



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/>
Eprints ID : 17630

To cite this version :

Cartiaux, Benjamin. *Caractérisation et étude de la radiosensibilité de lignées cellulaires de gliome canin et approche de la virothérapie oncolytique*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2017, 146 p.

Any correspondence concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

CARACTÉRISATION ET ÉTUDE DE LA RADIOSENSIBILITÉ DE LIGNÉES CELLULAIRES DE GLIOMES CANINS ET APPROCHE DE LA VIROTHÉRAPIE ONCOLYTIQUE

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

CARTIAUX Benjamin
Né, le 17/06/1991 à Albi (81)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Stéphane BERTAGNOLI
Mme Alexandra DEVIERS

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

Directrice : **Madame Isabelle CHMITELIN**

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MILON Alain**, *Microbiologie moléculaire*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootchnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- Mme **HAGEN-PICARD, Nicole**, *Pathologie de la reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Biologie Médicale Animale et Comparée*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des aliments*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des aliments d'Origine animale*
- Mme **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie Vétérinaire*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Aviculture et pathologie aviaire*
- Mme **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique, animaux d'élevage*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
M **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
Mme **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
Mme **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
Mme **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
Mme **BOUHSIRA Emilie**, *Parasitologie, maladies parasitaires*
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
Mme **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie vétérinaire et comparée*
Mme **FERRAN Aude**, *Physiologie*
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
Mme **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
M. **LE LOC'H Guillaume**, *Médecine zoologique et santé de la faune sauvage*
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
Mme **MILA Hanna**, *Elevage des carnivores domestiques*
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
Mme **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
Mme **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie*
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

Mme **COSTES Laura**, *Hygiène et industrie des aliments*
Mme **LALLEMAND Elodie**, *Chirurgie des Equidés*
Mme **SABY-CHABAN Claire**, *Gestion de la santé des troupeaux bovins*

Remerciements

A Monsieur le Professeur Christophe Pasquier,
Professeur des Universités,
Doyen de la faculté des sciences pharmaceutiques
Virologie humaine et animale

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Hommages respectueux.*

A Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Virologie – Infectiologie

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon directeur de thèse, pour le temps précieux passé à mes côtés, à me guider à travers ce travail et à travers le monde de la recherche.

A Madame le Docteur Alexandra Deviers
Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire
de Toulouse

Anatomie et Imagerie médicale

Pour avoir accepté d'être assesseur de ma thèse, pour votre disponibilité et votre soutien, pour votre patience, passée et future.

Table des matières

Remerciements	5
Table des matières	7
Liste des abréviations	11
Table des illustrations	15
Figures.....	15
Tableaux.....	17
Introduction.....	19
I. Etude bibliographique	23
A. Les gliomes diffus.....	25
1. Définition histopathologique	25
2. Épidémiologie	31
a) Incidence	31
b) Facteurs de risque	31
3. Diagnostic.....	32
a) Clinique.....	32
b) Radiologique.....	33
(1) Tomodensitométrie (TDM).....	33
(2) Modalités anatomiques et fonctionnelles de l'IRM.....	33
(3) La tomographie à émission de positons (TEP).....	37
c) Anatomopathologie.....	38
4. Traitement.....	40
a) Chirurgie	40
b) Radiothérapie	42
c) Chimiothérapie	42
d) Traitements adjuvants	44
e) Résistance aux traitements	47
5. Pronostic.....	48
B. Les gliomes diffus canins comme modèle d'étude en oncologie comparative	52
1. Intérêts du modèle canin	53
a) Arguments en faveur d'une convergence nosologique entre gliomes canins et humains	53

(1) Arguments épidémiologiques	53
(2) Arguments génétiques.....	54
(3) Arguments étiopathogéniques.....	54
(4) Arguments morphologiques.....	56
b) Avantages du modèle canin par rapport au modèle murin	58
2. Les lignées cellulaires de gliomes canins comme modèle d'étude in vitro	59
C. La virothérapie oncolytique	63
1. Définition.....	63
2. Les virus oncolytiques possèdent	64
a) ... des voies d'entrée spécifiques	64
b) ... des mécanismes oncolytiques direct et indirect	65
c) ... la capacité de stimuler un système immunitaire immunodéprimé .	67
3. Trois exemples de virus utilisés en thérapie oncolytiques	70
a) Human α Herpes Virus de type 1.....	70
b) Adénovirus.....	72
c) Virus de la maladie de Newcastle.....	73
4. Le virus myxomateux : vers une thérapie innovante.....	74
a) Description du virus myxomateux.....	74
(1) Morphologie générale.....	75
(2) Génome du MYXV	76
(3) Cycle viral.....	76
b) La myxomatose	79
c) Le MYXV, un virus oncolytique	81
(1) Un virus au spectre d'hôte limité aux léporidés.....	81
(2) ... capable d'infecter les cellules tumorales.....	82
(3) Limites actuelles et amélioration du potentiel oncolytique	82
II. Etude expérimentale	85
A. Matériel et méthodes.....	89
1. Lignées cellulaires	89
2. Virus	89
3. Infection virale des lignées cellulaires.....	90
4. Immunohistochimie des lignées cellulaires.....	90
5. Temps de doublement	92
6. Test de clonalité et morphologie cellulaire	93

7. Caryotype des lignées cellulaires	93
8. Irradiation des lignées cellulaires.....	93
B. Résultats	95
1. Caractérisation phénotypique et génotypique des lignées de gliomes canins	95
a) Morphologie cellulaire.....	95
b) Temps de doublement.....	96
c) Test de clonalité.....	96
d) Immunohistochimie.....	97
e) Caryotype	99
2. Evaluation de la réponse radio-induite des lignées de gliome canin.....	102
3. Infection des lignées cellulaires de gliome canin par le MYXV	104
a) Infection des J3T	104
b) Infection des SDT3 et des Raffray	105
c) Infection des cellules SDT3 par le virus SG33-GFP	106
C. Discussion	113
1. Caractérisation cellulaire	113
2. Caractérisation radio-induite	116
3. Infection virale par le SG33.....	118
4. Limites de l'étude.....	119
5. Perspectives futures	120
Conclusion générale.....	123
Publications scientifiques.....	126
• Congrès du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire (ECVP) et de la Société Européenne de Pathologie Vétérinaire (ESVP), Bologne, Septembre 2016 (Poster) : prix du meilleur poster	126
Annexes.....	127
Annexe 1 : Protocole d'infection par la souche SG33 du MYXV.....	127
Annexe 2 : Protocole d'inclusion d'une culture cellulaire en HistoGel™.....	127
Annexe 4 : Protocole d'évaluation du temps de doublement.....	128
Annexe 5 : Présentation du test de clonalité.....	130
Bibliographie.....	131

Liste des abréviations

AFA :	Alcool-Formol-Acide
ADSC :	Adipocyte Derived Stem Cell
5-ALA :	5-Aminolevulinic Acid
⁶ O-meG :	⁶ O-méthyl-guanine
Ad :	Adénovirus
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AMM :	Autorisation de Mise sur le Marché
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ATRX :	ATP-dependant X-linked helicase
AVC :	Accident Vasculo-Cérébral
bFGF :	basic Fibroblast Growth Factor
BHM :	Barrière Hémato-Méningée
BOLD :	Blood Oxygen Level Dependant
Cho :	Choline
CED :	Convection-Enhanced Delivery
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV :	Cytomégalovirus
Cr :	Créatinine
CSC :	Cellules Souches Cancéreuses
DAMP :	Damage-Associated Molecular Pattern
DCx :	Doublecortin
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTI :	Diffusion Tensor Imaging
ECP :	Effet CytoPathique
EGFR :	Récepteur du Facteur de Croissance Epidermique
EOR :	Etendue de Résection
GBM :	Glioblastome
Gd :	Gadolinium
GFAP :	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP :	Green Fluorescent Protein
GM-CSF :	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HHV1 :	<i>Human Alphaherpesvirus 1</i>
HIF :	Hypoxia-Inducible Factor
HGMB1 :	High Mobility Group protein B1
HRE :	Hypoxia Responsive Element
HSP :	Heat Shock Protein
HSV-1 :	Herpès Simplex Virus de type 1
IARC :	Agence International de la Recherche sur le Cancer
ICD :	Immunogenic Cell Death
ICD-O :	International Classification of Diseases for Oncology)
IDH :	Isocitrate Déshydrogénase
IL-6 :	Inter-leukine 6

ICAM-1 : Molécule d'adhésion intracellulaire-1
 IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
 IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
 ISRM : Imagerie Spectroscopie par Résonance Magnétique
 KPS : Indice de Karnofsky
 LCS : Liquide Cérébro-Spinal
 MCV : Virus du molluscum contagiosum
 MDR : Multi Drug Resistance
 MGF : Myxoma Growth Factor
 MGMT : ⁶O-methylguanine-DNA methyltransferase
 MOI : Multiplicity of Infection
 MRP1 : Multidrug resistance-related protein 1
 MRS : Magnetic Resonance Spectroscopy
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
 MYXV : Myxomavirus
 NAA : N-Acétylaspartate
 NDV : Virus de la maladie de Newcastle
 NeuN : Neuronal Nuclei
 NK : Natural Killer
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 ORF : Open Reading Frame
 PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 Pgp : P-glycoprotéine
 PHDs : specific prolyl hydroxylase-domain
 POXV : *Poxviridae*
 PpIX : Protoporphyrine IX
 PS : Pénicilline-Streptomycine
 RGD : Arginine-Glycine-Acide Aspartique
 RI : Rayons ionisants
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 ROI : Region of Interest
 RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
 RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
 SAMD9 : Sterile Alpha Motif Domain containing 9 protein
 SI : Système Immunitaire
 SNC : Système Nerveux Central
 SPARC : Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein
 SVF : Sérum de Veau Fœtal
 TAAs : Tumeur-associated Antigens
 TEP : Tomographie à Emission de Positons
 TDM : Tomodensimétrie
 TGFβ : Transforming Growth Factor-β
 TIR : Terminale Inverted Repeated Region
 TMZ : Témazolomide
 TP53 : Protéine tumorale 53
 Treg : Lymphocyte T Régulateur

UAB : Université Autonome de Barcelone
VACV : Virus de la vaccine
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VO : Virus Oncolytique

Table des illustrations

Figures

Figure 1 Schéma de l'organisation des cellules gliales (d'après Jansen 2014).	26
Figure 2 Classification simplifiée des gliomes diffus, d'après la classification OMS 2016.....	30
Figure 3 Tumeurs du SNC a) ensemble des tumeurs primitives b) tumeurs malignes du SNC.....	31
Figure 4 Examen tomodensitométrique sans produit de contraste, d'un patient atteint de GBM.	33
Figure 5 Séquences IRM chez un patient atteint d'un GBM.	34
Figure 6 Représentation d'un cadre stéréotaxique et mise en évidence de la trajectoire de la biopsie.	35
Figure 7 DTI réalisée chez un patient souffrant d'un astrocytome..	36
Figure 8 ISRM réalisée chez un patient atteint d'un GBM.	36
Figure 9 TEP et IRM associées, de deux patients atteints d'un GBM au début de leur traitement et 3 semaines plus tard.....	38
Figure 10 Corrélation entre un ratio Cho/NAA élevé et la surexpression de SOX-2.	39
Figure 11 Photographies d'aires corticales motrices (cercle blanc) en présence de 5-ALA, (A) sous lumière blanche et (B) sous ultraviolet (UV).	41
Figure 12 Exemple de résultats immunohistochimiques obtenus pour un GBM canin	55
Figure 13 Coupes coronales issues d'une séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium chez un patient humain (A) et un patient canin (B) atteints de GBM temporal gauche.....	57
Figure 14 Représentation schématique de la dynamique d'infection virale d'un VO de cellules tumorales.....	66
Figure 15 Rôle des VO dans la réactivation du SI	69
Figure 16 Images IRM en T1 avec PDC. (A) IRM avant traitement (B) Stabilisation de la maladie au premier contrôle (C-D) Réponse partielle à 15 et 20 semaines (E-F) Réponse complète à 25 et 30 semaines	74
Figure 17 Image par microscopie électronique d'une fine section intracellulaire de VACV d'un virion mature (MV).....	75
Figure 18 Représentation schématique du génome caractéristique des poxvirus (ici exemple du VACV)	76
Figure 19 Microscopie électronique à balayage des microvillosités d'actines viro-induites par le VACV.	77
Figure 20 Cycle de réplication du MYXV.	78

Figure 21 Lapin domestique atteint par la souche Toulouse 1 (grade1) 10 jours post-inoculation	80
Figure 22 Dispositif CED implanté chirurgicalement.....	83
Figure 23 IHC sur du GBM a) Nestin, b) faible expression de Nestin c&d) CD133, e) Olig2, f) DCx, g) Ki-67.....	91
Figure 24 Test de clonogénie.	94
Figure 25 Morphologie de 3 lignées cellulaires incluses en Histogel™ et colorées à l'Hémalun-Eosine (A : J3T-Bg ; B : G06A ; C : J3T))	95
Figure 26 Résultats bruts du temps de doublement pour chaque lignée cellulaire ..	96
Figure 27 Microscopie photonique au grossissement X40 montrant deux clones cellulaires.....	97
Figure 28 Exemple de résultats immunohistochimiques pour 4 marqueurs de différenciation, obtenu sur la lignée cellulaire J3T-Bg	98
Figure 29 Immunohistochimie des cellules RAFFRAY incluses en Histogel™, pour le marqueur Olig2.....	99
Figure 30 Caryotype des différentes lignées cellulaires.....	101
Figure 31 Courbes de survie clonogénique des différentes lignées cellulaires.....	103
Figure 32 Représentation schématique de la dynamique d'infection de la lignée J3T par le SG33	105
Figure 33 Représentation schématique de la dynamique d'infection des lignées V et Raffray 1 par le SG33.....	106

