-DS-Fi1). Ten pictures per slide were taken for data processing.

### *Immunocytofluorescence*

At T15, escaped cells in Labtek™ II 8 wells were fixed with 4% (v/v) PFA for 30 minutes and then gently washed once with PBS. Cells were permeabilized with 0.1% (v/v) Triton-X-100 diluted in PBS for 10 minutes. The cells were gently rinsed for 5 minutes with PBS. Cells were saturated in 2% (w/v) BSA solution diluted in PBS for 1 hour. 150 µl of anti-connexin 43 primary antibody (rabbit polyclonal IgG, C6219, Sigma; dilution 1:400 in 2% PBS-BSA) was gently deposited into Labtek™ II wells. The antibody was incubated at 4°C overnight. The next day, slides were washed with PBS (3 times for 5 minutes). The Fc part of the primary antibody was detected with an Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibody (Goat IgG anti-Rabbit IgG, Interchim, FP-SD5000; dilution 1:400 in 2% PBS-BSA). F-Actin was detected with Alexafluor-488-conjugated phalloidin (Ab176753, Abcam; dilution 1:1000 in 2% PBS-BSA). In practice, 150 µl of a mixed solution containing the Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibody and the Alexafluor-488-conjugated phalloidin was deposited in Labtek II wells for 1 hour in the dark, at room temperature. The cells were then rinsed for 5 minutes with PBS, 3 times. Nuclei were counterstained with Hoechst 33432 (Thermo Scientific, 62249; dilution 1:1000 in PBS) for 15 minutes. Cells were rinsed once with PBS and then a solution against photobleaching (Ibidi, 50001) was applied before slide-lamellar mounting. Phalloidin and secondary antibody fluorescence was analyzed using an ImageXpress® Micro Confocal instrument with a 10x and 20x APO Plan objective and MetaXpress software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Acquisitions were



performed by exciting Alexafluor 488 and Alexafluor 555. The emitted fluorescence was detected in the appropriate wavelength window. Ten images were captured with a 0.2 µm z-step.

### *Zymography*

For these experiments, after spheroid withdrawal at T13, culture medium of invading cells was replaced by reduced serum media (Opti-MEM I reduced serum medium, no phenol red, Gibco). Supernatants from the escaped cells were collected at T15 on ice and centrifuged at 300G for 10 minutes at 4°C to remove cell debris. The quantification of the secreted proteins in the supernatants was performed by colorimetric assay using Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, France). 4 µg of proteins were respectively deposited in a 10% polyacrylamide gel with 1% porcine gelatin (Sigma Aldrich, France). Proteins migrated for two hours at 4°C. Gelatinases were reactivated in a pH 7.6 buffer for 24 hours at 37°C. After staining with 0.2% Coomassie Blue (Thermo Fisher Scientific, France) for at least 15 min, MMP activity was revealed using a Doc XR+ Gel (Bio Rad, France). Densitometric quantification of the bands was performed with ImageJ software.

### *Neurosphere assays*

After recovery by trypsinisation, escaped cells were seeded at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells per well in low-attachment 6-well plates. For neurosphere assays, the serum-free culture medium used was a DMEM-F12 medium containing 0.001% insulin (v/v), 1% penicillin/Streptomycin (v/v), 2% B27 reagent (v/v), 1% N2 reagent (v/v), 0.002% EGF (v/v), and 0.002%  $\beta$  FGF (v/v). Plates were placed at 37°C under a humid atmosphere diffusing 5% CO<sub>2</sub> for 4 days. At the end of experiments, for improved contrast, the formed floating neurospheres were stained by addition of 1 mL of MTT at a concentration of 1 mg/mL and incubated for 3 hours before revelation with the GelCount™ device (Oxford, Optronix). GelCount™ software was used to count neurosphere and measure neurosphere size.

### *Analysis of Gene Expression by RT-qPCR*

RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described in [Suppl Meth. 3](#). Among the 5 reference genes selected, GAPDH and RPL32 were identified as the most stable genes according RefFinder web-tool (Xie et al, 2012). The list of reference and targeted genes is given in [Suppl Meth. 3](#). Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed with qPCR BIO SyGreen Blue Mix according to manufacturer instructions (PCRBIOSYSTEMS), in a Biorad CFX96 Touch thermocycler using the Bio-Rad CFX Maestro 2.3 software. Relative gene expression was calculated using the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method<sup>22</sup>.

### *In vivo experiments*

The *in vivo* experiments were performed in the institution EU 0393 CRAN UMR 7039 (approval number D54-547-03). The experiments were performed on 6-week-old female homozygous *BALB/cAnNRj-Foxn1nu*

nude mice (20-25 g in weight) (Janvier Lab, France). After evaluation by the “Comité d’Ethique Lorrain en Matière d’Expérimentation Animale” (CELMEA, C2EA-66), these experimental protocols have received the necessary ministerial authorisations (APAFIS numbers: 4776-2016040118263024. v4 and 14597-2018040722467360.v7) certifying that the housing conditions, the experiments and the surgical techniques implemented were in accordance with the ethics and legislation in force. All experiments (surgery, intravital microscopy observation, radiotherapy treatment) were performed on anaesthetised animals. Anaesthesia consisted of an intraperitoneal injection (5 µL/g body weight) of a mixture of ketamine (90 mg/kg, Imalgen 500, Merial, France) and xylazine (8 mg/kg, Rompun 2%, Bayer Health Care, France) diluted in water for injection.

**Chronic cranial window model.** The chronic cranial window model (Suppl Meth. 4) is a model adapted from the previously published protocols that allows for longitudinal following of intracerebral tumor progression<sup>23–25</sup>. After anaesthesia, the mice were placed on a heating blanket and secured in a stereotaxic frame. A sterile ointment is applied to the eyes to prevent keratitis and the surgical site was cleaned by 0.2% chlorhexidine solution. A subcutaneous injection of 50 µL of 2% xylocaine was performed at the surgical site. To prevent the formation of cerebral oedema after surgery, an intramuscular administration of dexamethasone (20 µL of a 2 mg/mL solution) was performed in the quadriceps. An incision (half circle of about 1 cm<sup>2</sup>) was carefully made over the skin of the right hemisphere and a skin flap as well as the periosteum were gently removed. Using a microdrill (Foredom®, MH 150, Phymep, France), a craniotomy corresponding to a circle of approximately 4 mm in diameter between the bregma, sagittal and lambdoid sutures was performed through careful drilling. The dura mater was quickly removed with fine forceps. In the centre of the trepanning area, a breach was created within the cortex near a vascular network. A U87-GFP spheroid, approximately 450 µm in diameter, was deposited into the breach. For *in vivo* evaluation of treatment efficacy, we grafted U87-GFP spheroids immediately after filtration (*i.e.* T7 of the spheroid process) whereas to study U87 tumor invasion after treatments, U87-GFP spheroids were treated *in vitro* prior to *in vivo* implantation (*i.e.* T8 of the spheroid process) (Suppl Meth. 5).

To sterilely seal the trepanning hole, the brain was covered with a sterile circular glass slide (diameter 5 mm) fixed with cyanoacrylate glue (Histoacryl®, Braun, Spain) and dental acrylic (Mega dur, Megadental, GmbH, Germany). The cyanoacrylate glue, applied to the peripheral skull and the edges of the flap, was used to seal the bone flap. A thin layer of dental acrylic was applied under the skin at the wound margins and also covering a small edge of the flap to strengthen fixation.

**Intravital microscopy.** A Nikon AZ100 fluorescence microscope (Nikon, France) was used for longitudinal monitoring spheroid viability, growth and progression. Acquisition of fluorescence signals was performed in the appropriate wavelength window: for GFP (Exc 395 nm/Em 504 nm) and Cy5 (Exc 650 nm/Em 670 nm). Three or five days after surgery, a first imaging was performed to check the good vascularization of

the spheroids, a prerequisite for their long-term viability. Intravital microscopy observations were repeated once a week.

***In vivo* evaluation of treatment efficacy.** [Suppl. Meth. 6](#) summarizes the experimental schedule used. Five days after spheroid implantation (Di), mice with well-vascularized tumor were randomly assigned to the different treatment groups and treatment was started, defining the D0 of the following. Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles were injected intravenously at a dose of 75 mg/kg from a 10 g/L solution. Radiotherapy-treated mice received a 2 X 5 Gy schedule (*i.e.* 5 Gy irradiation on D0 and D3). For the combined treatments, Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles were administered 10 min before the first irradiation fraction. Tumor volumes (V) were calculated from the recorded fluorescence images, according to the equation  $V = \frac{[d^2 \times D]}{2}$  where d and D represent the smallest and the largest diameter, respectively. Relative tumor volume was determined by dividing tumor volume on day X by tumor volume on D0.

### *Statistical analysis*

The Mann–Whitney *U* test was used to compare untreated and treated groups. A *P*-value less than 0.05 was considered as statistically significant. # : represents statistically significant difference between the RT groups *versus* Ctrl group. \* : represents statistically significant difference between Au@DTDTPA(Gd) group *versus* Ctrl group or between groups receiving combined treatment *versus* groups receiving irradiation alone.

