



HAL
open science

Utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines pour la thérapie cellulaire anti-cancéreuse dans un modèle de glioblastome

Anastassia Karageorgis

► **To cite this version:**

Anastassia Karageorgis. Utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines pour la thérapie cellulaire anti-cancéreuse dans un modèle de glioblastome. Sciences pharmaceutiques. 2010. dumas-00593130

HAL Id: dumas-00593130

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00593130v1>

Submitted on 13 May 2011

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2010

Thèse N°

UTILISATION
des CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES
POUR LA THERAPIE CELLULAIRE
ANTI-CANCEREUSE
DANS UN MODELE DE GLIOBLASTOME

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLOME D'ETAT

Par **ANASTASSIA KARAGEORGIS**

Née le 17 février 1986 à Toulouse (31)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT
A L'INSTITUT ALBERT BONNIOT
Le 9 décembre 2010 à 18 heures

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Monsieur le Professeur Michel SEVE
Membres : Madame le Docteur Marie-Jeanne RICHARD
 Monsieur le Docteur Walid RACHIDI
 Madame le Docteur Claire ROME (Directeur de thèse)



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci
38700 LA TRONCHE

Année 2009 – 2010

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice-Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n=17)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et procédés pharmaceutique (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR, SAMU /PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (Directeur UFR / LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean-Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (Therex, TIMC)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie –Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie- Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie-Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)



PROFESSEUR EMERITE (n=1)

FAVIER

Alain

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)

BELLET

Béatrice

Pharmacie Clinique

RIEU

Isabelle

Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)

TROILLER

Patrice

Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD

Pierre-Alexis

Chimie (D.P.M.)

CHU	Centre Hospitalier Universitaire
DPM	Département de Pharmacologie Moléculaire
HP2	Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB	Institut Albert Bonniot
LBFA	Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBI	Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR	Laboratoire des Radiopharmaceutiques
PAST	Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG	Professeur Agrégé
UVHCI	Unit of Virus Host cell Interactions



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci
38700 LA TRONCHE

Année 2009 – 2010

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice-Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n=32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie – Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et Génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ – DELPORTE	Martine	Droit pharmaceutique
DEMEILLERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (U.V.H.C.I./MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)



MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie – Mycologie Médicale (CIB / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP form Adjoint UJF, D.P.M)

ASSITANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE	Pierre-Emmanuel	Maitre de Conférences
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	Professeur Certifié

ATER (n=5)

ELAZZOUZI	Samira	Pharmacie Galénique
SHEIKH HASSAN	Amhed	Pharmacie Galénique
MAS	Marie	Anglais Master ISM
ROSSI	Caroline	Anglais Master ISM



SAPIN

Emilie

Physiologie Pharmacologie

MONITEURS ET DOCTORANTS contractuels (n=6)

CARO	Lydia	(01-10-2007 au 30-09-2010)
DUCAROUGE	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011)
HAUTECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011)
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012)
BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012)

ATER	Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherches
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIB	Centre d'Innovation en Biologie
DPM	Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2	Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB	Institut Albert Bonniot Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS	Institut de Biologie Structurale
LAPM	Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA	Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM	Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB	Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA	Laboratoire d'Ecologie Alpine
TIMC-IMAG	Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI	Unit of Virus Host Cell Interactions

A mes parents,

A mon frère et à ma sœur,

A Marjolaine et à Olivier,

A mon parrain.

"Ουκ εν το πολλω το ευ

αλλα εν το ευ το πολλω"

*("Ce n'est pas dans la quantité que se trouve la qualité
mais dans la qualité que se trouve la quantité").*

Ζηνων Κιτιου (*Zenon de Kition*) (335 av.J.C. - 262 av. J.C.).

Remerciements

Ils s'adressent aussi bien à tous ceux qui m'ont marquée pendant mes études de Pharmacie, qui touchent à leur fin ce jour, qu'à tous ceux qui m'aident et me conseillent au quotidien pendant mes études de Recherche qui commencent ainsi qu'à mes proches et chers.

Remerciements aux éminents membres du jury

A Monsieur le Professeur Michel Sève, Président du Jury

Monsieur le Président,

Vous m'avez acceptée en Master et en Thèse de Sciences. Je vous en remercie.

Votre acceptation de présider, aujourd'hui, le Jury de ma Thèse en Pharmacie m'honore au plus haut point.

Je vous assure de ma gratitude et vous exprime mon respect.

A Madame le Docteur Marie-Jeanne Richard, Chef de service de l'Unité mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Chef du service Biochimie des Cancers et Biothérapie (Institut de Biologie et de Pathologie)

Madame,

Mon stage dans votre service fait partie des repères-clefs de mon cursus « filière-Recherche ».

Je suis honorée que vous ayez pu vous libérer pour siéger au Jury de ma Thèse en Pharmacie.

A Monsieur le Docteur Walid Rachidi, Maître de Conférence

Monsieur,

Je suis très heureuse que le chercheur que vous êtes ait accepté de faire partie du Jury de ma Thèse en Pharmacie. Je vous en remercie.

A Madame le Docteur Claire Rome, Maître de Conférence - Directrice de la Thèse

Madame,

C'est un honneur que vous ayez accepté de diriger ma Thèse.

Je vous remercie de votre immense disponibilité à mon égard et de la confiance, quotidiennement grandissante, que vous m'accordez. Je ne démentirai pas.

Remerciements à des personnalités de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Grenoble

A Madame le Professeur Renée Grillot, Doyen de la Faculté

Madame le Doyen,

*J'ai bénéficié de conditions d'études remarquables tant en qualité qu'en environnement.
Je vous prie d'accepter l'expression de mon respect.*

A Monsieur le Professeur Emmanuel Drouet

Monsieur,

*Je vous suis reconnaissante de m'avoir soutenue pendant mes études et aidée à suivre ma voie.
Je serai heureuse que vous acceptiez l'expression de mon profond respect.*

A Monsieur le Professeur Alain Favier

Monsieur,

*Il m'aurait été impossible de présenter cette Thèse en Pharmacie sans vous citer.
Vous m'avez fait l'honneur de présider le Jury d'examen de mon mémoire à l'issue de mon stage
d'Initiation à la Recherche.
Votre cours sur les cellules souches a été le révélateur de mon chemin ; je le suis avec conviction.
Je suis heureuse d'avoir été votre élève et vous exprime mon respect.*

*A Monsieur le Docteur Frédéric Garban, MCU-PH, (Chef du Service de Soins Intensifs
d'Hématologie, CHU de Grenoble)*

Monsieur,

*Au cours de mon stage dans votre service, votre pédagogie m'a marquée et votre humanisme émue. Je
vous prie d'accepter mes remerciements respectueux.*

Remerciements à des personnalités et au personnel de l'Institut Albert-Bonniot-Grenoble

A Monsieur le Professeur Christian Brambilla, Directeur de l'Institut Albert-Bonniot, Grenoble

Monsieur le Professeur,

Je suis très honorée de préparer ma Thèse de Sciences au sein de l'Institut que vous dirigez.

Au Docteur Jean-Luc Coll, (Chef de l'équipe n° 5, Institut Albert-Bonniot, Grenoble)

Monsieur,

Vous m'avez acceptée dans votre équipe et avez œuvré pour que j'y reste.

Je vous présente mes remerciements et mon respect pour l'aide que vous m'apportez et l'intérêt que vous témoignez pour mon travail.

A Madame le Docteur Chantal Rémy

Madame,

Faire partie des personnes qui travaillent au sein de votre projet est une chance inestimable dont je suis consciente.

A Madame le Docteur Florence de Fraipont

Madame,

A l'occasion de cette Thèse, je souhaite vous exprimer le plaisir que j'ai de faire partie de ceux travaillant dans le cadre de votre projet.

Au Docteur Nicolas Coquery,

Certes parfois « ça chauffe » mais c'est pour la noble cause de la Recherche.

Nous savons que nous nous apprécions.

Au Docteur³ Sandrine Dufort,

Je ne suis pas sûre qu'une montagne de muffins suffise pour te remercier pour toute l'aide que tu m'as apportée. Merci pour ton soutien quotidien à tous les niveaux et surtout pour les souvenirs mémorables de notre entreprise de « pot-de-thèse planner ».

Au Docteur Delphine Larrieu,

Merci beaucoup mon « Mentor » pour l'exemple que tu m'as donné à suivre. Si j'atteins la moitié de ta réussite, ma thèse de Sciences sera un succès. Merci pour tous tes petits conseils judicieux et de m'avoir accueillie chaque fois dans ton bureau avec ton sourire contagieux.

Au Docteur Ali et au Dr Destaing

Merci pour ces séances de "tea-time" si agréables en votre compagnie.

A Romuald et à Sandrine F,

Je vous remercie pour votre soutien quotidien, les longues séances papote mais également pour les bons délires.

A Michelle,

Je te remercie pour ta gentillesse, ta bonne humeur et pour ton amitié. Je suis fière de former avec toi la « greek team » de l'institut.

A Laetitia, je te remercie pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton sourire qui rendent tellement agréable le travail au quotidien.

A l'ensemble de l'équipe 1, 2 et 5,

Merci de m'avoir si bien accueillie parmi vous, de votre bonne humeur, votre disponibilité, accessibilité et de la confiance que vous m'accordez.

*A l'ensemble de la Pharmacie Griffon - Aubenas
Monsieur Griffon, mon Maître de stages officinaux,
Mathilde Ripoll, Pharmacien,
Charly, Christelle et Jenny,
Vous m'avez fait goûter à la Pharmacie Officinale ; je vous en remercie.
Soyez certains que ma pensée n'est jamais bien loin de vous.*

A Aline G, Sandrine G, Emilie, Paméla, Thomas ; mes collègues de première année de pharmacie. Merci de m'avoir laissé de bons souvenirs de cette année, d'avoir rendu agréable ce changement de vie dans cette nouvelle ville qui me paraissait être un univers hostile.

A Camille, Charlotte, Edouard, Greg, Jérôme, Maëlle, Vanessa, merci d'avoir fait de ces années d'études une période de ma vie unique et mémorable, remplie de week-ends, de soirées et d'expériences tous plus loufoques les uns que les autres. Ces sept années ont passé bien trop vite à mon goût. Même si nous ne gardons pas un contact régulier sachez que je ne vous oublierai jamais.

A Sarah, Roomie, merci pour ta « boulette-attitude » qui a tant égayé nos soirées dans le couloir de Matisse.

A Céline et à Maria, merci pour tous ces moments de complicité, de réconfort, de délires et de fous rires qui font que grâce à vous Grenoble est devenue une terre promise.

Je remercie mes Grands-parents pour la sagesse qu'ils m'ont transmise.

Je remercie mon Père pour avoir cru en moi tout au long de mes études, supporté toutes mes crises de doutes au cours de mes révisions, d'avoir vécu mes examens avec moi de même que l'attente des résultats. Je le remercie également de m'avoir transmis cet amour du domaine médical et de la chirurgie que j'applique consciencieusement sur des souris.

Je remercie ma Mère pour son excentricité, son amour et tous les moments complices qui m'ont permis de m'évader de mes soucis.

Jamais je ne remercierai assez mon Frère et ma Sœur. Vous êtes ce que je suis aujourd'hui, mes piliers sans qui je ne pourrais exister. « Un tabouret à trois pieds n'est jamais bancal ». Mon vœux le plus cher est que nous restions soudés à jamais.

Je remercie ma tante, « Tantie » qui est toujours là malgré la distance qui nous sépare et dont je suis l'exemple.

Je remercie Marjolaine, ma « deuxième sœur », bien plus qu'une simple amie, pour tout ce qu'elle m'apporte. Du jour où nous nous sommes rencontrées nous avons eu l'impression de nous connaître depuis toujours. Je t'adore et suis consciente de la chance que j'ai de compter parmi tes amis.

A Olivier, chaque jour je me rends compte encore un peu plus de la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés. Merci de ton Amour et de ton soutien sans faille surtout dans les moments difficiles de ma vie et ce, malgré notre éloignement géographique.

Certainement j'ai oublié des personnes et non des moindres.

Qu'elles se reconnaissent et veuillent bien excuser mon involontaire oubli.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Définition du cancer.....	1
1.1.2 Généralités sur le cancer	2
1.1.3 Prises en charge thérapeutiques conventionnelles du cancer.....	3
1.2 Les tumeurs cérébrales	4
1.2.1 Définition et classification	4
1.2.2 Epidémiologie	6
1.2.3 Origine et facteurs de risque	7
1.2.4 Les moyens de diagnostic.....	7
1.2.4.1 Le scanner.....	8
1.2.4.2 L’Imagerie par Résonance Magnétique	9
1.2.5 Prise en charge thérapeutique actuelle des glioblastomes	10
1.2.5.1 La chirurgie.....	10
1.2.5.2 La radiothérapie	11
1.2.5.3 La chimiothérapie	12
1.3 Les cellules souches en général	16
1.3.1 Définition des cellules souches	16
1.3.2 Définition des Cellules Souches Mésenchymateuses.....	16
1.3.3 Mode d’obtention des cellules souches mésenchymateuses	17
1.3.4 La sélection des cellules souches mésenchymateuses	18
1.3.5 L’intérêt des cellules souches mésenchymateuses.....	19
1.4 Cellules souches et cancer	20
1.4.1 Tropisme des cellules souches mésenchymateuses pour les tumeurs.....	20
1.4.2 Explication du tropisme tumoral.....	21
1.4.3 Immunogénicité.....	24

1.4.4	<i>Mécanisme d'action des CSMh sur les tumeurs</i>	27
1.4.4.1	Mécanisme d'action anti-cancéreuse.....	27
1.4.4.2	Mécanisme d'action pro-cancéreuse.....	29
1.4.5	<i>Utilisation des CSMh en thérapie</i>	30
1.4.5.1	Thérapie cellulaire.....	31
1.4.5.2	Thérapie génique.....	35
1.4.5.3	Potentialisation du tropisme des CSMh.....	36
1.4.6	<i>Modification des CSMh</i>	37
1.5	Imagerie <i>in vivo</i>	39
1.5.1	<i>L'imagerie optique de bioluminescence</i>	40
1.5.2	<i>L'imagerie optique de fluorescence</i>	41
1.5.3	<i>L'imagerie par résonance magnétique</i>	42
1.6	Projet de Recherche.....	44
II.	MATERIEL ET METHODES	46
2.1	Les animaux.....	46
2.2	Lignées cellulaires et culture cellulaire.....	47
2.3	Modèle de glioblastome.....	48
2.4	Marquage des CSMh.....	49
2.4.1	<i>Marquage par la GFP-Actine</i>	49
2.4.2	<i>Marquage par des nanoparticules</i>	49
2.5	Injections des CSMh.....	50
2.6	Evaluation de la progression tumorale <i>in vivo</i> : bioluminescence et IRM.....	50
2.7	Suivi des CSMh <i>in vivo</i> : fluorescence.....	52
2.8	Sacrifice des souris.....	52
2.9	Histologie.....	53

III. RESULTATS	55
3.1 Détermination du moment d'administration des CSMh dans un modèle de glioblastome humain chez des souris <i>Nude</i> NMRI	55
3.2 Marquage des CSMh avec un lentivirus LV-Actine-GFP et des nanoparticules ...	56
3.3 Evaluation <i>in vivo</i> par IRM du tropisme tumoral des CSMh marquées par des nanoparticules	57
3.4 Evaluation par IRM de l'impact des CSMh-GFP-NP sur la croissance tumorale..	58
3.5 Evaluation par l'imagerie optique de bioluminescence de l'impact des CSMh sur la croissance tumorale.....	60
3.6 Confirmation de l'impact des CSMh-GFP-NP injectées par voie intra-veineuse sur la croissance tumorale	62
3.7 Evaluation de l'effet de la dose de CSMh-GFP-NP injectée sur la croissance tumorale.....	63
3.8 Comparaison des méthodes d'imagerie pour l'évaluation de la croissance tumorale : IRM et bioluminescence	65
3.9 Etude du tropisme des CSMh pour la tumeur et de leur capacité à transporter des NP	67
IV. DISCUSSION	70
4.1 Le double marquage des CSMh.....	70
4.2 Le tropisme tumoral des CSMh.....	72
4.3 L'impact des CSMh sur la croissance tumorale	74
4.4 Importance de la dose de CSMh injectée	77
4.5 Importance de l'immunocompétence de l'hôte	78
4.6 Comparaison des méthodes d'imagerie.....	79
4.7 L'utilisation des CSMh en thérapie.....	80
V. CONCLUSIONS	82

Figures

Figure 1 : les différents cancers cérébraux.....	5
Figure 2 : coupe transversale de cerveau humain porteur d'une tumeur cérébrale visualisée par scanner.....	8
Figure 3 : visualisation par IRM d'un gliome sur une coupe transversale de cerveau humain.....	10
Figure 4 : les différentes molécules de chimiothérapie utilisées pour la prise en charge du glioblastome.	13
Figure 5 : les différentes sources et modes de caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines.....	18
Figure 6 : schéma explicatif du tropisme tumoral naturel des CSMh.....	22
Figure 7 : les mécanismes mis en jeu expliquant l'immunogénicité naturelle des cellules souches mésenchymateuses.	26
Figure 8 : principe de la bioluminescence.....	41
Figure 9 : principe de la fluorescence.	42
Figure 10 : Courbe de croissance des cellules U87 implantées en intra-cérébral chez des souris <i>Nude</i> NMRI.	55
Figure 11 : vérification du double marquage des CSMh.	57
Figure 12 : IRM réalisée sur des souris <i>Nude</i> NMRI ayant reçu des CSMh-GFP-NP ou des NP seules.	59
Figure 13 : Evaluation de la croissance tumorale, avec injection IA ou IV de CSMh-GFP-NP chez des souris <i>Nude</i> NMRI porteuses d'un gliome, par imagerie optique de bioluminescence.....	61

Figure 14 : Evaluation par imagerie optique de bioluminescence de la croissance tumorale chez des souris *Nude* NMRI porteuses de glioblastome en intra-cérébral.. 63

Figure 15 : Evaluation de l'effet de la quantité de CSMh-GFP-NP injectée par voie intra-veineuse chez des souris *Nude* NMRI porteuses de glioblastome. 64

Figure 16 : Evaluation de la corrélation entre l'histologie et la bioluminescence 66

Figure 17 : Evaluation de la corrélation entre l'histologie et l'IRM..... 66

Figure 18 : visualisation de la fluorescence sur des coupes de cerveau centrées sur la tumeur avec un microscope biphotonique..... 68

Figure 19 : coupes histologiques des tumeurs cérébrales avec un marquage hématoxyline/éosine et un marquage au bleu de Prusse 69

Tableaux

Tableau 1 : tableau comparatif des différentes méthodes d'imagerie *in vivo* non invasives..... 43

Tableau 2: les différents groupes de souris constitués pour l'évaluation de l'impact des CSMh-GFP-NP sur les cellules tumorales..... 58

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ang	Angiopoïétine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CCD	Cooled Charge-coupled Device
CCR	CC Chemokine Receptor
CD	Classe de Différenciation
CMH	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CSM	Cellules Souches Mésoenchymateuses
CSMh	Cellules Souches Mésoenchymateuses humaines
CMV	CytoMégaloVirus
CXCL	CXC Chemokine Ligand
CXCR	CXC Chemokine Receptor
DAPI	4.6-DiAmino-2-PhenylIndole
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DV	Dorso Ventral
EGF	Endothelial Growth Factor
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
Em	Emission
Ex	Excitation
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FGF	Fibroblast Growth Factor
fLuc	firefly Luciferase
FOV	Field Of View
FRI	Fluorescence Reflectance Imaging
GCSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GCV	GanCicloVir
GFP	Green Fluorescent Protein
Gy	Gray

HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA	Human leucocyte Antigen
HMGB	High Mobility Group B
HSV	Herpes Simplex Virus
IA	Intra-Artérielle
IFN	InterFéroN
Ig	Immunoglobuline
IL	InterLeukine
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
IV	Intra-Veineux
Luc	Luciférase
LV	LentiVirus
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MEM	Mimum Essential Medium
ML	MedioLatéral
MTIC	Monométhyl TriazenoImidazole Carboximide
NK	Natural Killer
NP	NanoParticules
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PANC	human PANcreatic Carcinoma epithelial-like cell line
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEDF	Platelet Endothelial Derived Factor
PFA	ParaFormAldéhyde
Poly-ICLC	Polylysine et carboxymethylcellulose
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
RLU	Relative Light Unit
rpm	rotation par minute
SDF	Stromal cell Derived Factor

SVF	Sérum de Veau Fœtal
TE	Temps d'Echo
TGF	Transforming Growth Factor
Th	lymphocytes T helpers
Tk	Thymidine kinase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR	Temps de Résonance
TRAIL	Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg	Lymphocytes Trégulateurs
UV	Ultra Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

I. Introduction

Le cancer demeure aujourd'hui un problème majeur de santé publique et ce, malgré les traitements à notre disposition. Bien que de nombreux progrès aient été réalisés au cours des dernières années dans le traitement du cancer, celui-ci reste délicat.

En effet, l'inconvénient des thérapies efficaces pour détruire les cellules cancéreuses est que non seulement elles détruisent la tumeur mais elles détruisent également le tissu sain, entraînant ainsi des effets indésirables majeurs voire mortels. Face à ce constat, il est nécessaire de développer des techniques de thérapies ciblées en vue d'améliorer la thérapie anti-cancéreuse.

Nous allons nous intéresser au glioblastome, cancer particulièrement agressif du cerveau.

Le but de ce projet est de développer une nouvelle approche de thérapie ciblée pour la prise en charge du glioblastome. Pour cela, nous utiliserons les propriétés intrinsèques des cellules souches mésenchymateuses humaines que nous testerons sur un modèle murin de glioblastome humain orthotopique.

1.1 Le cancer

1.1.1 Définition du cancer

Le cancer est la conséquence de la multiplication anarchique de cellules anormales, les moyens de contrôle du cycle cellulaire par l'organisme étant altérés.

Dans l'organisme, il n'est pas rare que les cellules subissent de nombreux stress (rayonnements UV, stress oxydant) occasionnant des lésions qui empêchent leur bon

fonctionnement et nécessitent un mécanisme de réparation. Dans le cas où ces cellules ne parviennent pas à réparer les lésions, elles déclenchent leur mécanisme de mort programmée, l'apoptose, afin d'éliminer les cellules lésées et de maintenir l'intégrité de l'organisme. Il arrive parfois que certaines lésions entraînent une inactivation du processus d'apoptose conduisant à une prolifération incontrôlée des cellules, aboutissant à la formation d'une masse tumorale plus ou moins diffuse altérant le bon fonctionnement de l'organe. Cette pathologie est désignée sous le nom de cancer.

1.1.2 Généralités sur le cancer

A l'échelle mondiale, le cancer est aujourd'hui l'une des principales causes de mortalité et de morbidité (Loebinger *et al.*, 2010). Depuis 2004, les cancers sont devenus la cause de décès la plus fréquente dans le monde. Ils représentent la première cause de mortalité chez l'homme (un décès sur trois), et la deuxième chez la femme (un décès sur quatre) après les maladies cardio-vasculaires (ouvrage 5).

Selon l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), en 2005, le nombre de nouveaux cas de cancers en France a été estimé à près de 320 000/an dont 180 000 (56%) chez les hommes et 140 000 (44%) chez les femmes. Entre 1980 et 2005, le nombre de nouveaux cas de cancers a presque doublé (augmentation de 93% chez l'homme et de 84% chez la femme). La moitié de cette augmentation est due à l'accroissement de la population et à son vieillissement, la fréquence des cancers augmentant avec l'âge. L'autre moitié revient à l'amélioration du dépistage et du diagnostic, et à l'augmentation de l'exposition à des facteurs de risque qu'ils soient environnementaux, comportementaux ou professionnels (Belot *et al.*, 2008). La

projection du nombre de nouveaux cas de cancers en France pour l'année 2009 a été estimée à près de 350 000 (ouvrage 4).

1.1.3 Prises en charge thérapeutiques conventionnelles du cancer

La prise en charge classique du cancer est basée sur trois moyens thérapeutiques : la chirurgie d'exérèse, la chimiothérapie et la radiothérapie. Selon le stade évolutif du cancer, son accessibilité chirurgicale et les facteurs pronostiques, ces trois moyens seront utilisés seuls ou en association afin d'obtenir un effet thérapeutique optimal. Classiquement, la chirurgie est utilisée en premier pour enlever la masse tumorale primitive si elle est localisée et extirpable, la chimiothérapie est administrée secondairement afin d'éliminer les cellules tumorales circulantes. La radiothérapie vient compléter l'action des deux moyens précédents pour détruire les cellules tumorales résiduelles au niveau du foyer chirurgical.

Dans certains cas, lorsque la chirurgie première est impossible, une chimiothérapie et/ou une radiothérapie peuvent être réalisées afin de diminuer la taille tumorale avant l'exérèse chirurgicale suivie d'une nouvelle cure de radiothérapie et/ou de chimiothérapie.

Malgré la bonne efficacité thérapeutique des agents anti-tumoraux, leur inconvénient majeur est leur manque de spécificité pour le tissu tumoral. Ceci est à l'origine d'effets indésirables sévères et d'une mauvaise tolérance limitant l'efficacité thérapeutique. Ainsi, des approches de ciblage tumoral ont été développées pour améliorer l'efficacité et pour minimiser la toxicité systémique en modifiant les profils de biodistribution d'agents anti-cancéreux (Hu *et al.*, 2010). En effet, un des

challenges dans la prise en charge du cancer est de parvenir à délivrer les agents thérapeutiques uniquement au niveau du site tumoral (Loebinger *et al.*, 2010).

Par exemple, les technologies ciblées utilisant des méthodes pro-apoptotiques associées à de l'imagerie par résonance magnétique, permettant de suivre les molécules thérapeutiques *in vivo*, peuvent devenir un adjuvant important de la radio et de la chimiothérapie, ouvrant de nombreuses possibilités pour les futurs traitements du cancer (Loebinger *et al.*, 2009).