Tableaux

Tableau 1 Classification des différents types tumoraux (d'après la classification OMS 2007)	27
Tableau 2 Nouvelle classification des gliomes, d'après la classification OMS 2016	29
Tableau 3 Indice de Karnofsky)	50
Tableau 4 Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires.	60
Tableau 5 Récapitulatif des voies d'entrées et des avantages présentés par les principaux virus oncolytiques.....	65
Tableau 6 Gradation de la virulence du MYXV	80
Tableau 7 Particularités spécifiques des anticorps primaires utilisés en IHC.....	92
Tableau 8 Evaluation des scores de proportion, d'intensité et immunohistochimique	92
Tableau 9 Temps de doublement pour chaque lignée cellulaire	96
Tableau 10 Score immunohistochimique pour les différentes lignées cellulaires de chien.....	98
Tableau 11 Principales informations issues des caryotypes des lignées cellulaires	100
Tableau 12 Moyenne (+/- écart-type) du nombre de colonies survivantes en fonction de la dose d'irradiation.....	102
Tableau 13 Mean Inactivation Dose (MID), exprimée en Gy, des différentes lignées de gliomes canins.....	103
Tableau 14 Résultats obtenus pour les 2 ^{ème} et 3 ^{ème} expériences	104
Tableau 15 Tableau présentant les images obtenues par imagerie confocale avec la dynamique d'infection virale par le SG33-GFP.....	108
Tableau 16 Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique et des résultats obtenus concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires	109

Introduction

Parmi les principales causes de décès en France, le cancer est la première chez l'homme et la seconde chez la femme sur la période de 2005 à 2009. Il correspond à un développement anarchique d'un certain type de cellules, échappant aux différents mécanismes de régulation, moléculaires et cellulaires, dont les conséquences mettent la vie du patient en danger. Malgré les recherches actuelles permettant une meilleure compréhension de la tumorigenèse ainsi que des mécanismes de développement, le cancer reste le mal premier du XXI^{ème} siècle. En effet, on compte plus de 385 000 nouveaux cas en France lors de l'année 2015 (*Les cancers en France - Edition 2015 -Institut National Du Cancer*), même si le vieillissement de la population, l'amélioration des outils diagnostiques ainsi que les politiques préventives mises en place à travers la France, et de nombreux pays dans le monde, peuvent expliquer cette augmentation. Les cancers du poumon, du sein et du côlon sont les plus fréquents mais bénéficient d'un taux de guérison élevé. À l'inverse, certains cancers, de prévalence bien plus faible, présentent des taux de mortalité plus élevés.

Parmi ces derniers, les tumeurs issues des cellules gliales - les gliomes – sont associées à un pronostic sombre. La classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) permet de distinguer les gliomes selon le type de cellules initiatrices (astrocyte, oligodendrocyte, épendymocyte) et de grader chaque gliome selon son degré de malignité (Louis et al. 2007). Cette classification a récemment été mise à jour afin de prendre en considération des données moléculaires qui apportent des informations pronostiques et permettent de guider la décision thérapeutique, notamment pour le sous-groupe des gliomes diffus qui rassemble des astrocytomes et oligodendrogliomes particulièrement invasifs (Louis et al. 2016). La prise en charge thérapeutique des gliomes diffus repose sur une exérèse chirurgicale lorsqu'elle est possible, suivie d'une radiothérapie (RT) associée à du témozolomide (TMZ) pour les hauts-grades (grades III et IV), ou l'une de ces modalités thérapeutiques pour les grades II. Malgré l'approche multimodale dans le traitement des gliomes diffus de haut-grade, les récurrences sont nombreuses et la médiane de survie est faible : elle varie de

10 à 15 mois selon les études (Smith, Jenkins 2000; Alifieris, Trafalis 2015). Une des explications à cet échec repose sur l'apparition d'une chimiorésistance et d'une radiorésistance précoce des cellules cancéreuses (Dean, Fojo, Bates 2005). Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la résistance aux radiations ionisantes (RI) et aux agents chimiothérapeutiques est donc un prérequis indispensable afin de pouvoir proposer des traitements plus efficaces aux patients souffrant de gliomes diffus.

L'étude des mécanismes de résistance cellulaire aux traitements repose sur des travaux réalisés *in vitro* sur lignées cellulaires tumorales et *in vivo* sur modèle animal reproduisant la pathologie humaine. Actuellement, le modèle murin est celui utilisé pour les différentes études (Stylli et al. 2015). Cependant, il présente de nombreux inconvénients : les tumeurs chez la souris sont induites et des injections stéréotaxiques sont nécessaires afin d'étudier le développement tumoral intracérébral. De plus, les souris utilisées pour la recherche sont des souris immunodéficientes ; l'interaction entre le système immunitaire et le développement tumoral ne peut donc pas être pris en compte dans les études actuelles. Enfin, le modèle murin ne permet pas d'utiliser certains outils diagnostiques et thérapeutiques utilisés chez l'Homme tels que l'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou la chirurgie stéréotaxique. Le chien représente quant à lui un modèle animal très intéressant pour l'étude des gliomes diffus car il peut spontanément développer ces tumeurs avec une prévalence similaire à celle rapportée chez l'Homme (Song et al. 2013). Outre les avantages inhérents au modèle spontané (immunocompétence, diversité clonale, similarité des mécanismes oncogéniques avec la pathologie humaine), le chien présente un avantage anatomique majeur par rapport au modèle murin : la grande taille de son encéphale permet d'utiliser les mêmes outils d'imagerie et de RT que ceux utilisés pour le patient humain. Le modèle canin semble donc être plus pertinent que le modèle murin pour l'étude des gliomes diffus de l'Homme (Candolfi et al. 2007). Cependant, avant de pouvoir l'utiliser comme modèle d'étude dans un contexte de recherche en radio-oncologie comparative, il est indispensable de démontrer la similarité de réponse à la RT entre gliomes canins et humains. Cette caractérisation de la réponse tumorale radio-induite devra se faire dans un premier temps sur différentes lignées cellulaires de gliomes canins préalablement caractérisées.

Face aux limites de la RT dans le traitement des gliomes diffus, de nouvelles stratégies sont actuellement étudiées pour en améliorer l'efficacité ou pour la remplacer. Dans ce contexte, la virothérapie représente une option thérapeutique particulièrement intéressante. En effet, depuis le début du XX^{ème} siècle, des cas de rémission cancéreuse ont été observés lors d'infection virale concomitante. Depuis la découverte des virus, nombre d'entre eux ont présenté des propriétés oncolytiques. Les virus oncolytiques (VO) correspondent à des virus qui ont la capacité de détruire, directement ou non, les cellules cancéreuses et qui ne s'attaquent pas aux cellules saines. D'une part, les VO détruisent les cellules cancéreuses *via* leur cycle lytique ou *via* la lyse des cellules endothéliales. D'autre part, l'activité virale au sein de la tumeur est responsable d'une réactivation du Système Immunitaire (SI) antitumoral : les VO jouent un rôle essentiel dans l'immunothérapie anti-cancéreuse. De nombreux virus ont présenté des propriétés anti-cancéreuses et ont fait l'objet de virothérapie anti-tumorale. Les virus les plus étudiés sont l'Herpès Simplex Virus de type 1 (HSV-1), les Adénovirus (Ad), les poliovirus et les paramyxovirus tels que le virus de la rougeole. Ces virus ont été modifiés afin d'améliorer leur spécificité tumorale, leurs propriétés oncolytiques ou leur pouvoir immunogène. Ces virus sont appelés des virus armés. De nombreux essais thérapeutiques sont en cours à travers le monde avec ces VO armés. Une autre approche de la virothérapie correspond à l'utilisation combinée avec d'autres agents anticancéreux tels que des molécules anticancéreuses (Bartlett et al. 2013 ; Lawler et al. 2016 ; Spencer et al. 2015).

Le virus myxomateux est aussi un VO (Lun 2005). L'avantage présenté par le Myxomavirus (MYXV) par rapport aux autres VO ci-dessus, est sa spécificité d'hôte des lagomorphes. Ainsi, il a démontré une innocuité vis-à-vis des cellules humaines et canines *in vitro* et *in vivo* (Jackson et al.,1966). De plus, l'absence d'anticorps préexistants fait du virus myxomateux un candidat intéressant pour la virothérapie oncolytique.

Dans un contexte de recherche translationnelle, le chien atteint de gliomes diffus représente un modèle d'étude pertinent qui pourrait être utilisé dans un futur proche pour des études précliniques visant à évaluer l'efficacité de stratégies thérapeutiques innovantes telles que l'association du MYXV à la RT. La mise en place de telles études précliniques chez le chien nécessite dans un premier temps d'évaluer

in vitro, sur lignées cellulaires de gliome canin préalablement caractérisées, l'efficacité anti-tumorale de la RT, du MYXV et de l'association des deux.

Ainsi mon projet de thèse vétérinaire a pour buts de :

- (i) Réaliser la caractérisation phénotypique et génotypique de différentes lignées cellulaires de gliome canin de haut-grade de malignité,
- (ii) Caractériser la réponse radio-induite de ces lignées cellulaires,
- (iii) Évaluer l'efficacité oncolytique de la souche SG33 du MYXV sur ces lignées cellulaires

Dans une première partie, une revue de la littérature visant à détailler les différents éléments nécessaires à la compréhension du sujet sera réalisée. Une approche générale du gliome chez l'Homme, mais aussi chez le chien sera faite afin de mieux comprendre cette entité pathologique. Puis dans un second temps, nous étudierons les différents VO étudiés actuellement et nous nous intéresserons plus particulièrement au MYXV.

Dans une deuxième partie, nous ferons une présentation du matériel et des méthodes mis en œuvre ainsi que des résultats obtenus pour chacune des problématiques de ce travail de thèse.

I. Etude bibliographique

A. Les gliomes diffus

1. Définition histopathologique

(a) Les cellules de la glie

Les gliomes correspondent aux tumeurs du SNC issues des cellules gliales. Initialement, ce type cellulaire a longtemps été considéré comme un simple support du tissu nerveux en permettant le maintien de son architecture et de sa stabilité (Louis et al. 2007). La découverte des différents types de cellules gliales a montré que ce tissu joue un rôle bien plus important au sein du SNC. Ainsi, on distingue deux grands types cellulaires (Dimou, Gotz 2014) (figure 1):

- La microglie : ces cellules forment le système immunitaire inné du SNC et est capable de phagocytose. Elle est au contact des neurones et peut supprimer les synapses défaillantes. On parle de *synaptic stripping* (Kettenmann 2013).
- La macroglie : on distingue différents sous-types cellulaires
 - Les astrocytes permettent le maintien de l'homéostasie métabolique et ionique au sein du cerveau. Par ailleurs, ceux-ci interviennent dans la communication neuronale au niveau de la synapse, mais aussi dans la cicatrisation lors d'atteinte du SNC.
 - Les oligodendrocytes sont les cellules gliales myélinisantes du SNC.
 - Les épendymocytes sont à l'interface entre le SNC et le Liquide Cérébro-Spinal (LCS).
 - Les cellules gliales NG2 ont été découvertes à l'aide d'anticorps NG2, spécifiques du protéoglycane chondroïtine sulfaté de type 4. Elles forment un réseau péri-neuronal, permettent de stabiliser la synapse et sont distribuées dans l'ensemble du cerveau adulte. Elles interviennent dans la cicatrisation du tissu nerveux et peuvent se différencier en d'autres types cellulaires, tels que des oligodendrocytes.

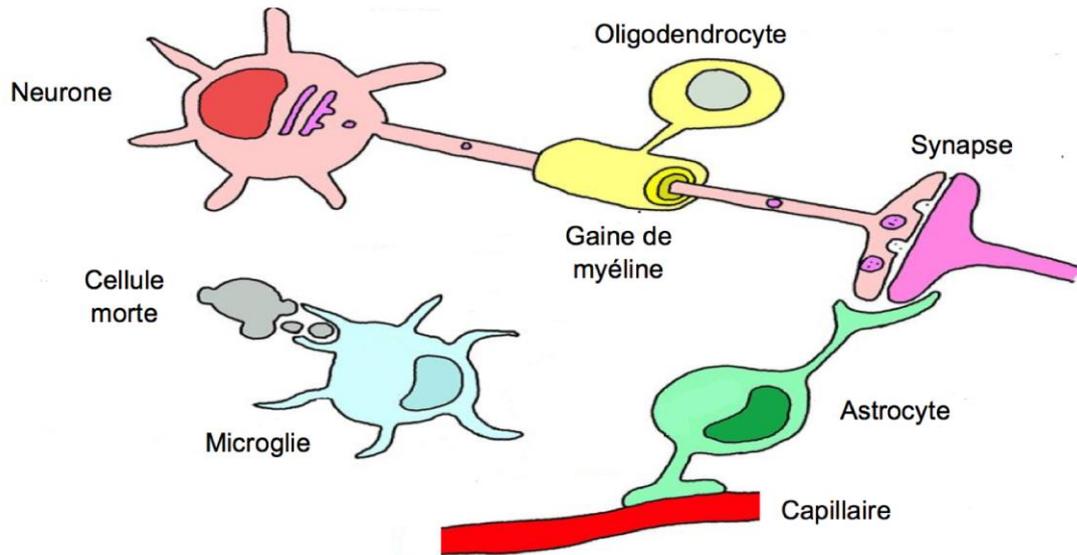


Figure 1 Schéma de l'organisation des cellules gliales (d'après Jansen 2014). Les astrocytes soutiennent le réseau neuronal et interviennent dans la nutrition des neurones et la communication synaptique. Les oligodendrocytes forment des gaines de myéline autour des axones dans le SNC. La microglie participe à la défense du SNC et possède la capacité de phagocyter les débris cellulaires.