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Radiosensitizing potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles.*

To assess the radiosensitizing effects of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles when combined with photon irradiation, a stepwise experimental approach from *in vitro* assays to *in vivo* studies was implemented to take into account the intrinsic properties of cancer cells alone and then in their microenvironment.

So, in a first time, the radiosensitizing potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles was evaluated *in vitro* by clonogenic assays on U87 glioblastoma cells. [Figure 1A](#) shows the radiation dose–response curves for U87 cells monolayers exposed or not to 5 mM of NPs for 24h: the proportion of surviving U87 cells irradiated at 2 Gy and 10 Gy was lower after exposure to gold nanoparticles (85% and 45%, respectively) than in the absence of gold nanoparticles (94% and 63%, respectively), and the dose modifying factor (DMF) reached 0.5.

In parallel, we have assessed the effects of the treatment combining RT (10 Gy monodose) and Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on 3D cell culture models and compared them to the control group (no RT, no nanoparticles), the group only exposed to the nanoparticles and to the group only submitted to RT ([Figure 1B](#)). Hence, the growth of U87 spheroids was monitored by optical microscopy for 1 week after treatments: our results showed that the volume of spheroids exposed to RT 10 Gy alone or to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles + 10 Gy irradiation was significantly reduced, as compared to untreated spheroids. Moreover, the spheroids receiving the combined treatment was significantly smaller than those treated by RT alone, suggesting that the exposure to nanoparticles was able to enhance the antitumor effect of X-ray irradiation. In a previous work, using the alkaline Comet assay, Miladi *et al.* showed that exposure to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles enhanced the amount of DNA damage in U87 cells submitted to <sup>137</sup>Cs-gamma radiation at two different doses (5 and 10 Gy)<sup>18</sup>. As DNA damage is the main cause of radiation-induced cell death, the radiosensitizing effect observed *in vitro* in our study may be the consequence of increased DNA damage.

These promising *in vitro* results led to *in vivo* testings in which we used an intracerebral xenograft model of U87-GFP spheroids under chronic cranial windows and a fractionated X-ray irradiation regimen (*i.e.* RT 2 X 5 Gy). As the radiosensitizing effect depends mainly on the accumulation of nanoparticles in the tumor tissue, we previously verified by intravital microscopy the presence of Cy5-labelled Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles<sup>26</sup> in the intracerebral tumour after *i.v.* injection ([Suppl Fig 1](#)).

The model of U87-GFP spheroid under the chronic cranial window was relevant to evaluate the radioresponse of brain tumors *in vivo*, because it allowed for long-term monitoring of tumor progression which could be performed for 30 days after randomization of the animals: based on the acquisition of fluorescence images, relative tumor volume (RTV) were determined and plotted as a function of time on [figure 1C](#) for each mouse in each therapeutic group. As compared to the exponential growth of untreated-

tumors, all treatments have slowed down tumor growth. So, mean RTV at D30 have reached 145 for NPs-treated tumors, 77 for RT-receiving mice and only 46 for tumors treated by RT+NPs, suggesting that combined treatments were more efficient to delay tumor growth than radiotherapy alone. Consistently, the median time for tumors to reach a RTV equal to 30 was 18.4 days for RT group vs 25.1 days for RT+NPs group (Table 1). In addition, the progression of RT-receiving tumors seemed more heterogenous than those of tumors treated by RT+NPs. For example, on D20, 5 out of 8 RT-treated mice exhibited RTV  $\geq 30$  while 0 out of 8 mice receiving combined treatment. In comparison to RT alone, the combined treatment RT+NPs seemed beneficial, even though the benefit was less marked than that reported by Miladi *et al.* with synchrotron-generated X-ray microbeams that allows for very high dose of irradiation at very high dose rate. Low dose rate of conventional X-rays irradiation was likely less favorable to physical interactions between ionizing radiations and gold nanoparticles, leading into less cellular damages.

Strikingly, the contouring of tumors and the volume determination appeared more difficult in RT-receiving mice, because of areas of tumor extension not so bright and more blurred than in other groups (Suppl. Fig 2). Several converging experimental clues suggest that therapeutic intervention such as irradiation might promote tumor cell invasion abilities<sup>27,28</sup>. We therefore wondered whether more diffuse progression occurs for RT-treated tumors with perhaps, more neoplastic cells infiltrating the peripheral regions of glioblastoma spheroid and we assessed the impact of nanoparticles exposure.

#### *Anti-invasive effects of Au@DTDTPA(Gd) on irradiated cells.*

To address the invasion of U87 cells after treatments, we have explored invasion properties using 3 distinct and complementary models based on spheroids: in the first one, untreated or treated U87 spheroids were embedded in a matrix composed of Matrigel® and hyaluronic acid, consistently with conventional “3D invasion assays”; the second model corresponded to organotypic brain slice cultures, allowing untreated or treated U87-GFP spheroids to grow *in vitro* into cerebral environment; and the third model consisted in implanting a U87-GFP spheroid after *in vitro* treatment into brain parenchyma of mice under a cranial window for intravital microscopy-based monitoring.

Conventional 3D invasion assays have been carried out to determine the impact of radiotherapy on invasiveness properties of tumors, in presence or absence of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles. The influence of the X-photon dose (2 Gy, 5 Gy or 10 Gy) (Figure 2A) and the influence of the fractionation regimen (10 Gy-monodose, vs 2 fractions of 5 Gy (2 X 5 Gy) vs 5 fractions of 2 Gy (5 X 2 Gy)) were assessed (Figure 2B). The surface of tumor cores was slightly impacted by irradiation whatever the dose and the regimen considered, as compared to control group. Unexpectedly, radiotherapy failed to reduce tumor cell invasion expressed as area or distance of invasion. Worse, the irradiation tended to increase the average surface or distance of invasion and the difference became statistically significant in particular for the 5 X 2 Gy regimen ( $793 \pm 126 \mu\text{m}$  vs CTRL  $525 \pm 144 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.0001$ ), which represents the usual clinical radiotherapy protocol. These results suggest that radiotherapy could stimulate invasion, especially for the

most unfavorable irradiation schedule, which is consistent with previously reported data<sup>2</sup>. While surface of spheroid's core was globally unchanged in groups receiving nanoparticles + irradiation (as compared to control group), measured surfaces or distances of invasion were in mean lower in RT+NP groups than in RT groups, suggesting that the combined treatments were efficient to interfere with glioblastoma cell invasiveness after irradiation. For example, the surface of invasion was only  $1.67 \pm 0.64 \text{ mm}^2$  when spheroids were treated by Au@DTDTPA(Gd) + 2 x 5 Gy irradiation while it reached  $2.42 \pm 0.67 \text{ mm}^2$  for 2 x 5 Gy irradiation alone ( $p=0.003$ ). These results are consistent with previous studies showing the reduction of cell migration of various carcinoma lines treated with gold nanoparticles in combination with 6 MV X-rays<sup>29,30</sup>.

As this conventional *in vitro* model limits the duration of monitoring, we attempted to confirm these results by implementing complementary approaches. When untreated- or 10 Gy-irradiated U87-GFP spheroids were grafted onto organotypic brain slices, the progression of fluorescent tumor cells in cerebral environment were followed over 12 days after implantation (Fig 2C). It is noteworthy that tumor progression comprises the growth of the central cores along with their infiltrating extensions. While the sole exposition of spheroids to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles did not lead into any change as compared to control group, 10 Gy-irradiated spheroids exhibited reduced tumor progression but diffuse infiltration was clearly noticeable. By contrast, pre-treatment by Au@DTDTPA(Gd) of 10 Gy-irradiated spheroids led into reduced infiltrating area.

To complete this, implantation of U87-GFP into the brain parenchyma under a cranial window allowed for a longer-term follow-up (Suppl Fig 3). Untreated spheroids and NPs-treated spheroids resulted in rapid growth of tumor mass, forcing the sacrifice of mice before day 30 of follow-up. In contrast, the *in vivo* environment revealed specific tumor behavior after radiation therapy. Ten Gy-irradiation induced a dramatic reduction of tumor mass until it almost disappeared but isolated tumor cells escaped from the tumor bulk and progressively disseminated into the brain parenchyma, causing disease symptoms (considered as end points implying euthanasia) after 75 days. When spheroids were treated by 10 Gy-irradiation plus Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles, the tumor cells disappeared, allowing the animals to remain alive until the end of the study (> 4 months). Taken together, our results confirmed the anti-invasive effects of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles and suggested that nanoparticles could prevent tumor cells from escaping from the main tumor mass and disseminating into normal brain parenchyma, which required further investigations.