1.2 Les tumeurs cérébrales

Dans ce projet, nous avons choisi de travailler sur un modèle murin de xéno greffe de glioblastome humain. En effet, le glioblastome est un des cancers cérébraux les plus fréquents. Les caractéristiques intrinsèques du glioblastome, telles que son caractère disséminé et sa résistance radio et chimiothérapeutique naturelle, en font un véritable challenge de prise en charge thérapeutique. Actuellement, la médiane de survie de cette maladie est extrêmement courte. Ainsi, la moindre avancée aurait un impact immédiat dans sa prise en charge.

1.2.1 Définition et classification

Les tumeurs cérébrales se caractérisent par des proliférations anarchiques de cellules au sein du cerveau.

L'OMS classe ce groupe de cancer en fonction du type cellulaire dont dérivent les cellules composant la tumeur. Les neurinomes dérivent des cellules de Schwann, les gliomes des cellules de la glie et les méningiomes dérivent, quant à eux, des cellules des couches méningées (figure 1). Il existe plusieurs variétés de tumeurs primitives

cérébrales mais les gliomes (les astrocytomes et oligodendrogliomes en constituent la majeure partie) en représentent plus de la moitié.

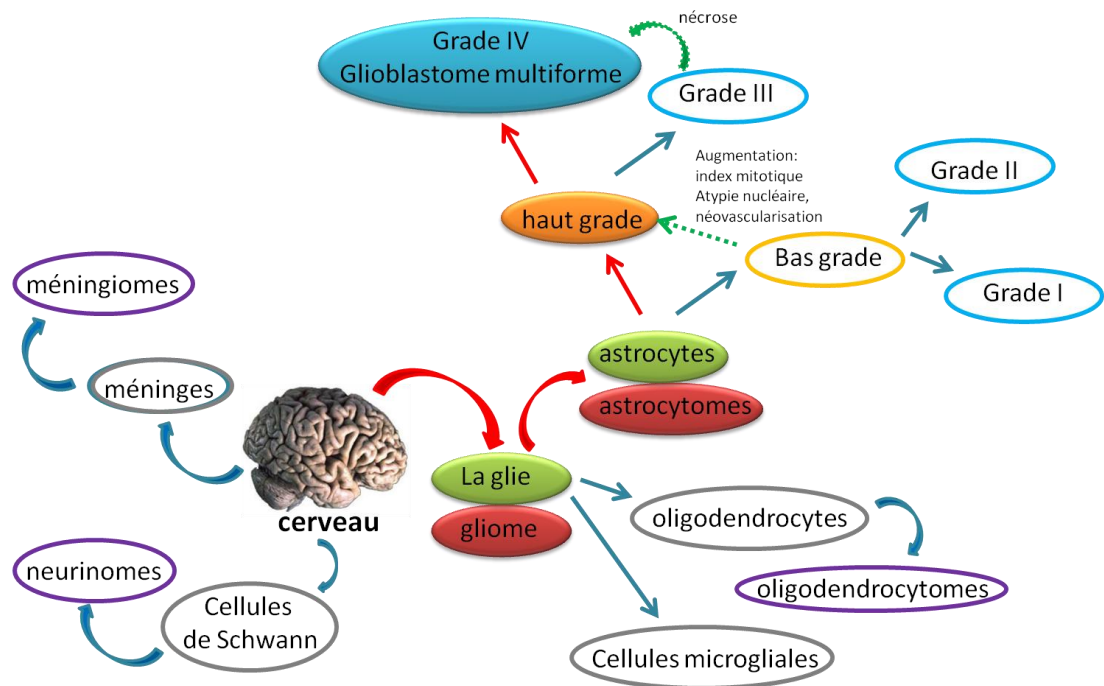


Figure 1 : les différents cancers cérébraux.

Ce schéma représente les différentes cellules cérébrales pouvant être impliquées dans des processus de tumorigénèse. Les différents cancers dépendent du type de cellule concerné. Les flèches rouges indiquent l'origine du glioblastome multiforme.

La glie est constituée de trois types cellulaires : les oligodendrocytes, les cellules microgliales et les astrocytes. Les astrocytomes dérivent des astrocytes (cellules qui, activées, ont une forme d'étoile). Les astrocytes, véritables passerelles entre le sang et les neurones, assurent la nutrition des neurones, gèrent les connexions interneuronales et régulent les neurotransmetteurs (Baudrimont *et al.*, 1991). Ainsi, la perturbation de leur fonctionnement normal entraînera d'importants troubles physiologiques.

Les astrocytomes sont classés en bas grade (I : astrocytomes pilocytiques et II : astrocytomes diffus) ou en haut grade (III : astrocytomes anaplasiques et IV : glioblastomes multiformes). Les grades III et IV sont regroupés sous le terme de gliomes malins.

Les tumeurs de bas grade évoluent au cours du temps vers des astrocytomes de haut grade pour aboutir au glioblastome multiforme qui constitue la forme la plus grave. La transformation en haut grade est notamment associée à l'augmentation de l'index mitotique, à des atypies nucléaires et surtout à l'augmentation de la néo-vascularisation (grade III) puis associée à de la nécrose (grade IV : le glioblastome multiforme) (Louis *et al.*, 2006 ; ouvrage 3) (figure 1). Les glioblastomes sont caractérisés par leur croissance locale et l'infiltration agressive du tissu cérébral sain.

1.2.2 Epidémiologie

Bien que peu fréquents, les cancers cérébraux sont parmi les cancers les plus dramatiques en raison des fonctions et de la fragilité de ce tissu, ainsi que de leur résistance aux différentes thérapies (ouvrage 1).

Alors que les tumeurs intra-crâniennes représentent moins de 5% de l'ensemble des cancers de l'adulte, elles représentent, en revanche, 20% des tumeurs de l'enfant (ouvrage 1). Chez l'enfant, les tumeurs primitives du système nerveux central constituent le deuxième cancer le plus fréquent (23%) après les leucémies et sont responsables de 25% des décès par cancer.

Chaque année, aux Etats-Unis, environ 20 000 nouveaux cas de gliomes sont diagnostiqués (Khasraw *et al.*, 2010). Une augmentation de l'incidence a été observée ces dernières années (ouvrage 2). Le gliome représente à lui seul 40 à 60% des tumeurs cérébrales malignes de l'adulte (ouvrage 1). Les glioblastomes et les méningiomes sont les formes les plus fréquentes chez l'adulte (plus de 50%). Le glioblastome multiforme est le sous-type le plus fréquent et le plus agressif (Khasraw *et al.*, 2010). Les tumeurs cérébrales seraient plus fréquentes dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Aux Etats-Unis, l'incidence

et la mortalité sont plus élevées chez les Caucasiens d'origine que dans les autres groupes ethniques (ouvrage 1). Les glioblastomes sont de très mauvais pronostic puisque 90% des patients ne survivent pas plus de deux ans après la prise en charge thérapeutique (ouvrage 2). De plus, le pronostic des tumeurs primitives du système nerveux central se détériore avec l'âge. L'âge médian de survie est de 60 ans, le taux d'incidence atteignant son maximum vers 70 ans.

1.2.3 Origine et facteurs de risque

Dans la majorité des cas, les tumeurs cérébrales surviennent de manière sporadique. Leurs causes sont inconnues (Schiffer *et al.*, 2010). En effet, les facteurs génétiques ainsi que les facteurs environnementaux tels que les rayonnements électromagnétiques jouent un rôle mineur (ouvrage 1). Néanmoins 1 à 3% s'inscrivent dans un contexte héréditaire. Compte tenu de ces caractéristiques, les possibilités de prévention et de dépistage n'existent pas (ouvrage 1).

1.2.4 Les moyens de diagnostic

La détection précoce des cancers est primordiale pour permettre une thérapie efficace. En effet, aux stades précoces de la maladie, le nombre de cellules tumorales à éliminer est relativement faible et ces cellules ne possèdent pas toutes les anomalies génétiques qui leur permettront de s'adapter et de résister aux traitements. Les tumeurs primitives du système nerveux central se singularisent par le fait qu'elles sont très localisées et qu'elles ne s'étendent qu'exceptionnellement au-delà de ce système. Elles sont suspectées sur les résultats d'examens d'imagerie médicale

(scanner et IRM). Le diagnostic de certitude exige une preuve histologique de biopsie stéréotaxique ou sur la pièce d'exérèse.

1.2.4.1 *Le scanner*

Le scanner cérébral est l'examen réalisé en première intention chez un patient présentant une symptomatologie clinique neurologique. Cependant, si les accidents hémorragiques sont facilement distingués des processus tumoraux, les ischémies peuvent constituer un diagnostic différentiel plus difficile.

Le scanner X (ou tomодensitométrie) mesure les différents coefficients d'absorption des tissus traversés par un faisceau de rayons X. Chaque tissu a un coefficient d'absorption caractéristique (web 1) (figure 2). Ainsi, le scanner permet d'obtenir des images précises d'un organe en réalisant des coupes transversales du corps humain. L'emploi d'agents de contraste injectés par voie intra-veineuse (IV) permet de distinguer la tumeur de l'œdème périphérique dans la mesure où le développement tumoral entraîne une rupture de la barrière hématoencéphalique et permet donc l'opacification tumorale (ouvrage 2), (figure 2 et tableau 1).

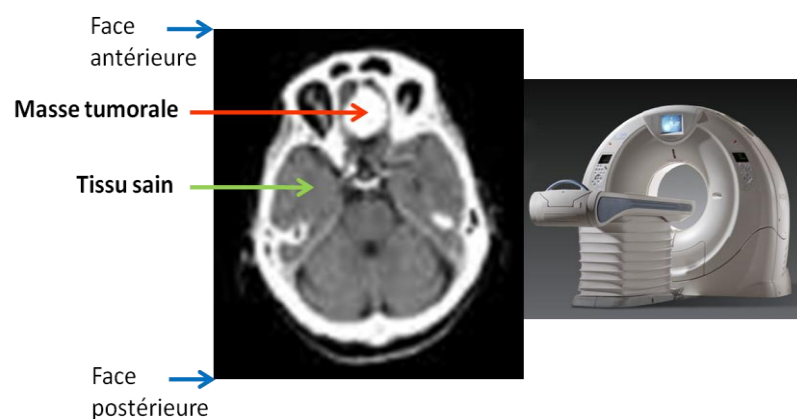


Figure 2 : coupe transversale de cerveau humain porteur d'une tumeur cérébrale visualisée par scanner. L'image de gauche est une coupe de cerveau humain porteur d'une tumeur cérébrale (apparaît en blanc) et visualisée par scanner. L'image de droite représente un exemple d'appareillage utilisé en clinique humaine.

1.2.4.2 L'Imagerie par Résonance Magnétique

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est aujourd'hui l'examen de choix dans la détection des tumeurs cérébrales (Galanis *et al.*, 2000).

Le principe de l'IRM repose sur le fait qu'en appliquant une combinaison d'ondes électromagnétiques à haute fréquence sur une partie du corps et en mesurant le signal réémis par l'hydrogène, il est possible de déterminer la composition chimique, et donc la nature des tissus biologiques en chaque point du volume imagé. La force du signal est fonction du nombre de protons. Le processus de relaxation, correspondant au retour à l'état basal des spins, peut être décrit par deux constantes fondamentales : T1 (relaxation longitudinale) et T2 (relaxation transversale). L'IRM est très utile pour la détection des tumeurs en permettant notamment un suivi longitudinal de leur évolution, car plusieurs sessions de cette imagerie peuvent être effectuées en toute sécurité.

Par ailleurs, bien que traditionnellement utilisée pour la visualisation des tissus mous, l'imagerie par résonance magnétique permet de réaliser de l'imagerie moléculaire tumorale grâce à l'injection IV d'agents de contraste tels que les chélates de gadolinium.

Cette technique présente de nombreux avantages tels qu'une très bonne résolution, une exploration dans tous les plans de l'espace et fournit une carte anatomique et chimique avec transparence du squelette (ouvrage 2 ; web 1) (figure 3 et tableau 1).

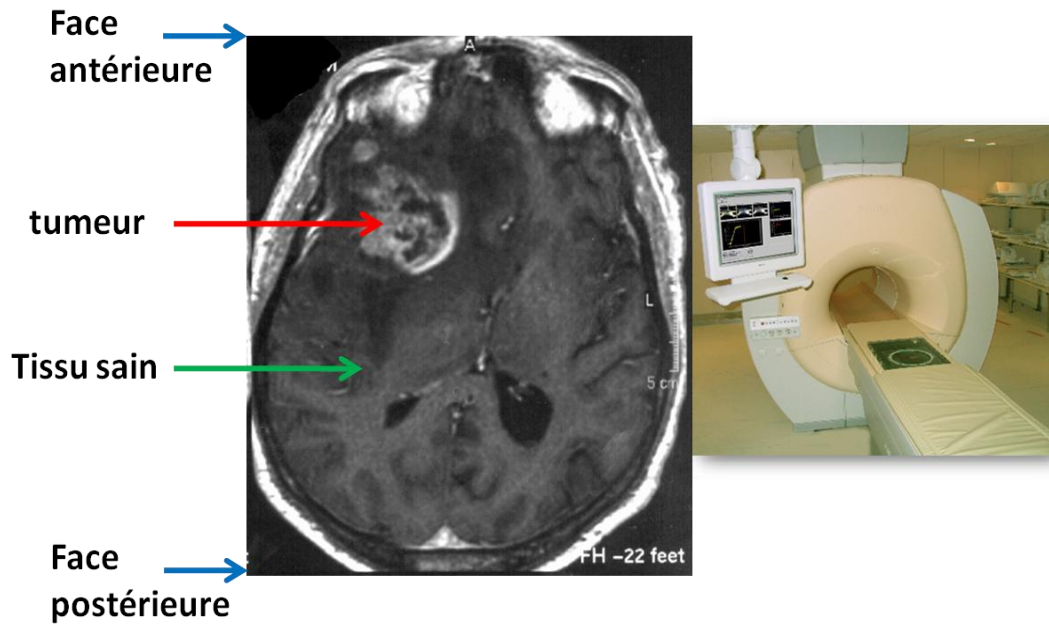


Figure 3 : visualisation par IRM d'un gliome sur une coupe transversale de cerveau humain.
 L'image de gauche est une coupe de cerveau humain porteur d'un gliome (en blanc) et visualisé par IRM.
 L'image de droite est un exemple d'appareillage utilisé en clinique humaine.

1.2.5 Prise en charge thérapeutique actuelle des glioblastomes

Malgré les nombreuses avancées réalisées dans le traitement du glioblastome par des thérapies conventionnelles, telles que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, il n'existe pas de traitements efficaces et le pronostic est très mauvais avec une médiane de survie de seulement 10 à 14 mois (Birnbbaum *et al.*, 2010 ; Yong *et al.*, 2009 ; Nakamura *et al.*, 2004 ; Porada *et al.*, 2010).

1.2.5.1 La chirurgie

L'exérèse chirurgicale tumorale représente la prise en charge thérapeutique principale des tumeurs intra-cérébrale. Les indications opératoires dépendent principalement de la localisation tumorale vis-à-vis des zones fonctionnelles

majeures du cerveau, de la taille, de l'infiltration tumorale et de l'état général du patient (ouvrage 2).

Etant donné la nature invasive des glioblastomes, une résection complète de la tumeur est impossible et la tumeur récidive en dépit de l'exérèse chirurgicale agressive (Daneyemez *et al.*, 1998). Des protocoles de prise en charge des glioblastomes ont été développés en essayant de détruire les cellules cancéreuses résiduelles par l'administration de radiothérapie et de chimiothérapie après la chirurgie.

1.2.5.2 La radiothérapie

La radiothérapie est utile pour le traitement de nombreuses tumeurs cérébrales soit par défaut, quand la tumeur n'est pas opérable, soit dans le cadre d'une stratégie à visée curative après exérèse chirurgicale de la tumeur (ouvrage 2 ; Shaw *et al.*, 1989). La radiothérapie cérébrale comporte des effets indésirables qui peuvent être aigus tels que l'œdème cérébral qui se traduit par des céphalées et des nausées, ou tardifs comme de la somnolence, des nausées et de l'irritabilité dues, dans la majorité des cas, à une démyélinisation irréversible. Un déficit neurocognitif est souvent observé suite à l'irradiation. La complication la plus grave est la survenue d'une nécrose cérébrale reproduisant souvent la symptomatologie tumorale initiale (ouvrage 2).

L'inconvénient majeur de la radiothérapie est, qu'au cours du traitement, le glioblastome a tendance à acquérir un phénotype radiorésistant.

1.2.5.3 La chimiothérapie

Les tumeurs cérébrales ne présentant pas habituellement de risque métastatique extracérébral, l'intérêt majeur de la chimiothérapie est de participer au contrôle local de la tumeur qui constitue l'essentiel du pronostic. Deux obstacles sont à prendre en compte : d'une part, la chimiosensibilité médiocre de la plupart des gliomes et, d'autre part, l'accessibilité réduite aux tumeurs cérébrales des médicaments cytotoxiques du fait de l'existence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE limite la diffusion bien que, dans un certain nombre de cas, cette barrière soit en fait détruite par la tumeur elle-même.

Le schéma thérapeutique le plus souvent utilisé pour la prise en charge d'un glioblastome est une chirurgie visant à la réduction du volume tumoral suivie d'une radiothérapie (60Gy) et d'une chimiothérapie de type Procarbazine, Vincristine, Lomustine ou Témazolomide (ouvrage 2) (figure 4).

Le Témazolomide (Témodal®) est un agent alkylant de l'ADN. C'est un dérivé triazène, qui subit une conversion chimique rapide à pH physiologique en monométhyl triazenoimidazole carboxamide (MTIC) actif. La cytotoxicité du MTIC est vraisemblablement due principalement à une alkylation de la guanine en position 6 de l'atome d'oxygène et à une alkylation supplémentaire en position 7 de l'atome d'azote. Les lésions cytotoxiques qui sont développées par la suite sont supposées entraîner une réparation aberrante de l'ADN méthylé (web 2). Le Témazolomide est administré par voie orale et il est bien toléré. Il améliore la médiane de survie et la qualité de vie sur le long-terme quand il est administré en même temps que la radiothérapie, en comparaison avec une radiothérapie seule suivant une résection chirurgicale maximale (Khasraw *et al.*, 2010).

Depuis 2005 et selon les recommandations de l'EORTC-NCIC (European Organization for Research and Treatment of Cancer), le traitement standard du glioblastome consiste en une résection chirurgicale massive suivie par de la radiothérapie associée au Témzolomide ; ceci est suivi par au moins 6 mois de cures de Témzolomide seul (Khasraw *et al.*, 2010).

Le contrôle avec la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie par Témzolomide reste le pilier du traitement actuel des gliomes de haut grade (Khasraw *et al.*, 2010). Cependant, à ce jour, aucun protocole de chimiothérapie n'a fait la preuve d'une efficacité régulière dans le traitement des gliomes malins (ouvrage 2).

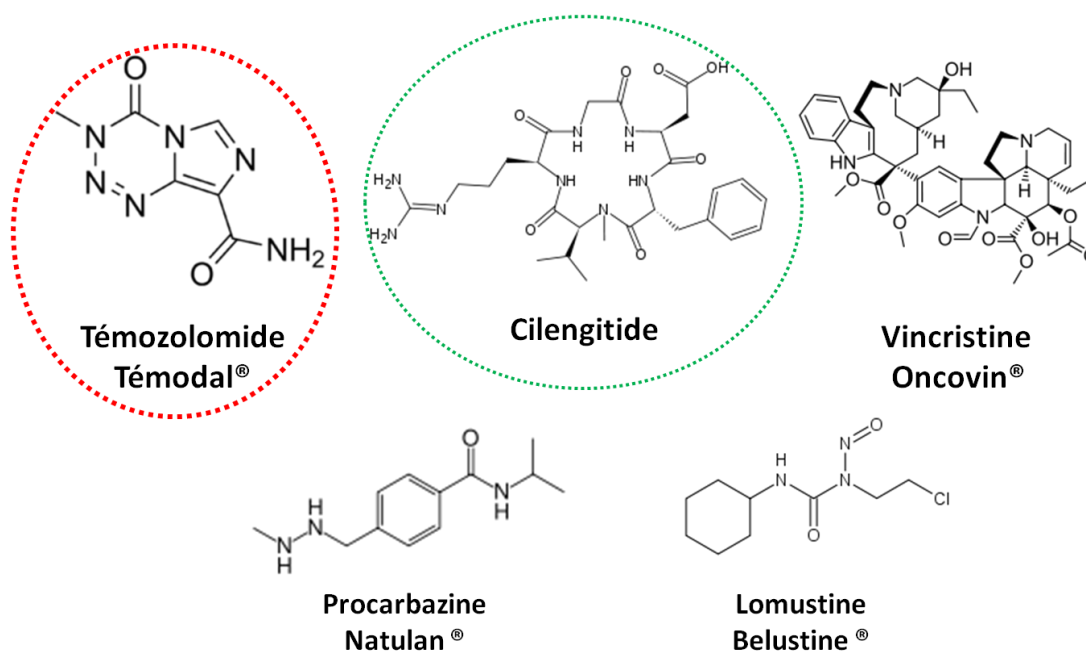


Figure 4 : les différentes molécules de chimiothérapie utilisées pour la prise en charge du glioblastome.

Le cercle rouge indique la molécule de chimiothérapie indiquée dans les protocoles de prise en charge du glioblastome. Le cercle vert indique la nouvelle molécule anti-angiogénique indiquée pour le traitement du glioblastome.

Le mauvais pronostic combiné aux effets toxiques et à la courte demi-vie des molécules thérapeutiques nécessite le développement de stratégies thérapeutiques anti-tumorales innovantes, efficaces et ciblées (Sasportas *et al.*, 2009). Ainsi, des

molécules ont été développées pour cibler notamment l'angiogénèse tumorale. En effet, il est maintenant bien connu que la croissance tumorale dépend de l'angiogénèse puisqu'elle est essentielle pour l'apport d'oxygène, de nutriments, de facteurs de croissance et pour la dissémination des cellules tumorales. Dans le cas des gliomes malins, l'angiogénèse est typiquement associée à une augmentation de la libération de VEGF, une protéine qui stimule la formation de nouveaux vaisseaux (Khasraw *et al.*, 2010).

Le Cilengitide est une molécule anti-angiogénique qui empêche la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à la croissance tumorale (figure 4). Le Cilengitide bloque deux protéines réceptrices à la surface des cellules, les intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$, qui jouent un rôle important dans l'angiogénèse. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui fixent des ligands extracellulaires multiples. Cette liaison les active pour réguler l'invasion tumorale, la migration, la prolifération, la survie et l'angiogénèse (Khasraw *et al.*, 2010). Les glioblastomes expriment l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et l'emploient comme facteur de survie. Le Cilengitide pourrait ainsi viser les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et la tumeur elle-même, et déclencher la mort des cellules tumorales (Khasraw *et al.*, 2010 ; web 2).

Un deuxième axe de thérapie anti-angiogénique ciblée est le développement d'anticorps monoclonaux anti-VEGF tel que le Bevacizumab (Avastin[®]) (Khasraw *et al.*, 2010). Les résultats encourageants obtenus avec le Bevacizumab pour les maladies récidivantes ont conduit à la recherche d'un bénéfice potentiel lors des nouveaux diagnostics. Cependant, des problèmes de toxicité persistent (Khasraw *et al.*, 2010, Kang *et al.*, 2008). En effet, il est possible que l'association du Bevacizumab avec la radiothérapie et le Témazolomide diminue la survie chez

certains patients en raison d'une toxicité fatale. Par ailleurs, des résultats récents laissent à penser que le Bevacizumab pourrait promouvoir une biologie tumorale plus agressive qui diminuerait la survie des patients en comparaison à l'association radiothérapie/Témzolomide (Khasraw *et al.*, 2010 ; Desjardins *et al.*, 2008).

Bien que le Bevacizumab soit maintenant une option de traitement bien établie pour les patients porteurs d'un glioblastome multiforme récidivant, les traitements disponibles après l'échec d'une thérapie par Bevacizumab ne permettent qu'un contrôle transitoire de la croissance tumorale. Ainsi, la chimiothérapie dans les gliomes malins récidivant représente un véritable challenge (Khasraw *et al.*, 2010).

Face à cet échec des chimiothérapies anti-angiogéniques (Tabatabai *et al.*, 2009), d'autres pistes telles qu'une vaccination ou une immunomodulation pour le traitement des gliomes ont été proposées. Ainsi, le Poly-ICLC (acide polyinosinique-polycytidique stabilisé par de la polylysine et du carboxymethylcellulose) pourrait stimuler la libération de cytokines cytotoxiques en induisant la production d'IFN- γ qui augmenterait les activités tumoricides de certaines cellules (Khasraw *et al.*, 2010). Une autre étude montre un temps de progression plus long des patients traités par un vaccin à base de cellules dendritiques en comparaison aux patients non traités (Khasraw *et al.*, 2010). Enfin, l'utilisation de virus pour le traitement des gliomes ne semble pas très prometteuse puisque ce sont des tumeurs hétérogènes (Betensky *et al.*, 2002), contenant des multiples barrières à la diffusion virale. De même, l'administration répétée d'adénovirus est limitée par leur toxicité (Yong *et al.*, 2009).

En dépit de tous les traitements disponibles, le pronostic vital reste très mauvais pour les patients atteints de gliomes malins en général et de glioblastome en particulier (Khasraw *et al.*, 2010 ; Sathomsumetee *et al.*, 2008)

Face à ce challenge thérapeutique, l'utilisation de nouveaux outils pour réaliser une thérapie ciblée sont nécessaires. Dans ce cadre, différentes études ont mis en évidence que les cellules souches mésenchymateuses constitueraient un outil prometteur de thérapie cellulaire et génique (Nakamizo *et al.*, 2005).

1.3 Les cellules souches en général

1.3.1 Définition des cellules souches

Une cellule souche est une cellule ayant la capacité de se différencier en un grand nombre de cellules spécialisées et ce, pendant une période prolongée après transplantation *in vivo* (Kosztowski *et al.*, 2009 ; Sasportas *et al.*, 2009 ; Charbord *et al.*, 2010). Pour affirmer le caractère « cellule souche », deux propriétés sont nécessaires, à savoir le caractère de multipotence (différenciation en plusieurs lignées cellulaires) et le caractère d'auto-renouvellement (Kosztowski *et al.*, 2009 ; Sasportas *et al.*, 2009 ; Coulombel *et al.*, 2007).