(b) Classification des gliomes selon l'OMS

L'OMS a mis en place une classification des tumeurs cérébrales dès le milieu des années 1960, et n'a cessé de l'enrichir avec de nouvelles données. La première classification, qui date de 1979, différenciait les tumeurs selon leur type histologique. Ainsi, la principale dichotomie se fait entre les cellules astrocytaires, épendymaires et oligodendrogiales. La seconde classification de 1993 apporte des informations supplémentaires *via* l'analyse immunohistochimique des différents types cellulaires (Kleihues et al., 1993). La troisième classification fournit les profils génétiques des cellules afin d'affiner la description des tumeurs cérébrales. Par ailleurs, cette nomenclature fait référence pour la première fois à l'épidémiologie, les symptômes ainsi que le pronostic pour chaque entité clinique (Kleihues et al. 2002). La classification de 2007 s'appuie sur les travaux précédents et fournit de nouvelles informations pronostiques sur les tumeurs. Les différents types histologiques de gliomes et le grade OMS associé sont présentés dans le tableau ci-après.

Tableau 1 Classification des différents types tumoraux (d'après la classification OMS 2007)

Type	Sous-type	Grade			
		I	II	III	IV
Astrocytomes	Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes	x			
	Astrocytome pilocytique	x			
	Astrocytome pilomyxoïde		x		
	Astrocytome diffus		x		
	Xanthoastrocytome pléomorphique		x		
	Astrocytome anaplasique			x	
	Glioblastome				x
	Glioblastome à cellules géantes				x
	Gliosarcome				x
Oligodendrogliomes	Oligodendrogliome		x		
	Oligodendrogliome anaplasique			x	
Oligoastrocytomes	Oligoastrocytome		x		
	Oligoastrocytome anaplasique			x	
Ependymomes	Subependymome	x			
	Ependymome myxopapillaire	x			
	Ependymome		x		
	Ependymome anaplasique			x	

Parmi les tumeurs présentées dans le tableau 1, certaines sont particulièrement infiltrantes, difficiles à réséquer et posent des problèmes de récurrence locale : elles sont alors désignées de manière usuelle sous le terme de « gliomes diffus ». Elles correspondent aux astrocytomes diffus, anaplasique et de grade IV ainsi que les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade II et III.

La cinquième classification OMS de Juillet 2016 apporte une modification considérable à celle de 2007. En effet, les paramètres génétiques sont pris en compte dans l'établissement du diagnostic, mais aussi du pronostic des tumeurs. Ainsi, la classification repose sur le diagnostic histologique en premier lieu, qui est ensuite complété par le diagnostic génétique lorsque celui-ci est possible. L'apport des données génétiques est responsable d'une restructuration de certains types tumoraux (tableau 2). L'un des exemples les plus marquants de cette restructuration concerne le groupe des gliomes diffus qui devient alors une entité à part entière, pour laquelle certains marqueurs moléculaires ont une valeur pronostique (mutations des gènes

IDH1 et *IDH2*) et d'autres ont une valeur diagnostique telles que la mutation du gène *ATRX* fortement associée aux astrocytomes et la codélétion 1p/19q associée aux oligodendrogliomes. Le gène *IDH* code l'enzyme de même nom (Isocitrate déshydrogénase) qui est responsable de la transformation de l'isocitrate en α -kétoglutarate lors du cycle des acides tricarboxyliques. Sa mutation entraîne la production d'une nouvelle molécule, le D-2-HG (D-2-Hydroxyglutarate), dont la concentration importante entraîne des modifications épigénétiques et une hyperméthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les patients atteints de gliomes avec une mutation IDH présente une médiane de survie plus élevée par rapport à ceux avec un profil IDH « sauvage » (Dunn et al., 2013). La codélétion 1p/19q est un marqueur fortement associé au diagnostic d'oligodendrogliome et représente aussi un facteur pronostic favorable (Nikiforova et al, 2011). Ainsi, la classification des gliomes diffus repose dans un premier temps sur une différenciation histologique, puis dans un second temps sur la caractérisation de différents marqueurs pronostiques dont le statut IDH (figure 2).

Tableau 2 Nouvelle classification des gliomes, d'après la classification OMS 2016 (Louis et al., 2016)

Type	Sous-type	Grade			
		I	II	III	IV
Tumeurs astrocytaires et oligodendrogliales diffuses	Astrocytome diffus, IDH-mutant		x		
	Astrocytome diffus, IDH-sauvage		x		
	Astrocytome diffus, NOS		x		
	Astrocytome anaplasique, IDH-mutant			x	
	Astrocytome anaplasique, IDH-sauvage			x	
	Astrocytome anaplasique, NOS			x	
	Glioblastome, IDH-mutant				x
	Glioblastome, IDH-sauvage				x
	Glioblastome, NOS				x
	Gliome diffus de la ligne médiane, H3K27M-mutant				x
	Oligodendrogliome, IDH-mutant et 1p/19q codéleté		x		
	Oligodendrogliome, NOS		x		
	Oligodendrogliome anaplasique, IDH-mutant et 1p/19q codéleté			x	
	Oligodendrogliome anaplasique, NOS			x	
	Oligoastrocytome, NOS		x		
	Oligoastrocytome anaplasique, NOS			x	
Autres tumeurs astrocytaires	Astrocytome pilocytique	x			
	Astrocytome sous épendymaire à cellules géantes	x			
	Xanthoastrocytome pléomorphique		x		
	Xanthoastrocytome pléomorphique anaplasique			x	
Ependymomes	Subépendymome	x			
	Ependymome myxopapillaire	x			
	Ependymome		x		
	Ependymome, <i>RELA fusion-positive</i>		x	x	
	Ependymome anaplasique			x	
Autres gliomes	Gliome angiocentrique	x			
	Gliome choroïde du 3 ^{ème} ventricule		x		

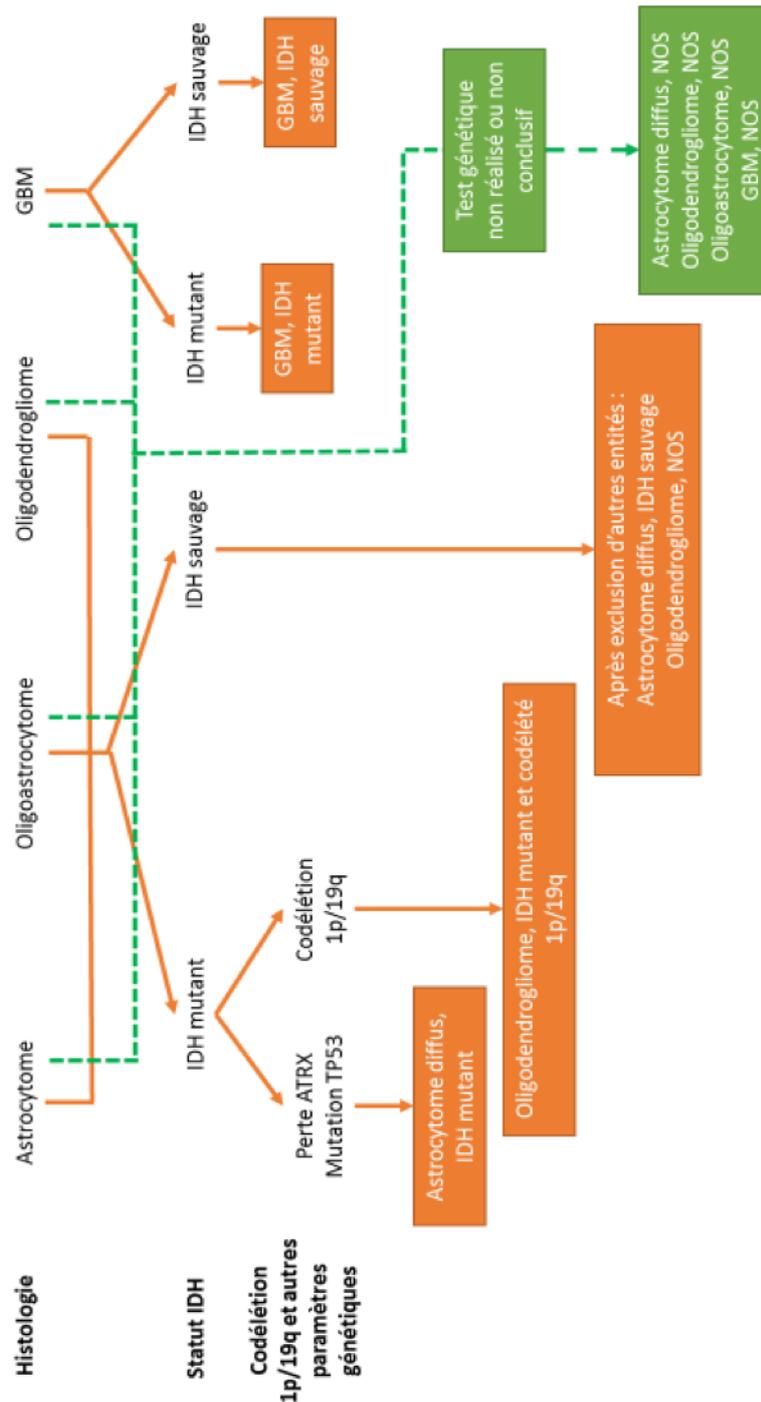


Figure 2 Classification simplifide des gliomes diffus, d'apr s la classification OMS 2016.

Le terme NOS (Not Otherwise Specified) ne reprsente pas un groupe tumoral spcifique : il dsigne les tumeurs dont les tests gntiques n'ont pas t ralis s, n'ont pas t faits intgralement ou n'ont pas montr d'alt rations gntiques diagnostiques. Une classification NOS regroupe ainsi des types tumoraux dont les crit res pathologiques, cliniques et gntiques sont incomplets et ncessitent des tudes compl mentaires (Louis et al., 2016)

2. Épidémiologie

a) Incidence

Les gliomes représentent 80% des tumeurs malignes du SNC (figure 3). Le GBM, qui est le gliome le plus fréquent, est associé aux taux de survie à 5 ans les plus faibles. L'incidence des gliomes, tous confondus, varie de 4.67 à 5.73/100 000 personnes. Celle du GBM varie entre 0.59 et 3.69 pour 100 000 personnes selon différentes études. L'incidence pour les astrocytomes anaplasiques et le GBM augmente avec l'âge, et le groupe des 75-84 ans est le plus atteint. De manière générale, les hommes sont plus atteints que les femmes puisqu'ils correspondent à 55% des cas de tumeurs malignes (Ostrom et al. 2015).

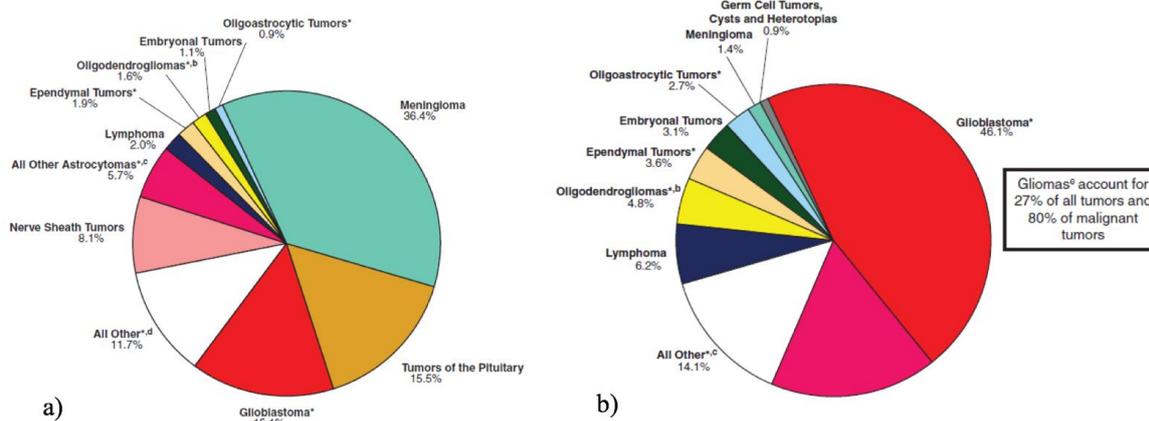


Figure 3 Tumeurs du SNC a) ensemble des tumeurs primitives b) tumeurs malignes du SNC (d'après Ostrom et al, 2015)

b) Facteurs de risque

L'utilisation des téléphones mobiles est un sujet sensible quant aux risques que leur usage au quotidien représente pour notre cerveau. En effet, l'émission d'ondes de radiofréquence par un mobile pourrait sur le long-terme avoir des effets néfastes sur le tissu nerveux. De nombreuses études s'intéressent à ce sujet, bien qu'aucune n'apporte de réponses claires et précises. D'une part, certaines ne montrent pas d'augmentation de risque, sauf sur une période supérieure à 10 ans, lors d'utilisation du côté ipsilatéral (Hardell et al. 2007 ; Little et al. 2012). D'autre part, une étude

française de 2015 fait référence à une augmentation du risque de développer des méningiomes ou des gliomes, lors d'une utilisation chronique de portable. Elle recommande à l'agence de l'IARC (Agence International de la Recherche sur le Cancer) de réévaluer la nocivité des ondes radiofréquences et les classer dans le groupe 2A « probable » des carcinogènes chez l'homme plutôt que le groupe 2B « possible ».