#### *Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles reduced the number of invading tumor cells after irradiation.*

Next, *in vitro* experiments were conducted to focus on invading cells that have escaped from U87 spheroids. Cell count at T15 revealed that fifteen U87 spheroids give rise to  $1.59 \pm 0.27 \times 10^5$  invading tumor cells among which  $80.2 \pm 4.4 \%$  are viable cells (Figure 3A and 3B). These invading cells mainly



1  
2  
3  
4  
5 formed new clusters all over the culture well (*red arrows*), and clusters could be linked together by isolated  
6 cells that emitted membrane extensions (Fig 3C).

7  
8 For the irradiated spheroids, in addition to their slower growth, the number of invasive cells was  
9 significantly reduced as compared to control group, although the rate of inhibition depended on the  
10 treatment regimen. Not surprisingly, the single-dose schedule was the most effective in limiting tumor cell  
11 invasiveness. Indeed, the 10 Gy monodose treatment divided the number of invasive cells by a factor of  
12 2.3 ( $0.67 \pm 0.17 \times 10^5$  cells;  $p = 0.002$ ) (Figure 3A) and induced a significant decrease of viability ( $53.5 \pm$   
13  $13.3\%$ ;  $p = 0.002$ ) of the invading tumor cells (Figure 3B). The fractionated schedules (5 X 2 Gy and 2 X 5  
14 Gy) reduced the number of invasive cells by approximately 25% and 40%, respectively. As the efficacy of  
15 radiation therapy increased, cell morphology became more altered with an increasing proportion of cells  
16 that were larger and more spread out, and fewer tumor cell clusters could be observed (Figure 3C and  
17 Suppl. Fig 4A). It is noteworthy that in all RT groups, thin and very long membrane extensions (*i.e.* some  
18 exceeding 500  $\mu\text{m}$  in length) often connected the remaining tumor cells together.

19  
20 Fifteen U87 spheroids exposed to 5 mM of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles gave rise to  $1.20 \pm 0.15 \times 10^5$   
21 invading tumor cells, *i.e.* 25% less than untreated spheroids (Figure 3A). The viability of invading cells was  
22 slightly affected by nanoparticles treatment ( $73.7 \pm 5.6\%$ ; not statistically significant) (Figure 3B). In this  
23 condition, only few clusters were detectable in the culture wells and isolated cells remained connected by  
24 membrane extensions (Suppl. Fig 4A). Whatever the RT regimen considered, the association of  
25 nanoparticles with irradiation brought a significant benefit. Thus, the regimen 10 Gy monodose + NPs  
26 divided the number of invasive cells by a factor of 4.1, with only  $0.39 \pm 0.10 \times 10^5$  cells escaped from 15  
27 spheroids (Figure 3A) and the viability was less than 50% (Figure 3B). In this case, invading cell morphology  
28 was critically altered, no tumor cell clusters have been formed, and few smaller membrane extensions  
29 failed to connect remaining tumor cells together (Suppl. Fig 4A).

30  
31 The low cell viability along with the altered morphology of invading cells have drawn our attention. In a  
32 previous study, we have demonstrated that 5 nm gold nanoparticles were able to enhance radiation-  
33 induced mitotic catastrophe<sup>31</sup>. Mitotic catastrophe (MC) is defined as inopportune entry into mitosis  
34 despite the persistence of non-repaired DNA lesions. This phenomenon can occur during the first or  
35 subsequent cell divisions after irradiation, and results in the loss of clonogenic ability. Mitotic catastrophe  
36 is characterized by unique nuclear alterations that lead to micronucleation and/or multinucleation and is  
37 considered as the main event that precede radiation-induced cell death<sup>32–34</sup>. Consistently, we attempted  
38 to visualize micro- and multinucleation of invading cells using hematoxyllin and eosin staining to detect  
39 morphologically abnormal nuclei (Suppl Fig 4B) and we have determined the rate of MC for each  
40 therapeutic condition (Fig 3D). While MC concerned only  $7.5 \pm 0.7\%$  of cells in control group, the rate of  
41 MC significantly increased after radiotherapy, whatever the irradiation schedule applied. Fractionated  
42 schedules led into  $23.7 \pm 1.6\%$  (for 5 x 2 Gy) and  $31.9 \pm 1.9\%$  of MC (for 2 x 5 Gy) and as expected, 10 Gy  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

single-dose irradiation was the most effective regimen, inducing  $37.5 \pm 2.5\%$  of MC. Exposure of spheroids to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles doubled the rate of MC in invasive cells ( $14.8 \pm 1.4\%$ ,  $p=0.008$ ) as compared to control group and significantly enhanced MC events in case of fractionated irradiation (e.g.  $38.2 \pm 1.9\%$  for NPs + RT 2 x 5 Gy ;  $p = 0.007$  compared to RT 2 x 5 Gy alone) (Figure 4D). These results confirmed the ability of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles to impair the long-term survival of invading cells after irradiation.

In parallel, we attempted to characterize the actin-rich membrane protrusions (Fig. 3E). Immunocytochemistry experiments revealed that in RT groups, punctate connexin 43 immunoreactivity was visible along protrusion. These actin-based tubular connections are reminiscent of the *tumor microtubules* previously described by the Winkler's research team<sup>35,36</sup>. Considering the groups of spheroids receiving RT and NPs, Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles seemed to interfere with the emission of cellular protrusions and connexin 43 immunoreactivity mainly corresponded to diffuse intracytoplasmic staining.

#### *Agressiveness and recurrence potential of invading tumor cells post-irradiation was altered by Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles*

For cellular locomotion and invasion, invading glioma cells need remarkable plasticity and proteolytic activity allowing them to move through the brain parenchyma: this relies on membrane protrusions and invadopodia, which contribute to ECM degradation, facilitated by the secretion of proteases<sup>37</sup>. Thus, we focused on the proteolytic activity of U87 cells that have escaped from untreated or treated U87 spheroids. Among proteinases, the matrix metalloproteinases MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) were shown to play a key role in glioma progression through the degradation of the extracellular matrix<sup>38,39</sup>. Fig. 4A represents gelatin zymography of conditioned media samples obtained from invading cells receiving the different treatments. As previously described<sup>40</sup>, we detected the MMP2 proenzyme and active MMP2, as well as pro-MMP9 but to a lesser extent. For the densitometric quantification of the bands, we focused on MMP2 secretion (*i.e.* we considered the sum of signals for MMP2 proenzyme and for active MMP2) (Fig 4B) and the active MMP2 (Fig 4C). Our results showed that MMP2 secretion and active MMP2 were lower in NPs-treated groups (without or with irradiation) than in other groups. These data suggest that Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles can interfere with invasion by reducing proteolytic activity of invading cells that have escaped from U87 spheroids. Our observations are concordant with previously published results. Indeed, Mulens-Arias et al. have demonstrated that citrate-coated spherical gold nanoparticles disturbed extracellular matrix degradation due to a reduction in MMP2 activity<sup>41</sup>. This anti-proteolytic effect is likely cumulative with the direct anti-migrative effect that we have previously described in a recent published work<sup>19</sup>. Indeed, on glioblastoma cells grown as monolayers, atomic force microscopy measurements revealed that Au@DTDTPA(Gd) uptake induced a marked increase of the Young's modulus and a decreased number of protrusions, causing an increased cell stiffness that impaired cell motility.

1  
2  
3  
4  
5 In glioblastoma, invading cells are considered as the major threat because of their high recurrence  
6 potential. Munthe et al. have shown that migrating tumor cells in glioma biopsy material display a stem  
7 cell phenotype<sup>42</sup>. So, we tried to determine whether any of the escaped cells might have stem-like features  
8 using the neurosphere assay, as previously described<sup>43</sup>. Briefly, U87 glioblastoma cells that had escaped  
9 from untreated or treated-spheroids (RT and/or Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles) were resuspended in  
10 appropriate serum-free culture medium for 4 days. In these conditions, only glioma stem-like cells can  
11 enter into active proliferation and rapidly form floating neurospheres<sup>44</sup>. Considering untreated spheroids,  
12 we counted an average of 2230 neurospheres formed from  $1 \times 10^5$  seeded invading cells (Figure 4D),  
13 suggesting that stem-like cells represented 2.2 % of invading cells. Treatments markedly affected the  
14 ability of invading cells to form neurospheres. In particular, the number and the size of neurospheres was  
15 significantly reduced when spheroids were irradiated with 2 x 5 Gy or 10 Gy monodose regimen (*i.e.* for  $1$   
16  $\times 10^5$  seeded invading cells,  $1551 \pm 236$  neurospheres and  $1151 \pm 100$  neurospheres were counted,  
17 respectively) (Figure 4D and 4E). Consistently with previous results, the exposure of U87 spheroids to  
18 Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles further reduced the neurosphere forming ability which dropped to  $\sim 700$   
19 for « NPs + 2 X 5 Gy » and « NPs + 10 Gy » groups (*i.e.*  $665 \pm 81$  neurospheres;  $p = 0.029$  for « NPs + 2 X 5  
20 Gy » as compared to RT 2 x 5 Gy alone) (Figure 4D). Similarly, the average diameter of the neurospheres  
21 was smallest in these two treatment groups (Figure 4E). As the neurosphere assay is not sufficient to prove  
22 the presence of glioma stem cells, additional experiments such as stem cell markers expression are  
23 ongoing<sup>45</sup>. In this context, the influence of treatments on the expression Sox2 seems relevant as this  
24 transcription factor is considered as a master regulator of maintenance of tumor stem cell properties. In  
25 preliminary experiments, the relative expression of Sox2 mRNA in escaped cells was decreased of about  
26 25% when spheroids were treated by RT + NPs, as compared to RT alone (Table 2). Taken together, our  
27 results provide converging evidence that aggressiveness of glioblastoma cells is strongly reduced when  
28 U87 spheroids are exposed to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles before irradiation and show that the  
29 combined treatment is able to reduce the proportion of stem cells to less than 0.75%.