1.3.2 Définition des Cellules Souches Mésenchymateuses

Les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) dérivent de progéniteurs mésodermiques, que l'on trouve dans différents tissus aussi bien adultes que fœtaux comme le sang du cordon ombilical. Dans la moelle osseuse, notamment adulte, les CSM forment une petite population constituant le compartiment non-hématopoïétique (Ozawa *et al.*, 2008).

Les CSM sont des cellules progénitrices multipotentes adultes qui ont la capacité de générer différents tissus mésenchymateux dont du cartilage, des os, des muscles, des tendons, des ligaments et de la graisse (Kosztowski *et al.*, 2009 ; Dazzi *et al.*, 2007 ;

Wang *et al.*, 2009 ; Zielske *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2010 ; Coulombel *et al.*, 2007).

Le comité de la société internationale des cellules souches tissulaires et mésenchymateuses a proposé trois critères minimum pour définir une CSM :

- 1) la capacité d'adhérer au plastique ;
- 2) l'absence à plus de 95% de marqueurs d'expression endothéliaux ou hématopoïétiques (CD14⁻ ou CD11b⁻, CD19⁻ ou CD79a⁻, CD34⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺);
- 3) la différenciation des CSM en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes *in vitro* (Motaln *et al.*, 2010) (figure 5).

1.3.3 Mode d'obtention des cellules souches mésenchymateuses

Les CSM sont facilement isolables à partir de tissus adultes, ceci permettant également d'éviter les problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules souches embryonnaires. De plus, elles sont facilement amplifiables *in vitro* en vue d'une utilisation clinique (Dazzi *et al.*, 2007 ; Yong *et al.*, 2009). Les CSM peuvent être obtenues à partir de plusieurs sources dont les cellules souches embryonnaires, la moelle osseuse, le placenta, le tissu adipeux, la peau et le sang de cordon ombilical (Loebinger *et al.*, 2009 ; Motaln *et al.*, 2010 ; Feng *et al.*, 2009) (figure 5). Récemment, les membranes amniotiques sont devenues une source intéressante de CSM. En effet, ce tissu fœtal est récupéré sans problème éthique et donne la plus grande quantité de CSM. De plus, il est dépourvu de vascularisation ce qui évite les contaminations par des cellules hématopoïétiques (Motaln *et al.*, 2010).

1.3.4 La sélection des cellules souches mésenchymateuses

Des méthodes simples et non-invasives de propagation *in vitro* permettent d'obtenir des CSM (Hu *et al.*, 2010). Les CSM sont obtenues par une aspiration iliaque de moelle osseuse (Sasportas *et al.*, 2009). Elles sont ensuite sélectionnées par leur capacité d'adhérence au plastique puisqu'aucun marqueur de surface spécifique n'a été caractérisé à ce jour (Kallifatidis *et al.*, 2008 ; Hamada *et al.*, 2005 ; Porada *et al.*, 2010). Ainsi, en l'absence de marqueur cellulaire spécifique, leur identification repose sur la combinaison de leur aptitude à se différencier *in vitro* en graisse, os, cartilage, l'expression de CD73, CD90, CD105 et l'absence d'expression de marqueurs hématopoïétiques sur la surface cellulaire (Loebinger *et al.*, 2010).

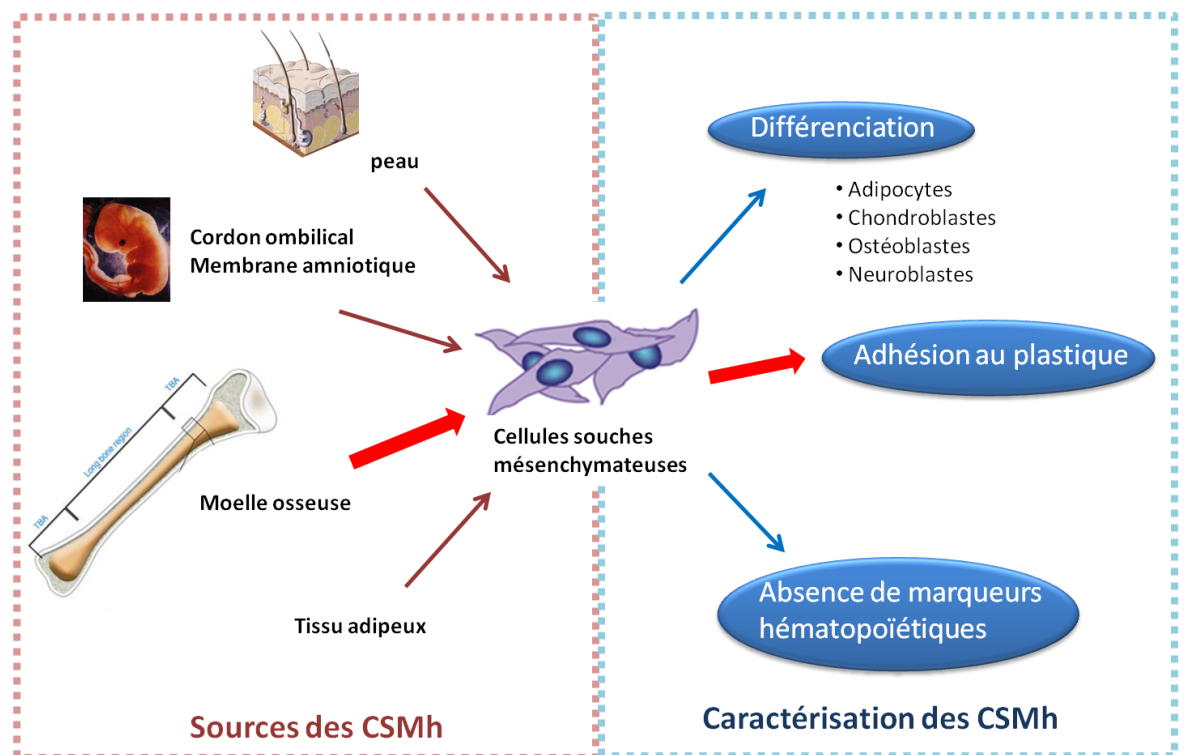


Figure 5 : les différentes sources et modes de caractérisation des cellules souches mésenchymateuses humaines.

La partie de gauche du schéma indique les différentes sources possibles des CSMh. La partie de droite indique les différents modes de caractérisation possible des CSMh. Les flèches rouges épaisses indiquent la source de CSMh utilisées dans notre étude ainsi que le mode de caractérisation utilisé.

1.3.5 L'intérêt des cellules souches mésenchymateuses

Malgré le fait qu'actuellement peu d'éléments sont connus quant au devenir *in vivo* des CSM humaines (CSMh) après injection systémique, les CSMh ont l'avantage d'être facilement obtenues et d'être facilement amplifiables *in vitro*. Elles présentent également une faible immunogénicité, une faible capacité de mutation et ne sont ni neurotoxiques ni tumorigènes. Ainsi, elles peuvent être facilement greffées chez un patient sans avoir recours à un traitement immunosuppresseur (Birnbaum *et al.*, 2007 ; Yong *et al.*, 2009 ; Sasportas *et al.*, 2009 ; Hu *et al.*, 2010 ; Parekkadan *et al.*, 2010). Par ailleurs, les CSMh sont facilement modifiables génétiquement par les vecteurs lentiviraux (Gao *et al.*, 2010, Nalamizo *et al.*, 2005). Elles ont la propriété de garder leur caractère de « cellule souche » même lorsqu'elles sont modifiées. Elles survivent plus longtemps dans le gliome que dans le tissu sain et migrent spécifiquement vers les tumeurs (Sasportas *et al.*, 2009).

L'intérêt majeur des CSMh issues de la moelle osseuse est qu'elles sont déjà utilisées dans le cadre d'essais cliniques (actuellement 79 sites d'essais cliniques sont répertoriés pour l'évaluation de thérapies *via* les CSMh à travers le monde (web 3)), notamment pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux en vue de reperfuser les zones hypoxiques ou pour de la thérapie tissulaire réparatrice. Ainsi, les critères de sécurité sont bien déterminés et permettent d'envisager un transfert rapide de la recherche vers la clinique humaine (Parekkadan *et al.*, 2010).

1.4 Cellules souches et cancer

1.4.1 Tropisme des cellules souches mésenchymateuses pour les tumeurs

Une des propriétés remarquables des CSMh est leur tropisme pour les cellules tumorales (Kosztowski *et al.*, 2009, Birnbaum *et al.*, 2007). La capacité de ciblage est l'aptitude des CSMh à résider dans un tissu pour migrer activement vers un foyer en réponse à des chemokines (Motaln *et al.*, 2010). Or, il s'avère que les CSMh sont capables de cibler et de s'incorporer spécifiquement dans les tumeurs et les métastases éloignées de la tumeur primitive après une injection systémique (Ozawa *et al.*, 2008 ; Balyasnikova *et al.*, 2010 ; Loebinger *et al.*, 2009, 2010 ; Feng *et al.*, 2009 ; Porada *et al.*, 2010). Plus généralement, les CSMh migrent vers les sites de dommages tissulaires dont les sites inflammatoires et les tissus normaux ayant subi des lésions après irradiation (Zielske *et al.*, 2009 ; Kidd *et al.*, 2009). Ainsi, après injection, les CSMh se greffent au niveau du foyer inflammatoire. Elles restent détectables uniquement au niveau des sites de lésions et colocalisent de manière persistante au niveau des sites de développements tumoraux (Motaln *et al.*, 2010).

Zielske *et al.* ont ainsi mis en évidence que les CSMh migrent vers des tumeurs d'origines variées et qu'elles sont très peu retrouvées dans le tissu sain (Zielske *et al.*, 2009). De même, Kidd *et al.* ont montré que des CSMh exprimant le gène de la luciférase firefly (fLuc), administrées par voie systémique chez des souris saines, non porteuses de tumeurs, résident au niveau des poumons puis au niveau du foie et de la rate avant d'être éliminées. Cependant, les CSMh injectées chez des souris porteuses de tumeurs restent au niveau de la tumeur et ce, de manière plus durable (Kidd *et al.*, 2009). De plus, ces cellules ont la capacité de traverser la barrière hémato-

encéphalique et ont ainsi un tropisme inné *in vivo* pour les gliomes lorsqu'elles sont administrées par voie intra-vasculaire (Kosztowski *et al.*, 2009). Nakamizo *et al.* ont en effet démontré pour la première fois que les CSMh pourraient se greffer elles-mêmes dans des gliomes humains (Nakamizo *et al.*, 2005).

Par conséquent, les CSMh pourraient être utilisées pour délivrer des thérapies anticancéreuses ciblées, notamment pour le traitement des gliomes (Ozawa *et al.*, 2008 ; Birnbaum *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2009 ; Loebinger *et al.*, 2009 ; Motaln *et al.*, 2010 ; Loebinger *et al.*, 2010 ; Porada *et al.*, 2010).

1.4.2 Explication du tropisme tumoral

Le principe de l'utilisation des CSMh issues de la moelle osseuse comme agents thérapeutiques est basé sur le concept que la moelle osseuse est source de CSM circulantes qui sont recrutées par des stress ou des lésions (Birnbaum *et al.*, 2007).

Cependant, les mécanismes moléculaires exacts mis en jeu lors de la migration vers les tumeurs solides ainsi que les signaux qui guident les CSMh ne sont pas complètement élucidés (Birnbaum *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2009 ; Dwyer *et al.*, 2010 ; Goa *et al.*, 2010 ; Kallifatidis *et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 2010).

L'explication la plus probable de cette migration est la libération d'un gradient chimotactique par la tumeur ou par une zone enflammée (Loebinger *et al.*, 2010).

Ces conditions sont typiquement accompagnées par la libération de signaux endocrines spécifiques depuis les tissus lésés, qui vont ensuite être transmis à la moelle osseuse, conduisant au recrutement et à la mobilisation des CSMh vers leur cible (Feng *et al.*, 2009). L'intégration des CSMh dans le stroma de la tumeur semble être le résultat de la forte concentration locale de chemokines inflammatoires et de

facteurs de croissance. En effet, le microenvironnement tumoral est considéré comme un site d'inflammation chronique (Dwyer *et al.*, 2010). Il peut être assimilé à « une plaie qui ne cicatrise jamais ». Ainsi, la tumeur libère en permanence des signaux inflammatoires, des chemokines et des cytokines qui interagissent avec les récepteurs des CSMh pour les recruter et les activer (Wang *et al.*, 2009 ; Loebinger *et al.*, 2009 ; 2010 ; Feng *et al.*, 2009 ; Hu *et al.*, 2010) (figure 6).

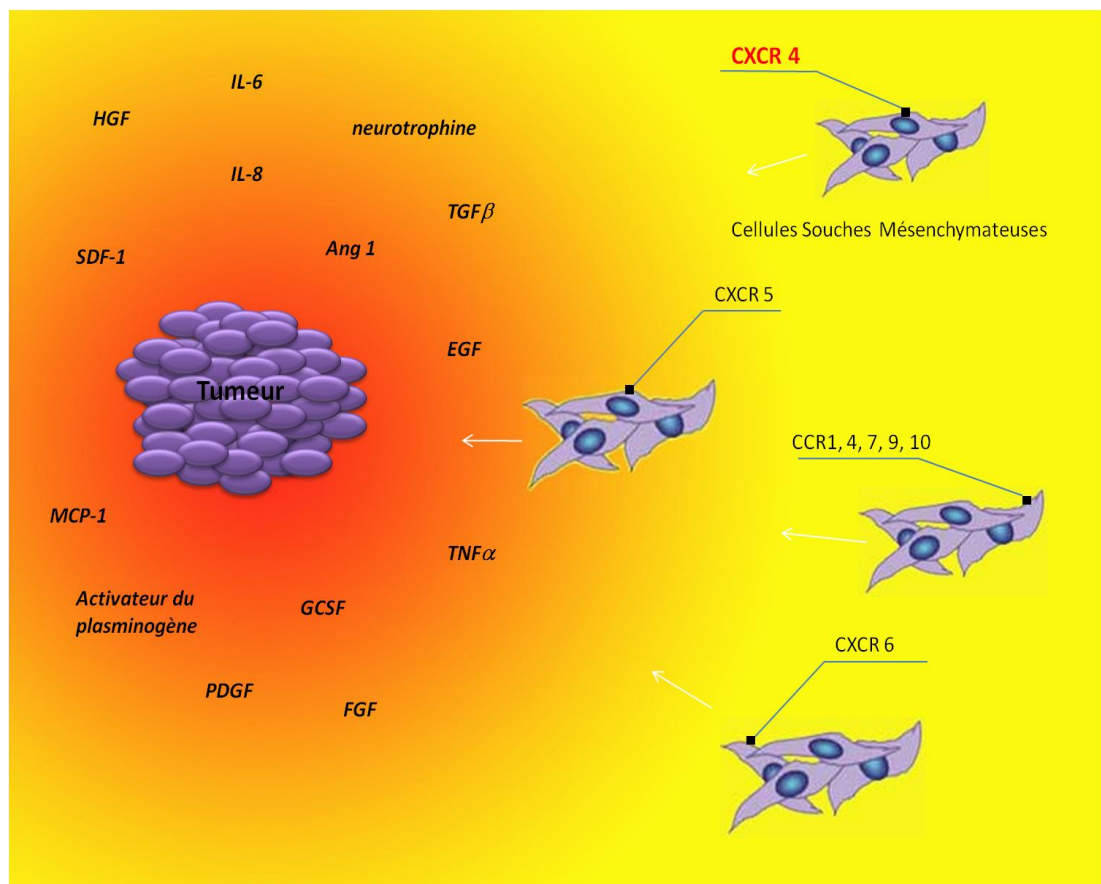


Figure 6 : schéma explicatif du tropisme tumoral naturel des CSMh

La tumeur sécrète des cytokines, des chemokines et des facteurs solubles dans le microenvironnement tumoral et forme un gradient de concentration du plus concentré (en rouge) au moins concentré (en jaune) qui interagit avec les récepteurs membranaires des CSMh. La chemokine CXCR4 (écrite en rouge) est la plus importante impliquée dans le tropisme tumoral.

Le tropisme tumoral des CSMh peut faire intervenir plusieurs combinaisons de récepteurs/ligands (Hu *et al.*, 2010). Les études qui ont tenté de déterminer le mécanisme de migration des CSMh se sont basées sur l'étude des récepteurs

chemokines présents sur la surface cellulaire des CSMh et leur importance fonctionnelle par des études *in vitro*. Une telle approche a cependant conduit à un manque de consensus entre les études en raison de la différence des récepteurs étudiés. En effet, les CSMh possèdent une grande variété de récepteurs cytokiniques et chemokines (Hu *et al.*, 2010 ; Kallifatidis *et al.*, 2008 ; Loebinger *et al.*, 2010). D'après les nombreuses études, un grand nombre de cytokines et leurs récepteurs (tels que SDF-1/CXCR4, SCF/c-Kit, HGF/c-Met, VEGF/VEGFR, MCP-1/CCR2 et HMGB1/RAGE) ainsi que des molécules d'adhésion (telles que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 2$), de même que des facteurs solubles (tels que l'EGF-A, le FGF, le PDGF, le SDF-1/CXCL12, l'IL-8, l'IL-6, le GCSF, l'Ang1, le CCL2, le HGF, le TGF $\beta 1$ et l'activateur du plasminogène) seraient impliqués dans le tropisme tumoral des CSMh (Sasportas *et al.*, 2009 ; Dwyer *et al.*, 2010 ; Feng *et al.*, 2009).

Le rôle apparent de l'inflammation dans le tropisme des CSMh suppose que l'irradiation tumorale augmenterait ce tropisme puisqu'elle est associée à une libération de cytokines par les tissus irradiés. Klopp *et al.* ont ainsi mis en évidence qu'une faible dose d'irradiation de la tumeur augmente le tropisme des CSMh et leur greffe au niveau des sites tumoraux. L'irradiation conduit à l'apoptose des cellules et à l'augmentation de la libération de signaux inflammatoires au niveau du site irradié dont le TNF- α , le PDGF, de même que les chemokines CCL2 et CCR8 (Dwyer *et al.*, 2010).

Il semble également que les CSMh utilisent un mécanisme semblable à celui utilisé par les leucocytes pour l'extravasation depuis le compartiment vasculaire en utilisant des molécules d'adhésion et des intégrines. Malgré ces similitudes, il persiste

cependant quelques différences entre l'extravasation des leucocytes et celle des CSMh. Par exemple, PECAM-1 (platelet/ « endothelial cell adhesion molecule-1 ») qui est impliquée dans l'extravasation des leucocytes, n'est pas exprimée sur la surface des CSMh (Loebinger *et al.*, 2010).

La migration des CSMh semble également être régulée, tout comme la migration leucocytaire, par des molécules d'adhésion. Les molécules impliquées dans les mouvements tels que la fixation, le roulement, l'adhésion et la transmigration depuis la circulation sanguine vers le tissu sont exprimées sur les CSMh. Elles incluent les cytokines, les sélectines et les récepteurs aux chemokines (Dwyer *et al.*, 2010).

1.4.3 Immunogénicité

La capacité des CSMh à se localiser spécifiquement dans les sites tumoraux fait d'elles des outils très attractifs en thérapie anti-cancéreuse. Cependant, les CSMh ne sont pas simplement des vecteurs inertes mais des cellules actives exerçant des effets sur les processus physiologiques (Loebinger *et al.*, 2010, Yagi *et al.*, 2010). Une propriété unique des CSMh est leur très faible immunogénicité et leur forte activité immunosuppressive (Ozawa *et al.*, 2008 ; Tseng *et al.*, 2010, Zhi-Gang *et al.*, 2008). Ce phénomène permet d'administrer les CSMh en thérapie cellulaire sans avoir nécessairement une compatibilité de système HLA (Ozawa *et al.*, 2008).

Le mécanisme mis en jeu est le sujet de nombreuses recherches actuelles. Il a été montré que les CSMh interfèrent avec la génération et la maturation des lymphocytes T cytotoxiques et des lymphocytes T helpers, des cellules dendritiques (présentatrices d'antigène) et des lymphocytes B (Augello *et al.*, 2005). Les CSMh semblent également supprimer indirectement la génération d'une réponse immunitaire en induisant la formation de lymphocytes T régulateurs (Treg) puissants

(Porada *et al.*, 2010). Ces lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4⁺CD25⁺FoxP3 limitent d'autant plus l'activation des voies CD4 et CD8 ainsi que celle des lymphocytes B et celle des Natural Killers (NK) (Loebinger *et al.*, 2010 ; Feng *et al.*, 2009). Ce privilège immunologique peut-être également dû au fait que les CSMh expriment des molécules de CMH de classe I mais pas de molécules de CMH de classe II ni de molécules de co-stimulation CD80, CD86 ou CD40 requises pour produire des molécules co-stimulantes nécessaires pour la présentation de l'antigène (Loebinger *et al.*, 2010 ; Hu *et al.*, 2010). Par ailleurs, les CSMh sont aussi connues pour sécréter des prostaglandines, du TGF- β et du HGF qui régulent la réponse immunitaire aux lymphocytes T, diminuant ainsi la probabilité d'une éventuelle réponse immunitaire à la suite de l'injection des CSMh. Elles représentent par conséquent des éléments attractifs pour les administrations répétées (Dwyer *et al.*, 2010 ; Ren *et al.*, 2008 ; Loebinger *et al.*, 2009). Les CSMh peuvent diminuer la sécrétion d'IFN- γ des cellules Th1, mais augmentent la sécrétion d'IL-4 par les lymphocytes Th2 (Loebinger *et al.*, 2010 ; Feng *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les CSMh ne semblent pas être un bon moyen pour lyser les lymphocytes T cytotoxiques ou les cellules NK et ne stimulent pas vraiment la prolifération de lymphocytes allogéniques (Porada *et al.*, 2010). Des effets similaires ont été démontrés sur les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Les CSMh agissent ainsi sur les cellules immunitaires par plusieurs mécanismes incluant le contact cellulaire direct et la libération de facteurs solubles dont l'oxyde nitrique (Loebinger *et al.*, 2010). Les CSMh inhibent la maturation des cellules dendritiques en régulant négativement les molécules sécrétées par les cellules présentatrices d'antigènes. Elles altèrent également le profil de sécrétion cytokinique des cellules dendritiques tel que le TNF- α . Les CSMh suppriment la réponse CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺

et lymphocytaire T aux antigènes allogéniques. Ainsi, les lymphocytes T cultivés avec des CSMh ne prolifèrent pas même avec des stimuli antigéniques ou mitogéniques (Loebinger *et al.*, 2010) (figure 7).

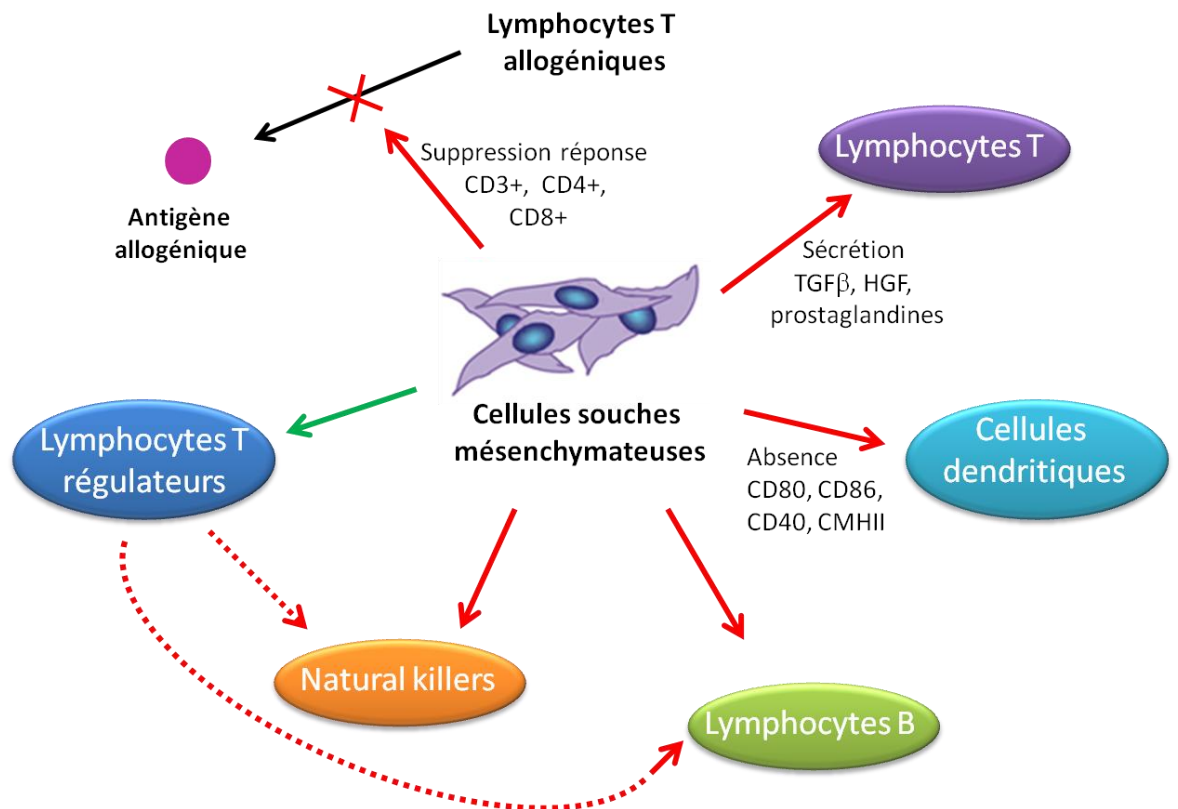


Figure 7 : les mécanismes mis en jeu expliquant l'immunogénicité naturelle des cellules souches mésenchymateuses.

Les flèches rouges indiquent l'inhibition entraînée par les CSMh alors que la flèche verte indique la stimulation entraînée par les CSMh.