D'autre part, de nombreuses études épidémiologiques ont montré que les patients qui ont un terrain allergique (allergie alimentaire, asthme, eczéma...) ont moins de risque de développer un gliome. Les patients atteints de gliomes ont des taux d'immunoglobuline E (IgE), marqueurs de l'allergie, inférieurs à la moyenne. L'expression du marqueur CD133, marqueur d'agressivité du GBM, est négativement corrélée à l'expression des gènes en lien avec l'allergie et l'inflammation (Schwartzbaum et al. 2010).

3. Diagnostic

a) Clinique

Les signes cliniques sont les premiers éléments à orienter le diagnostic vers des troubles nerveux ; cependant, ces signes dépendent de la taille et de la vitesse de croissance de la tumeur, mais aussi de sa localisation (Young et al. 2015). L'œdème péri-tumoral peut aussi comprimer le tissu cérébral et entraîner par la même occasion des signes cliniques. La présentation clinique peut ainsi être très variable selon les individus. Les patients atteints pourront présenter des migraines, des troubles de la vision, une anisocorie ou des nausées. Certains signes cliniques peuvent impacter la vie du patient comme des troubles cognitifs, des changements de personnalité, une perte de conscience ou des troubles convulsifs. Ces crises convulsives sont le signe clinique le plus fréquent chez les personnes atteintes de gliome de haut ou de bas grade (Ruda et al. 2012).

Les commémoratifs, la vitesse d'apparition des symptômes, les facteurs de risques sont des éléments à prendre en considération dans l'évaluation clinique. Malheureusement, ces troubles peuvent s'observer avec d'autres entités cliniques que les gliomes; une hémorragie sub-arachnoïdienne ou un AVC ischémique sont à inclure

dans le diagnostic différentiel (Singla et al. 2016). C'est pourquoi l'imagerie joue un rôle primordial dans le diagnostic des tumeurs cérébrales.

b) Radiologique

(1) Tomodensitométrie (TDM)

L'examen d'imagerie à réaliser en premier lieu est un examen tomodensitométrique du crâne. En effet, cet examen va permettre d'évaluer l'intégrité du parenchyme cérébral et de faire rapidement le différentiel entre une masse cérébrale et des lésions vasculaires. Le TDM sera aussi recommandé chez les patients possédant des implants intégrés ou des dispositifs métalliques et qui ne peuvent subir d'IRM (Liu 2016). Le GBM apparaît comme une masse hypodense, avec un centre nécrotique (figure 4). Néanmoins, le TDM présente des limites de définition et l'IRM, une fois le diagnostic de masse tumorale établi, est l'outil d'imagerie de choix pour affiner le diagnostic.



Figure 4 Examen tomodensitométrique sans produit de contraste, d'un patient atteint de GBM. Présence d'une masse hypodense, créant un effet masse et comprimant le ventricule latéral (d'après Young et al, 2015)

(2) Modalités anatomiques et fonctionnelles de l'IRM

L'IRM, technique d'imagerie qui repose sur le principe de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), est l'outil d'imagerie de choix pour évaluer les anomalies affectant le corps humain, et particulièrement le cerveau. Au cours d'un examen IRM, différentes séquences sont réalisées (figure 5). La séquence pondérée en T1 permet d'obtenir une image « anatomique » de l'encéphale : la substance blanche apparaît plus claire que la substance grise et le LCS apparaîtra plus sombre (figure 6A). Lors de tumeur, le gadolinium (Gd), qui est un produit de contraste, est utilisé pour mieux

visualiser le processus néoplasique. La séquence pondérée en T2 est une image en contraste de la séquence T1 : l'eau et l'œdème apparaissent en hyper signal. Le FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*) correspond à une image T2 dont le signal de l'eau a été atténué : il permet de mettre en évidence l'œdème péri-tumoral. Ainsi, ces séquences sont couramment utilisées dans l'exploration des masses tumorales : le GBM apparaît alors comme une masse contrastée, avec un anneau hyperdense et un centre hypodense, qui correspond à un centre nécrotique en séquences T1-Gadolinium. Les marges de la tumeur sont peu distinctes du fait de l'œdème péri-tumoral et de la nature infiltrante des gliomes diffus (Young et al. 2015).

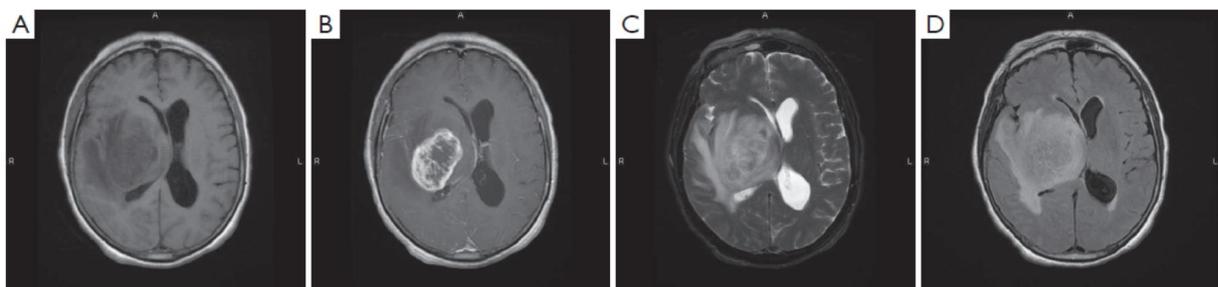


Figure 5 Séquences IRM chez un patient atteint d'un GBM.

(A) Séquence pondérée en T1 sans produit de contraste montrant une masse tumorale comprimant le ventricule latéral droit. (B) Séquence pondérée en T1 avec injection de gadolinium, montrant une masse sphérique avec une prise de contraste en anneau un centre hypodense compatible avec un centre nécrotique. (C) Image pondérée en T2, montrant l'œdème péri-tumoral. (D) Séquence FLAIR montrant, comme le T2, l'œdème péri-tumoral (d'après Young et al., 2015)

Cette première partie de l'examen IRM permet d'évaluer l'extension de la tumeur, sa localisation et de savoir si l'exérèse chirurgicale est possible. De plus, l'obtention d'une image 3D de haute résolution permet l'utilisation d'un cadre stéréotaxique avec les données cartésiennes afin de réaliser une biopsie à l'aiguille fine de la tumeur (figure 6).

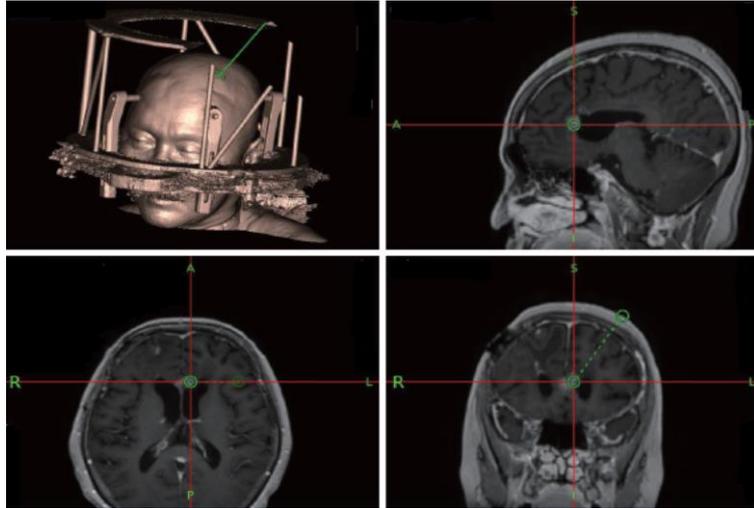


Figure 6 Représentation d'un cadre stéréotaxique et mise en évidence de la trajectoire de la biopsie. Présence des 3 coupes sagittale, axiale et coronale du crâne et trajectoire (en vert) de la biopsie. (Young et al., 2015)

Afin de préciser le diagnostic et fournir des informations supplémentaires en vue de la chirurgie, d'autres techniques d'IRM peuvent être réalisées. La DTI (*Diffusion Tensor Imaging*) ou IRM du tenseur de diffusion, permet d'évaluer pour chaque molécule d'eau sa position et sa direction, sachant que celle-ci est influencée par la matière qui l'entoure. Or, l'organisation de la substance blanche, constituée de gaines d'axone myélinisées parallèles, facilite le mouvement de l'eau, au long de ces axes. Ainsi, indirectement, le DTI permet de mettre en évidence la trajectoire des fibres nerveuses et d'observer la connectivité cérébrale. Le développement d'une masse tumorale peut modifier la trajectoire des fibres et expliquer ainsi certains troubles (figure 7) (Jellison et al. 2004). Le chirurgien doit connaître avec précision le trajet des fibres, afin d'éviter leur résection lors de l'exérèse chirurgicale large. L'IRMf (IRM fonctionnelle) peut être utilisée en association avec le DTI. Cette technique permet d'évaluer indirectement l'activité cérébrale, et de définir les aires du cerveau responsables des fonctions principales (les aires de Broca et Wernicke, responsables de la parole, aires motrices, ...). Lorsqu'une zone du cerveau est activée, l'afflux de sang augmente et des variations hémodynamiques sont enregistrées. On mesure ainsi l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependent), liée à la différence d'aimantation entre l'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine.

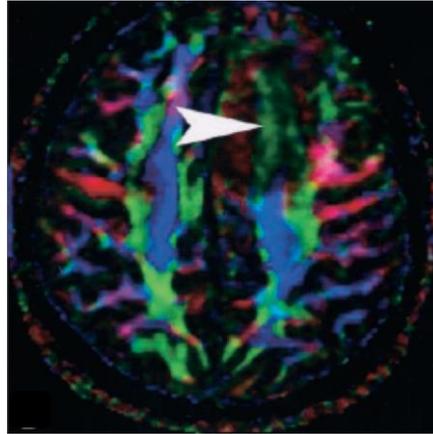


Figure 7 DTI réalisée chez un patient souffrant d'un astrocytome. La masse tumorale modifie le trajet des fibres de substance blanche (Wolbers et al., 2014).

La spectroscopie ou ISRM (Imagerie de Spectroscopie par Résonance Magnétique) est une technique d'imagerie non-invasive qui permet d'évaluer le métabolisme au sein d'un tissu. Elle se base sur les propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Ainsi, chaque molécule aura une signature spécifique, en fonction des différents atomes qui la compose. La Choline (Cho), le lactate, les lipides, la créatinine et le N-acétylaspartate (NAA) sont des métabolites couramment observés au sein du tissu nerveux sain et tumoral, dans des proportions spécifiques (Deviens et al. 2014). Le lactate est le signe d'un métabolisme anaérobie que l'on peut observer au sein d'une tumeur (Caivano et al. 2013) (figure 8). L'augmentation de la choline et une diminution du pic de NAA sont associées à des critères de malignité : un ratio Cho/NAA > 2 est en faveur de tumeurs malignes (Muruganandham et al. 2014).

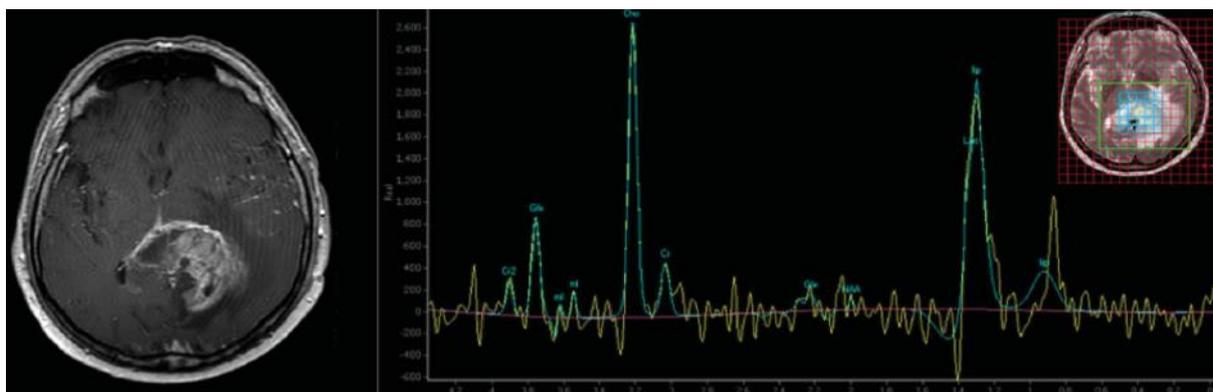


Figure 8 ISRM réalisée chez un patient atteint d'un GBM. On observe un rapport Cho/Cr > 2, un pic NAA diminué et un pic en lactate dans la région d'intérêt (Young et al., 2015)

(3) La tomographie à émission de positons (TEP)

Cette modalité d'imagerie permet d'identifier une activité métabolique au sein d'un tissu à partir des positons émis par un traceur radioactif, injecté au préalable. L'un des marqueurs les plus couramment utilisés est le ^{18}F -FDG (fluorodésoxyglucose marqué au ^{18}F) : ce glucose modifié est absorbé par les cellules, mais ne peut être métabolisé. Il va donc s'accumuler dans les cellules, de façon proportionnelle à leur consommation. Les cellules cancéreuses, hautement consommatrices de glucose vont donc être fortement marquées. Bien que les cellules du cerveau aient une demande importante en glucose, les cellules tumorales seront renforcées sur les images. De nombreux autres marqueurs sont à l'étude afin d'augmenter leurs spécificités vis-à-vis des différentes tumeurs. Une étude chinoise publiée en Avril 2016 évaluait la capacité du marqueur ^{18}F -RGD à caractériser la réponse précoce du GBM au traitement de radiochimiothérapie standard (Zhang et al. 2016). Le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) se fixe spécifiquement sur le récepteur intégrine $\alpha\text{v}\beta_3$ qui est exprimé par les cellules tumorales et qui permet l'expression et le maintien de l'angiogenèse tumorale. Cette molécule permet de visualiser les lésions du GBM et de prédire la réaction tumorale dès 3 semaines après la mise en place du traitement multimodal, comme on peut le noter sur la figure 9.