## CONCLUSION

While conventional X-ray radiotherapy is essential to treat glioblastoma patients, its efficacy remains insufficient and many therapeutic strategies, including inorganic nanoparticles-based radioenhancement are being investigated to overcome the limitations. In this context, we have evaluated the radiosensitizing potential of an ultrasmall polyaminocarboxylate-coated gold nanoparticles, then labelled with  $Gd^{3+}$  ions named as Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles when combined with conventional X-ray irradiation. In an original way, the present study looked at on the overall progression of brain tumors, including for the first time analysis of the effects of treatments on the infiltrative tumor area, through the implementation of various complementary approaches and biological models. Despite of the well-known limits of *in vitro* experiments, our results showed that conventional X-ray radiotherapy, depending on dose fractionation, is globally effective to slow down glioma progression but they highlight that surviving cells after irradiation can develop adaptative response allowing increased aggressiveness. Indeed, surviving glioblastoma cells after X-ray irradiation were able to escape from the main tumor mass and invade surrounding brain tissue. They were able to emit long membrane protrusions, likely tumor microtubes, to maintain intercellular connexion and likely facilitate radioresistance and tumor recurrence<sup>35,36</sup>.

In addition, our results confirmed the interest of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles as a radiosensitizing agent *in vitro* and *in vivo*, which is consistent with previously published data even if the low dose rate of conventional irradiation does not seem the best condition. Above all, our findings are particularly interesting because they reveal that the attractive potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles goes beyond their role of « physical radiation dose enhancer ». Indeed, exposure to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles prior to irradiation reduced the aggressiveness of glioblastoma cells, notably by (i) decreasing the number and viability of tumor cells that escape and can invade the surrounding brain parenchyma, (ii) preventing the ability of invading cells to form an interconnected network that is probably involved in GBM radioresistance (iii) altering their ability to give rise new tumor spheres, reflecting tumor recurrence. Interestingly, the addition of the Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles could contribute to render fractionated RT regimen as biologically effective as a single-dose 10 Gy treatment, which is very relevant for a possible clinical transfer.

Although further research is needed to clarify the underlying mechanisms, Au@DTDTPA(Gd)-enhanced radiotherapy opens interesting perspectives for addressing the threat that invading cells pose to glioblastoma patients.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the research funds of (i) the Cancéropole Est, Régions Grand Est and Bourgogne-Franche-Comté, (ii) Ligue Contre le Cancer CCIR-GE, and (iii) the CPER.

## DATA AVAILABILITY

The raw/processed data required to reproduce these findings cannot be shared at this time due to technical or time limitations.

## REFERENCES

1. Cuddapah, V. A., Robel, S., Watkins, S. & Sontheimer, H. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci* **15**, 455–465 (2014).
2. Wank, M. *et al.* Human Glioma Migration and Infiltration Properties as a Target for Personalized Radiation Medicine. *Cancers (Basel)* **10**, 456 (2018).
3. Wank, M. *et al.* Evaluation of radiation-related invasion in primary patient-derived glioma cells and validation with established cell lines: impact of different radiation qualities with differing LET. *J Neurooncol* **139**, 583–590 (2018).
4. Baulch, J. E. *et al.* Irradiation of primary human gliomas triggers dynamic and aggressive survival responses involving microvesicle signaling. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **57**, 405–415 (2016).
5. Elbanna, M., Chowdhury, N. N., Rhome, R. & Fishel, M. L. Clinical and Preclinical Outcomes of Combining Targeted Therapy With Radiotherapy. *Front Oncol* **11**, 749496 (2021).
6. Hintelmann, K., Kriegs, M., Rothkamm, K. & Rieckmann, T. Improving the Efficacy of Tumor Radiosensitization Through Combined Molecular Targeting. *Frontiers in Oncology* **10**, (2020).
7. University Hospital, Grenoble. *Radiotherapy of Multiple Brain Metastases Using AGuIX® Gadolinium-chelated Polysiloxane Based Nanoparticles: a Prospective Randomized Phase II Clinical Trial*. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03818386> (2021).
8. Liu, Y. *et al.* Metal-based NanoEnhancers for Future Radiotherapy: Radiosensitizing and Synergistic Effects on Tumor Cells. *Theranostics* **8**, 1824–1849 (2018).

- 1  
2  
3  
4  
5 9. Schuemann, J. *et al.* Roadmap to Clinical Use of Gold Nanoparticles for Radiation Sensitization. *Int J*  
6 *Radiat Oncol Biol Phys* **94**, 189–205 (2016).  
7  
8
- 9 10. Le Duc, G. *et al.* Toward an image-guided microbeam radiation therapy using gadolinium-based  
10 nanoparticles. *ACS Nano* **5**, 9566–9574 (2011).  
11  
12
- 13 11. Lux, F. *et al.* AGulX® from bench to bedside-Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based  
14 nanoparticle to clinical medicine. *Br J Radiol* **92**, 20180365 (2019).  
15  
16
- 17 12. Lux, F. *et al.* Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew Chem Int*  
18 *Ed Engl* **50**, 12299–12303 (2011).  
19  
20
- 21 13. Penninckx, S., Heuskin, A.-C., Michiels, C. & Lucas, S. Gold Nanoparticles as a Potent Radiosensitizer:  
22 A Transdisciplinary Approach from Physics to Patient. *Cancers* **12**, 2021 (2020).  
23  
24
- 25 14. Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T. & Prise, K. M. Biological mechanisms of gold  
26 nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nano* **8**, 2 (2017).  
27  
28
- 29 15. Pitchaimani, A., Nguyen, T. D. T., Koirala, M., Zhang, Y. & Aryal, S. Impact of cell adhesion and migration  
30 on nanoparticle uptake and cellular toxicity. *Toxicology in Vitro* **43**, 29–39 (2017).  
31  
32
- 33 16. Wu, Y., Zhang, Q., Ruan, Z. & Yin, Y. Intrinsic effects of gold nanoparticles on proliferation and invasion  
34 activity in SGC-7901 cells. *Oncology Reports* **35**, 1457–1462 (2016).  
35  
36
- 37 17. Alric, C. *et al.* Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray  
38 Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5908–5915 (2008).  
39  
40
- 41 18. Miladi, I. *et al.* The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents.  
42 *Small* **10**, 1116–1124 (2014).  
43  
44
- 45 19. Durand, M. *et al.* The detrimental invasiveness of glioma cells controlled by gadolinium chelate-coated  
46 gold nanoparticles. *Nanoscale* **13**, 9236–9251 (2021).  
47  
48
- 49 20. Retif, P. *et al.* Nanoparticles for Radiation Therapy Enhancement: the Key Parameters. *Theranostics* **5**,  
50 1030–1044 (2015).  
51  
52
- 53 21. Eisemann, T. *et al.* An advanced glioma cell invasion assay based on organotypic brain slice cultures.  
54 *BMC Cancer* **18**, 103 (2018).  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