Les propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires des CSMh s'exercent à la fois *in vitro* et *in vivo* (Porada *et al.*, 2010). Il semble donc évident que les CSMh peuvent être transplantées malgré les barrières de l'allogénicité sans induire une réponse immune.

Ainsi, les CSMh allogéniques et xéno greffées pourraient être utilisées même chez des patients immunocompétents (Loebinger *et al.*, 2010). Cette caractéristique permettrait de développer un grand nombre de thérapies où des CSMh modifiées

pourraient être administrées chez des patients sans les préoccupations ni les complications entraînées par l'immunomodulation associée à leur utilisation (Bartholomew *et al.*, 2009). Cette propriété pourrait théoriquement permettre le développement d'une banque de CSMh où des cellules allogéniques pourraient être utilisées pour traiter des patients (Loebinger *et al.*, 2010).

1.4.4 Mécanisme d'action des CSMh sur les tumeurs

1.4.4.1 Mécanisme d'action anti-cancéreuse

Après migration jusqu'à la tumeur, les CSMh semblent inhiber la croissance tumorale. Peu d'éléments sont connus concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans cette inhibition (Qiao *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2009 ; Feng *et al.*, 2009).

Les différentes études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont conduit à plusieurs hypothèses que ce soit un mécanisme par interaction directe cellule-cellule ou par sécrétion de cytokines (Zhu *et al.*, 2009 ; Feng *et al.*, 2009). En effet, Matuskova *et al.* ont montré que les CSMh interagissent avec des cellules tumorales et communiquent par l'intermédiaire de jonctions. Ainsi, il a été mis en évidence que les CSMh forment des jonctions avec les cellules de glioblastome et peuvent être des véhicules cellulaires pour exercer un effet cytotoxique en utilisant une combinaison enzyme/prodrogue HSV-Tk/GCV (Herpes Simplex Virus-Thymidine kinase/Ganciclovir) (Matuskova *et al.*, 2009).

Les cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12 et l'IFN- β peuvent stimuler la réponse anti-tumorale à travers l'activation des lymphocytes T qui provoque une réponse immunitaire pour détruire les tumeurs (Hu *et al.*, 2010). Ces cytokines présentent une clairance plasmatique rapide et une faible rétention au niveau de la tumeur ce qui

nécessite une administration fréquente de tels agents. Ainsi l'utilisation thérapeutique de ces cytokines *in vivo* est limitée par une toxicité excessive liée à des administrations systémiques fréquentes et à hautes doses (Hu *et al.*, 2010).

Afin de diminuer cette toxicité et d'améliorer le ciblage tumoral par les cytokines, Hu *et al.* ont administré des CSMh modifiées pour exprimer l'IFN- β dans un modèle de tumeur pulmonaire. Une forte réduction du volume tumoral a été mise en évidence. Une analyse immunohistochimique du tissu pulmonaire a mis en exergue une augmentation de l'apoptose dans les cellules de la tumeur et une diminution de la prolifération cellulaire ainsi que du nombre de vaisseaux sanguins. Une augmentation significative de l'activité des lymphocytes T NK a été observée à la suite de la thérapie par IFN- β , ce qui est corrélé avec l'effet anti-tumoral (Hu *et al.*, 2010).

Une autre explication de cette action anti-tumorale serait que les CSMh augmenteraient l'expression des ARNm des régulateurs négatifs du cycle cellulaire tels que p21 et l'apoptose associée à la protéase caspase 3. Ceci conduirait à un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et à la mort des cellules tumorales par apoptose (Feng *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Motaln *et al.* ont mis en évidence que les CSMh inhibent le phénotype malin des cellules cancéreuses en diminuant leur expression oncogénique (c-myc, PCNA et β -catenin) et augmentent le temps de latence de la formation tumorale (Motaln *et al.*, 2010). Cette inhibition du phénotype malin par les CSMh a également été mise en évidence par Qiao *et al.* dans un modèle d'hépatocarcinome humain (Qiao *et al.*, 2008).

De plus, des études ont mis en évidence l'importance de la quantité de CSMh injectée. En dessous d'un certain seuil, à déterminer expérimentalement, aucun effet n'est observable (Feng *et al.*, 2010). Ainsi, il a été montré que l'injection de CSM chez des rats porteurs de carcinomes du colon entraîne une inhibition de la croissance tumorale qui devient totale lorsque la quantité de CSM injectée est au moins égale au nombre de cellules tumorales présentes (Dwyer *et al.*, 2010).

1.4.4.2 Mécanisme d'action pro-cancéreuse

En opposition avec l'effet d'inhibition tumorale entraîné par les CSMh et observé dans plusieurs études, d'autres publications suggèrent que les CSMh contribueraient à la maintenance et à la progression des cancers (Djouad *et al.*, 2003 ; Zhu *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2008 ; Feng *et al.*, 2009).

Le pouvoir pro-cancéreux serait attribué à plusieurs phénomènes. En effet, les CSMh ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales qui peuvent participer au processus néoplasique. De même, les CSMh ont des propriétés immunosuppressives *in vivo*, qui peuvent indirectement protéger les cellules tumorales du système immunitaire (Zhu *et al.*, 2009). Malheureusement, les CSMh sont donc aussi considérées comme pouvant entraîner l'initiation de la cancérisation de par leur aptitude à se différencier *in vitro*. De tels changements génétiques, s'ils apparaissent *in vivo* pourraient conduire à l'établissement d'une lignée cellulaire souche maligne (Motaln *et al.*, 2010). Matushansky *et al.* ont ainsi émis l'hypothèse que des tumeurs peuvent se développer à partir de CSMh transformées et au fort pouvoir invasif (Matushansky *et al.*, 2007).

Le rôle potentiel des CSMh dans l'initiation ou la progression tumorale est une préoccupation importante qui doit être complètement élucidée afin de pouvoir les utiliser en thérapie cellulaire. Ce rôle constitue l'objet d'un débat récurrent.

D'une part, l'amplification des CSMh *in vitro* est requise en vue d'applications thérapeutiques donc leur stabilité en culture est primordiale. Or, la transformation spontanée de CSMh a été mise en évidence dans le cas de passages *in vitro* à long terme, alors que Bernardo *et al.* n'ont montré aucune évidence de transformation. En effet, la majorité des études montre que les CSM humaines sont stables alors que les CSM murines sont plus sujettes aux transformations génétiques au cours de la culture *in vitro* (Dwyer *et al.*, 2010).

D'autre part, le pouvoir immunosuppresseur naturel des CSM fait qu'elles pourraient inhiber ou restreindre la réponse inflammatoire participant ainsi à la formation d'un microenvironnement tumoral immunodéprimé qui favoriserait la croissance tumorale et le développement de métastases (Feng *et al.*, 2009). De même, les CSM expriment des facteurs pro-angiogéniques notamment l'angiopoïétine-1, le VEGF et des facteurs de croissance tels que le PDGF, le FGF-2 et le FGF-7, mais également des cytokines IL-6 et TNF- α ainsi que l'activateur du plasminogène. Toutes ces molécules agissent de manière synergique sur les cellules endothéliales pour promouvoir la vasculogénèse et l'angiogénèse favorisant ainsi le développement tumoral (Feng *et al.*, 2009 ; Tang *et al.*, 2009).

1.4.5 Utilisation des CSMh en thérapie

Les cellules souches mésenchymateuses représentent une plateforme prometteuse pour la thérapie cellulaire et génique dans le traitement du cancer (Ozawa *et al.*, 2008 Nakamizo *et al.*, 2005). En effet, les CSMh ont la capacité de migrer spécifiquement

vers les tumeurs et les métastases à travers le corps et même de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) pour atteindre les gliomes. Ceci permet d'envisager des avancées considérables en modifiant les cellules pour qu'elles expriment des molécules anti-cancéreuses et les utiliser comme agents thérapeutiques spécifiquement ciblant (Kosztowski *et al.*, 2009 ; Nakamizo *et al.*, 2005 ; Loebinger *et al.*, 2010 ; Feng *et al.*, 2009).

1.4.5.1 Thérapie cellulaire

Les CSMh migrent et prolifèrent au niveau des sites inflammatoires et des tumeurs. Ce comportement des CSMh a été exploité pour une stratégie de ciblage tumoral dans le cadre de thérapies cellulaires anti-cancéreuses (Wang *et al.*, 2009 ; Matuskova *et al.*, 2009). En effet, la greffe de CSMh, modifiées ou non, pour transporter des molécules d'intérêt, permettrait de délivrer des substances cytotoxiques, d'inhiber la croissance tumorale, tout en évitant de léser, voire même en protégeant, le tissu sain avoisinant et en particulier le tissu cérébral dans le cas du traitement du glioblastome (Ren *et al.*, 2008 ; Bexell *et al.*, 2008 ; Dwyer *et al.*, 2010 ; Khasraw *et al.*, 2010 ; Sasportas *et al.*, 2009 ; Valtieri *et al.*, 2008).

En plus de leur tropisme tumoral, il a été montré que les CSMh s'intègrent et persistent dans le stroma tumoral. Cette intégration implique que ces cellules peuvent être utilisées comme véhicule pour délivrer des agents biologiques variés dont l'administration systémique est limitée par leur demi-vie courte et par leur toxicité aux doses requises pour la thérapie. En effet, les CSMh peuvent être modifiées pour sécréter de manière efficace des produits biologiques au niveau des sites tumoraux (Dwyer *et al.*, 2010).

Ainsi, différentes études utilisant des CSMh modifiées ont été réalisées. Ces modifications permettent de cibler les tumeurs mais elles permettent également la sécrétion au niveau tumoral de différentes protéines thérapeutiques telles que l'IFN- β (Nakamizo *et al.*, 2005), l'IL-2 (Nakamura *et al.*, 2004), l'IL-12 (Hamada *et al.*, 2005), le « pigment epithelium derived factor » (Gao *et al.*, 2010), le NK4, TRAIL (Sasportas *et al.*, 2009), la sécrétion de prodrogues activant des gènes suicides (Aboody *et al.*, 2008) ou la délivrance de virus oncolytiques répliquatifs (Dwyer *et al.*, 2010).

L'utilisation d'un système de délivrance spécifique aux tumeurs, associé à des cytokines permettrait d'optimiser le potentiel thérapeutique sur la tumeur elle-même tout en minimisant les effets indésirables sur l'hôte. Ainsi l'utilisation d'une plateforme de ciblage permet l'accumulation des cytokines dans le microenvironnement tumoral, l'activation de leur activité immunologique dirigée contre les cellules tumorales sans entraîner de toxicité systémique (Chen *et al.*, 2010). En effet, Chen *et al.* ont montré que des CSMh modifiées pour exprimer des cytokines peuvent être induites dans le microenvironnement tumoral et se différencient sélectivement dans le tissu tumoral et non pas dans les tissus sains. Elles sont ainsi incorporées dans l'architecture tumorale. Ces CSMh peuvent libérer des molécules biologiques efficaces pour attaquer les cellules et le réseau microvasculaire tumoral directement (Nakamizo *et al.*, 2005).

Plusieurs équipes ont concentré leurs efforts sur l'apport d'un facteur d'intérêt au niveau tumoral. Ainsi, Hamada *et al.* ont utilisé des CSMh modifiées pour sécréter de l'IL-12 au niveau de la tumeur dans un modèle de gliome chez le rat. Ce traitement permet de diminuer la croissance tumorale et d'augmenter la survie en comparaison avec le groupe témoin (Hamada *et al.*, 2005). De même, Chen *et al.* ont

réalisé une étude dans laquelle des CSMh modifiées par des adénovirus pour exprimer l'IL-12 permettent de diminuer la croissance tumorale et de supprimer des métastases, sans toxicité systémique inhérente à leur administration. De plus, une analyse histomorphométrique quantitative montre que l'expression de VEGF-D au niveau des tissus tumoraux a permis d'éliminer une partie des nodules tumoraux lymphatiques avec une augmentation significative de l'index apoptotique. Ces études ont été réalisées dans des modèles de mélanomes, de cancers du sein et d'hépatocarcinomes (Chen *et al.*, 2010).

De même, les CSMh présentent un effet anti-tumoral inné contre les cellules PANC1. Elles peuvent ainsi permettre de délivrer de l'IFN- β pour le traitement des cancers pancréatiques (Hu *et al.*, 2010). Nakamizo *et al.*, quant à eux, ont montré que des CSMh modifiées pour exprimer IFN- β permettent une délivrance intra-tumorale tout en réduisant la toxicité systémique. Dans un modèle de gliome intra-cérébral, ils ont mis en évidence que les CSMh présentent un tropisme tumoral après une administration par voie intra-veineuse. De plus les CSMh-IFN- β ont permis d'augmenter de manière significative la survie des animaux en comparaison avec les animaux témoins (Nakamizo *et al.*, 2005). Enfin, Kidd *et al.* ont montré une diminution de la croissance tumorale dans le cas d'animaux porteurs de tumeurs pancréatiques et traités par des CSMh-IFN- β en comparaison avec le groupe témoin. Ainsi, l'utilisation de molécules anti-inflammatoires dans le cas de tumeurs traitées par CSMh-IFN- β a entraîné une diminution de l'incorporation des CSMh dans le stroma tumoral, sûrement due à une diminution de la migration des CSMh en réponse aux facteurs inflammatoires/migratoires présents dans le microenvironnement tumoral. Ainsi, les effets bénéfiques des CSMh peuvent être amoindris dans les thérapies combinant les CSMh et des agents anti-inflammatoires

(Kidd *et al.*, 2010). Cette expression de cytokines spécifiques de la tumeur peut être prolongée sans entraîner d'effets indésirables sur le long terme. En effet, après sept à dix doublements, les CSMh perdent leur capacité de prolifération ce qui garantit une sécurité clinique (Chen *et al.*, 2010).

Dans une autre étude, Matuskova *et al.* ont testé l'efficacité des CSMh-Tk/GCV (CSMh modifiées pour exprimer le gène de la thymidine kinase sous contrôle d'un promoteur activable par le Ganciclovir) dans un modèle de xénogreffe de glioblastome. Ils mettent ici en évidence l'aptitude des CSMh issues du tissu adipeux à exprimer un transgène HSV-Tk ayant un effet suicide similaire à celui observé avec des CSMh issues d'une source différente. Ils ont démontré la capacité de la combinaison CSM-Tk/GCV à induire une cytotoxicité sur les cellules de glioblastome humain en co-culture directe. Ce type de thérapie requiert une interaction cellule-cellule directe (Matuskova *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Gao *et al.* ont montré que l'injection par voie intra-veineuse de CSMh modifiées pour exprimer le PDGF a permis de diminuer de manière significative la croissance de tumeurs hépatiques primitives ainsi que le développement de métastases pulmonaires dans un modèle de souris *Nude*. De plus, l'immunohistochimie réalisée sur les tumeurs primitives hépatiques a montré une plus faible densité microvasculaire dans le cas des souris traitées en comparaison avec les souris témoins (Gao *et al.*, 2010).

Enfin, la capacité de TRAIL à cibler les cellules tumorales, notamment les cellules de glioblastome, tout en restant inoffensif pour les cellules saines, en fait un candidat attractif pour une thérapie pro-apoptotique des tumeurs cérébrales malignes (Sasportas *et al.*, 2009).

1.4.5.2 *Thérapie génique*

La technologie génique assure l'expression sélective d'agents anti-tumoraux, alors que la technologie « cellules souches » permet d'apporter ces agents thérapeutiques sélectivement au niveau des sites tumoraux. Ainsi, la combinaison de la thérapie cellulaire et de la thérapie génique est une option intéressante car les cellules protégeront le vecteur de la réaction immunitaire et permettront la délivrance du gène ou de la protéine thérapeutique directement au niveau de la tumeur tout en minimisant la toxicité systémique (Dwyer *et al.*, 2010 ; Zielske *et al.*, 2009 ; Kallifatidis *et al.*, 2008). Le transfert efficace des gènes d'intérêt dans ces cellules apporterait un nouveau panel de propositions thérapeutiques (Matuskova *et al.*, 2009 ; Kallifatidis *et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 2010).

Différents systèmes de transfection peuvent être utilisés pour réaliser de la thérapie génique à savoir des vecteurs viraux ou non viraux (polycations, lipides cationiques). Les vecteurs viraux sont les plus prometteurs puisqu'ils permettent d'obtenir un haut niveau de transfert et d'expression génique que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, les vecteurs viraux libres sont éliminés bien avant d'atteindre le tissu ciblé ou d'exprimer leur gène. Ainsi il est essentiel de mettre au point un système de délivrance qui permette le ciblage des tumeurs pour que les vecteurs vulnérables et fragiles puissent exprimer leur gène thérapeutique dans le microenvironnement tumoral. Les meilleurs candidats pour cibler les tumeurs dans ce cas sont les CSMh puisqu'elles ne sont pas repérables par le système immunitaire et ciblent directement la tumeur après injection systémique (Chen *et al.*, 2010).

Par conséquent, pour inhiber la croissance tumorale *in situ*, la modification génique des CSMh est nécessaire pour produire de grandes quantités de gènes thérapeutiques qui interrompent la cinétique de croissance (Kallifatidis *et al.*, 2008).

Le but principal de la stratégie d'inhibition de croissance tumorale est de modifier génétiquement des CSMh pour qu'elles agissent directement comme transporteurs de molécules thérapeutiques qui entraînent une toxicité irréversible sur les cellules tumorales ; cela permettrait la destruction définitive des tumeurs.

C'est ainsi que plusieurs études rapportent l'utilisation des CSMh modifiées génétiquement pour délivrer des cytokines thérapeutiques directement dans le microenvironnement tumoral et ainsi obtenir des concentrations suffisantes en protéines d'intérêt au niveau des sites tumoraux afin de diminuer la croissance tumorale (Hu *et al.*, 2010). Les effets anti-tumoraux des CSMh modifiées génétiquement et administrées par voie intraveineuse ont été montrés dans les poumons, le cerveau et les tumeurs sous-cutanées (Hu *et al.*, 2010). De même, Motaln *et al.* ont montré que des CSMh modifiées pour exprimer un gène suicide, le gène de la tyrosine kinase HSV1-Tk, ont permis la destruction des tumeurs puis leur remplacement par un tissu stromal sain (Motaln *et al.*, 2010).

1.4.5.3 Potentialisation du tropisme des CSMh

L'irradiation focale des cellules tumorales augmente la production de médiateurs de l'inflammation produits par la tumeur. Or, les CSMh ciblent le microenvironnement tumoral grâce aux médiateurs de l'inflammation. Ainsi, l'irradiation focale améliore le recrutement des CSMh au niveau tumoral (Zielske *et al.*, 2009 ; Hu *et al.*, 2010).

Par conséquent, la radiothérapie anti-tumorale peut fonctionner en synergie avec l'injection des CSMh génétiquement modifiées pour améliorer la thérapie génique

anti-cancéreuse (Zielske *et al.*, 2009). De plus, la radiothérapie est couramment utilisée en thérapie anti-tumorale et est souvent associée à la prise en charge du cancer. Ainsi, elle pourrait facilement être combinée à la thérapie cellulaire pour augmenter le tropisme des CSMh vers la tumeur (Zielske *et al.*, 2009).

1.4.6 Modification des CSMh

La technologie et la méthodologie de la transfection génique est devenue de plus en plus importante pour améliorer l'efficacité de la thérapie génique dans la prise en charge du cancer (Hu *et al.*, 2010).

Une méthode de modification des CSMh permettant une forte efficacité de transduction génique est nécessaire pour éviter la culture à long terme de CSMh qui pourrait conduire à la sénescence et compromettrait leur caractère multipotent. En effet, selon le donneur dont étaient issues les CSMh, un phénotype de sénescence a été observé à partir des passages sept à douze en culture *in vitro* (Kallifatidis *et al.*, 2008).

Différents types de vecteurs existent pour transduire des gènes dans des CSMh. Il s'agit des vecteurs rétroviraux, adénoviraux ou lentiviraux (Goa *et al.*, 2010). Afin d'obtenir un profil d'expression à long terme, l'utilisation de vecteurs lentiviraux d'immunodéficience humaine (VIH) est requise (Zielske *et al.*, 2009).

Les vecteurs lentiviraux ont la capacité de transduire à la fois les cellules en division et les cellules quiescentes, ce qui est adapté aux CSMh présentant un temps de doublement long (de l'ordre de soixante-douze heures). De plus, ils permettent une intégration stable et efficace dans le génome de la cellule hôte ce qui garantit l'expression à long terme de gènes thérapeutiques et la transmission du transgène aux

cellules descendantes (Gao *et al.*, 2010 ; Kallifatidis *et al.*, 2008). Ces avantages justifient l'utilisation de vecteurs lentiviraux pour la modification des CSMh (Gao *et al.*, 2010 ; Sasportas *et al.*, 2009) d'autant plus que cette modification n'entraîne pas une altération du nombre de copies d'ADN (Sasportas *et al.*, 2009 ; Loebinger *et al.*, 2010). En effet les cellules modifiées gardent leurs caractéristiques, ciblent les gliomes et ont un effet anti-tumoral *in vivo* significatif que ce soit sur les tumeurs invasives ou malignes (Sasportas *et al.*, 2009).

Kallifatidis *et al.* ont optimisé le transfert génique par infection lentivirale de CSMh pour établir une utilisation facile, rapide et efficace de ces progéniteurs comme véhicules de transfert génique en thérapie anti-tumorale (Kallifatidis *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'efficacité des vecteurs lentiviraux pour la transduction des CSMh rend possible le changement d'échelle pour réaliser un transfert génique dans des modèles animaux ou même pour des essais cliniques (Kallifatidis *et al.*, 2008).

Cependant, un inconvénient de cette efficacité de transduction lentivirale est le risque important d'oncogénèse dû à une intégration multiple de vecteurs. C'est pourquoi, l'utilisation de vecteurs avec des propriétés d'auto-inactivation diminue significativement le risque d'activation de proto-oncogènes voisins (Kallifatidis *et al.*, 2008).

Un grand nombre d'études rapporte l'utilisation des différents systèmes de vecteurs viraux pour transduire les CSMh. Cependant, certains vecteurs ont entraîné des effets indésirables inattendus tels que la toxicité, l'immunogénicité et l'oncogénicité (Hu *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'utilisation de systèmes non viraux n'est pas adaptée pour la transfection des CSMh. En effet, il induisent une expression génique transitoire alors

qu'une expression génique sur une longue durée est requise pour observer une efficacité thérapeutique (Hu *et al.*, 2010).

1.5 Imagerie *in vivo*

En expérimentation animale, les cellules souches mésenchymateuses marquées peuvent être détectées par marquage immunohistochimique, par visualisation de la fluorescence *ex vivo* ou par Polymerase Chain Reaction (PCR) afin d'évaluer la migration de ces cellules et ce, uniquement après sacrifice de l'animal. Bien que sensibles, ces méthodes requièrent un grand nombre d'animaux qui sont sacrifiés à différents temps. C'est pourquoi l'imagerie *in vivo* du petit animal présente un fort intérêt dans la recherche (Kidd *et al.*, 2009 ; Allport *et al.*, 2001 ; Bremer *et al.*, 2001). Les nouvelles approches d'imagerie multimodale non invasive sont applicables cliniquement et pourraient combiner la haute sensibilité (obtenue par les techniques d'imagerie optique) avec la détection directe (obtenue grâce à l'imagerie par résonance magnétique) pour le suivi en temps réel des CSMh avec une forte résolution (Boddington *et al.*, 2010).

L'imagerie non invasive est un outil essentiel pour le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses (van Eekelen *et al.*, 2010). La capacité de suivre *in vivo* les cellules transplantées et de monitorer leur biodistribution est pré-requise pour la compréhension de la migration cellulaire après transplantation, tout particulièrement pour les CSM humaines en vue d'une utilisation clinique (Tseng *et al.*, 2010 ; Loebinger *et al.*, 2010). Cependant, la fonction et le déplacement des CSMh après leur injection sont inconnus à ce jour (Tseng *et al.*, 2010). Le marquage des CSMh avec un gène rapporteur couplé à l'utilisation de l'imagerie constitue une méthode

innovante et non invasive pour quantifier et suivre le devenir des cellules administrées *in vivo* (Wang *et al.*, 2009).

1.5.1 L'imagerie optique de bioluminescence

L'imagerie de bioluminescence des cellules tumorales permet une mesure rapide et non invasive de la masse tumorale (Sasportas *et al.*, 2009 ; Soling *et al.*, 2003 ; Ozawa *et al.*, 2010).

Cette technique se base sur la détection *in vivo* des cellules marquées avec le gène rapporteur de la luciférase, exprimé uniquement dans des cellules vivantes et métaboliquement actives (Kidd *et al.*, 2009 ; 2010 ; Sato *et al.*, 2004). Au contact de son substrat, la luciférine, la luciférase entraîne la production d'oxyluciférine et de photons. Les photons sont captés et quantifiés par une caméra adaptée (Kidd *et al.*, 2009) (figure 8). Bien que la détection de la lumière visible soit limitée en profondeur au niveau de la pénétration des tissus, la technique est idéale pour imager des petits animaux tels que la souris. Actuellement, l'imagerie de bioluminescence a déjà fait ses preuves comme technique pour évaluer la croissance tumorale et la réponse aux traitements (Kidd *et al.*, 2009).

Cependant, l'imagerie de bioluminescence permet seulement de corrélérer une augmentation ou une diminution du flux de photons avec une augmentation ou une diminution relative du nombre de cellules présentes au niveau de la région d'intérêt dans un modèle expérimental (Kidd *et al.*, 2009) (tableau 1).