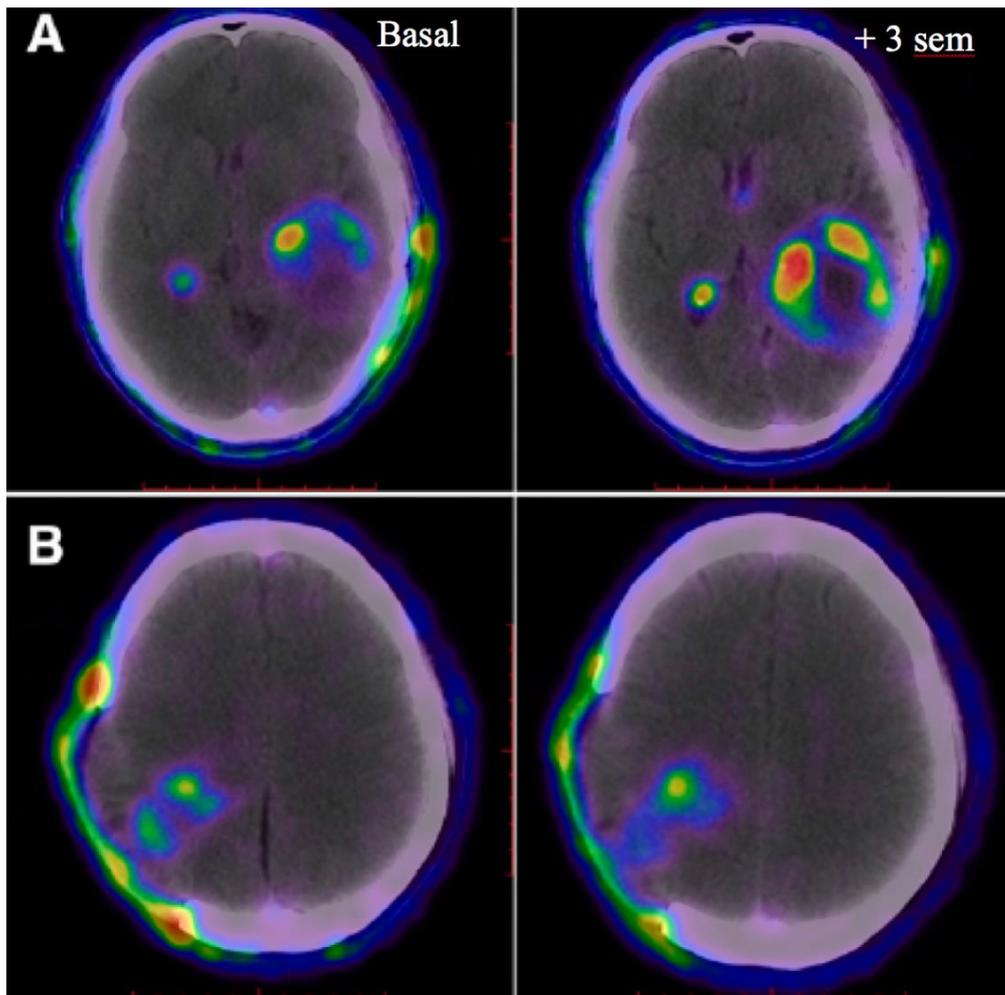


Figure 9 TEP et IRM associées, de deux patients atteints d'un GBM au début de leur traitement et 3 semaines plus tard.
Le patient A est un patient dont la tumeur est résistante tandis que pour le patient B, le volume tumoral est en régression par rapport à l'image de base établie avant l'initiation du traitement (d'après Zhang et al., 2016)

c) Anatomopathologique

L'une des dernières étapes dans l'établissement d'un diagnostic de certitude est la réalisation d'une biopsie pour examen anatomopathologique. A la microscopie, la morphologie des cellules, les critères de malignité tels qu'infiltration, atypies cytonucléaires, index mitotique, présence de néo-capillaires permettent d'orienter le diagnostic qui peut être complété par des analyses immunohistochimiques et la recherche de marqueurs génétiques (mutation ATRx et codélétion 1p19q, cf. *ante*).

De récentes études ont montré l'intérêt d'utiliser la spectroscopie pour guider la biopsie. Une étude américaine publiée en Juin 2016 a corrélié les voxels anormaux en spectroscopie (ratio Cho/NAA élevé) avec les lames histologies obtenues après biopsie. Les régions présentant un ratio Cho/NAA anormal montrent aussi des anomalies histologiques et immunohistochimiques (figure 10). Un panel de marqueurs a été évalué dont IDH, SOX2, p53, Ki67, EGFR, Olig2, GFAP... Par ailleurs, cette étude montre qu'un ratio Cho/NAA anormal au sein d'un tissu qui apparaît « sain » à l'IRM indique les zones d'infiltration tumorale (Cordova et al., 2016).

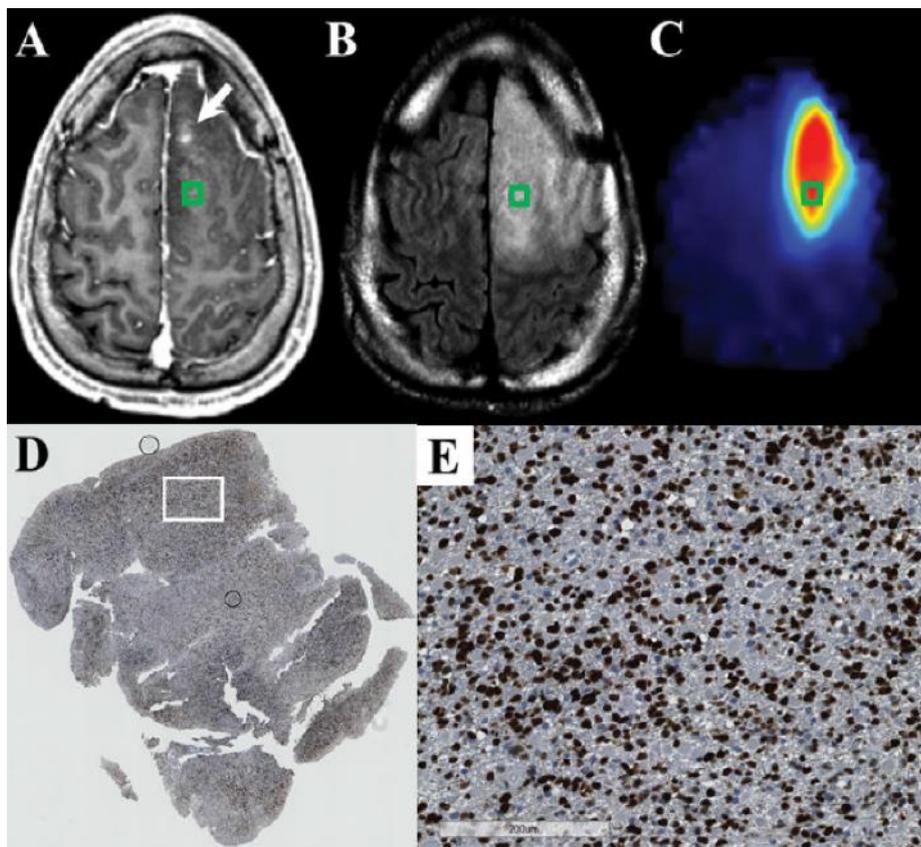


Figure 10 Corrélation entre un ratio Cho/NAA élevé et la surexpression de SOX-2. (A-C) IRM pondérée en T1, FLAIR et spectroscopie d'un patient atteint d'un astrocytome anaplasique. (D-E) Immunohistochimie du tissu prélevé dans la région d'intérêt (i.e. Carré vert présent sur les images précédentes) montrant des atypies nucléaires et une surexpression de la protéine SOX2 (d'après Cordova et al., 2016)

4. Traitement

a) Chirurgie

La chirurgie est la clé de voute du traitement des gliomes chez l'Homme. Cependant, la mise en place d'un traitement chirurgical repose sur certains facteurs. En effet, l'âge du patient, l'indice KPS et la localisation tumorale peuvent indiquer ou non la prise en charge chirurgicale. Une indice KPS supérieur à 70% est en faveur de la chirurgie. La décision finale est une décision collégiale entre neurochirurgien, neurologue, oncologue et anesthésiste : elle évalue le bénéfice de la chirurgie par rapport aux risques per- et post-opératoires. L'étendue de la résection tumorale (EOR) est une évaluation, en pourcentage, de l'efficacité de l'ablation tumorale (Stupp et al. 2014). L'EOR est un facteur prédictif pour la survie post-opératoire du patient : meilleure est l'EOR, meilleur est la médiane de survie du patient. Chez les patients atteints de GBM, une EOR > 80% permet d'améliorer le taux de survie (Oppenlander et al. 2014).

Afin d'obtenir une résection supra-maximale, qui correspond au retrait de la tumeur et de marges saines, l'imagerie préopératoire est essentielle pour l'approche chirurgicale du chirurgien (DTI, IRMf). L'IRM intra-opératoire permet au chirurgien une neuronavigation précise et fournit des EOR élevées. Cependant, cette technique est peu répandue actuellement du fait de l'augmentation du temps chirurgical et du coût élevé, requis par cette approche (Young et al. 2015). La craniotomie éveillée est une méthode fréquemment employée, principalement lorsque la localisation de la tumeur est proche du « cortex éloquent », c'est-à-dire, proche des aires du cerveau dédiées à la parole ou au mouvement (aire de Broca, aire de Wernicke, gyrus précentral). Une fois la boîte crânienne ouverte, le patient est réveillé et le neurochirurgien délivre des neurostimulations aux aires corticales, afin de déterminer les limites tumorales. Simultanément, un neurologue évalue en continue les fonctions motrices et vocales du patient. Un défaut de l'élocution ou de la motricité lors de la neurostimulation traduit une stimulation corticale par le neurochirurgien : il définit ainsi le contour de la tumeur. Une fois l'ensemble de la tumeur délimitée, le patient est de nouveau endormi et l'exérèse se poursuit. Il existe des contre-indications à ce type d'intervention : les patients claustrophobes, avec des troubles psychiatriques, une toux chronique, une

dysphagie, une hémiplégie, ne sont pas éligibles à ce type d'opération (Hervey-Jumper, Berger 2016 ; Chacko et al. 2013 ; Meyer et al. 2001).

Le 5-ALA (5-Aminolevulinic Acid) est une prodrogue non-fluorescente donnée oralement au patient en préopératoire qui va être transformée et s'accumuler au sein des cellules cancéreuses sous forme de porphyrines fluorescentes (Protoporphyrine IX [PpIX] principalement). La concentration de ce marqueur fluorescent est maximale durant 12h. Le chirurgien, équipé de lentilles adaptées sur le microscope chirurgical, peut ainsi avoir une délimitation précise de la masse tumorale, sous lumière UV. Comme le montre la figure 11, la fluorescence émise permet de retirer les résidus de cellules tumorales, qui auraient pu être laissées *in situ* sans cette approche. Le 5-ALA permet alors d'obtenir une meilleure EOR et les patients bénéficient d'une augmentation de 50% du taux de survie à 6 mois (41% pour ceux traités avec le 5-ALA par rapport à 21.1% pour ceux traités en chirurgie conventionnelle) (Stummer et al. 2006). Par ailleurs, certaines études ont démontré que la PpIX peut être utilisée pour la photothérapie dynamique. Sous l'action de la lumière, cette molécule va libérer des radicaux libres qui vont endommager des cibles cellulaires autres que l'ADN, comme les mitochondries.