- 1  
2  
3  
4  
5 22. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative  
6 PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).  
7  
8  
9 23. Li, Y., Baran, U. & Wang, R. K. Application of Thinned-Skull Cranial Window to Mouse Cerebral Blood  
10 Flow Imaging Using Optical Microangiography. *PLOS ONE* **9**, e113658 (2014).  
11  
12  
13 24. Holtmaat, A. *et al.* Long-term, high-resolution imaging in the mouse neocortex through a chronic  
14 cranial window. *Nat Protoc* **4**, 1128–1144 (2009).  
15  
16  
17 25. Mostany, R. & Portera-Cailliau, C. A method for 2-photon imaging of blood flow in the neocortex  
18 through a cranial window. *J Vis Exp* 678 (2008) doi:10.3791/678.  
19  
20  
21 26. Jiménez Sánchez, G. *et al.* Fluorescent Radiosensitizing Gold Nanoparticles. *International Journal of*  
22 *Molecular Sciences* **20**, 4618 (2019).  
23  
24  
25 27. Fujita, M., Yamada, S. & Imai, T. Irradiation induces diverse changes in invasive potential in cancer cell  
26 lines. *Seminars in Cancer Biology* **35**, 45–52 (2015).  
27  
28  
29 28. Moncharmont, C. *et al.* Radiation-enhanced cell migration/invasion process: A review. *Critical Reviews*  
30 *in Oncology/Hematology* **92**, 133–142 (2014).  
31  
32  
33 29. Shahhoseini, E. *et al.* Combined Effects of Gold Nanoparticles and Ionizing Radiation on Human  
34 Prostate and Lung Cancer Cell Migration. *IJMS* **20**, 4488 (2019).  
35  
36  
37 30. Shahhoseini, E., Nakayama, M., Piva, T. J. & Geso, M. Differential Effects of Gold Nanoparticles and  
38 Ionizing Radiation on Cell Motility between Primary Human Colonic and Melanocytic Cells and Their  
39 Cancerous Counterparts. *Int J Mol Sci* **22**, 1418 (2021).  
40  
41  
42 31. Paquot, H. *et al.* Radiation-induced mitotic catastrophe enhanced by gold nanoparticles: assessment  
43 with a specific automated image processing workflow. *Radiation Research* **192**, 13–22 (2019).  
44  
45  
46 32. Ianzini, F. & Mackey, M. A. Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic  
47 catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells. *Int J Radiat Biol* **72**, 409–421 (1997).  
48  
49  
50 33. Ianzini, F. & Mackey, M. A. Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-  
51 irradiation of HeLa S3 cells. *Mutagenesis* **13**, 337–344 (1998).  
52  
53  
54 34. Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825–2837  
55 (2004).  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5 35. Osswald, M. *et al.* Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature* **528**,  
6 93–98 (2015).  
7  
8  
9 36. Weil, S. *et al.* Tumor microtubes convey resistance to surgical lesions and chemotherapy in gliomas.  
10 *Neuro-Oncology* **19**, 1316–1326 (2017).  
11  
12  
13 37. Stylli, S. S., Kaye, A. H. & Lock, P. Invadopodia: at the cutting edge of tumour invasion. *J Clin Neurosci*  
14 **15**, 725–737 (2008).  
15  
16  
17 38. Wang, M., Wang, T., Liu, S., Yoshida, D. & Teramoto, A. The expression of matrix metalloproteinase-2  
18 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol* **20**, 65–72 (2003).  
19  
20  
21 39. Park, C.-M. *et al.* Ionizing Radiation Enhances Matrix Metalloproteinase-2 Secretion and Invasion of  
22 Glioma Cells through Src/Epidermal Growth Factor Receptor–Mediated p38/Akt and  
23 Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathways. *Cancer Res* **66**, 8511–8519 (2006).  
24  
25  
26 40. Frankowski, H., Gu, Y.-H., Heo, J. H., Milner, R. & Del Zoppo, G. J. Use of gel zymography to examine  
27 matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods*  
28 *Mol Biol* **814**, 221–233 (2012).  
29  
30  
31 41. Mulens-Arias, V., Balfourier, A., Nicolás-Boluda, A., Carn, F. & Gazeau, F. Disturbance of adhesomes  
32 by gold nanoparticles reveals a size- and cell type-bias. *Biomater. Sci.* **7**, 389–408 (2018).  
33  
34  
35 42. Munthe, S. *et al.* Migrating glioma cells express stem cell markers and give rise to new tumors upon  
36 xenografting. *J Neurooncol* **130**, 53–62 (2016).  
37  
38  
39 43. Galli, R. The Neurosphere Assay (NSA) Applied to Neural Stem Cells (NSCs) and Cancer Stem Cells  
40 (CSCs). *Methods Mol Biol* **1953**, 139–149 (2019).  
41  
42  
43 44. Soares, R. *et al.* The neurosphere assay: an effective in vitro technique to study neural stem cells.  
44 *Neural Regen Res* **16**, 2229–2231 (2021).  
45  
46  
47 45. Ishiguro, T. *et al.* Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications.  
48 *Cancer Sci* **108**, 283–289 (2017).  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Table 1: Effects of treatments on the growth of U87 intracerebral tumor. Based on the determination of tumor volume by intravital microscopy, two criteria were considered: the time taken for the relative tumor volume (RTV) to reach 30 and the number of mice whose RTV exceeded 30 on day 20 of follow-up.

Therapeutic groups	Number of days to reach RTV = 30		RTV ≥ 30 reached on D20	
	Median (in days)	Range	Number of animals	(Percentage)
Control	12.9	[4.5-23.5]	6/7	(85.7%)
Au@DTDTPA(Gd) NPs	18.6	[8-35.5]	6/8	(75.0%)
RT	18.4	[14.5-34.5]	5/8	(62.5%)
RT + NPs	25.3	[21.5-35]	0/8	(0.0%)

NPs: Mice received intravenous injection of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles at a dose of 75 mg/kg

RT: 2 fractions of X-rays irradiation at 5 Gy on D0 and D3

RT + NPs: intravenous injection of Au@DTDTPA(Gd) at 75 mg/kg 5 minutes before the first fraction of irradiation; 2 fractions of 5 Gy on D0 and D3.

*Table 2: Effects of treatments on relative expression of SOX2 mRNA.*

Therapeutic groups	Mean $\pm$ SE
Control	1.00 $\pm$ 0.42
Au@DTDTPA(Gd) NPs	0.37 $\pm$ 0.08
RT 2 x 5 Gy	1.01 $\pm$ 0.97
RT 2 x 5 Gy + NPs	0.78 $\pm$ 0.32
RT 10 Gy	1.47 $\pm$ 0.63
RT 10 Gy + NPs	1.09 $\pm$ 0.31

Figure 1: Radiosensitizing potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles

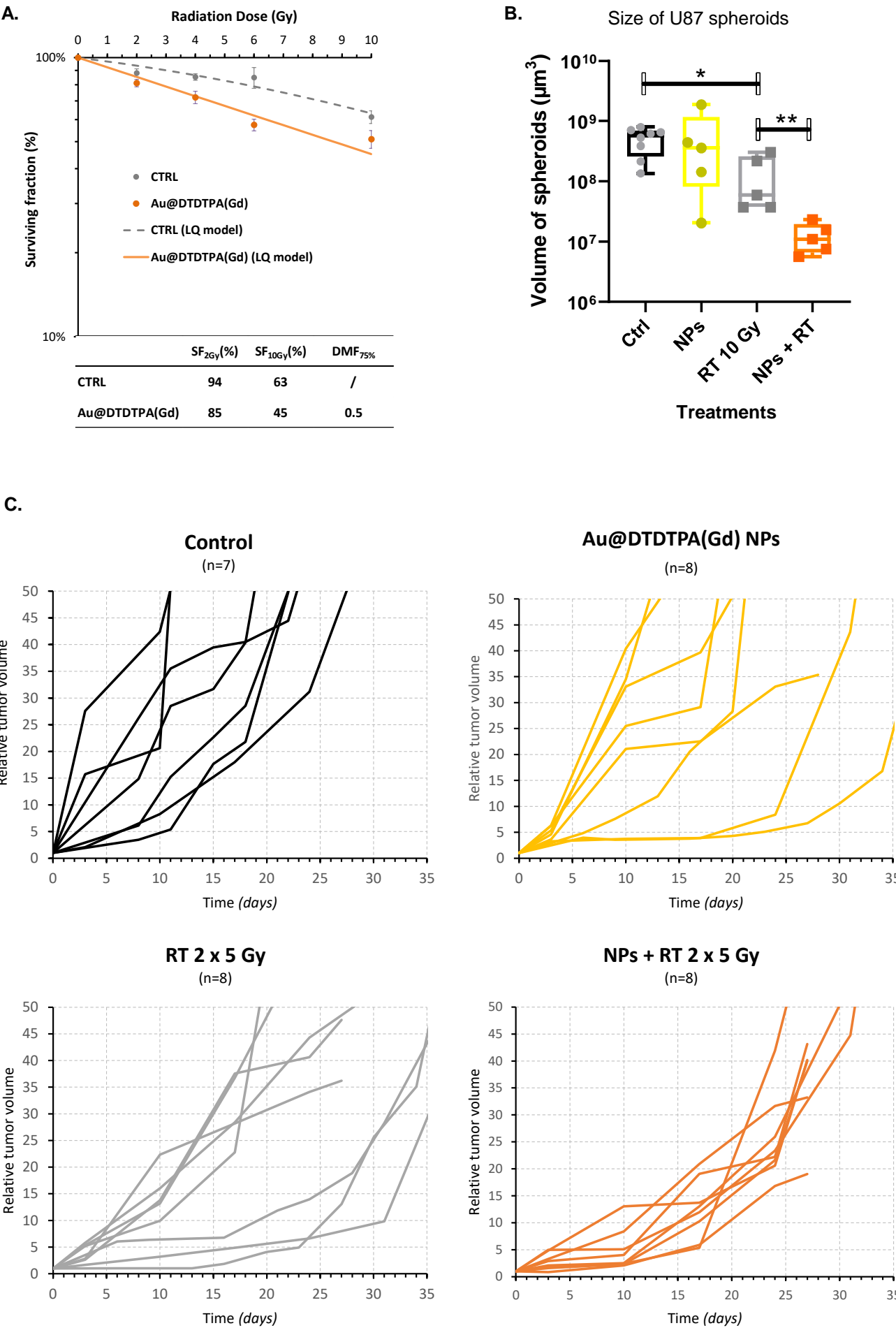


Figure 2: *In vitro* anti-invasive effect of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on irradiated cells.