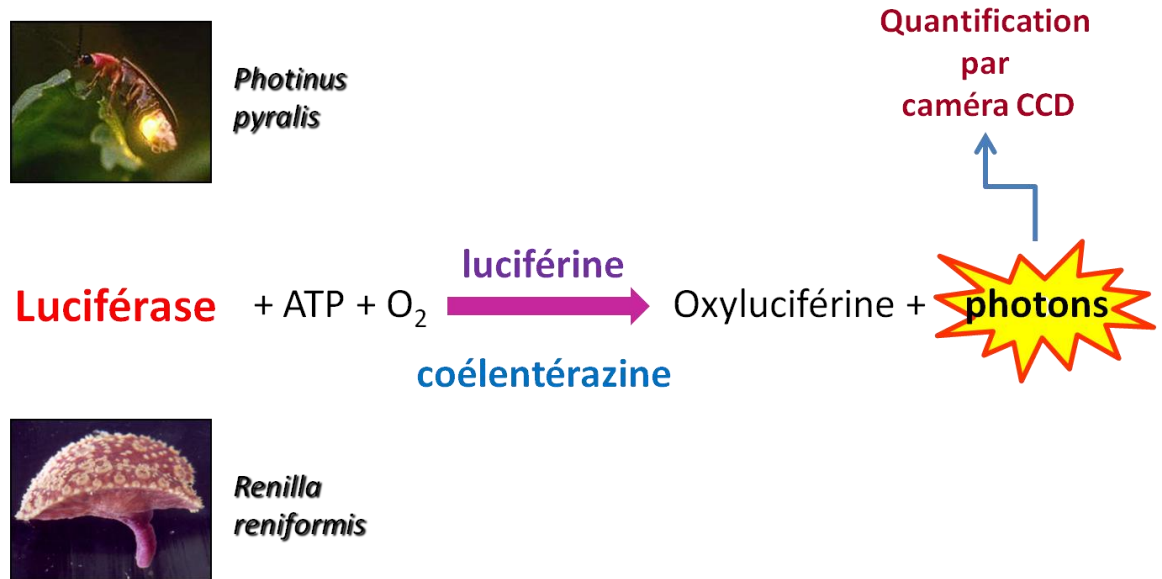


Figure 8 : principe de la bioluminescence.

La luciférase (une enzyme) est présente chez différents organismes mais est absente chez l'homme. La bioluminescence est basée sur la réaction enzymatique entre la luciférase et la luciférine ou entre la luciférase et la coéluentérazine ceci dépendant de l'organisme dont est issue la luciférase. A la suite de cette réaction, des photons sont émis et sont quantifiés par une caméra CCD.

1.5.2 L'imagerie optique de fluorescence

L'imagerie de fluorescence se base sur l'utilisation d'un fluorophore pour marquer un élément biologique que ce soit *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*. Chaque fluorophore présente une longueur d'onde d'excitation et d'émission caractéristique. Ainsi, après excitation, le fluorophore passe d'un état fondamental à un état excité. Son retour à l'état basal est caractéristique et permet l'émission d'une lumière dans une longueur d'onde précise (figure 9).

L'imagerie par fluorescence présente l'avantage de permettre un suivi non invasif *in vivo* (Frangioni *et al.*, 2003 ; Ballou *et al.*, 2005). Cependant, cette technique, en plus de nécessiter un marquage préalable, présente une limite de détection pour les organes profonds notamment à cause des fluides biologiques interférants absorbant dans les longueurs d'ondes des fluorophores. De plus, ce type d'imagerie est fortement dépendant de l'auto fluorescence de l'organisme observé. Or, le corps et en

particulier les poils, riches en kératine, sont naturellement auto-fluorescents dans les longueurs d'onde visibles ; ainsi, seuls des fluorophores du proche infra-rouge et des conditions d'expérimentations adaptés permettront un suivi *in vivo*. Par ailleurs, la résolution spatiale de ces techniques est faible et n'apporte pas de données anatomiques précises (Tseng *et al.*, 2010) (tableau 1).

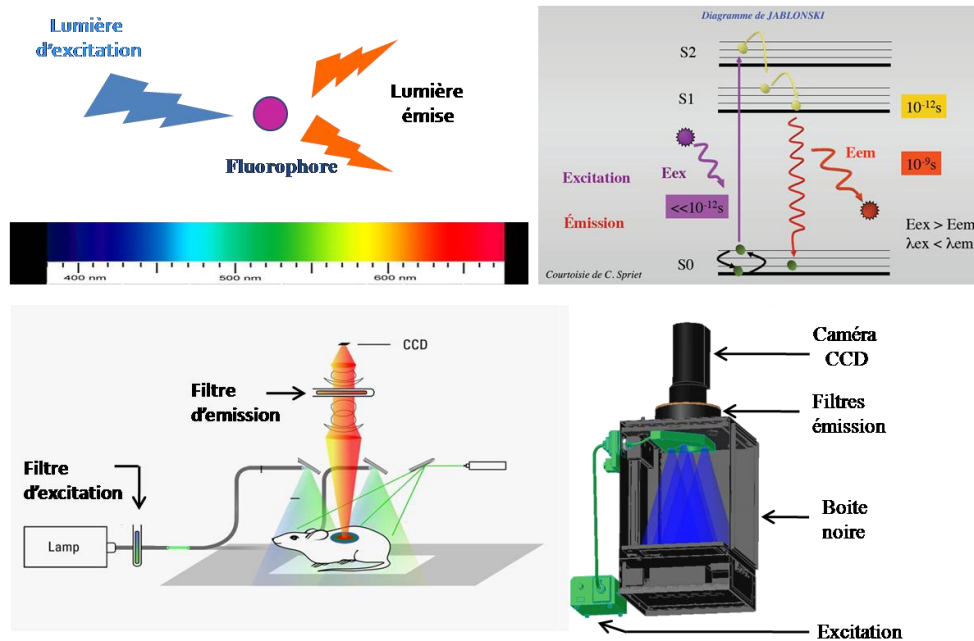


Figure 9 : principe de la fluorescence.

Une lumière excite un fluorophore *via* un filtre d'excitation. Le fluorophore excité retourne à son état fondamental en émettant une lumière d'émission qui est filtrée à une longueur d'onde donnée et captée par une caméra CCD. Chaque fluorophore présente une longueur d'onde d'excitation et d'émission caractéristique.

1.5.3 L'imagerie par résonance magnétique

Tout comme la fluorescence ou la bioluminescence, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est une méthode non invasive d'imagerie *in vivo*. L'IRM possède une bonne résolution spatiale mais une faible sensibilité. L'utilisation d'un marquage magnétique des cellules est capitale pour garder la limite de détection aussi basse que possible (Tseng *et al.*, 2010).

Par conséquent, un des principaux challenges de l'imagerie cellulaire est de développer des techniques optimisées de marquage cellulaire qui permettent d'obtenir un compromis entre la concentration minimale possible pour la sensibilité de détection cellulaire et la concentration maximale qui ne perturbe pas la fonction cellulaire (Boddington *et al.*, 2010).

Tableau 1 : tableau comparatif des différentes méthodes d'imagerie *in vivo* non invasives

	Résolution	Principe	Avantages	Inconvénients
Scanner	50µm	<ul style="list-style-type: none"> - Rayons X - Mesure des coefficients d'absorption caractéristiques des différents tissus 	<ul style="list-style-type: none"> - Images précises - Utilisée en clinique - pas de marquage préalable 	<ul style="list-style-type: none"> - Rayonnements ionisants - Faible contraste sur les tissus mous
Imagerie par Résonance Magnétique	10-100µm	<p>Ondes magnétiques à haute fréquence</p> <p>Le signal indique l'environnement des protons présents</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Excellente résolution spatiale - Rayonnements non ionisants - Pas de limite de profondeur - Signal quantitatif - Utilisation en clinique - Bon contraste sur tissus mous - Pas de marquage préalable 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de visualisation de tissus durs - Durée d'acquisition longue
Fluorescence	2-3mm	Visualisation d'un fluorophore après excitation	<ul style="list-style-type: none"> - Non invasive - Rapide - Peu coûteuse - Très sensible - Temps d'acquisition court - Méthode de choix pour le petit animal 	<ul style="list-style-type: none"> - Pas utilisée en clinique - Faible résolution spatiale - Profondeur de détection limitée - Nécessité d'utiliser un traceur. - Problème de l'autofluorescence des tissus
Bioluminescence	Une dizaine de cellules	Réaction enzymatique entre les cellules présentant le gène de la luciférase et le substrat injecté la luciférine	<ul style="list-style-type: none"> - Non invasive - Très sensible 	<ul style="list-style-type: none"> - Ne fonctionne que sur des cellules Luciférase + - Peu résolutive - Dépend de l'état métabolique de la cellule - très coûteuse

1.6 Projet de Recherche

Un réel débat persiste quant à l'utilité des cellules souches mésenchymateuses en thérapie anti-cancéreuse. En effet, sont-elles naturellement pro ou anti-tumorales ?

Malgré les doutes concernant ces cellules, des thérapies cellulaires mettant en œuvre des Cellules Souches Mésenchymateuses humaines (CSMh) ont gagné de la notoriété de par leur viabilité et les options de traitement proposées pour une variété de maladies considérées comme étant incurables (Hingtgen *et al.*, 2010). Pour de telles maladies, résistantes aux autres stratégies thérapeutiques, les CSMh permettent de proposer des options de traitement efficace quand elles sont utilisées comme véhicule de transport de molécules thérapeutiques (Hingtgen *et al.*, 2010).

De récentes études montrent que cette population cellulaire présente une capacité unique de ciblage des sites tumoraux pour exercer un effet suppresseur sur la croissance tumorale. De plus de nouvelles évidences suggèrent que les CSMh faciliteraient des thérapies ciblées vers les sites métastatiques puisque ces sites exercent la même attraction que la tumeur primaire. Ces différentes propriétés font des CSMh des transporteurs cellulaires très intéressants pour le ciblage spécifique des sites tumoraux (Chen *et al.*, 2010).

Ainsi, afin d'évaluer le caractère anti- ou pro-cancéreux des CSMh, notre projet consiste à étudier l'effet des cellules souches mésenchymateuses humaines en thérapie cellulaire anti-cancéreuse dans un modèle de glioblastome humain xéno greffé chez des souris *Nude*. Des tumeurs bioluminescentes ont été implantées en intra-cérébrale chez ces souris. Après modification stable des CSMh par des lentivirus nous avons pu suivre en parallèle le développement tumoral et la

biodistribution des CSMh dans l'organisme. De plus, nous avons comparé deux méthodes d'imagerie non invasives *in vivo* à savoir les méthodes d'imagerie optique, avec la bioluminescence et la fluorescence, et la méthode d'imagerie par résonance magnétique (IRM).

II. Matériel et méthodes

2.1 Les animaux

Les souris utilisées sont des femelles âgées de 3 à 9 semaines de type *Nude* NMRI. Elles proviennent des laboratoires Janvier (Le Genest Saint Isle (53), France). A leur arrivée, elles sont placées en stabulation durant une semaine avant toute expérimentation. Les souris *Nude* NMRI sont caractérisées par une aplasie du thymus ce qui leur donne la particularité d'être déficientes en lymphocytes T, la réponse aux anticorps est limitée aux IgM, la réponse aux lymphocytes T dépendant des antigènes est faible mais une augmentation des Natural Killers (NK) en compensation de cette immunodépression est observée. Le caractère *Nude* NMRI facilite notamment le développement de tumeurs xéno greffées en évitant leur rejet immunitaire. Elles sont maintenues dans des conditions exemptes d'agents pathogènes à température et hygrométrie contrôlées.

Toutes les expérimentations sont réalisées sous anesthésie par isoflurane gazeux (4% en induction puis 2.5% en maintien avec un système Minerve, Esternay, France avec de l'isoflurane Bellamont, Cournon d'Auvergne, France). Lors d'une action invasive, un mélange de 50µL de chlorhydrate de médétomidine 0.085% (Domitor[®] Pfizer), et 500µL de Kétamine (Imalgène1000[®] Merial) dilués dans 4450µL de PBS stérile (Phosphate Buffer Saline : 155mM NaCl ; 4mM KH₂PO₄ ; 16mM Na₂HPO₄ ; pH8) est administré par voie intra-péritonéale à raison de 230µL par 20 grammes de souris.

Avant toute expérimentation, les protocoles d'expérimentation animale sont soumis, au comité d'éthique en expérimentation animale de Grenoble (38).

2.2 Lignées cellulaires et culture cellulaire

Des cellules et lignées cellulaires ont été utilisées dans cette étude :

- Les cellules U87 MG –HTB-14 (American Type Culture Collection, Manassas, VA), une lignée de glioblastome-astrocytome humain.
- Les cellules U87-Luc, une lignée cellulaire de glioblastome-astrocytome humain transfectées par rétrovirus pour exprimer de manière stable le gène rapporteur de la luciférase firefly (fLuc).
- Les cellules Souches Mésenchymateuses humaines (CSMh) obtenues à partir de moelle osseuse de patients donateurs sains après réception de leur consentement écrit (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire, Grenoble, France).

Les cellules U87 et U87-Luc sont maintenues en culture *in vitro* dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM-glutamax, Invitrogen) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), des acides aminés non essentiels (Gibco) et 1% de mélange pénicilline/streptomycine (Gibco).

Les cellules souches mésenchymateuses sont maintenues en culture *in vitro* dans un milieu minimum essential medium eagle (MEM Sigma®) supplémenté par du glutamax, 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen) et 1% de mélange pénicilline/streptomycine (Gibco). Les cellules ne sont pas cultivées au-delà de 4 passages.

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ et de 95% d'air.

2.3 Modèle de glioblastome

Des cellules de glioblastome humain U87 et U87-Luc ont été utilisées pour développer un modèle de tumeur cérébrale orthotopique. Toutes les implantations sont pratiquées sur des souris anesthésiées à l'isoflurane (cf 2.1).

Les cellules (U87, U87-Luc) cultivées en monocouches subconfluentes sont détachées par trypsination, lavées, comptées au compteur de cellules Invitrogen et resuspendues dans du PBS (Sigma, France) afin d'obtenir une concentration de 10^5 cellules/5 μ L.

Les tumeurs cérébrales ont été obtenues par implantations stéréotaxiques (bregma ; ML : 2.0mm ; DV : 3mm). Les souris femelles *Nude* NMRI sont placées sur un cadre stéréotaxique et une incision longitudinale de la peau du crâne est réalisée le long de la ligne médiane. La suspension cellulaire (10^5 cellules dans 5 μ L) est ensuite injectée lentement (5 min) à travers le crâne, dans le cerveau, par une aiguille 30G connectée à une seringue de Hamilton. Trois minutes après la fin de l'injection, la seringue est retirée progressivement. La perforation osseuse est obstruée avec de la cire et la peau du crâne suturée.

Une analgésie post-opératoire préventive est réalisée par une injection sous-cutanée de 20 μ L de carprofène (Rimadyl® 50mg/mL) pour une souris de 25 grammes. Le site opératoire est désinfecté avec de la povidone iodée.

Le développement tumoral est visualisé par imagerie IRM une semaine après l'implantation des cellules tumorales.

2.4 Marquage des CSMh

2.4.1 Marquage par la GFP-Actine

Trois semaines avant l'injection, les CSMh ont été modifiées de manière stable avec un lentivirus de troisième génération (pLV-Actine-GFP) permettant l'expression du gène GFP-actine (Green Fluorescent Protein ; Ex/Em = 488nm/507nm) sous contrôle d'un promoteur CMV. Le lentivirus pLV-Actine non répliquatif a été développé et offert gracieusement par le Docteur Olivier Destaing (Institut Albert Bonniot, Grenoble, France). Le surnageant lentiviral est mis dans le milieu de culture d'une flasque T150 de CSMh.

Deux semaines après la modification, afin d'évaluer l'efficacité et la stabilité du marquage, les cellules sont observées en microscopie de fluorescence grâce à l'expression de la protéine fluorescente (GFP) ainsi que par cytométrie en flux (FACS Aria Cell-Sorting System, BD Biosciences).

2.4.2 Marquage par des nanoparticules

Le jour précédant l'injection *in vivo*, les CSMh sont marquées avec des nanoparticules BANGS (Bangs laboratory, Fisher, IN, Etats-Unis ; 0.01µg/µL) à raison de 21µg de fer pour 8×10^6 cellules pour 1mL de milieu de culture cellulaire (Valable *et al.*, 2008). Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur de fer carboxylé polydispersé (0.9µm de diamètre, 63.4% magnétite w/w) entouré de molécules Flash Red fluorescentes dans le proche infra-rouge (Ex/Em=660nm/690nm). Ces nanoparticules peuvent être observées en utilisant l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) grâce au fer et par l'imagerie optique

de fluorescence grâce aux fluorophores. Les CSMh sont incubées avec les nanoparticules pendant 18 heures dans une atmosphère à 37°C contenant 5% de CO₂.

2.5 Injections des CSMh

Les CSMh cultivées dans la flasque T150 sont rincées avec du PBS puis sont détachées par trypsination, rincées deux fois avec du PBS et centrifugées à 600rpm pour enlever les nanoparticules n'ayant pas été incorporées par les cellules.

Des groupes homogènes de souris sont réalisés d'après les résultats de bioluminescence ou d'IRM préalablement obtenus afin d'avoir une représentation de toutes les tailles de tumeurs dans chaque groupe.

Les souris sont anesthésiées sous isoflurane (4% en induction et 2.5% en maintien).

Un groupe de souris reçoit une injection intra-veineuse de CSMh marquées (5×10^5 cellules/200µL PBS/souris), le groupe de souris témoin reçoit 200µL de nanoparticules seules en IV.

Les animaux vont être traités soit par voie intra-veineuse soit par voie intra-artérielle par injection dans la carotide interne. Quatre groupes d'animaux sont constitués : le premier groupe reçoit des CSMh-GFP-NP par voie intra-veineuse alors que le deuxième groupe les reçoit par voie intra-artérielle. Le troisième et le quatrième groupe sont les témoins, ils reçoivent des NP seules par voie intra-veineuse ou par voie intra-artérielle.

2.6 Evaluation de la progression tumorale *in vivo* : bioluminescence et IRM

Afin d'évaluer la croissance tumorale des cellules de glioblastome humain marquées de façon stable avec le gène de la luciférase (U87-Luc), une imagerie « corps-entier »

par bioluminescence a été réalisée aux jours 2, 5, 8, 13, 16, 19, 21, 23, 26, 30 et 33 après l'implantation tumorale.

Dans un premier temps, 300 μ L de luciférine (10mg/mL dans 0.9% NaCl, Promega, Charbonnière, France) sont injectés aux souris éveillées par voie intra-péritonéale. 5 minutes après l'injection, les souris sont anesthésiées sous isoflurane (4% en induction puis 2.5% en maintien) afin de réaliser une image de bioluminescence de la tumeur.

Les souris sont maintenues en position horizontale dans une chambre d'imagerie exempte de lumière et équipée d'une caméra CCD (Cooled Charge-coupled Device, Hamamatsu Photonics, Massy, France) qui permet la capture des photons issus de la réaction luciférine/luciférase. La bioluminescence est quantifiée à l'aide du logiciel Wasabi (fabricant ?); le bruit de fond est systématiquement soustrait.

Parallèlement à la bioluminescence, une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a été pratiquée sur les souris ayant reçu des cellules de glioblastome non marquées à la luciférase (U87). Ces expériences ont été réalisées avec une IRM 4.7T (Bruker Avance 3 console) en utilisant une antenne de volume pour l'excitation et une antenne de surface pour la détection. Les expériences de résonance magnétique sont réalisées sous anesthésie : 5% d'isoflurane pour l'induction puis 2% au cours de l'expérience. Les images anatomiques T2 ont été acquises grâce à une séquence IRM turbo-RARE (TR/TE = 3000/10.4ms, NA = 4, 19 coupes avec FOV = 16mm et une taille de voxel = 125x153x1000 μ m³). Pour détecter le fer, les valeurs de T2* sont mesurées en séquence d'écho de multi-gradient (7 échos, TR/TE = 1500/[3.5, 8.5, 13.5, 18.5, 23.5, 28.5, 33.5ms]), 7 coupes avec FOV = 16mm et taille de voxel = 95x95x1000 μ m³).

Les volumes tumoraux ont été obtenus en délimitant les tumeurs sur les images des coupes adjacentes obtenues en T2, en comptant les pixels compris dans les limites de la tumeur.

2.7 Suivi des CSMh *in vivo* : fluorescence

A la suite de la bioluminescence, les souris sont maintenues anesthésiées sous isoflurane 2.5%. Les souris sont illuminées par des diodes à 633nm équipées de filtres interférents. Les images de réflectance de fluorescence (FRI) ont été acquises avec une caméra CCD et un filtre long pass RG 665 (Melle Griot, Voisin le Bretonneux, France) en vue d'éliminer toute la lumière d'excitation. Les images de fluorescence sont superposées à l'image en noir et blanc pour une meilleure localisation du signal de fluorescence. Les données semi-quantitatives sont obtenues à partir des images de fluorescence en dessinant les régions d'intérêt. La fluorescence émise est quantifiée (le bruit de fond est systématiquement soustrait). Les résultats sont exprimés en RLU (Relative Light Unit)/pixel. L'acquisition, l'analyse et la quantification des images est réalisée à l'aide du logiciel Wasabi (Hamamatsu Photonics).

2.8 Sacrifice des souris

Les souris sont sacrifiées 12 jours (souris ayant reçu les injections par voie intra-artérielle) ou 19 jours (souris ayant reçu des injections par voie intra-veineuse) après l'injection de CSMh ou de nanoparticules.

Pour chaque expérimentation, la moitié des souris témoins et la moitié des souris ayant reçu les CSMh sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les organes sont

prélevés puis congelés à -80°C afin de réaliser des analyses de biologie moléculaire par la suite.

Les souris restantes sont sacrifiées par perfusion intra-cardiaque de paraformaldéhyde (PFA) (4% % de poudre de paraformaldéhyde dissoute dans un tampon de phosphate de Sörensen 0.1M (pH7.3)) qui permet de fixer les tissus de la souris. Ce type de fixation permet de réaliser des coupes histologiques de cerveau. Pour la fixation au PFA, les souris sont anesthésiées avec une solution de Domitor/Kétamine (cf 2.1 les animaux), puis elles reçoivent une perfusion intra-cardiaque est réalisée de 10mL de PBS puis de 10mL de PFA 4%. Les organes sont ensuite conservés à $+4^{\circ}\text{C}$.

2.9 Histologie

Des coupes flottantes des cerveaux de souris de $10\mu\text{m}$ sont réalisées avec un cryostat (2800 frigocut Reichert-Jung[®] à -20°C) et sont placées sur des lames de microscope (7.6x2.6mm /3x1 inch, StarFrost[®], Braunschweig). Une partie des coupes reçoit un marquage hématoxyline/éosine (H/E) en vue d'étude histologique alors qu'une autre partie des coupes reçoit un marquage au bleu de Prusse afin de marquer le fer présent sur les coupes de cerveau.

La dernière partie sera étudiée par microscopie de fluorescence. Les lames sont montées avec un milieu de montage VECTASHIELD et les noyaux sont visualisés en utilisant le 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Vector laboratories, Burlingame, CA). Les coupes sont analysées avec un microscope confocal LSM510-Meta (Carl Zeiss, Jena, Allemagne) équipé du logiciel SP2 (version 3.2). Les images de fluorescence ont été obtenues après une excitation avec un LASER dans le canal bleu à 457nm (visualisation de la GFP) et un LASER à 633nm (visualisation des

nanoparticules) pour le canal rouge. Les images ont été acquises en utilisant un plan achromatique 20x ou 63x/1.4 avec un objectif à immersion à huile puis ont été traitées avec le logiciel de traitement d'image ImageJ (NIH, Etats-Unis).

III. Résultats

3.1 Détermination du moment d'administration des CSMh dans un modèle de glioblastome humain chez des souris *Nude* NMRI

En vue d'applications thérapeutiques, nous avons tout d'abord déterminé les conditions optimales d'injection des CSMh dans un modèle de glioblastome humain xenogreffé chez la souris *Nude* NMRI. Pour cela, nous avons implanté 10^5 cellules de glioblastome humain (U87) en intra-cérébral chez trois souris puis nous avons suivi la croissance tumorale.

Le volume tumoral a été évalué par IRM durant trois semaines (figure 10). La courbe présente un point d'exponentialisation au jour 14 (flèche orange sur la figure 10). Pour toutes les expérimentations, les CSMh seront injectées 14 jours (J14) après l'implantation tumorale.

Une courbe de croissance similaire a été obtenue avec les cellules U87-luciférase+ (données non montrées).

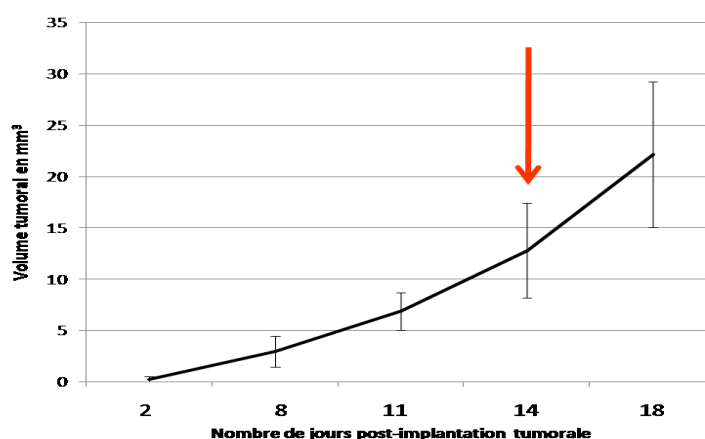


Figure 10 : Courbe de croissance des cellules U87 implantées en intra-cérébral chez des souris *Nude* NMRI.

Le volume tumoral a été évalué par IRM. La flèche orange (J14) correspond au point d'inflexion de la courbe qui prend une allure de courbe exponentielle. Ce point sera le jour d'administration des CSMh.

3.2 Marquage des CSMh avec un lentivirus LV-Actine-GFP et des nanoparticules

Les CSMh ont été efficacement transduites par le lentivecteur fraîchement fabriqué codant pour le gène de fusion Actine-GFP, sous le contrôle du promoteur CMV comme le montre la fluorescence cellulaire émise par la GFP en microscopie (excitation 488nm) (figure 11). L'efficacité d'infection des cellules souches par les lentivirus ainsi que la durée d'expression du gène rapporteur ont été analysées par FACS (excitation 488nm) (figure 11) deux semaines après l'infection. Le résultat de cette analyse indique que 85.3% des cellules ont été modifiées par l'infection lentivirale et l'expression est toujours visible deux semaines plus tard. De même, la fluorescence de la GFP est visible *in vitro* avant injection (figure 11). L'objectif de ce marquage avec la GFP est de nous permettre de visualiser ultérieurement les CSMh sur les coupes de cerveau, *ex vivo*, au microscope confocal, après sacrifice des souris.