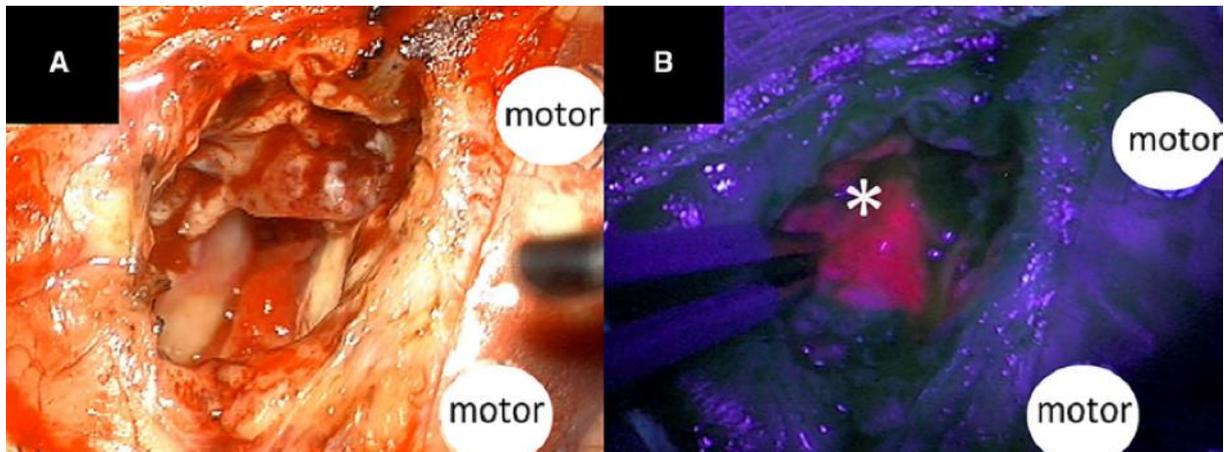


Figure 11 Photographies d'aires corticales motrices (cercle blanc) en présence de 5-ALA, (A) sous lumière blanche et (B) sous ultraviolet (UV). L'astérisque en (B) montre de la fluorescence émise par les cellules tumorales marquées par les protoporphyrines (d'après Stummer et al. 2006)

b) Radiothérapie

Dans la continuité de la chirurgie, la radiothérapie est indiquée à partir des gliomes de grade III, et des gliomes de grade II si la tumeur est non résécable ou s'il existe des facteurs pronostiques négatifs. Les protocoles de radiothérapie reposent sur les travaux de Stupp de 2005 et 2007. Les patients âgés de moins de 70 ans, reçoivent une dose fractionnée de 2Gy quotidienne pendant 5 jours par semaine, durant 6 semaines consécutives : la tumeur reçoit ainsi une dose totale de 60 Gy. Les radiations ionisantes sont délivrées au volume tumoral macroscopique, avec des marges de 2-3cm pour atteindre le volume cible clinique. Ces volumes sont calculés au préalable à l'aide de l'imagerie IRM préopératoire ou post-opératoire selon les cas (Stupp et al. 2005). Actuellement, de nouvelles approches de radiothérapies sont à l'étude afin d'améliorer l'efficacité du traitement. L'hypofractionnement consiste à délivrer une dose totale identique de 60 Gy, en un nombre de fraction plus faible. Cette technique permet de diminuer le temps de radiothérapie et par conséquent, d'améliorer la qualité de vie du patient. Par ailleurs, la dose reçue pour chaque fraction étant plus élevée, un plus grand nombre de cellules tumorales sont touchées, ce qui ralentit le phénomène de repopulation cellulaire. La médiane de survie est identique à celle obtenue avec le protocole Stupp (Panet-Raymond et al. 2009). Une étude de phase III randomisée multicentrique en cours vise à comparer la radiothérapie conventionnelle avec la radiothérapie avec modulation d'intensité, dont le *boost* est déterminé par l'ISRM. La tumeur reçoit une dose globale de 60 Gy selon le protocole de Stupp, et la zone d'intérêt (zones avec un ratio Cho/NAA>2) reçoit une dose cumulée de 72 Gy (Ken et al. 2015). Concernant les patients de plus de 70 ans, le protocole de radiothérapie n'est pas clairement défini : la radiothérapie hypofractionnée semble plus adaptée car elle affecte moins la qualité de vie du patient et entraîne moins de troubles cognitifs (Sulman et al. 2016 ; Lévy, Chapet, Mazon 2014).

c) Chimiothérapie

L'agent le plus utilisé en chimiothérapie pour le traitement des gliomes est le témozolomide (TMZ). Cette molécule est un agent alkylant efficace, bien tolérée par les patients et elle possède une bonne diffusion de la barrière hémato-méningée. Son

utilisation entre dans le protocole Stupp et est concomitante à la radiothérapie : le patient reçoit la dose de 75mg/m² de surface corporelle par jour, 7 jours par semaine, week-end compris, du premier au dernier jour de radiothérapie. Le TMZ est par la suite utilisé en traitement adjuvant à la dose de 150mg/m²/jour pendant 5 jours. Puis pour le deuxième cycle, la dose est augmentée à 200mg/m²/j pendant 5 jours si le traitement est bien toléré. Les cures sont répétées tous les 28 jours pour une durée initiale de 6 cycles *in toto*. L'apport concomitant et adjuvant du TMZ a permis d'augmenter de manière significative la médiane de survie (14.6 mois vs 12.1 mois avec radiothérapie seule) (Stupp et al. 2005). Une étude française de 2013 a montré que le prolongement de ce traitement semble augmenter la survie globale sans augmentation de la toxicité (Darlix et al. 2013).

Le principe actif du TMZ agit en alkylant la position ⁶O de la guanine formant de la ⁶O-méthyl-guanine (⁶O-meG) qui entraîne des cassures double-brin de l'ADN responsable de la mort cellulaire, par apoptose ou autophagie. Le gène *MGMT* (⁶O-methylguanine-DNA méthyltransférase) code une enzyme qui va réparer cette lésion. Lorsque le gène *MGMT* est fonctionnel, on observe alors une certaine résistance au TMZ. Au contraire, lorsque le promoteur du gène *MGMT* est méthylé, le gène devient inactif, ce qui sera associé à une meilleure réponse du patient au TMZ. La méthylation du promoteur du gène *MGMT* sera alors recherchée afin d'évaluer la sensibilité de la tumeur à ce type de chimiothérapie (Villano, Seery, Bressler 2009). D'autres molécules sont aussi utilisées en seconde intention après le traitement au TMZ, telles que la carmustine et la lomustine.

Une thérapie locale est fréquemment utilisée, en complément de la chirurgie. Un « patch » imprégné de carmustine est déposé sur les marges de la tumeur et va délivrer la molécule durant 2 à 3 semaines. Cette technique apporte un bénéfice de survie aux patients traités, sans conséquences néfastes pour le patient (Westphal et al. 2003).

Les gliomes de haut-grade tels que le GBM sont des tumeurs qui possèdent une vascularisation périphérique anarchique, tortueuse. Cette vascularisation est consécutive à la surexpression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) par les cellules gliales et a pour conséquence la mise en place d'un milieu hypoxique au sein de la tumeur, qui favorise les mécanismes de résistance des cellules tumorales. De plus, cette vascularisation anarchique limite la délivrance des molécules

chimiothérapeutiques au sein de la tumeur. Ainsi, la lutte contre l'angiogenèse tumorale apparaît être une approche thérapeutique intéressante. C'est dans ce contexte que le bévacizumab (BVZ), un anticorps recombinant humain anti-VEGF A est étudié. Bien que les mécanismes du BVZ ne sont pas encore connus dans leur ensemble, cette molécule a montré des effets bénéfiques dans le traitement du cancer du sein et du colon. Le BVZ permet ainsi de limiter la néo-angiogenèse tumorale et de rétablir une bonne perfusion de la tumeur. Bien que l'essai randomisé de phase III AVAGLIO montre une augmentation significative de la durée de médiane de survie sans progression avec BVZ : 10.7 mois contre 7.3 mois lors du traitement conventionnel, la survie globale n'est pas augmentée (Fan et al. 2010 ; Chinot et al. 2014).

d) Traitements adjuvants

La prise en charge de la tumeur repose sur le traitement de la tumeur d'une part, mais aussi sur les complications liées à la tumeur en elle-même ou aux traitements mis en œuvre d'autre part. En effet, les tumeurs malignes ont des effets délétères qui impactent la qualité de vie des patients. Ceux-ci sont susceptibles de développer des convulsions, des thromboembolies veineuses ou des troubles du comportement selon la localisation tumorale. Par ailleurs, les traitements antitumoraux peuvent quant à eux présenter aussi des effets secondaires (Schiff et al. 2015).

Les convulsions sont fréquentes lors de tumeur cérébrale et peuvent survenir lors du développement tumoral, selon la localisation, le type tumoral et la vitesse de croissance. Les gliomes de bas-grade provoquent des crises convulsives dans 80% des cas, tandis qu'elles ne sont présentes que dans 20% des cas chez les patients atteints de gliomes de haut-grade. Les traitements de chimiothérapie à base de TMZ, ainsi que l'exérèse chirurgicale et la RT permettent de diminuer la fréquence des convulsions. La craniotomie est souvent associée à la prise préventive d'antiépileptique. Cependant, aucune étude n'a montré d'effet bénéfique à cette médication. De plus, ces molécules peuvent présenter des effets négatifs, tels que des démangeaisons dans 18% des cas de patients recevant une radiothérapie (Mamon et al. 1999). Les antiépileptiques diminuent par ailleurs l'efficacité des corticoïdes.

Les risques de thromboembolies veineuses sont importants à prendre en considération lors de la période péri-opératoire. Des études rétrospectives ont montré

un risque de thromboembolie de 3 à 25 % dans les 6 semaines post-opératoires (Marras, Geerts, Perry 2000). Les facteurs de risque sont nombreux et reposent sur un âge élevé du patient (>75ans), un alitement prolongé, une tumeur de haut grade ou sur une taille de tumeur supérieure à 5cm de diamètre. Un état hypercoagulable induit par la tumeur a été démontré chez les personnes atteintes de gliome malin : des molécules procoagulante et antifibrinolytique, telles que le facteur tissulaire, le VEGF sont produites par ce type de tumeur. De plus, la chimiothérapie, la radiothérapie et les traitements anti-angiogénique sont associés à des risques augmentés de thrombose (Jenkins et al. 2010 ; Zangari et al. 2009). Ainsi, la prévention des thromboses est essentielle dans la prise en charge des tumeurs cérébrales et repose sur une prophylaxie péri-opératoire. C'est pourquoi les patients atteints de gliomes de haut-grade reçoivent donc généralement un traitement préventif d'héparine de bas poids moléculaire (HBPM), sur une période minimale d'un mois (Perry 2012).

La plupart des patients atteints de tumeur cérébrale sont amenés au cours de leur traitement à prendre des corticoïdes. Ces médicaments permettent de contrôler l'œdème cérébral et ainsi de limiter les troubles neurologiques et les convulsions associés. Par ailleurs, les corticoïdes ont un effet analgésique et ils permettent d'améliorer l'appétit et le comportement des patients. Généralement, le médicament utilisé en première intention est la dexaméthasone, car il ne perturbe pas l'axe corticotrope. Cependant, l'usage à long terme des corticoïdes ont des effets systémiques négatifs : la myopathie, associée à une faiblesse musculaire correspond à l'effet le plus fréquemment rencontré. De plus, des ulcères gastriques, une hyperglycémie ou de l'ostéoporose peuvent apparaître sur le long terme et nécessitent la prise de traitements supplémentaires (Pruitt 2011). Les doses de corticoïdes doivent donc être limitées dans le temps afin d'éviter ces complications, et la décroissance doit se faire lentement. Par ailleurs, un exercice physique doit être maintenu durant le traitement, ainsi qu'un régime hyposodé afin de maintenir une bonne hygiène de vie.

Le traitement de chimiothérapie appartient à l'arsenal thérapeutique mis en place afin de lutter contre les gliomes. Le TMZ est l'anticancéreux utilisé en première intention. Cependant, l'emploi de ces molécules est associé à des effets secondaires, qui impactent la vie du patient. En effet, le TMZ possède une toxicité hématologique : bien que les anémies soient rarement observées, les lymphopénies sont fréquemment présentes lors des séances de chimiothérapies. L'utilisation conjointe d'agents chimiothérapeutiques et de corticoïdes dépriment le système immunitaire et forme un

terrain favorable aux infections. Malgré cette immunodépression, on observe seulement 2-3% d'infection du SNC, suite à une rupture de la barrière hémato-méningée lors de craniotomie. *Pneumocystis jirovecii pneumoniae* (PCP) est un agent pathogène opportuniste qui profite de ce contexte pour entraîner des troubles pulmonaires. De plus, l'utilisation du TMZ a été associée à une réactivation d'Herpèsvirus ou du cytomegalovirus (Ridola et al. 2011).

Enfin, lors d'atteinte tumorale, la fatigue et les troubles du sommeil sont des symptômes que l'on retrouve fréquemment chez les patients : 40 à 70% des patients rapportent une fatigue plus importante (Armstrong, Gilbert 2012). Ces symptômes sont d'origine biologique, mais aussi psychologique. L'inflammation cérébrale, induite par la masse tumorale, provoque une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6). Ces molécules vont en conséquence perturber la neurotransmission, la production de mélatonine et vont conduire aux symptômes tels que l'insomnie et la fatigue. De même, les effets de la radiothérapie sont similaires : une étude de Hickok et al., a montré que la radiothérapie a un impact directement sur la fatigue des patients. Sur les 160 patients ne présentant pas de fatigue au début de la radiothérapie, 70% l'ont développée au cours des 3 à 5 semaines de cure. (Hickok et al. 2005). Cette fatigue chronique a aussi une origine psychologique liée à la détresse émotionnelle, à la peur que représente le diagnostic et le traitement du cancer. Nombre de patients souffrent par ailleurs de dépression, d'anxiété durant leur maladie : une étude de 2002 estime à environ 40%, le nombre de patients atteints de tumeur cérébrale, qui sont sujets à des symptômes de dépression (Pelletier et al. 2002). Des troubles cognitifs sont aussi présents, en lien avec la masse tumorale et l'œdème péri-tumoral. Ces troubles peuvent même affecter la capacité de prise de décision médicale du patient. Ceci serait lié à des déficits de la mémoire verbale à court terme (Triebel et al. 2009). Ces troubles sont très fréquents suite à la radiothérapie : 90% des patients déclarent des troubles cognitifs dans les 6 mois qui suivent le traitement aux rayons ionisants (Crossen et al. 1994).