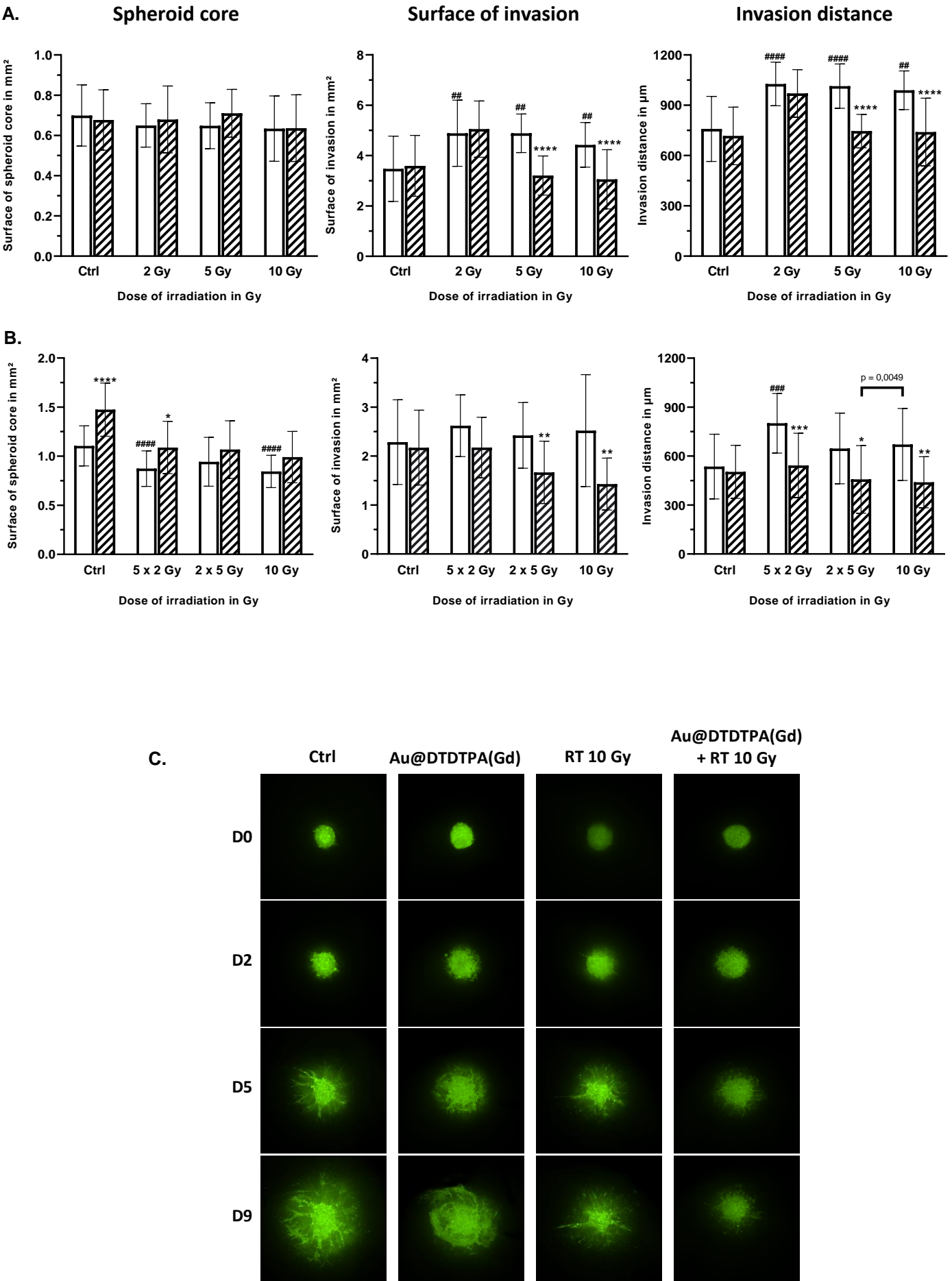




Figure 3: Impact of treatments on escaped tumor cells.

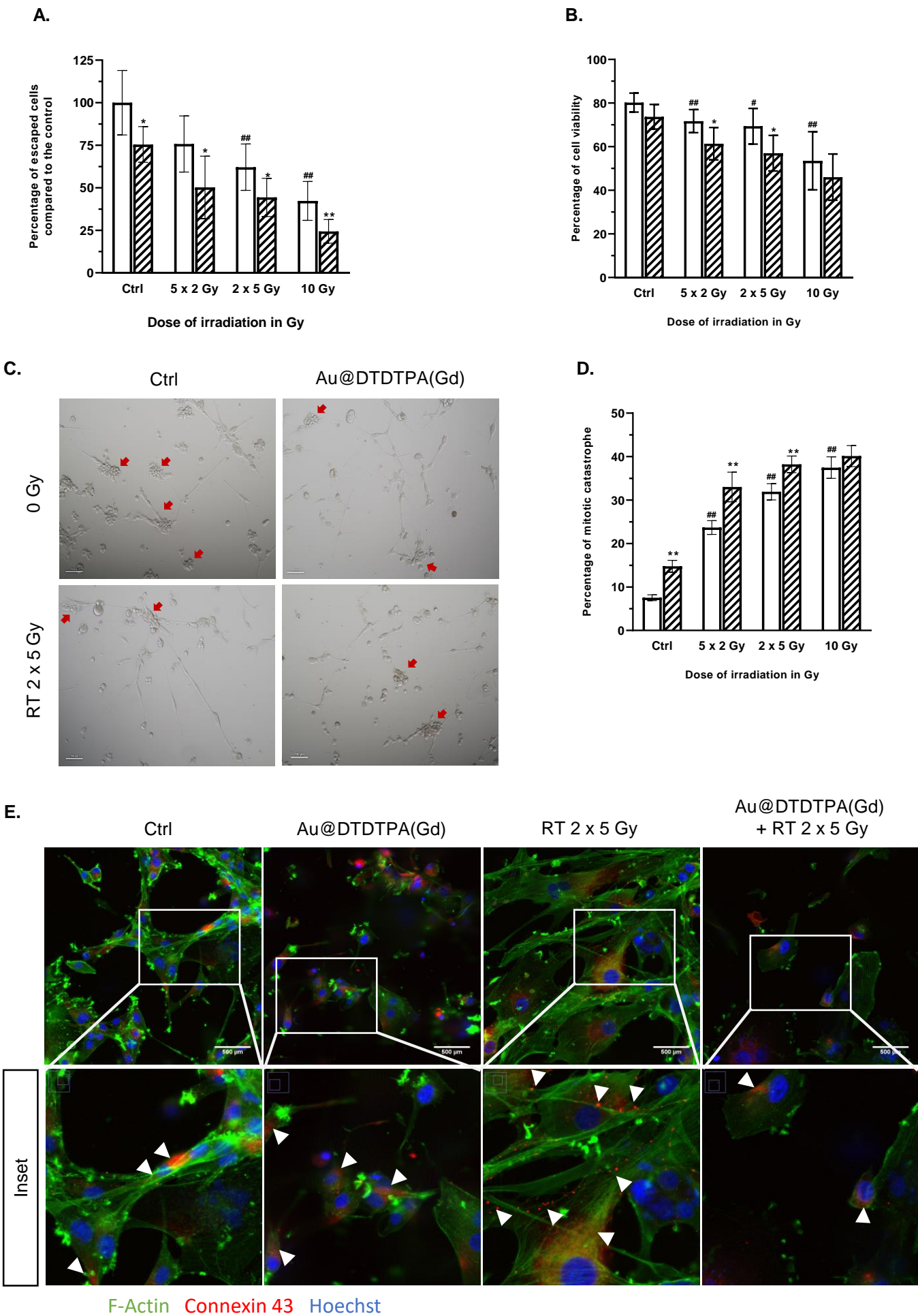
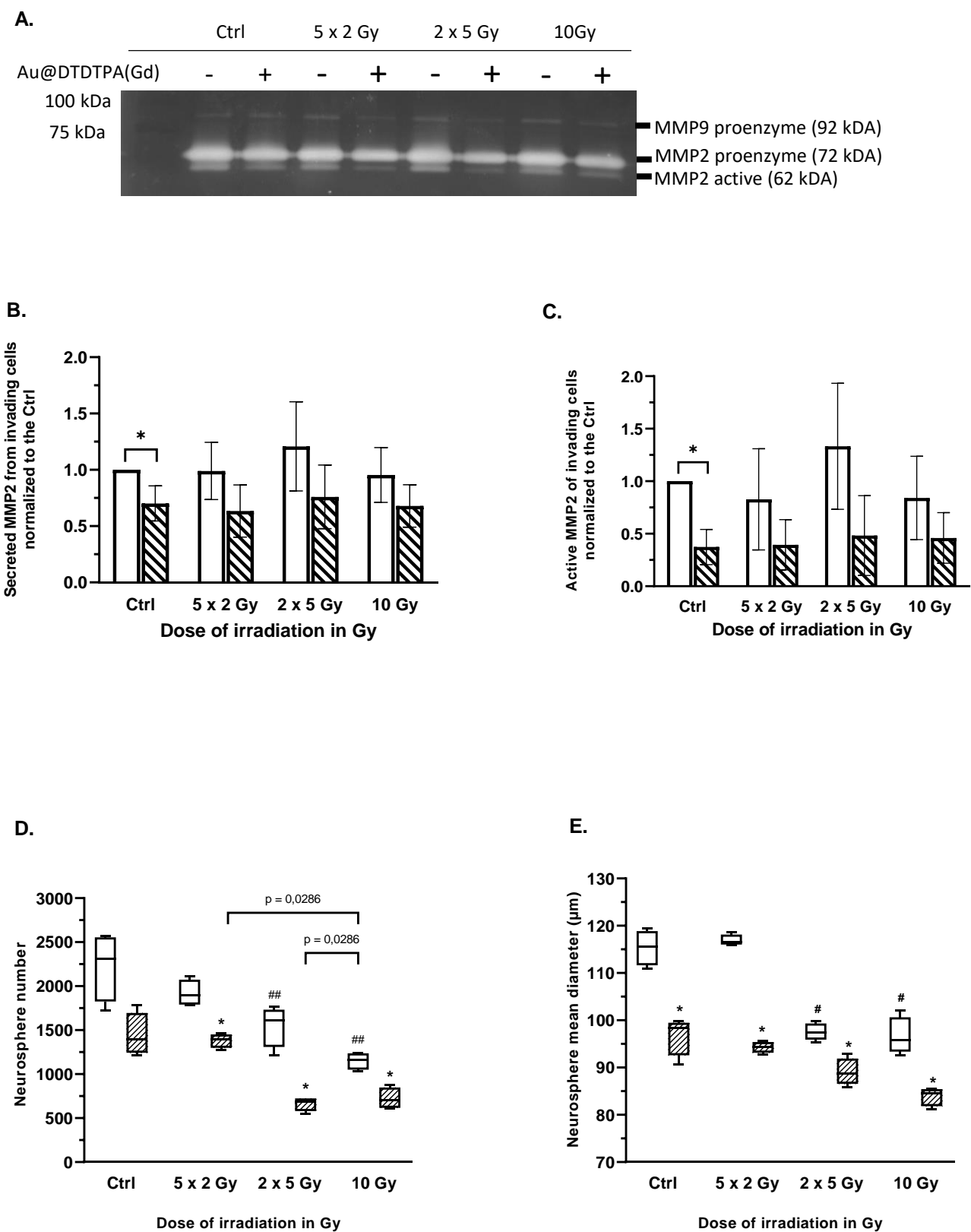