En parallèle, les CSMh ont aussi été marquées avec des nanoparticules BANGS (oxyde de fer/fluorophores) afin de permettre leur suivi *in vivo* par IRM ou par imagerie optique de fluorescence. L'efficacité et la stabilité de ce double marquage a été vérifiée par FACS ainsi que par visualisation par imagerie de fluorescence *ex vivo* (660nm) d'une goutte de 10 μ L contenant 25 000 CSMh marquées avant injection (figure 11). Vingt-deux heures après la modification des CSMh par les nanoparticules (temps correspondant au moment d'injection des CSMh dans nos expérimentations), 82.5% des CSMh sont marquées et la fluorescence est bien visible (figure 11).

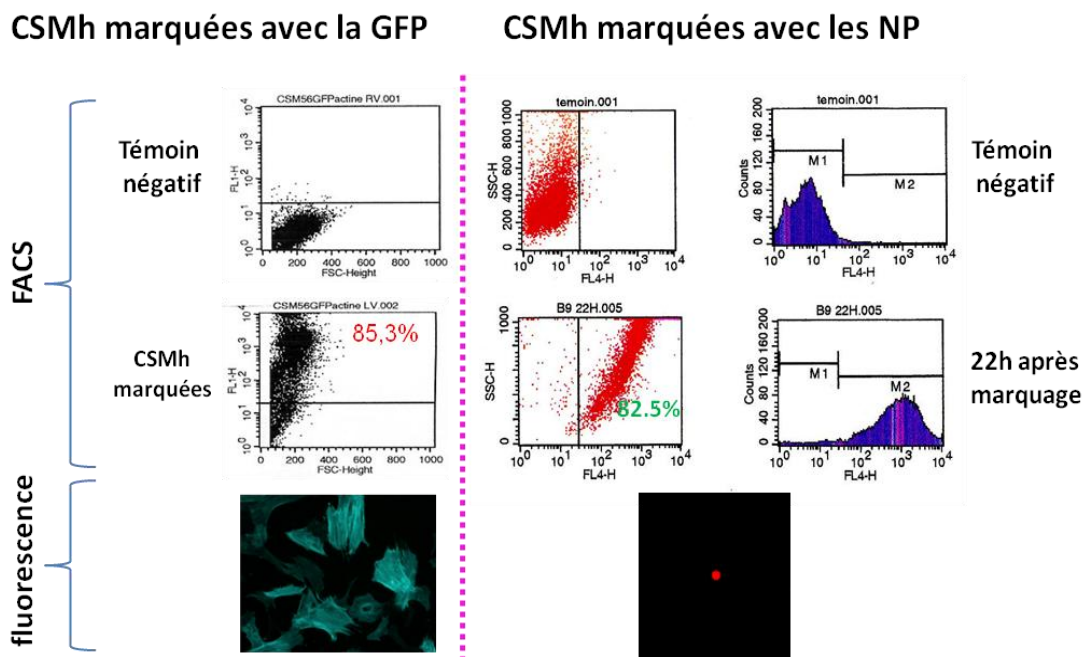


Figure 11 : vérification du double marquage des CSMh.

Les CSMh ont été doublement marquées avec un gène rapporteur (GFP) et avec des nanoparticules BANGS. Les CSMh ont été transduites avec le lentivirus LV-GFP-Actine et, deux semaines plus tard, ont été observées par FACS. De même, 22heures après le marquage des CSMh par les nanoparticules (NP), l'efficacité du marquage des CSMh a été évaluée par FACS. Avant l'injection des CSMh, la fluorescence de la GFP a été observée *in vitro* sur les CSMh en culture alors que la fluorescence des nanoparticules a été évaluée sur une goutte de CSMh-GFP-NP.

3.3 Evaluation *in vivo* par IRM du tropisme tumoral des CSMh marquées par des nanoparticules

Afin de déterminer la possibilité de suivre *in vivo* le ciblage des tumeurs par les CSMh, nous avons injecté par voie intra-veineuse et intra-artérielle des CSMh doublement marquées avec la GFP et des nanoparticules de fer (CSMh-GFP-NP) chez des souris porteuses d'un glioblastome et réalisé des IRM.

10^5 cellules U87 ont été implantées en intra-cérébral chez dix souris *Nude* NMRI. Quatorze jours après l'implantation tumorale, les volumes tumoraux étaient compris entre 8 et 28mm³.

Trois groupes de souris ont été constitués (tableau 2).

Tableau 2: les différents groupes de souris constitués pour l'évaluation de l'impact des CSMh-GFP-NP sur les cellules tumorales

Nombre de souris	Type d'injection	Injection
1	intra-artérielle	5×10^5 CSMh-GFP-NP
6	intra-veineuse	5×10^5 CSMh-GFP-NP
3	intra-veineuse	200 μ L nanoparticules

Des séquences T2 et T2* ont été réalisées en IRM avant et après l'administration de CSMh. L'imagerie T2 permet d'obtenir des renseignements morphologiques précis concernant la tumeur, à savoir sa taille et son positionnement intra-cérébral. La tumeur apparaît en blanc sur la coupe de cerveau. L'imagerie T2* permet, quant à elle, de visualiser le fer par des signaux hypo-intenses (apparaissent en noir sur les images) (figure 12A). Ainsi, la séquence T2* nous permet d'évaluer l'éventuel état hémorragique de la tumeur avant l'administration des CSMh, ceci correspondant au signal non spécifique des nanoparticules. Après l'injection des nanoparticules, le signal de fer est comparé à l'image précédente pour évaluer la présence de nanoparticules au sein de la tumeur.

Dans le cas où les souris ont reçu des CSMh-GFP-NP, un signal hypo-intense est visible au niveau de la tumeur, ce qui n'est pas le cas pour les souris témoins ayant reçu des nanoparticules seules ($n = 1/4$).

3.4 Evaluation par IRM de l'impact des CSMh-GFP-NP sur la croissance tumorale

Afin d'évaluer l'impact des CSMh sur la croissance tumorale, la taille des tumeurs a été évaluée par IRM, quatre jours avant (figure 12A, J-4) et trois jours après (figure 12A, J+3) l'administration des CSMh-GFP-NP.

La croissance tumorale augmente plus chez les souris témoins que chez les souris traitées par les CSMh-GFP-NP par voie intra-veineuse (n=4/5). Par ailleurs, dans le cas de la souris ayant reçu une injection intra-artérielle (intra-carotidienne) de CSMh-GFP-NP, une légère diminution de la croissance tumorale est observée (figure 12B).

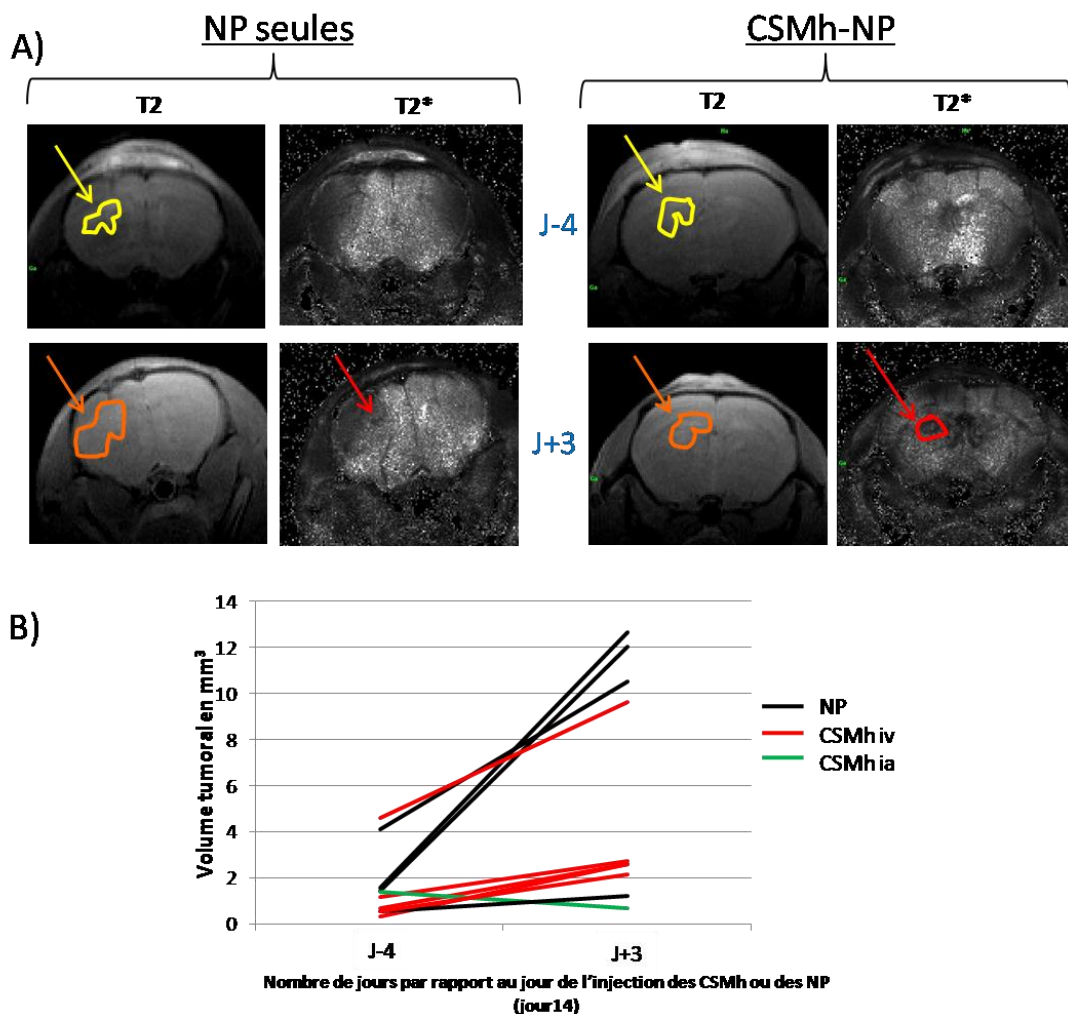


Figure 12 : IRM réalisée sur des souris *Nude* NMRI ayant reçu des CSMh-GFP-NP ou des NP seules.

A) Visualisation morphologique de la tumeur (entourée en jaune et en orange) par une séquence T2 d'IRM et du signal de fer des nanoparticules (entouré en rouge et flèche rouge) par une séquence T2*. Des IRM ont été réalisées quatre jours avant et trois jours après la greffe de CSMh.

B) Évolution du volume tumoral avant et après la greffe de CSMh (courbes rouges : souris ayant reçu des CSMh-GFP-NP par voie intra-veineuse ; courbes vertes : souris ayant reçu des CSMh par voie intra-artérielle ; courbes noires : souris ayant reçu des NP seules en IV).

3.5 Evaluation par l'imagerie optique de bioluminescence de l'impact des CSMh sur la croissance tumorale

Afin de confirmer les effets observés des CSMh sur les glioblastomes *in vivo* par IRM, nous avons réalisé des images de bioluminescence dans le but d'évaluer l'impact des CSMh injectées par voie intra-artérielle ou intra-veineuse chez des souris porteuses de glioblastome humain.

Pour cela, nous avons implanté des cellules (10^5 cellules U87-Luc) en intra-cérébral chez dix-neuf souris *Nude* NMRI. Les cellules tumorales implantées possèdent le gène de la luciférase qui permet, après une injection intra-péritonéale de luciférine, de visualiser les cellules porteuses de ce gène par imagerie de bioluminescence. Quatorze jours après implantation, nous avons injecté des NP ou des CSMh exprimant le gène de fusion GFP-Actine et marquées avec des NP (CSMh-GFP-NP). Le jour de l'injection, les volumes tumoraux sont mesurés et quatre groupes homogènes de souris sont constitués. Cinq souris reçoivent les CSMh-GFP-NP par voie intra-artérielle et six souris les reçoivent par voie intra-veineuse. Quant aux souris témoins, trois souris reçoivent les NP seules par voie intra-artérielle et trois par voie intra-veineuse.

La bioluminescence est mesurée pendant douze à dix-neuf jours après injection des CSMh soit vingt-six à trente-trois jours après l'implantation tumorale (figure 13). Les souris sont sacrifiées lorsque les considérations éthiques le nécessitent (perte de poids supérieure à 10%, comportement stressé). Plus particulièrement, les souris ayant reçu les injections par voie intra-artérielle ont été sacrifiées plus précocément que les souris ayant reçu les injections par voie intra-veineuse, leur état général

s'étant dégradé à la suite de l'opération chirurgicale pour injection dans la carotide interne.

Le premier graphique (figure 13A) représente l'évolution de la croissance tumorale chez les souris ayant reçu des injections par voie intra-artérielle alors que le deuxième graphique (figure 13B) celle des souris ayant reçu les injections par voie intra-veineuse. La courbe rouge représente l'évolution de la croissance tumorale chez les souris témoins alors que la courbe bleue représente l'évolution de la croissance tumorale chez les souris traitées par les CSMh-GFP-NP. La tendance observée est la même que les souris reçoivent une injection par voie intra-artérielle ou par voie intra-veineuse, (figure 13). En effet, la croissance tumorale semble être moins importante chez les souris traitées que chez les souris témoins. En revanche, cette différence n'est pas statistiquement significative entre les deux groupes.

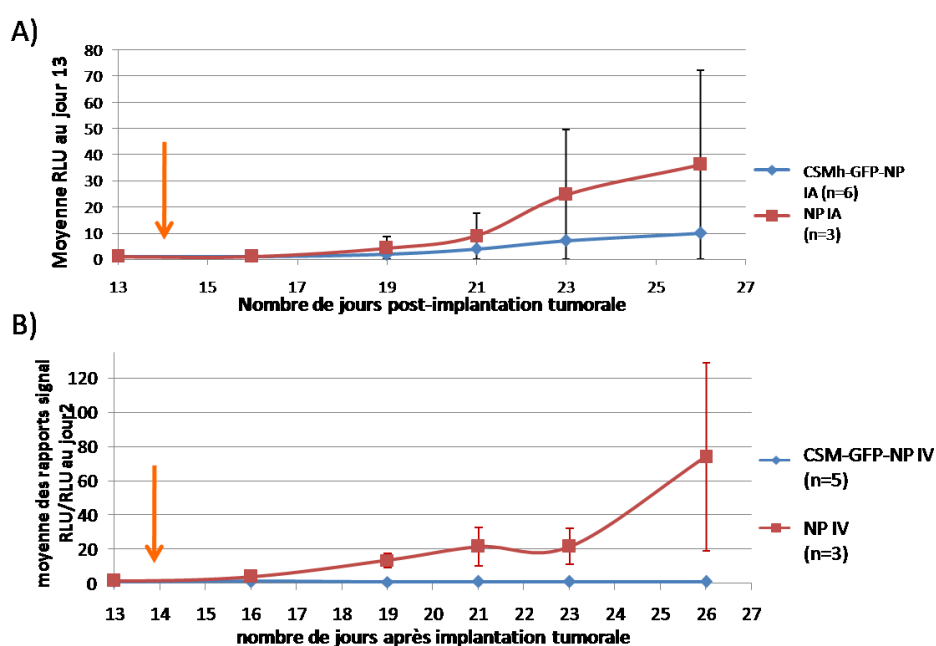


Figure 13 : Evaluation de la croissance tumorale, avec injection IA ou IV de CSMh-GFP-NP chez des souris *Nude* NMRI porteuses d'un gliome, par imagerie optique de bioluminescence.

10^5 cellules tumorales U87-Luc ont été injectées en intra-cérébrale au jour zéro. Au jour 14 (flèche orange), un groupe de souris a reçu 5×10^5 CSMh-GFP-NP en IA et un autre groupe en IV alors que les groupes témoins ont reçu des NP seules. A) Intensité de bioluminescence des cellules U87-Luc implantées en intra-cérébrale après injection intra-artérielle de cellules CSMh-GFP-NP (courbe bleue) ou de NP (courbe rouge). B) Intensité de bioluminescence des cellules U87-Luc implantées en intra-cérébrale après injection intra-veineuse de CSMh-GFP-NP (courbe bleue) ou de nanoparticules (courbe rouge).

3.6 Confirmation de l'impact des CSMh-GFP-NP injectées par voie intra-veineuse sur la croissance tumorale

Afin de confirmer les résultats observés par bioluminescence et par IRM qui mettent en évidence une diminution de la croissance tumorale par les CSMh-GFP-NP en comparaison avec les nanoparticules seules, l'expérience a été répétée sur un plus grand nombre de souris.

10^5 cellules U87-Luc sont implantées en intra-cérébral chez seize souris *Nude* NMRI. Quatorze jours après l'implantation tumorale, la bioluminescence est mesurée et deux groupes de huit souris sont constitués, chacun comprenant toutes les tailles de tumeur. Huit souris reçoivent 5×10^5 CSMh-GFP-NP par voie intra-veineuse alors que les huit autres souris reçoivent des NP seules. La croissance tumorale est évaluée par mesure de la bioluminescence pendant dix-neuf jours après l'implantation tumorale.

Les souris témoins (courbe rouge) présentent une croissance tumorale plus importante que les souris traitées (courbe bleue). Cependant, la différence observée entre les deux groupes n'est pas statistiquement significative (cf figure 14).

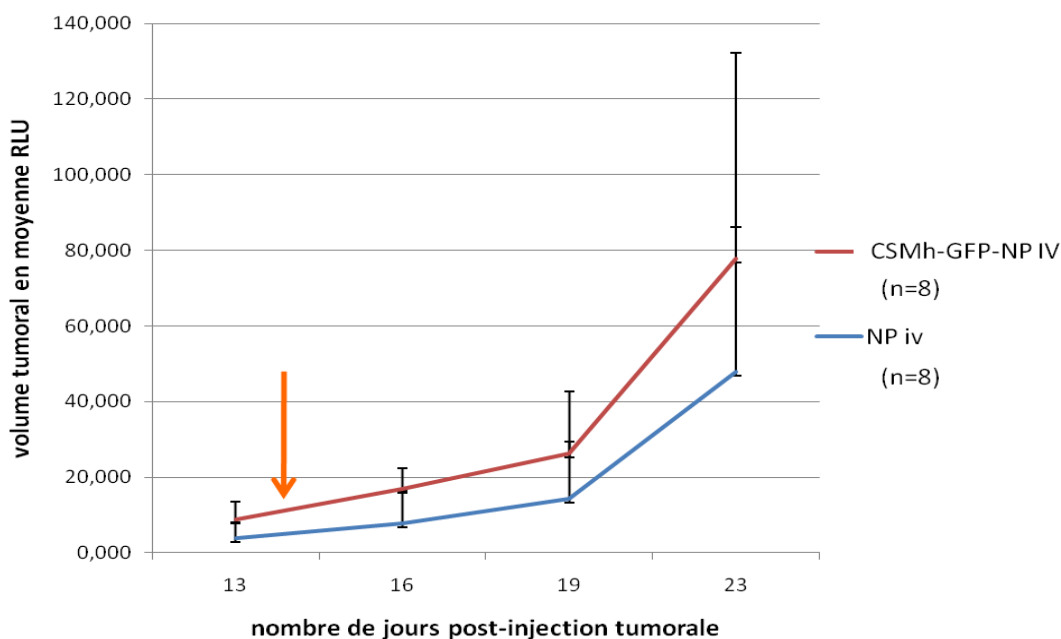


Figure 14 : Evaluation par imagerie optique de bioluminescence de la croissance tumorale chez des souris *Nude NMRI* porteuses de glioblastome en intra-cérébral.

Courbe rouge : souris (n=8) ayant reçu des nanoparticules seules par voie intra-veineuse au jour 14.

Courbe bleue : souris (n=8) ayant reçu des CSMh-GFP-NP par voie intra-veineuse au jour 14.

La flèche orange indique le jour de l'injection des CSMh

3.7 Evaluation de l'effet de la dose de CSMh-GFP-NP injectée sur la croissance tumorale

Suite au constat d'une tendance des CSMh à ralentir la croissance tumorale après injection intra-veineuse *in vivo*, nous avons décidé de déterminer l'importance de la quantité de cellules injectées. Pour cela, 10^5 cellules U87 ont été implantées en intra-cérébral chez dix-neuf souris *Nude NMRI* et la croissance tumorale a été évaluée par IRM.

Quatorze jours après l'implantation tumorale, quatre groupes homogènes de souris ont été constitués. Toutes les souris ont reçu des injections intra-veineuses. Le premier groupe, constitué de cinq souris est le groupe témoin ; les souris ont reçu des NP seules. Le deuxième groupe, constitué de cinq souris, a reçu 1×10^5 CSMh-GFP-

NP. Le troisième groupe, constitué de cinq souris, a reçu 2.5×10^5 CSMh-GFP-NP. Enfin, le quatrième groupe a reçu 5×10^5 CSMh-GFP-NP (figure 15).

Les résultats obtenus mettent en évidence une diminution de la croissance tumorale en présence de CSMh-GFP-NP qui est d'autant plus importante que la quantité de CSMh injectée est grande. Les souris ayant reçu 5×10^5 CSMh-GFP-NP présentent une diminution de la croissance tumorale statistiquement significative par rapport - aux animaux témoins (Anova, mesures répétées, $p < 0,05$).

Evolution de la croissance tumorale en fonction de la dose de CSMh-GFP injectée

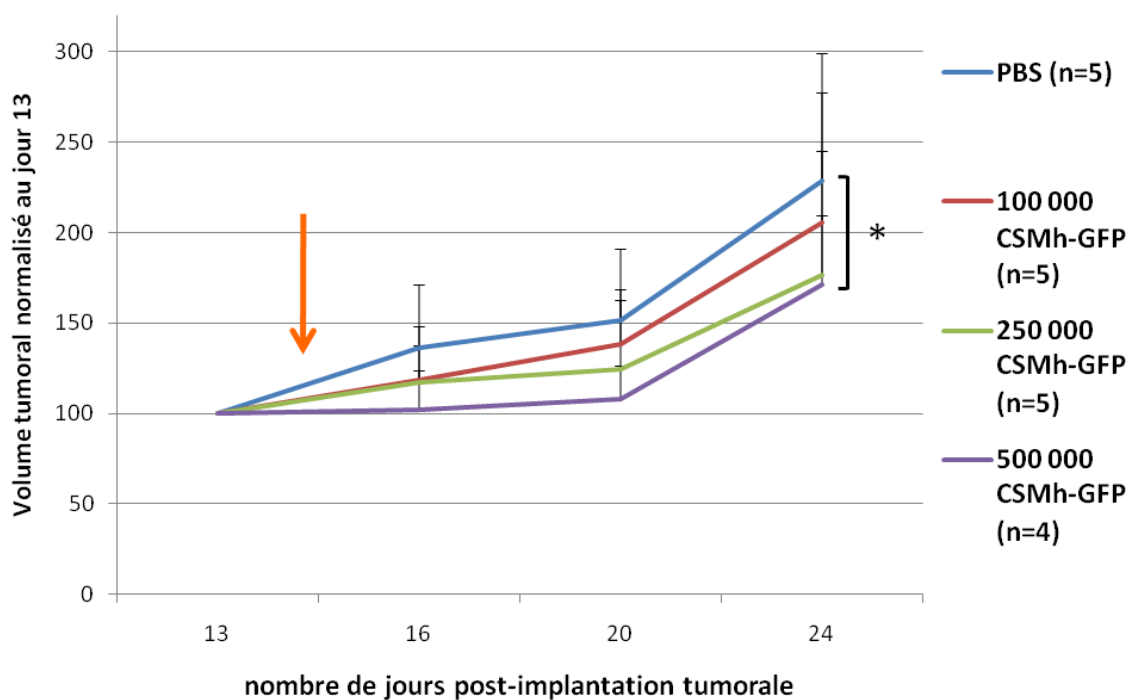


Figure 15 : Evaluation de l'effet de la quantité de CSMh-GFP-NP injectée par voie intra-veineuse chez des souris *Nude* NMRI porteuses de glioblastome.

La courbe bleue correspond aux souris (n=5) témoins n'ayant reçu que des NP seules. La courbe rouge correspond aux souris (n=5) ayant reçu 100 000 CSMh-GFP-NP. La courbe verte correspond aux souris (n=5) ayant reçu 250 000 CSMh-GFP-NP. La courbe violette correspond aux souris ayant reçu 500 000 CSMh-GFP-NP. * indique qu'il y a une différence significative ($p < 0,05$) au niveau de la croissance tumorale entre les souris témoins et les souris ayant reçu 500 000 CSMh-GFP-NP.

3.8 Comparaison des méthodes d'imagerie pour l'évaluation de la croissance tumorale : IRM et bioluminescence

Au cours de nos différentes expérimentations, nous avons utilisé deux méthodes d'imagerie pour évaluer la croissance tumorale : l'IRM et l'imagerie optique de bioluminescence. Afin de savoir si une méthode est plus fiable que l'autre, nous avons évalué la corrélation entre la taille tumorale réelle, mesurée sur des coupes histologiques marquées à l'hématoxyline/éosine, et le signal de bioluminescence mesuré, ainsi que la corrélation entre la taille mesurée sur les coupes histologiques et par IRM.

Dans le cas de la bioluminescence, la droite a un coefficient directeur égal à 23.46 ce qui est loin de 1. De plus, elle ne passe pas par le point zéro (figure 16). En revanche, dans le cas de l'IRM, la courbe de tendance a un coefficient directeur de 2.014 donc proche de 1 (figure 17). La corrélation entre l'IRM et l'histologie est meilleure que celle entre la bioluminescence et l'histologie.