La prise en charge d'un patient atteint de cancer repose donc sur une médecine globale qui soigne le patient dans son ensemble. Certes, le traitement de la tumeur est primordial mais il semble tout aussi essentiel de traiter la personne sur le plan psychologique, émotionnel et nutritionnel. Il est aussi important de traiter les effets secondaires liés aux nombreux traitements.

e) *Résistance aux traitements*

Les gliomes de haut-grade font partie des cancers avec les plus mauvais taux de survie. Ces chiffres s'expliquent d'une part par l'agressivité de ces tumeurs, leur nature infiltrante rendant difficile voire impossible une exérèse complète. D'autre part, ces tumeurs sont connues pour être plus chimio-radiorésistance que d'autres types tumoraux. Les mécanismes mis en jeu sont nombreux. La Barrière Hémato-Méningée (BHM) représente une barrière au passage des molécules du plasma dans le tissu nerveux. La BHM porte à sa surface des protéines qui appartiennent à la famille des molécules MDR (*MultiDrug Resistance*) telles que la P-glycoprotéine (Pgp) ou d'autres molécules comme la MRP1 (*Multidrug resistance-related protein 1*). Ces molécules sont des pompes ATP-dépendantes qui éliminent dans le milieu extracellulaire les drogues intracellulaires. Ces deux molécules sont surexprimées au sein des gliomes, dans des proportions distinctes selon le grade du gliome. MRP1 sera préférentiellement exprimée au sein des gliomes de grade IV tandis que l'expression de Pgp sera plus importante dans les grades I et II. Ainsi, les chercheurs ayant réalisé cette étude, proposent que la surexpression du gène MRP1 soit un critère de malignité des gliomes. Le choix thérapeutique et les cibles anti-tumorales seraient donc dépendants du grade du gliome (de Faria et al. 2008).

Un autre critère de chimiorésistance déjà évoqué dans les paragraphes ci-dessus correspond à l'expression ou à la méthylation du promoteur du gène *MGMT*. Ce gène est impliqué dans la réparation de l'ADN et particulièrement dans la déméthylation en ⁶O de la guanine. Or, cette lésion est celle engendrée par le TMZ, agent majeur de chimiothérapie contre les gliomes. Le statut méthylé ou non du promoteur de ce gène est donc primordial pour adapter au mieux l'arsenal thérapeutique.

L'hypoxie au sein de la tumeur entraîne l'expression des gènes HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*) qui permettent l'adaptation des cellules à un milieu pauvre en oxygène. En condition normale, HIF1 α est dégradé par des enzymes PHDs (*specific prolyl hydroxylase-domain*). En condition hypoxique, ces enzymes sont inhibées et la molécule HIF1 α peut entrer dans le noyau et se fixer sur une séquence ADN appelée HRE (*Hypoxia Responsive Element*) qui va transactiver des gènes favorisant l'angiogénèse, l'adaptation au métabolisme anaérobie, ou la résistance à l'apoptose. Ce gène joue ainsi de nombreux rôles dans la résistance des cellules à la

chimiothérapie et à la radiothérapie. De plus, il est surexprimé au sein des Cellules Souches Cancéreuses (CSC) présentes dans les niches tumorales. Ces cellules sont responsables de la repopulation tumorale après la thérapie. (Zhao et al. 2015 ; Ishii et al. 2016). Les CSC ont la capacité de s'auto-renouveler, de proliférer et de se différencier. Elles sont mises en évidence par des marqueurs spécifiques tels que le marqueur CD133, ou Notch. La résistance de ces cellules s'explique d'une part par des facteurs intrinsèques tels que l'expression de protéines Pgp, sa capacité à réparer les lésions à l'ADN, la quiescence et la résistance à l'apoptose. D'autre part, il semble que le microenvironnement tumoral prend une part importante dans les mécanismes de résistance. Ces CSC sont présentes dans des niches, entourées par une matrice extracellulaire spécifique, riche en tenascin C, en SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*), à proximité des cellules endothéliales avec lesquelles elles communiquent. La sensibilité à l'apoptose des CSC suite à une dose unique de radiations ionisantes est liée à la sensibilité à l'apoptose des cellules endothéliales (Garcia-Barros, 2003). La matrice extracellulaire peut contenir des molécules qui vont moduler la réponse aux radiations tels que le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) ou former une niche favorable au développement des cellules qui auront résisté à la radiothérapie (Dean, Fojo, Bates 2005 ; Mannino, Chalmers 2011).

5. Pronostic

Les principaux facteurs influençant le pronostic sont le type tumoral et son degré de malignité. En ce qui concerne le GBM, les trois facteurs retenus pour donner un pronostic de survie sont :

- l'efficacité de la résection tumorale : plus la résection tumorale est large, meilleur sera le pronostic,
- l'âge du patient au moment du diagnostic : une étude allemande de 2007 sur les survies associées au GBM a montré que l'âge au moment du diagnostic était un facteur pronostic. Les patients de cette étude avaient une moyenne d'âge de 51 ans pour une médiane de survie de 7 ans, alors qu'elle était de 4.6 ans pour une cohorte d'une moyenne d'âge de 60.9 ans. Un

jeune âge au moment du diagnostic apparaît donc comme un facteur pronostic positif (Krex et al. 2007),

- L'indice de Karnofsky (KPS) (Karnofsky, 1949) : cet indice de performance permet d'évaluer l'état de santé général du patient et sa capacité à effectuer les actes du quotidien. Il est utilisé en médecine humaine afin d'estimer la capacité du malade à supporter un traitement chimiothérapeutique dans un premier temps, puis à supporter l'ensemble des traitements oncolytiques. Cet indice repose sur une échelle de 0 à 100, où 100 correspond à un homme sain capable d'effectuer normalement une activité journalière et 0 correspond au décès du patient (tableau 3). Les patients avec un indice supérieur à 70% en préopératoire ont des pronostics de survie meilleurs que ceux avec un indice inférieur (Chambless et al. 2015). Le KPS influence aussi le choix de réaliser ou non une chirurgie : la chirurgie peut être remise en question si le KPS est aussi inférieur à 70%, du fait de l'impact négatif de la chirurgie sur l'autonomie du patient en post-opératoire.

Tableau 3 Indice de Karnofsky (d'après social-sante.gouv.fr)

Indice de Karnofsky		
Catégorie	Indice	Description
Capable de mener une activité normale	100%	Normal, pas de signes de maladie
	90%	Peut mener une activité normale, symptômes mineurs de la maladie, totalement autonome
	80%	Peut mener une activité normale, mais avec effort, symptômes ou signes mineurs, totalement autonome
Incapable de travailler, capable de vivre chez lui et d'assumer ses besoins personnels, une assistance variable est nécessaire	70%	Peut se prendre en charge, incapable de mener une activité normale, autonome mais à stimuler
	60%	Nécessite une aide occasionnelle mais peut prendre en charge la plupart des besoins, semi-autonome
	50%	Nécessite une aide suivie et des soins médicaux fréquents, semi autonome
	40%	Handicapé, nécessite une aide et des soins particuliers
Incapable de s'occuper de lui-même, nécessite des soins hospitaliers ou l'équivalent	30%	Sévèrement handicapé, dépendant
	20%	Très malade, soutien actif, absence totale d'autonomie
	10%	Moribond, processus fatal progressant rapidement
	0%	Mort du patient

Par ailleurs, le statut de méthylation du promoteur du gène *MGMT* (O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase) est un facteur pronostique supplémentaire pour les patients souffrant de GBM. *MGMT* code une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN, la méthylation de son promoteur entraîne une perte d'expression de l'enzyme. Une étude datant de 2005 a montré que l'extinction de l'expression de ce gène était favorable au traitement du GBM par le TMZ. Les patients avec une méthylation du promoteur de *MGMT* disposaient d'un allongement significatif de leur médiane de survie de 7 mois, par rapport au groupe contrôle (Hegi et al. 2005).

Cette première partie a montré que les gliomes diffus chez l'Homme sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et sont associées à un pronostic sombre, surtout en ce qui concerne le GBM. Malgré une approche thérapeutique multimodale reposant sur une chirurgie large, une RT ainsi qu'une chimiothérapie, les progrès en termes de médiane de survie sont limités depuis de nombreuses années. Il apparaît donc nécessaire de rechercher de nouvelles thérapies innovantes qui puissent permettre aux cliniciens d'améliorer la qualité de vie de leurs patients sur le long terme. Dans ce contexte, il est essentiel de pouvoir tester ces nouvelles stratégies thérapeutiques sur un modèle animal qui reproduise fidèlement les différentes caractéristiques tumorales.

B. Les gliomes diffus canins comme modèle d'étude en oncologie comparative

Le chien est le meilleur ami de l'Homme : plus de 7.3 millions de canidés sont présents au sein de nos foyers en France en 2014 (*Santevet.com*, 2015). Depuis sa domestication, il y a environ 30 000 ans, le chien partage notre foyer, notre environnement et notre mode de vie. Depuis leur ancêtre commun, *Canis lupus*, les chiens ont été sélectionnés par l'Homme et se subdivisent en de nombreuses races. Ainsi, le chien partage au quotidien notre vie, mais malheureusement aussi nos cancers. En effet, aux Etats-Unis, plus de 1 million de cancers sont diagnostiqués chez les chiens chaque année (Paoloni et al, 2008).

C'est dans ce contexte que s'est développée ces dernières années l'oncologie comparative, un domaine de la recherche qui rassemble vétérinaires, médecins et scientifiques afin d'évaluer la convergence nosologique entre cancers canins et humains. La similarité pathologique entre les deux espèces permettrait d'utiliser le chien malade comme modèle pertinent pour améliorer notre compréhension, approche diagnostique et thérapeutique des cancers chez l'Homme et chez le chien (Schiffman, Breen 2015). Le chien malade pourrait aussi être utilisé pour tester l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques, ce qui permettrait de récolter des arguments précliniques pertinents complémentaires à ceux déjà obtenus sur modèle murin. L'absence de traitement standard reconnu pour les gliomes chez le chien, permet aux vétérinaires de proposer en première intention des stratégies thérapeutiques innovantes sans se heurter à un problème éthique.

La section qui suit est consacrée à la démonstration de l'intérêt du modèle canin de gliomes en recherche translationnelle.

1. Intérêts du modèle canin

a) *Arguments en faveur d'une convergence nosologique entre gliomes canins et humains*

(1) Arguments épidémiologiques

L'incidence des tumeurs cérébrales canines est de 20 cas/10 000 chiens/an (Snyder et al. 2006) et sont responsables de 1 à 3 % des décès chez le chien (Dobson et al. 2002), ce qui représente une incidence équivalente à celle de l'Homme qui est de 20,59 cas/100 000 par an (Dolecek et al. 2012). Cependant, les données sont probablement sous-estimées du fait du manque de moyens diagnostiques en médecine vétérinaire ou du choix des propriétaires à réaliser une euthanasie suite à l'apparition des troubles neurologiques. En effet, en comparaison avec la médecine humaine en France, le droit à l'euthanasie est accepté chez les animaux domestiques et le manque de ressources financières du propriétaire peut représenter un frein dans la mise en place d'un traitement adéquat (LeBlanc et al. 2016). La proportion de gliomes par rapport aux tumeurs cérébrales primitives est également similaire chez le chien (36,6%) et l'Homme (24%), avec toutefois une différence quant au type de gliomes le plus fréquemment rencontré (oligodendrogliome anaplasique chez le chien, GBM chez l'Homme) (Song et al. 2013 ; Dolecek et al. 2012).

Comme chez l'Homme, l'âge représente un facteur de risque, avec une moyenne d'âge au moment du diagnostic de l'ordre de 7-8 ans. Pour l'instant, aucune prédisposition sexuelle n'a été mise en évidence chez le chien. Le facteur prédisposant le plus notable demeure la race : les chiens brachycéphales, avec un museau court, sont les plus fréquemment touchés. Parmi eux, les Boston Terriers, Boxers, Bouledogues anglais et français sont les plus sensibles (Song et al. 2013). Il semblerait donc que des gènes de prédisposition au développement de gliomes existent et qu'ils aient été conservés *via* la sélection et l'élevage de certaines races brachycéphales.

(2) Arguments génétiques

La faible variation génétique au sein d'une race canine facilite l'identification de gènes impliqués dans l'oncogenèse, gènes dont la modification d'expression peut ensuite être recherchée chez l'Homme.