Figure 4: Impact of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles on aggressiveness and recurrence potential of invading tumor cells.



**Figure 1: Radiosensitizing potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles. (A) Radiosensitizing effect assessed *in vitro* by clonogenic assays.** U87 cells were incubated with 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles for 24 hours, washed twice with HBSS and then irradiated at different doses (0, 2, 4, 6, 10 Gy) in fresh culture medium. A total of  $10^4$  cells were plated in soft-agar in 6-well plates and incubated for 12 days at 37°C 5% CO<sub>2</sub>. Surviving colonies containing at least 50 cells were counted using GelCount™ (Oxford Optronix, Abingdon, UK). Results of clonogenic assays were plotted as survival curves. The experimental data were fitted to a linear quadratic model, according to the equation  $SF = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}$ . **(B) Antitumor activity of treatments assessed *in vitro* using 3D cell culture models.** After 7 days growth in spinner, U87 spheroids were seeded in low-attachment 6-well plates. They were exposed to 5 mM Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles for 24 hours at T7 and/or irradiated with 10 Gy-monodose on T8. Subsequently, the U87 spheroids were seeded individually into a precoated 96-well plates. Each spheroid was imaged and their volume determined on the day of seeding and 8 days later. Results are presented as boxplot of data ( $n \geq 5$ ). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  according to the Mann-Whitney U test **(C) *In vivo* evaluation of the effects of treatments on tumor progression.** For *in vivo* experiments, we used an intracerebral xenograft model of U87-GFP spheroids under chronic cranial windows. Treatments started 5 days after spheroid implantation, thus defining the D0 of follow-up. The nanoparticles were injected intravenously at a dose of 75 mg/kg from a 10 g/L solution. Radiotherapy-treated mice received a 2 X 5 Gy regimen. For combined treatments, Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles were administered 5 min before the first fraction of radiation. Intravital microscopy using a Nikon AZ100 fluorescence microscope (Nikon, France) allowed us to follow the progression of intracranial U87-GFP tumors. Based on the recorded fluorescence images, tumor volumes were calculated and the tumor growth curve was plotted for each mouse in each treatment group.

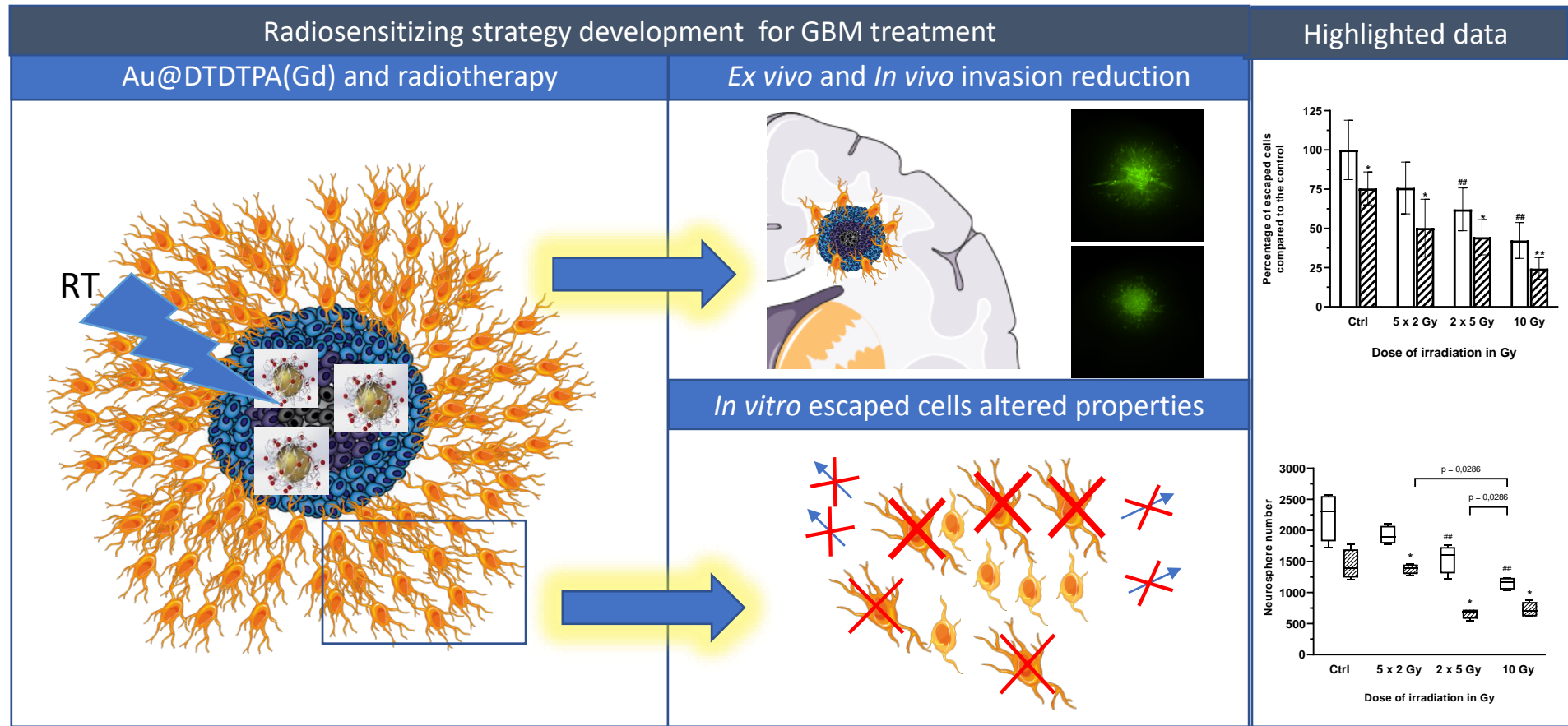
**Figure 2: *In vitro* anti-invasive effects of Au@DTDTPA(Gd) on irradiated cells.** After seeding in 6-well plates (15 spheroids per well), U87 spheroids were exposed 5 mM Au@DTDTPA(Gd) for 24 h and/or treated by X-photon irradiation. **(A) Influence of the dose of radiation:** single-dose of radiotherapy (2, 5 or 10 Gy) was delivered on T8 and each spheroid was then placed into individual well of 96-well plate and then embedded with 100  $\mu$ L of a mix of Matrigel® and hyaluronic acid (100  $\mu$ g/mL). **(B) Influence of the radiation fractionation.** Irradiated spheroids received either 10 Gy-monodose, 2 fractions of 5 Gy (2 X 5 Gy) or 5 fractions of 2 Gy (5 X 2 Gy) between T8 and T12 and spheroids were embedded in matrix at T13. Four days later, invasion of viable cells was imaged using the GelCount® system (Oxford Optronix, UK). Histograms represent for each treatment condition the measurements of the surface of spheroid core (mm<sup>2</sup>), the invasion surface (mm<sup>2</sup>) and the invasion distance ( $\mu$ m). They were measured with ImageJ software. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 12$  spheroids for at least  $n \geq 3$