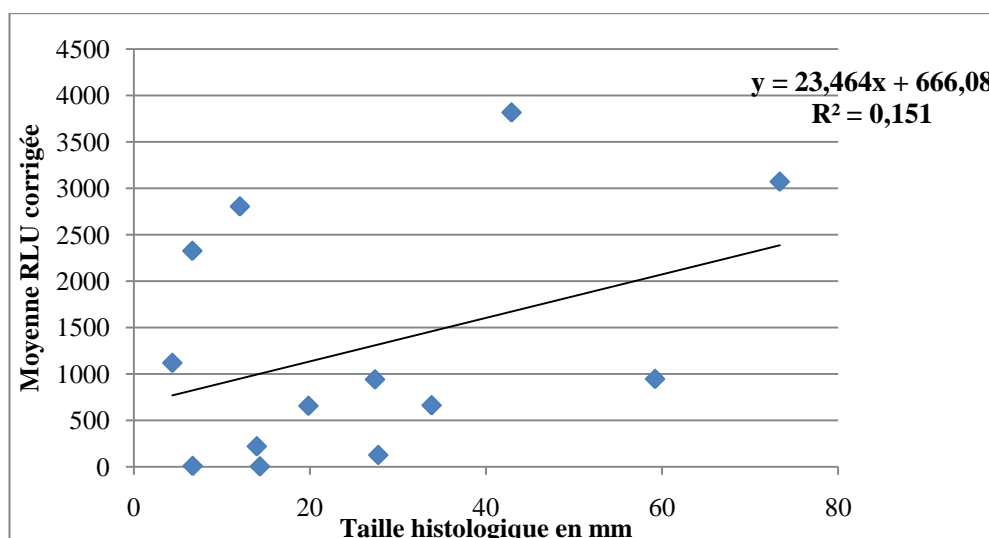


Figure 16 : Evaluation de la corrélation entre l’histologie et la bioluminescence

La taille tumorale a été évaluée le dernier jour de l’expérimentation soit trente-trois jours après l’implantation tumorale et dix-neuf jours après l’injection par voie intra-veineuse des CSMh-GFP-NP. Les mesures ont été faites d’une part *in vivo* par imagerie optique de bioluminescence juste avant le sacrifice de l’animal et d’autre part *ex vivo* en post-mortem sur des coupes histologiques. Les points sont au croisement entre la taille histologique mesurée en mm et le signal de bioluminescence observé (exprimé en moyenne des RLU corrigée). A partir de cet ensemble de points, une courbe de tendance a été tracée (courbe noire) et son coefficient directeur est mesuré.

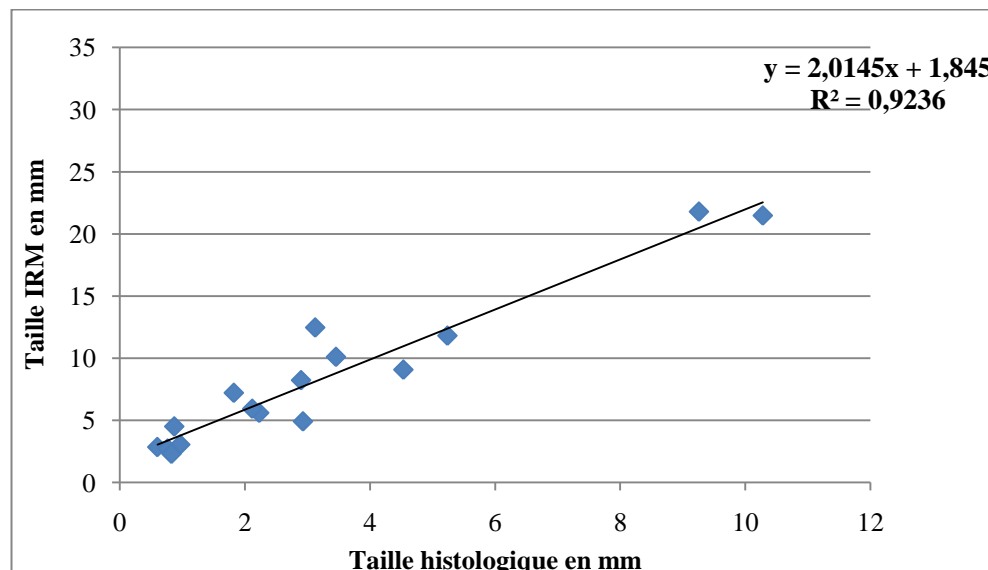


Figure 17 : Evaluation de la corrélation entre l’histologie et l’IRM

La taille tumorale a été évaluée le dernier jour de l’expérimentation soit trente-trois jours après l’implantation tumorale et dix-neuf jours après l’injection par voie intra-veineuse des CSMh-GFP-NP. Les mesures ont été faites d’une part *in vivo* par IRM juste avant le sacrifice de l’animal et d’autre part *ex vivo* en *post-mortem* sur des coupes histologiques. Les points sont au croisement entre la taille histologique mesurée en mm et la taille mesurée par IRM en mm. A partir de cet ensemble de points, une courbe de tendance a été tracée (courbe noire) et son coefficient directeur est mesuré.

3.9 Etude du tropisme des CSMh pour la tumeur et de leur capacité à transporter des NP

Afin d'évaluer le devenir des CSMh injectées chez les souris, des analyses histologiques ont été réalisées sur des coupes de cerveau de souris porteuses de glioblastome ayant reçu, ou non, des CSMh-GFP-NP.

Les coupes de cerveau ont été divisées en trois groupes pour réaliser différentes observations afin d'obtenir un maximum d'informations. Ainsi, une partie des coupes de cerveau a été observée en microscopie de fluorescence confocale avec pour seul marquage le DAPI (figure 18). Sur ces coupes, nous observons des CSMh exprimant un fort signal de la GFP au sein des tumeurs des souris ayant reçu des cellules marquées et ce, dix-neuf jours après leur injection par voie systémique. De même, les CSMh positives à la GFP présentent un marquage cytoplasmique fluorescent caractéristique des nanoparticules utilisées pour marquer les CSMh *ex vivo*. De plus, ces cellules ont été retrouvées uniquement au niveau de la tumeur et non pas dans le tissu sain avoisinant.

Par ailleurs, nous observons un signal de fluorescence dans les longueurs d'ondes des nanoparticules dans le cas des souris témoins ayant reçu des nanoparticules seules.

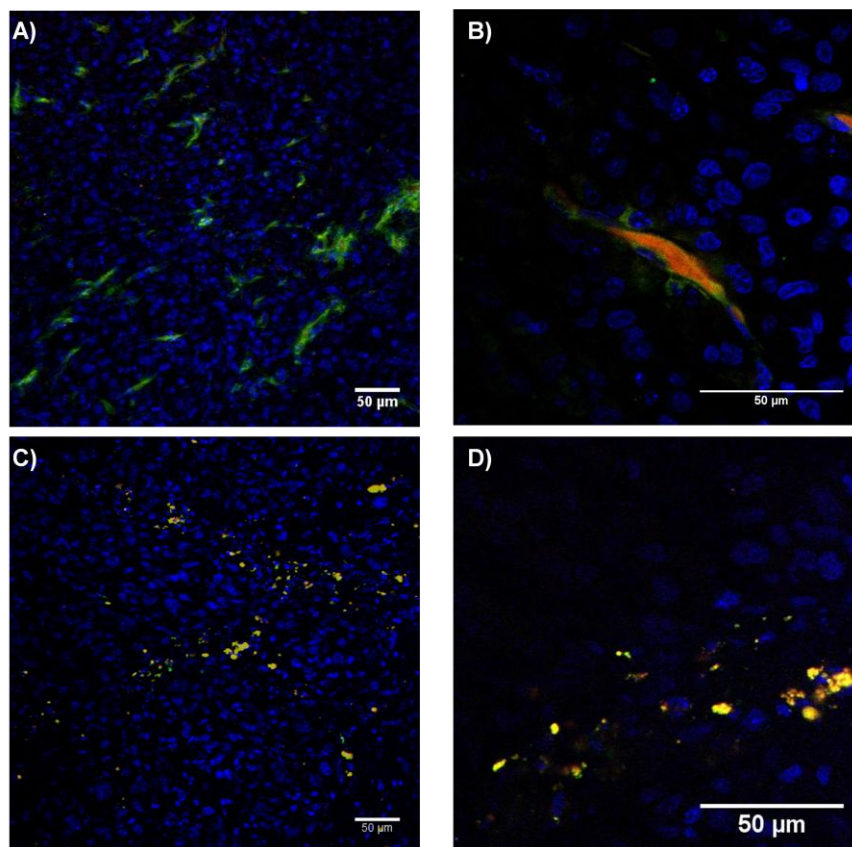


Figure 18 : visualisation de la fluorescence sur des coupes de cerveau centrées sur la tumeur avec un microscope biphotonique.

Ces images sont une superposition de la fluorescence dans le vert pour visualiser le gène de la GFP, de la fluorescence rouge pour visualiser les nanoparticules et de la fluorescence bleue pour visualiser les noyaux cellulaires. A) et B) sont des coupes du cerveau centrées sur la tumeur d'une souris ayant reçu des CSMh-GFP-NP par voie intra-veineuse alors que C) et D) sont des images de tumeur cérébrale de souris ayant reçu des nanoparticules seules. A) et C) sont visualisées avec un zoom x20 alors que B) et D) sont visualisées avec un zoom x63.

Le deuxième groupe de coupes de cerveau a été marqué par un marquage hématoxyline/éosine afin d'observer la morphologie tumorale (figure 19). Les tumeurs sont implantées à l'intérieur du cerveau et forment une masse homogène.

Enfin, le troisième groupe de coupes de cerveau a été marqué au bleu de Prusse afin d'observer les signaux du fer présent à l'intérieur des tumeurs (figure 19). Dans le cas des souris témoins ayant reçu des nanoparticules seules, des signaux de fer sont

visibles à l'intérieur de la tumeur et ce, en plus grande quantité que chez les souris traitées par les CSMh-GFP-NP.

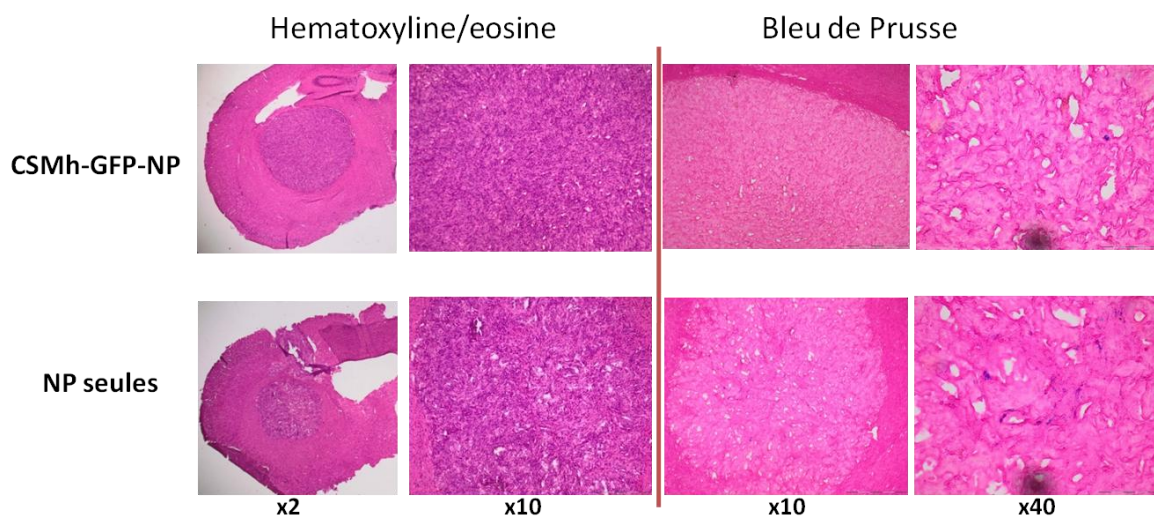


Figure 19 : coupes histologiques des tumeurs cérébrales avec un marquage hématoxyline/éosine et un marquage au bleu de Prusse

Les quatre coupes du haut correspondent au cerveau de souris traitées par les CSMh-GFP-NP alors que les quatre coupes du bas correspondent au cerveau des souris témoins ayant reçu des NP seules.

Les coupes marquées à l'hématoxyline/éosine permettent de voir l'histologie de la tumeur avec un zoom x2 et x10. Les coupes marquées au bleu de Prusse permettent de marquer en bleu les signaux de fer ; elles sont observés avec un zoom x10 ou x40.

IV. Discussion

Dans cette étude nous avons évalué, par des méthodes d'imagerie non invasives, la possibilité d'utiliser des CSMh modifiées par un gène rapporteur (GFP) et marquées par des nanoparticules dans un but thérapeutique anti-cancéreux. Nous avons montré que ces modifications permettaient aux CSMh de garder les caractéristiques de ciblage tumoral *in vivo* et que leur injection par voie intra-veineuse semblait avoir un impact sur la croissance des tumeurs dans notre modèle de glioblastome humain xéno greffé en position orthotopique chez la souris.

L'utilisation des CSMh comme vecteur cellulaire dans le traitement des cancers est une stratégie en plein développement car les propriétés de ciblage de ces cellules permettraient d'éviter la toxicité des actuelles approches thérapeutiques. De plus, il existe de nombreuses sources cliniques permettant d'obtenir facilement des CSMh, cellules prolifératives qu'il est possible d'utiliser pour des allogreffes et qui posent peu de problèmes éthiques contrairement aux cellules souches embryonnaires. Par ailleurs, il est possible d'utiliser des vecteurs lentiviraux pour les transduire et ce, sans affecter leur propriétés de cellules souches (Chan et al., 2005).

4.1 Le double marquage des CSMh

Les CSMh ont été doublement marquées d'une part avec un gène rapporteur, la GFP, à l'aide des lentivirus, et d'autre part avec des nanoparticules. Nous avons évalué l'efficacité ainsi que la stabilité de ce marquage afin de déterminer si cette méthode permettrait un transfert efficace d'un gène d'intérêt thérapeutique ultérieurement. Dans notre étude, nous avons montré que les CSMh pouvaient être transduites par

des lentivirus et que l'expression du transgène perdurait *in vivo*. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les lentivirus permettent un marquage efficace avec 85.3% des cellules marquées. Cette proportion est très importante pour des cellules souches qui ont un caractère quiescent et un temps de doublement long. En effet, les lentivirus permettent d'infecter des cellules qui ne sont pas répliquatives. De plus, cette infection lentivirale ne semble avoir affecté ni le tropisme naturel ni le phénotype des CSMh puisqu'elles sont retrouvées à l'intérieur de la tumeur où elles ont gardé leur allure fibroblastique caractéristique.

Par ailleurs, nous avons évalué la possibilité d'utiliser ces mêmes CSMh comme vecteur cellulaire de nanoparticules. Les nanotechnologies offrent de nombreux avantages pour le transport de gènes ou de pro-drogues en comparaison avec les vecteurs viraux. En effet, ils présentent une faible immunogénicité, un faible coût de production et une sécurité biologique. L'utilisation des nanoparticules a déjà été évaluée pour le suivi cellulaire (Shapiro *et al.*, 2006) ou pour modifier des CSMh afin qu'elles expriment du « vascular endothelial growth factor » (VEGF) (Yang *et al.*, 2010). A notre connaissance, l'utilisation des CSMh pour transporter des nanoparticules de fer dans les tumeurs cérébrales n'avait pas encore été décrite.

Les particules micrométriques d'oxyde de fer que nous utilisons peuvent être détectées par différentes méthodes d'imagerie *in vivo* (par IRM et par imagerie de fluorescence) mais également *ex vivo* (microscopie de fluorescence ou IRM) (Hill *et al.*, 2003 ; Shapiro *et al.*, 2004). De plus, le large cœur de fer (environ 1µm de diamètre) affecte fortement l'homogénéité du champ magnétique appliqué dans les expériences de résonance magnétique, permettant ainsi la détection d'une seule cellule par IRM (Shapiro *et al.*, 2006). Ce marquage avec des nanoparticules nous a

permis de visualiser les cellules par IRM grâce au signal du fer mais également par microscopie de fluorescence *ex vivo* sur des coupes de cerveau sur lesquelles nous pouvons visualiser le double marquage nanoparticules-GFP, caractéristique des CSMh que nous avons injectées. Après marquage avec les nanoparticules, les CSMh injectées ont conservé leur propriété de tropisme à la tumeur cérébrale. De plus, les imageries confocales nous prouvent que les nanoparticules sont toujours dans le cytoplasme cellulaire dix-neuf jours après l'injection des CSMh. Ces nanoparticules ne semblent donc pas être toxiques pour la cellule et permettent son suivi sans altération de ses propriétés naturelles.

En revanche, le suivi *in vivo* des nanoparticules par imagerie de fluorescence n'a pas été probant. Il est vrai que la sensibilité de la fluorescence diminue rapidement avec la profondeur de l'organisme. Non seulement la fluorescence traverse mal la boîte crânienne mais est également partiellement absorbée en surface par la kératine présente dans les phanères (les poils, les cheveux ou la peau) et en profondeur par les liquides biologiques. Après injection par voie systémique, les CSMh sont distribuées dans l'ensemble de l'organisme avant de s'accumuler au niveau de la tumeur. Les cellules migrant en petit nombre, la sensibilité de la technique ne nous permet pas de les observer *in vivo*. Par conséquent, cette méthode de suivi ne nous permet pas d'évaluer la biodistribution des CSMh *in vivo* après leur administration. Elle ne sera donc pas retenue pour nos expérimentations futures.

4.2 Le tropisme tumoral des CSMh

Un autre objectif de ce projet était d'évaluer le tropisme tumoral des CSMh injectées par voie systémique dans notre modèle de glioblastome humain xéno greffé chez la souris.

Ainsi, nous avons mis en évidence le tropisme des CSMh pour les tumeurs intracérébrales que ce soit par IRM en visualisant le signal des nanoparticules présentes dans le cytoplasme des CSMh ou par histologie *ex vivo* en visualisant la fluorescence de leur gène rapporteur. De manière plus précise, les CSMh sont retrouvées spécifiquement au niveau des régions intra et péri-tumorale, mais pas dans les régions saines du cerveau. Cette observation est en accord avec de précédentes études telles que celle de Kozstowski *et al.* qui ont montré que ces cellules ont la capacité de migrer à travers la barrière hémato-encéphalique vers la tumeur lorsqu'elles sont administrées par voie systémique (Kozstowski *et al.*, 2009 ; Yu *et al.*, 2008 ; Nakamizo *et al.*, 2005). D'autres études ont également mis en évidence que les CSMh migrent à travers le parenchyme cérébral sain vers les gliomes et traquent les nodules tumoraux microscopiques ainsi que les tumeurs isolées (Porada *et al.*, 2010). De même, comme Ozawa *et al.*, nous avons mis en évidence l'aptitude des CSMh à s'accumuler au niveau du site tumoral après une administration *in vivo* (Ozawa *et al.*, 2008).

Kidd *et al.* ont constaté que dans les différents modèles tumoraux étudiés, les CSMh se retrouvent bien au niveau de la tumeur. Cependant, en regardant plus attentivement, il s'avère que les CSMh sont organisées en cluster au niveau tumoral, ceci suggérant une formation structurale obtenue soit par migration des CSMh les unes vers les autres soit par prolifération au niveau des sites inflammatoires (Kidd *et al.*, 2009). Nakamura *et al.* ont également réalisé une étude *in vitro* pour mettre en évidence le tropisme tumoral inné des CSMh (Nakamura *et al.*, 2004).

Nous avons montré, dans notre étude, le tropisme des CSMh vers la tumeur cérébrale. En revanche, nos méthodes d'imagerie *in vivo* ne nous ont pas permis de déterminer avec précision leur biodistribution au cours du temps entre le moment de

leur injection et le sacrifice des souris. Cependant, Gao *et al.* ont montré que dans le cas d'un modèle d'hépatocarcinome orthotopique, sept jours après administration par voie intra-veineuse des CSMh, elles étaient présentes en grande quantité dans les poumons, alors que quatorze jours plus tard elles étaient indétectables dans les poumons et étaient entièrement distribuées dans la masse tumorale (Gao *et al.*, 2010). Notre étude est assez proche de celle de Gao *et al.* ; ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'au moment du sacrifice des souris, soit dix-neuf jours après l'injection des CSMh, ces cellules ont été libérées des poumons et sont, pour la plupart d'entre elles, localisées au niveau de la tumeur. Nous évaluerons cette biodistribution *in fine en post-mortem* avec des méthodes de biologie moléculaire, la qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), ainsi qu'avec des méthodes de quantification biochimique ou de stéréologie sur les organes clefs à savoir le cerveau, les poumons, le foie, les reins et la rate.

Notre étude met en évidence que les CSMh transduites, exprimant un transgène combiné avec un marquage par des nanoparticules, représentent un outil prometteur en tant que système cellulaire permettant le transport ciblé d'agents thérapeutiques mais également en tant qu'agent de contraste pour visualiser les tumeurs voire les micro-métastases *in vivo*.

4.3 L'impact des CSMh sur la croissance tumorale

Actuellement, une importante controverse existe concernant l'impact des CSMh sur la croissance tumorale puisqu'une partie des études met en évidence le pouvoir pro-tumoral des CSMh alors que l'autre partie met en avant leur pouvoir anti-tumoral.

Ainsi, certaines études soulignent la nécessité de prendre des précautions quant à l'utilisation des CSMh dans des conditions tumorales. En effet, le rôle des CSMh dans les tumeurs et en périphérie tumorale n'est pas encore élucidé et certaines études semblent indiquer que les CSMh augmenteraient le développement tumoral (Karnoub et al., 2007), soit en créant une niche pour les cellules souches cancéreuses, soit en altérant la surveillance du système immunitaire soit par leurs propriétés pro-angiogéniques *via* la sécrétion de VEGF (Yu et al., 2008).

Cependant, d'autres études démontrent le contraire (Lazennec *et al.*, 2008). Ainsi, Nakamura *et al.* ont mis en évidence des effets anti-tumoraux et une prolongation de la survie dans un modèle de gliome grâce à l'injection de CSMh modifiées pour exprimer IL-2. Bien qu'ils n'aient pas montré le mécanisme d'action mis en jeu, ils ont pu mettre en évidence qu'il s'agit d'un mécanisme indirect (Nakamura *et al.*, 2004). De même, Gao *et al.* ont montré que des CSMh issues de la moelle osseuse, modifiées par un lentivirus pour exprimer du PEDF et administrées par voie intra-veineuse exercent un effet anti-tumoral significatif sur un modèle d'hépatocarcinome orthotopique. De plus, cet effet est corrélé avec une diminution de la néoangiogénèse tumorale (Gao *et al.*, 2010).

Dans ce contexte, nous nous sommes donc demandés si, dans notre modèle utilisant des CSMh préparées dans des conditions conformes à leur utilisation thérapeutique en clinique humaine, les CSMh elles-mêmes avaient un impact sur la croissance tumorale.

Ainsi, nous avons injecté des CSMh chez des souris *Nude* NMRI présentant un glioblastome humain en phase exponentielle de croissance. Que ce soit par imagerie optique de bioluminescence ou par IRM, nous mettons en évidence une tendance de

ces cellules à ralentir la croissance tumorale lorsqu'elles sont injectées par voie systémique, et ce, de manière significative dans une de nos expérimentations.

De plus, que ce soit par fluorescence *ex vivo* sur les coupes de cerveau ou que ce soit par marquage histologique au bleu de Prusse, nous observons la présence des nanoparticules au sein de la tumeur chez les animaux témoins n'ayant pas reçu des CSMh. Nous mettons ainsi en évidence que l'effet de ralentissement de la croissance tumorale observé n'est pas dû à une toxicité entraînée par les nanoparticules mais bien par les CSMh elles-mêmes.

Le mécanisme d'action anti-tumorale des CSMh n'est pas totalement élucidé à ce jour et différentes hypothèses ont été émises. En effet, certaines études mettent en évidence un mécanisme d'action indirect mettant en jeu des facteurs solubles tels que les cytokines (Hu *et al.*, 2010), alors que d'autres prônent l'intervention de jonctions inter-cellulaires (Matuskova *et al.*, 2009).

Afin de déterminer quels sont les facteurs impliqués dans cette action anti-cancéreuse, nous développerons un modèle expérimental *in vitro* dans lequel les CSMh seront, ou non, séparées des cellules cancéreuses par une membrane semi-perméable. Ainsi, dans un premier temps nous pourrons observer si le mécanisme d'action est de nature directe ou indirecte. Dans un deuxième temps, s'il s'agit d'un mécanisme indirect, nous nous attarderons sur les facteurs sécrétés par les CSMh et présents dans le milieu de culture.

L'intérêt d'identifier le ou les facteurs mis en jeu dans le mécanisme d'action anti-tumorale naturel est de modifier par la suite les CSMh pour qu'elles expriment ce facteur non seulement en plus grande quantité mais également sous contrôle d'un promoteur inductible.

4.4 Importance de la dose de CSMh injectée

Face au constat du ralentissement de la croissance tumorale lors du traitement par CSMh, nous avons évalué l'importance de la quantité de cellules injectées. Notre étude met en évidence que la tendance de réduction de la croissance tumorale observée est d'autant plus marquée que la dose de CSMh injectée est importante. Une analyse statistique des mesures répétées indique même que cette tendance devient statistiquement significative pour 500 000 CSMh injectées.

Ce résultat nous permet d'élaborer une ébauche de schéma thérapeutique à adopter pour maîtriser au mieux le glioblastome. En effet, il serait intéressant de déterminer la dose de CSMh à injecter en fonction de la taille tumorale. Par ailleurs, il a été suggéré que plusieurs injections de CSMh peuvent être nécessaires pour obtenir un effet thérapeutique prolongé (Balyaniskova *et al.*, 2010). En effet, l'étude de l'évolution de la croissance tumorale chez les souris ayant reçu les CSMh met en évidence une évolution plus lente dans le groupe traité que dans le groupe témoin. Six jours après l'administration du traitement par CSMh-GFP-NP, la courbe d'évolution tumorale prend une allure exponentielle. En effet, tout comme les traitements chimiothérapeutiques utilisés actuellement en clinique humaine, il est probable qu'une seule injection de CSMh ne soit pas suffisante pour maîtriser la maladie alors que des injections répétées tous les trois ou quatre jours permettraient de maîtriser au mieux cette croissance voire même permettraient une régression de la tumeur. La suite logique de notre étude sera donc d'évaluer la fréquence et le nombre d'administrations nécessaires de CSMh pour maîtriser au mieux la prise en charge de cette maladie.