independent experiments). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\* and ###  $p < 0.001$  according to the Mann-Whitney U test. **(C)** Invasion after treatments have also been addressed using organotypic brain slice cultures, that allowed untreated or treated U87-GFP spheroids to grow *in vitro* into cerebral environment. Representative images acquired at D0, D2, D5, D9 using a Nikon AZ100 fluorescence microscope (Nikon, France) show the growth of the tumor core and the progression of invasive area. ( $n \geq 3$  independent experiments)

**Figure 3: Impact of treatments on escaped tumor cells.** Fifteen U87 spheroids were seeded per well. Many of tumor cells escaped from the spheroids and adhered to the bottom of the flasks: we defined them as "escaped cells" or "invading cells". **(A)** After trypsinization, recovered cells were counted and **(B)** cell viability was determined using the Trypan blue exclusion assay. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 4$  independent experiments). \* and #  $p < 0.05$ , \*\* and ##  $p < 0.01$  according to the Mann-Whitney U test. **(C)** The escaped cells were photographed using a transmitted light microscope (Nikon DIAPHOT 300 equipped with a Nikon Digital sight-DS-Fi1 camera) (40X magnification). These invading cells were able to form new clusters and clusters could be linked together by isolated cells that emitted membrane extensions. **(D)** Histograms represents the treatment-induced mitotic catastrophe (MC). Hematoxyllin and eosin staining of invading cells allowed to detect morphologically abnormal nuclei (*i.e.* micro- and multinucleation) and the MC rate (in %) was determined for each therapeutic condition as the *ratio* of the number of mitotic catastrophe events to the total number of cells. Results are presented as mean  $\pm$  SD ( $n \geq 4$  independent experiments). \*\* and ##  $p < 0.01$  according to the Mann-Whitney U test. **(E)** Invading cells were fixed on T15 for immunocytochemistry experiments and analyzed by confocal microscopy: visualization of F-actin was performed using Alexa Fluor™ 488-conjugated Phalloidin (green), connexin 43 was detected using a primary anti-Cx43 antibody and an Alexa Fluor 555-conjugated secondary antibody (red) while nuclei were counterstained with Hoechst 33432. Irradiated cells (RT 2 x 5 Gy) showed actin-rich membrane protrusions and numerous punctate Cx43 signals at these extensions. When cells were exposed to Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles, the organization of the actin cytoskeleton was strongly modified and Cx43 immunoreactivity corresponded to diffuse intracytoplasmic staining.

**Figure 4: Impact of treatments on aggressiveness and recurrence potential of invading tumor cells.** **(A-C)** Gelatin zymography method was carried out to assess gelatinases (MMP2 and MMP9) secretion and activity in invading cells supernatant. **(A)** 4  $\mu$ g of total proteins obtained from supernatant of escaped cells were deposited in a 10% polyacrylamide gel with 1% porcine gelatin. Image of gel was

acquired after migration for 2 hours and Coomassie Blue staining using a Doc XR+ Gel (Bio Rad, France). For each treatment condition, densitometric quantification of the bands allowed to determine **(B)** MMP2 secretion that corresponds to the sum of signals for MMP2 proenzyme and for active MMP2, and **(C)** active MMP2. Results are presented as mean  $\pm$  SD (n = 4 independent experiments) \* p < 0.05 according to the Mann-Whitney U test **(D-E)** Assessment of the stem-like features of invading cells by neurosphere assay. After trypsinization, invading cells were recovered and counted.  $1 \times 10^5$  invading cells were resuspended in appropriate serum-free culture medium for 4 days, allowing the formation of floating neurospheres. At the end of the experiment, **(D)** number and **(E)** size of neurospheres were measured using the GelCount<sup>®</sup> device (Oxford Optronix, UK). Results are presented as boxplot of data (n  $\geq$  4 independent experiments). \* and ## p < 0.05 and ## p < 0.01 according to the Mann-Whitney U test.









## ABSTRACT

**Background:** The clinical prognosis of glioblastoma (GBM), the most aggressive primary brain tumor in adults, remains poor (Stupp et al. 2005). Nanomedicine could provide new therapeutic tools to overcome the current limitations. The main objective of this thesis work is to evaluate the anti-invasive potential of Au@DTDTPA(Gd) hybrid gold and gadolinium nanoparticles associated with radiotherapy.

**Results:** Using 2D and 3D cell cultures on two GBM lines, U251 and U87, we evaluated the anti-invasive potential of Au@DTDTPA(Gd) nanoparticles alone and then in combination with radiotherapy. The nanoparticles alone do not induce direct cytotoxicity and reduce the migratory and invasive capacities of U251 cells and spheroids. The effects are not related to proteolytic activity but to a modification of the biomechanical properties of the cells. Nanoparticles enhance cell adhesion and traction forces via the actin cytoskeleton, integrin- $\beta$ 1 and talin-1 but decrease the number of protrusions. The anti-invasive potential of nanoparticles associated with radiotherapy was confirmed on the U87 line *in vitro* but also *ex vivo* in organotypic culture and *in vivo* using the cranial window model in mice. We have developed a 3D *in vitro* model that allows the recovery of migrating cells from treated spheroids. We observed that the combined treatment decreases the number of migrating cells and their viability. Several factors explain this phenomenon: an induction of mitotic catastrophes, a decrease in MMP2 secretion and proteolytic activity, and a loss of Cx43-mediated intercellular junctions. The culture of migrated cells in neurosphere medium showed that treated migrated cells seem to lose stemness potential. Taken together, our results suggest that our combination therapy has therapeutic potential for future preclinical studies of migrating GBM cells and relapsing GBM.

**Keywords :** Glioblastoma - Gold nanoparticles - Radiotherapy - Migration – Invasion

## RESUME

**Contexte :** Le pronostic clinique du glioblastome (GBM), la tumeur cérébrale primaire la plus agressive chez l'adulte, reste mauvais (Stupp et al. 2005). La nanomédecine pourrait fournir de nouveaux outils thérapeutiques pour surmonter les limitations actuelles. L'objectif principal de ce travail de thèse est d'évaluer le potentiel anti-invasif de nanoparticules hybrides d'or et de gadolinium Au@DTDTPA(Gd) associées à la radiothérapie.

**Résultats :** A partir des cultures cellulaires 2D et 3D sur deux lignées de GBM, U251 et U87, nous avons évalué le potentiel anti-invasif des nanoparticules Au@DTDTPA(Gd) seules dans un premier temps puis en association à la radiothérapie. Les nanoparticules à elles seules n'engendrent pas de cytotoxicité directe et réduisent les capacités migratoires et invasives des cellules et sphéroïdes U251. Les effets ne sont pas liés à l'activité protéolytique mais à une modification des propriétés biomécaniques des cellules. Les nanoparticules renforcent l'adhésion et les forces de tractions des cellules *via* le cytosquelette d'actine, l'intégrine- $\beta$ 1 et la taline-1 mais diminuent le nombre de protrusions. Le potentiel anti-invasif des nanoparticules associées à la radiothérapie a été confirmé sur la lignée U87 *in vitro* mais aussi *ex vivo* en culture organotypique et *in vivo* à l'aide du modèle de fenêtre crânienne chez la souris. Nous avons développé un modèle 3D *in vitro* qui permet de récupérer les cellules migratrices issues des sphéroïdes traités. Nous avons observé que le traitement combiné diminue le nombre de cellules migratrices et leur viabilité. Plusieurs facteurs expliquent ce phénomène : une induction de catastrophes mitotiques, une diminution de la sécrétion et de l'activité protéolytique MMP2 et une perte des jonctions intercellulaires médiées par Cx43. La mise en culture des cellules migratrices traitées dans un milieu neurosphère suggère une perte du potentiel souche. L'ensemble de nos résultats suggère que notre traitement combiné possède un potentiel thérapeutique pour de futures études précliniques sur les cellules GBM migratrices et sur le GBM récidivant.

**Mots clés :** Glioblastome - Nanoparticules d'or - Radiothérapie - Migration – Invasion