4.5 Importance de l'immunocompétence de l'hôte

Toutes les études mettent en évidence que le tropisme, et donc l'action des CSMh, dépend des facteurs de l'inflammation sécrétés dans le microenvironnement tumoral, or, la sécrétion de ces facteurs dépend de l'hôte présentant la tumeur.

Ainsi, dans le cadre de notre projet, nous avons évalué l'importance de l'immunocompétence de l'hôte pour le tropisme et pour l'action des CSMh sur la tumeur. Nous avons réalisé une expérimentation dans les mêmes conditions qu'habituellement mais chez des souris *Swiss Nude*. Ces souris ont la particularité d'être plus immunodéprimées que les souris *Nude NMRI*. En effet les souris *Swiss Nude* n'ont pas de lymphocytes T et présentent moins de lymphocytes B. De plus, contrairement aux souris *Nude NMRI*, les souris *Swiss Nude* n'ont pas plus de cellules NK pour compenser la perte de système immunitaire.

Il s'avère que dans ces conditions, contrairement aux autres expérimentations, nous ne mettons pas en évidence de ralentissement de la croissance tumorale chez les souris traitées par les CSMh. Aucune différence n'est observable entre le groupe traité et le groupe témoin (données non montrées).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. En effet, des études ont mis en évidence qu'après une injection par voie systémique, les CSMh sont guidées par le système immunitaire de l'hôte pour cibler la tumeur (Wang *et al.*, 2009). Ainsi, avec un système immunitaire quasiment absent, les CSMh ne peuvent pas cibler les tumeurs et par conséquent elles n'exercent pas leurs propriétés anti-tumorales.

Une autre hypothèse pouvant expliquer ce résultat est que la croissance tumorale est habituellement contrôlée en partie par le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, au jour de l'injection (J14), les tumeurs avaient un volume trois fois supérieur au volume observé habituellement chez les souris *Nude* NMRI. Le nombre de CSMh injectées étant le même que dans les expérimentations précédentes, la quantité de CSMh injectée était trop faible par rapport au nombre de cellules tumorales présentes (Motaln *et al.*, 2010).

Une des perspectives de ce projet serait de déterminer la dose optimale de CSMh à injecter en fonction du volume tumoral observé le jour de l'injection. Par ailleurs, ces résultats accentuent le fait que l'utilisation d'un traitement immunosuppresseur, ou l'état d'immunodépression d'un patient, serait néfaste pour l'effet anti-tumoral des CSMh.

4.6 Comparaison des méthodes d'imagerie

Au cours de notre étude, nous avons utilisé différentes méthodes d'imagerie. Ainsi, la microscopie de fluorescence nous a permis d'observer *ex vivo* les CSMh présentes au sein de la tumeur, d'étudier leur morphologie, leur marquage cytoplasmique, leur organisation en cluster. Cependant, cette méthode présente le fort inconvénient de ne pouvoir être réalisée qu'*ex vivo* en *post-mortem*.

Un des objectifs importants de ce projet était d'évaluer la croissance tumorale au cours du temps. Ainsi, nous avons utilisé deux méthodes d'imagerie non invasives *in vivo* et complémentaires à savoir l'imagerie optique de bioluminescence et l'imagerie par résonance magnétique qui permettent d'allier la sensibilité à la résolution.

La bioluminescence, bien que plus sensible que l'IRM, présente l'inconvénient d'avoir une reproductibilité discutable de par le fait qu'elle repose sur une réaction enzymatique.

Dans notre modèle, le jour de l'injection, la tumeur est bien implantée. C'est pourquoi la sensibilité de l'IRM, bien que moindre, est alors largement suffisante pour la visualiser.

De plus, l'étude de la corrélation entre l'histologie et la bioluminescence ou entre l'histologie et l'IRM met en évidence que l'IRM donne une taille tumorale beaucoup plus proche de la réalité que la bioluminescence. Par conséquent, les expérimentations futures favoriseront l'utilisation de l'IRM, de par sa meilleure résolution et sa sensibilité suffisante, pour obtenir les données les plus précises et les plus proches de la réalité.

4.7 L'utilisation des CSMh en thérapie

Le but ultime de cette recherche est le développement d'une thérapie cellulaire applicable en clinique humaine.

L'utilisation de CSMh génétiquement modifiées, soit pour augmenter la production naturelle de protéines spécifiques soit pour permettre l'expression de protéines qui ne sont pas présentes naturellement dans leur répertoire, permet d'améliorer fortement l'éventail de maladies pour lesquelles les CSMh pourraient induire un effet thérapeutique bénéfique (Porada *et al.*, 2010).

L'utilisation la plus probable des CSMh dans la thérapie anti-cancéreuse serait en combinaison avec la radiothérapie et la chimiothérapie (Loebinger *et al.*, 2010). En effet, il peut y avoir une potentialisation lors de la combinaison de plusieurs moyens

thérapeutiques, plus probante que l'addition de l'effet de chaque moyen thérapeutique exécuté isolément (Loebinger *et al.*, 2010). Une autre idée serait d'utiliser des CSMh génétiquement modifiées comme une adjonction après résection chirurgicale. Ainsi, les CSMh seraient transplantées en fin d'intervention chirurgicale pour détruire les cellules malignes résiduelles au niveau du site tumoral opéré et/ou pour détruire une éventuelle métastase (Porada *et al.*, 2010).

Cependant, le manque de certitudes concernant les mécanismes d'action mis en jeu fait que quelques préoccupations persistent concernant les thérapies basées sur les CSMh. Malgré cela, des essais cliniques de phase 1 et 2 ont été réalisés ou sont en cours, avec des CSMh allogéniques en vue de thérapie tissulaire réparatrice ou de thérapie de revascularisation suite à un accident vasculaire cérébral. Jusqu'à présent, aucun effet indésirable aigu ou chronique n'a été rapporté à la suite de l'injection de ces cellules (Loebinger *et al.*, 2010).

THESE SOUTENUE PAR : Anastassia KARAGEORGIS

TITRE : Utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines pour la thérapie cellulaire anti-cancéreuse dans un modèle de glioblastome

V. Conclusions

Les cellules souches mésenchymateuses sont actuellement au cœur d'un grand débat qui oppose les fervents du caractère pro-tumoral des CSMh, aux fervents d'un potentiel anti-cancéreux prometteur pour la thérapie de demain. En effet, certaines études ont montré une augmentation du volume tumoral potentiellement à travers les propriétés immunodépressives ou pro-angiogéniques des CSMh (Karnoub *et al.*, 2007 ; Zhu *et al.*, 2009), alors que d'autres, comme la notre, n'ont pas montré d'effet particulier des CSMh, ou mieux, ont mis en évidence une diminution de la croissance tumorale et une augmentation de la survie.

Bien qu'à ce jour nous ne sommes pas certains de l'effet positif ou négatif des CSMh utilisées en thérapie isolée, la littérature est plus à même de consentir à un effet positif documenté *in vivo* avec notamment une réduction de la croissance tumorale, l'élimination des métastases et une amélioration de la survie. La réussite dans ce domaine de travail procure de grands espoirs sur les applications cliniques potentielles et, bien que de nombreuses questions scientifiques basiques restent en suspens, notamment concernant la fréquence optimale d'injection, le nombre de cellules nécessaires et le mécanisme de ciblage impliqué, cela n'a pas empêché les

essais cliniques, avec l'obtention de résultats encourageants et l'observation de peu d'effets indésirables (Loebinger *et al.*, 2010).

Dans ce cadre, notre étude, qui montre une tendance des CSMh à diminuer la croissance tumorale dans un modèle de glioblastome, est très prometteuse pour l'amélioration de la prise en charge de ce cancer.

De plus, un des points forts de notre étude est que nous nous sommes placés dans des conditions au plus près de la réalité de la clinique humaine. Ainsi, nous avons implanté des cellules de glioblastome humain en position orthotopique dans un modèle murin. Nous avons attendu que la tumeur soit en phase exponentielle de croissance pour injecter les CSMh, ce qui correspond à la majorité des cas lors du diagnostic clinique de la maladie. Enfin, nous avons utilisé des CSM humaines, issues de patients donateurs sains et, conformément aux règles de sécurité, nous ne les avons pas utilisées au-delà du quatrième passage en *culture in vitro*.

Cette étude est donc au plus proche de la réalité clinique, ce qui permettra un transfert rapide de la recherche fondamentale au lit du patient.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 15 novembre 2010

LE DOYEN



Professeur Renée GRILLOT



LE PRESIDENT DE LA THESE



Professeur Michel SEVE

BIBLIOGRAPHIE*Les articles scientifiques**A*

Aboody, K.S., Najbauer, J., and Danks, M.K. (2008). Stem and progenitor cell-mediated tumor selective gene therapy. *Gene Ther* 15, 739-752.

Allport, J.R., and Weissleder, R. (2001). In vivo imaging of gene and cell therapies. *Exp Hematol* 29, 1237-1246.

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 35, 1482-1490.

B

Ballou, B., Ernst, L.A., and Waggoner, A.S. (2005). Fluorescence imaging of tumors in vivo. *Curr Med Chem* 12, 795-805.

Balyasnikova, I.V., Ferguson, S.D., Sengupta, S., Han, Y., and Lesniak, M.S. (2010). Mesenchymal stem cells modified with a single-chain antibody against EGFRvIII successfully inhibit the growth of human xenograft malignant glioma. *PLoS One* 5, e9750.

Bartholomew, A., Polchert, D., Szilagyi, E., Douglas, G.W., and Kenyon, N. (2009). Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance. *Transplantation* 87, S55-57.

Baudrimont, M. (1991). [Astrocytes: morphology and functional role]. *Ann Med Interne (Paris)* 142, 526-529.

Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F., and Delattre, J.Y. (2003). Primary brain tumours in adults. *Lancet* 361, 323-331.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., *et al.* (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 56, 159-175.

Betensky, R.A., Louis, D.N., and Cairncross, J.G. (2002). Influence of unrecognized molecular heterogeneity on randomized clinical trials. *J Clin Oncol* 20, 2495-2499.

Bexell, D., Gunnarsson, S., Tormin, A., Darabi, A., Gisselsson, D., Roybon, L., Scheduling, S., and Bengzon, J. (2009). Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther* 17, 183-190.

Birnbaum, T., Roider, J., Schankin, C.J., Padovan, C.S., Schichor, C., Goldbrunner, R., and Straube, A. (2007). Malignant gliomas actively recruit bone marrow stromal cells by secreting angiogenic cytokines. *J Neurooncol* 83, 241-247.

Boddington, S.E., Sutton, E.J., Henning, T.D., Nedopil, A.J., Sennino, B., Kim, A., and Daldrup-Link, H.E. (2010). Labeling Human Mesenchymal Stem Cells with Fluorescent Contrast Agents: the Biological Impact. *Mol Imaging Biol*.

Bremer, C., and Weissleder, R. (2001). In vivo imaging of gene expression. *Acad Radiol* 8, 15-23.

C

Chan, J., O'Donoghue, K., de la Fuente, J., Roberts, I.A., Kumar, S., Morgan, J.E., and Fisk, N.M. (2005). Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Stem Cells* 23, 93-102.

Chang, W., Song, B.W., Lim, S., Song, H., Shim, C.Y., Cha, M.J., Ahn, D.H., Jung, Y.G., Lee, D.H., Chung, J.H., *et al.* (2009). Mesenchymal stem cells pretreated with delivered Hph-1-Hsp70 protein are protected from hypoxia-mediated cell death and rescue heart functions from myocardial injury. *Stem Cells* 27, 2283-2292.

Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 21, 1045-1056.

Coulombel, L. (2007). [Adult stem cells: their scientific interest and therapeutic future]. *Gynecol Obstet Fertil* 35, 806-810.

D

Daneyemez, M., Gezen, F., Canakci, Z., and Kahraman, S. (1998). Radical surgery and reoperation in supratentorial malignant glial tumors. *Minim Invasive Neurosurg* 41, 209-213.

Darcel, F., Chatel, M., Gautris, P., and Labarre, J.F. (1990). The antitumoral action of polyamine linked cyclophosphazenes on human malignant glioma heterografts in nu/nu mice. *Anticancer Res* 10, 1563-1569.

Desjardins, A., Reardon, D.A., Herndon, J.E., 2nd, Marcello, J., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., Bailey, L., *et al.* (2008). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent WHO grade 3 malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 14, 7068-7073.

Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noel, D., and Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844.

Dwyer, R.M., Khan, S., Barry, F.P., O'Brien, T., and Kerin, M.J. (2010). Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther* 1, 25.

F

Feng, B., and Chen, L. (2009). Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm* 24, 717-721.

Frangioni, J.V. (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 7, 626-634.

G

Galanis, E., Buckner, J.C., Novotny, P., Morton, R.F., McGinnis, W.L., Dinapoli, R., Schomberg, P., and O'Fallon, J.R. (2000). Efficacy of neuroradiological imaging, neurological examination, and symptom status in follow-up assessment of patients with high-grade gliomas. *J Neurosurg* 93, 201-207.

Gao, Y., Yao, A., Zhang, W., Lu, S., Yu, Y., Deng, L., Yin, A., Xia, Y., Sun, B., and Wang, X. (2010). Human mesenchymal stem cells overexpressing pigment epithelium-derived factor inhibit hepatocellular carcinoma in nude mice. *Oncogene* 29, 2784-2794.

H

Hamada, H., Kobune, M., Nakamura, K., Kawano, Y., Kato, K., Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T., and Niitsu, Y. (2005). Mesenchymal stem cells (MSC) as therapeutic cytoreagents for gene therapy. *Cancer Sci* 96, 149-156.

Hill, J.M., Dick, A.J., Raman, V.K., Thompson, R.B., Yu, Z.X., Hinds, K.A., Pessanha, B.S., Guttman, M.A., Varney, T.R., Martin, B.J., *et al.* (2003). Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation* 108, 1009-1014.

Hingtgen, S.D., Kasmieh, R., van de Water, J., Weissleder, R., and Shah, K. (2010). A novel molecule integrating therapeutic and diagnostic activities reveals multiple aspects of stem cell-based therapy. *Stem Cells* 28, 832-841.

Hu, Y.L., Fu, Y.H., Tabata, Y., and Gao, J.Q. (2010). Mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy. *J Control Release* 147, 154-162.

\mathcal{K}

Kallifatidis, G., Beckermann, B.M., Groth, A., Schubert, M., Apel, A., Khamidjanov, A., Ryschich, E., Wenger, T., Wagner, W., Diehlmann, A., *et al.* (2008). Improved lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells for therapeutic intervention in pancreatic cancer. *Cancer Gene Ther* 15, 231-240.

Kang, T.Y., Jin, T., Elinzano, H., and Peereboom, D. (2008). Irinotecan and bevacizumab in progressive primary brain tumors, an evaluation of efficacy and safety. *J Neurooncol* 89, 113-118.

Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.

Khasraw, M., and Lassman, A.B. (2010). Advances in the treatment of malignant gliomas. *Curr Oncol Rep* 12, 26-33.

Kidd, S., Caldwell, L., Dietrich, M., Samudio, I., Spaeth, E.L., Watson, K., Shi, Y., Abbruzzese, J., Konopleva, M., Andreeff, M., *et al.* (2010). Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment. *Cytotherapy* 12, 615-625.

Kidd, S., Spaeth, E., Dembinski, J.L., Dietrich, M., Watson, K., Klopp, A., Battula, V.L., Weil, M., Andreeff, M., and Marini, F.C. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 27, 2614-2623.

Kosztowski, T., Zaidi, H.A., and Quinones-Hinojosa, A. (2009). Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 9, 597-612.

 \mathcal{L}

Lazennec, G., and Jorgensen, C. (2008). Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26, 1387-1394.

Loebinger, M.R., Eddaoudi, A., Davies, D., and Janes, S.M. (2009a). Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res* 69, 4134-4142.

Loebinger, M.R., and Janes, S.M. (2010). Stem cells as vectors for antitumour therapy. *Thorax* 65, 362-369.

Loebinger, M.R., Kyrtatos, P.G., Turmaine, M., Price, A.N., Pankhurst, Q., Lythgoe, M.F., and Janes, S.M. (2009b). Magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells homing to pulmonary metastases using biocompatible magnetic nanoparticles. *Cancer Res* 69, 8862-8867.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.

Luker, G.D., and Luker, K.E. (2008). Optical imaging: current applications and future directions. *J Nucl Med* 49, 1-4.

M

Matushansky, I., Hernando, E., Socci, N.D., Mills, J.E., Matos, T.A., Edgar, M.A., Singer, S., Maki, R.G., and Cordon-Cardo, C. (2007). Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J Clin Invest* 117, 3248-3257.

Matuskova, M., Hlubinova, K., Pastorakova, A., Hunakova, L., Altanerova, V., Altaner, C., and Kucerova, L. (2010). HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer Lett* 290, 58-67.

Motaln, H., Schichor, C., and Lah, T.T. (2010). Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer* 116, 2519-2530.

N

Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., *et al.* (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* 65, 3307-3318.

Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., Kurozumi, K., Kobune, M., Tsuda, H., Bizen, A., Honmou, O., Niitsu, Y., and Hamada, H. (2004). Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 11, 1155-1164.

O

Ozawa, K., Sato, K., Oh, I., Ozaki, K., Uchibori, R., Obara, Y., Kikuchi, Y., Ito, T., Okada, T., Urabe, M., *et al.* (2008). Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun* 30, 121-127.

Ozawa, T., and James, C.D. (2010). Establishing intracranial brain tumor xenografts with subsequent analysis of tumor growth and response to therapy using bioluminescence imaging. *J Vis Exp*.

P

Parekkadan, B., and Milwid, J.M. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 12, 87-117.

Porada, C.D., and Almeida-Porada, G. (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*.

Q

Qiao, L., Xu, Z., Zhao, T., Zhao, Z., Shi, M., Zhao, R.C., Ye, L., and Zhang, X. (2008). Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 18, 500-507.

R

Ren, C., Kumar, S., Chanda, D., Chen, J., Mountz, J.D., and Ponnazhagan, S. (2008). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells* 26, 2332-2338.

S

Sasportas, L.S., Kasmieh, R., Wakimoto, H., Hingtgen, S., van de Water, J.A., Mohapatra, G., Figueiredo, J.L., Martuza, R.L., Weissleder, R., and Shah, K. (2009). Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4822-4827.

Sathornsumetee, S., and Rich, J.N. (2008). Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci* 1142, 108-132.

Sato, A., Klaunberg, B., and Tolwani, R. (2004). In vivo bioluminescence imaging. *Comp Med* 54, 631-634.

Schiffer, D., Annovazzi, L., Caldera, V., and Mellai, M. (2010). On the origin and growth of gliomas. *Anticancer Res* 30, 1977-1998.

Shapiro, E.M., Sharer, K., Skrtic, S., and Koretsky, A.P. (2006). In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med* 55, 242-249.

Shapiro, E.M., Skrtic, S., Sharer, K., Hill, J.M., Dunbar, C.E., and Koretsky, A.P. (2004). MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 10901-10906.

Shaw, E.G., Scheithauer, B.W., Gilbertson, D.T., Nichols, D.A., Laws, E.R., Earle, J.D., Daumas-Duport, C., O'Fallon, J.R., and Dinapoli, R.P. (1989). Postoperative radiotherapy of supratentorial low-grade gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 16, 663-668.

Soling, A., and Rainov, N.G. (2003). Bioluminescence imaging in vivo - application to cancer research. *Expert Opin Biol Ther* 3, 1163-1172.

T

Tabatabai, G., and Stupp, R. (2009). Primetime for antiangiogenic therapy. *Curr Opin Neurol* 22, 639-644.

Tang, J., Wang, J., Yang, J., Kong, X., Zheng, F., Guo, L., Zhang, L., and Huang, Y. (2009). Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 36, 644-650.

Tseng, C.L., Shih, I.L., Stobinski, L., and Lin, F.H. (2010). Gadolinium hexanedione nanoparticles for stem cell labeling and tracking via magnetic resonance imaging. *Biomaterials* 31, 5427-5435.

V

Valable, S., Barbier, E.L., Bernaudin, M., Roussel, S., Segebarth, C., Petit, E., and Remy, C. (2008). In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage* 40, 973-983.

Valtieri, M., and Sorrentino, A. (2008). The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 217, 296-300.

van Eekelen, M., Sasportas, L.S., Kasmieh, R., Yip, S., Figueiredo, J.L., Louis, D.N., Weissleder, R., and Shah, K. (2010). Human stem cells expressing novel TSP-1 variant have anti-angiogenic effect on brain tumors. *Oncogene* 29, 3185-3195.

Vescovi, A.L., Galli, R., and Reynolds, B.A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6, 425-436.

W

Wang, H., Cao, F., De, A., Cao, Y., Contag, C., Gambhir, S.S., Wu, J.C., and Chen, X. (2009). Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells* 27, 1548-1558.

Y

Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R.G., Kobayashi, N., and Yarmush, M.L. (2010). Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 19, 667-679.

Yang, F., Cho, S.W., Son, S.M., Bogatyrev, S.R., Singh, D., Green, J.J., Mei, Y., Park, S., Bhang, S.H., Kim, B.S., *et al.* (2010). Genetic engineering of human stem cells for enhanced angiogenesis using biodegradable polymeric nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3317-3322.

Yong, R.L., Shinojima, N., Fueyo, J., Gumin, J., Vecil, G.G., Marini, F.C., Bogler, O., Andreeff, M., and Lang, F.F. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res* 69, 8932-8940.

Yu, J.M., Jun, E.S., Bae, Y.C., and Jung, J.S. (2008). Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev* 17, 463-473.

Z

Zhi-Gang, Z., Wei-Ming, L., Zhi-Chao, C., Yong, Y., and Ping, Z. (2008). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patient with hematological malignant diseases. *Leuk Lymphoma* 49, 2187-2195.

Zhu, W., Xu, W., Jiang, R., Qian, H., Chen, M., Hu, J., Cao, W., Han, C., and Chen, Y. (2006). Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol* 80, 267-274.

Zhu, Y., Sun, Z., Han, Q., Liao, L., Wang, J., Bian, C., Li, J., Yan, X., Liu, Y., Shao, C., *et al.* (2009). Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 23, 925-933.

Zielske, S.P., Livant, D.L., and Lawrence, T.S. (2009). Radiation increases invasion of gene-modified mesenchymal stem cells into tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75, 843-853.

Les ouvrages

Ouvrage 1 : Cancérologie, F. Scotté ; P. Colonna ; J-M. Andrieu ; Ellipses

Ouvrage 2 : Cancérologie clinique N. Daly-Schweitzer Masson 3^{ème} édition 2008

Ouvrage 3 : Darcel F (1996) Présentation critique des classifications histopronostiques. Biologie des tumeurs cérébrales gliales, Editions Espaces (ed) Montpellier

Ouvrage 4 : Hospices civils de Lyon / Institut de veille sanitaire / Institut national du cancer / Francim / Institut national de la santé et de la recherche médicale. Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2009. Rapport technique. Septembre 2009.

Ouvrage 5 : Aouba A, Péquignot F, Le Toullec A, Jouglà E. Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004. Bulletin épidémiologique hebdomadaire. 18 septembre 2007;35-36:308-314.

Les sites internet

Web 1 : <http://www.metz.supelec.fr/elevés/themes/imagerie/scannerX.htm>

Web 2 : www.theriaque.org

Web 3 : <http://clinicaltrials.gov>



Serment des Apothicaires

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Thèse soutenue par : Anastassia KARAGEORGIS
anastassia.karageorgis@hotmail.fr

Le 9 décembre 2010 à 18 heures

Titre :

**Utilisation des cellules souches mésenchymateuses humaines
pour la thérapie cellulaire anti-cancéreuse
dans un modèle de glioblastome**

Résumé :

La difficulté dans le traitement du cancer, et tout particulièrement dans le cas des gliomes, est liée à la faible quantité de molécules thérapeutiques distribuées au niveau du site tumoral. Les traitements classiques du glioblastome, la tumeur cérébrale maligne la plus courante chez l'adulte, conduisent à une médiane de survie de seulement 14 mois. Le pronostic des patients atteints par un gliome malin, tel que le glioblastome multiforme, est très mauvais en dépit des avancées chirurgicales, radio et chimiothérapeutiques.

L'aptitude des cellules souches mésenchymateuses à migrer vers les sites de lésions dans une variété de conditions pathologiques suggère qu'elles peuvent être des vecteurs idéaux pour la délivrance thérapeutique.

Dans notre étude, nous avons évalué le pouvoir des Cellules Souches Mésenchymateuses humaines (CSMh) elles-mêmes comme un outil dans la thérapie anti-cancéreuse.

En utilisant un modèle de gliome très invasif nous avons suivi *in vivo*, par imagerie optique de bioluminescence et par imagerie par résonance magnétique (IRM), la migration et l'impact des CSMh après injection systémique chez des souris porteuses de tumeurs. Ainsi des souris *Nude* NMRI ont été greffées avec des cellules de glioblastome humain et des CSMh ont été injectées en systémique. La progression tumorale a été évaluée par IRM ou par imagerie optique de bioluminescence.

Notre étude a mis en évidence que les CSMh injectées en systémique ont un tropisme pour les sites tumoraux, migrent à l'intérieur de la tumeur où elles restent vivantes. De plus, il s'avère que la croissance tumorale a tendance à être ralentie par la seule présence des CSMh et ce, de manière dose-dépendante. Cette étude, réalisée dans les conditions les plus proches de la clinique humaine, ouvre la possibilité d'un avenir prometteur quant à la prise en charge du glioblastome.

Mots clés : Cellules Souches Mésenchymateuses humaines, thérapie cellulaire, glioblastome, imagerie *in vivo*

Jury: Monsieur le Professeur Michel SEVE – Président du jury
Madame le Docteur Marie-Jeanne RICHARD
Monsieur le Docteur Walid RACHIDI
Madame le Docteur Claire ROME – Directeur de Thèse