La prédisposition des races brachycéphales au développement de gliomes rappelle les syndromes humains de prédisposition au cancer, pour lesquels des mutations génétiques héréditaires conduisent à l'apparition de tumeurs (mutation de *TSC1* et *TSC2* pour la sclérose tubéreuse, *NF1* pour la neurofibromatose de type 1 et 2, *VHL* pour la maladie de Von Hippel Lindau, *TP53* pour le syndrome de Li-Fraumeni) (Wrensch et al. 1997 ; Farrell et al., 2015). Jusqu'à présent, aucune étude n'a mis en évidence de mutation germinale de ces gènes chez les chiens atteints de gliomes.

Des facteurs de susceptibilité associés au développement de gliomes chez le chien ont été récemment mis en évidence par la réalisation d'une analyse d'association pangénomique (Truvé et al. 2016). Cette approche a permis d'identifier trois gènes candidats. La comparaison du tissu tumoral avec le tissu sain a montré que l'expression de deux de ces gènes candidats (*CAMKK2*, *P2RX7*) était modifiée au sein de la tumeur, à la fois chez le chien et l'Homme. Des études plus approfondies sont nécessaires afin d'évaluer exactement le rôle de ces gènes dans le développement oncogénique des gliomes canins et humains.

(3) Arguments étiopathogéniques

Dans la mesure où les gliomes du chien se développent de manière spontanée, il peut être supposé que les mécanismes oncogéniques soient similaires chez le chien et chez l'Homme.

La recherche d'altérations génétiques héréditaires et de gènes de susceptibilité impliqués dans le développement tumoral est toujours une voie active de recherche, comme cela vient d'être évoqué.

Plusieurs études sur l'oncogenèse des gliomes ont montré que tous les grades de gliomes humains comportaient des CSC, une sous-population cellulaire supposée

initier et maintenir le développement tumoral par sa capacité à s'auto-renouveler (Reya et al. 2001 ; Wilson et al. 2004 ; Rebetz et al. 2008). Selon l'hypothèse des CSC, les gliomes sont organisés de manière hiérarchique avec, en haut de la pyramide, des CSC autonomes se différenciant en cellules progénitrices, précurseurs et différenciées des lignées astrocytaire et oligodendrogliale. Il est également supposé que les CSC soient à l'origine des échecs thérapeutiques car elles sont plus chimio- et radorésistantes que les cellules différenciées et peuvent reformer localement la tumeur après traitement (Eyler, Rich 2008 ; Bao et al. 2006). Deux études ont pour l'instant démontré la présence de CSC dans les gliomes canins : l'étude de Stoica et al. pour laquelle les CSC isolées à partir d'un GBM canin ont reproduit la tumeur chez des souris Nude une fois implantées dans l'encéphale (Stoica et al. 2009). ; et l'étude de Fernandez et al. pour laquelle la présence de CSC a été mise en évidence par immunohistochimie dans un panel de 20 cas de gliomes diffus canins allant du grade II au grade IV (figure 12) (Fernández et al. 2016). Dans cette dernière étude, l'utilisation de marqueurs de différenciation des lignées astrocytaire, oligodendrogliale et neuronale avaient montré que les cellules Nestine+ et CD133+ (marqueurs de cellules souches) étaient présentes dans tous les grades de gliomes, avec un enrichissement plus important pour les haut-grades comme cela est le cas pour les gliomes humains.

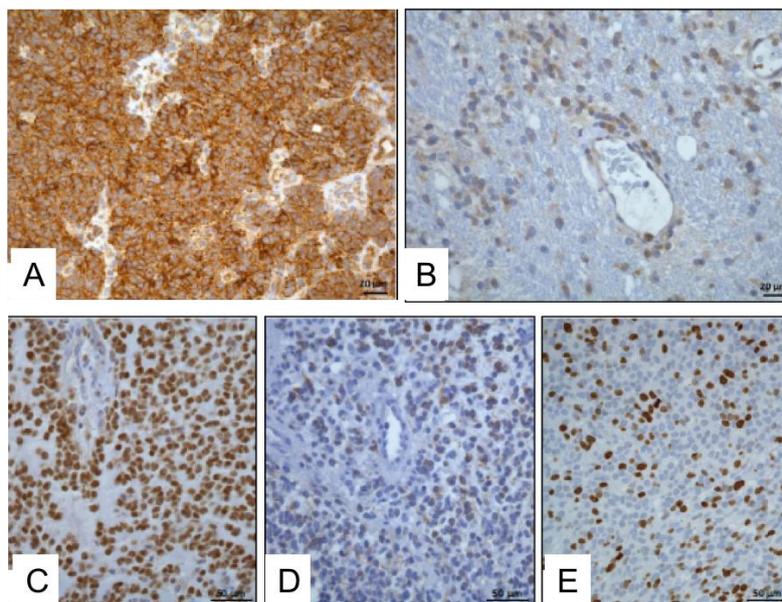


Figure 12 Exemple de résultats immunohistochimiques obtenus pour un GBM canin (Fernandez et al., 2016)

Certains évènements génétiques ont lieu de manière chronologique dans le développement tumoral, et sont d'ailleurs utilisés dans la nouvelle classification OMS 2016 pour aider dans le diagnostic des gliomes diffus : il s'agit de la mutation d'*IDH1* (événement précoce considéré comme une mutation « driver »), la codélétion 1p19q pour les oligodendrogliomes et la mutation d'*ATRx* pour les astrocytomes. La mutation d'*IDH1* et la codélétion 1p19q ont été recherchés dans les gliomes canins mais non retrouvés (Reitman et al. 2010 ; Thomas et al. 2009). Il se peut que la mutation d'*IDH1* concerne une autre région que celle affectée chez l'Homme (et donc testée chez le chien); d'autre part, il est également possible que des modifications portant sur un autre gène aient les mêmes conséquences que celles dues à la mutation d'*IDH1* (i.e. hyperméthylation d'un certain nombre de promoteurs). Ces différentes pistes sont en cours d'investigation. La présence d'une mutation du gène *ATRx* n'a quant à elle toujours pas été évaluée chez le chien.

(4) Arguments morphologiques

En ce qui concerne les caractéristiques anatomiques macroscopiques et microscopiques des gliomes, les similitudes sont nombreuses entre chien et Homme.

Les quelques données publiées sur l'aspect IRM des gliomes canins tendent à montrer un aspect similaire à celui rencontré chez l'Homme : il s'agit de masses hyperintenses en T2 et iso- à hypo-intense en T1, sans prise de contraste pour les bas-grades et une prise de contraste variable pour les haut-grades.(Wrensch et al. 1997 ; Lipsitz et al. 2003). La figure 13 met en parallèle deux coupes coronales pondérées en T1 après injection de gadolinium chez un patient humain atteint de GBM et un patient canin atteint de GBM. Dans les deux cas, la tumeur apparaît comme une volumineuse masse comprimant le ventricule latéral, avec une prise de contraste périphérique et un centre nécrotique.

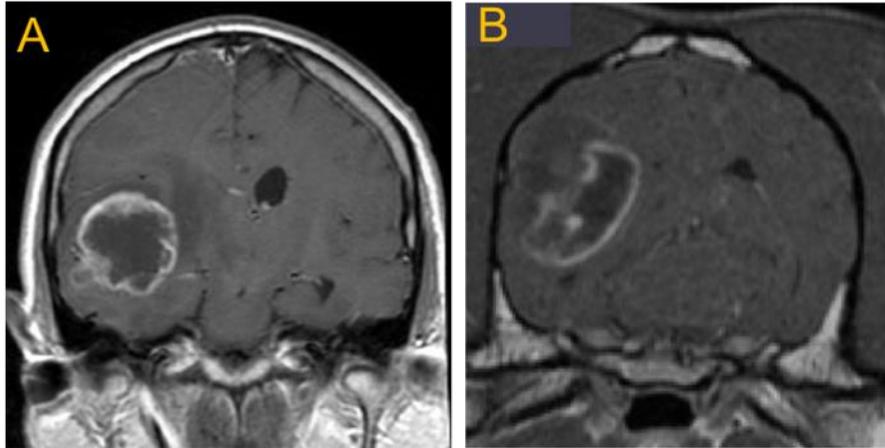


Figure 13 Coupes coronales issues d'une séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium chez un patient humain (A) et un patient canin (B) atteints de GBM temporal gauche. On note la même organisation avec un centre nécrotique, entouré d'une zone hyperintense. Images issues de : <http://neurowiki2014.wikidot.com/group:neurooncology> (image A) et <http://www.vetmed.vt.edu/clinical-trials/canine-glioma/brain-tumors-in-dogs.asp> (image B)

D'un point de vue histologique, les gliomes diffus canins présentent des caractéristiques morphologiques cellulaires, une infiltration péri-tumorale, des critères d'anaplasie (atypies cytonucléaires, index mitotique élevé, hyperplasie microvasculaire) et des critères pathognomoniques du GBM (capillaires « gloméruloïdes », foyers de nécrose entourés de pseudo-palissades) identiques à ceux des gliomes diffus humains. La classification OMS des tumeurs du SNC du chien n'ayant pas été mise à jour depuis 1999 (Koestner et al., 1999), les récentes publications vétérinaires sur les gliomes diffus ont utilisé la classification humaine pour leurs études (Higgins et al. 2010 ; York et al. 2012 ; Bentley et al. 2013 ; Fernández et al. 2016) montrant par là même que la similitude morphologique de ces tumeurs entre les deux espèces est telle qu'elle permet l'utilisation d'un unique schéma de classification.

Par ailleurs, des modifications de l'expression du gène *EGFR* (amplification d'*EGFR* et du chromosome orthologue de 7p) et des gènes codant d'autres récepteurs tyrosine kinase (surexpression de *PDGFR α* et *VEGFR*), ainsi que des altérations des voies de signalisation cellulaire p53/MDM2/p21, PI3K/Akt/mTOR et Rb1/p26 ont été observées dans les gliomes canins de manière similaire à ce qui est décrit chez l'Homme (Higgins et al. 2010 ; York et al. 2012 ; Stoica et al. 2004 ; Boudreau et al. 2015 ; Dickinson et al. 2008).

b) *Avantages du modèle canin par rapport au modèle murin*

Les modèles murins de gliomes diffus correspondent à des xénogreffes orthotopiques de lignées cellulaires tumorales humaines. Les deux inconvénients majeurs de ce modèle sont l'immunodépression des animaux utilisés et l'absence de diversité génétique des tumeurs induites. L'utilisation du modèle canin permet de pallier ces deux problèmes et ainsi d'obtenir des données pertinentes sur animaux immunocompétents présentant des tumeurs génétiquement variées.

En outre, la taille de l'encéphale des souris nécessite un matériel d'imagerie et de RT spécifiquement adaptés, ce qui rend difficile la transposition des résultats obtenus sur ce modèle directement à l'Homme. La grande taille de l'encéphale du chien permet au contraire de pouvoir utiliser exactement le même matériel d'imagerie (scanner IRM) et de RT qu'en médecine humaine (Bentley et al. 2016) et de pouvoir utiliser le chien malade comme substitut de la pathologie humaine dans les mêmes conditions de traitement et de suivi radiologique. Dans le cadre spécifique de la radio-oncologie comparative, le modèle canin semble particulièrement adapté car il présente une réponse clinique à la RT similaire à celle des patients (apparition de rechutes tumorales locales), des modalités de traitement proches (dose variant de 35 à 54.5 Gy délivrée en fractions de 2 Gy) et des facteurs de radiorésistance extrinsèque identiques (hypoxie tissulaire associée au grand volume tumoral) (Spugnini et al. 2000).

Même si le chien apparaît comme un modèle d'étude pertinent des gliomes, son utilisation en préclinique pour évaluer l'efficacité d'une nouvelle stratégie thérapeutique destinée à l'Homme ne pourra être envisageable qu'après validation de preuves de concept indispensables que sont (i) l'efficacité de cette nouvelle stratégie thérapeutique sur les cellules gliomateuses canines et (ii) l'homologie de réponse au traitement entre cellules gliomateuses humaines et canines. La validation de ces preuves de concept doit se faire *in vitro* sur un spectre de lignées cellulaires de gliomes canins suffisamment large pour assurer une représentativité adéquate de l'hétérogénéité génétique de ces tumeurs. Ces dernières permettront non seulement d'évaluer la réponse des tumeurs à la nouvelle stratégie testée, mais également de différencier les lignées sensibles des résistantes et d'identifier les facteurs moléculaires à l'origine de ce différentiel de réponse.

2. Les lignées cellulaires de gliomes canins comme modèle d'étude *in vitro*

Jusqu'à présent, quatre lignées cellulaires établies à partir de gliomes canins ont fait l'objet de plusieurs publications : les J3T, J3TBg, SDT3 et G06A (tableau 4). Une autre lignée de gliome canin a été établie à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes et a fait l'objet d'une thèse de doctorat vétérinaire (Dupont-Monod, 2014). Ces lignées cellulaires sont utilisées au sein des laboratoires qui les ont isolées et ne sont pas disponibles dans une banque de cellules. Seules les J3T ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique et génotypique. Le tableau 4 récapitule l'origine de ces lignées et les différentes analyses qui ont été réalisées dessus, en se concentrant sur les critères de caractérisation cellulaire.

Tableau 4 Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires.

		J3T	J3T-Bg	SDT-3	G06A	RAFFRAY
Tumeur d'origine						
		Astrocytome anaplasique d'un Boston Terrier mâle de 10 ans (Berens et al., 1993)	Lignée dérivée à partir des J3T après un passage sous-cutané sur souris Beige Nude XID (York et al. 2012)	GBM d'un Bouledogue anglais mâle de 12 ans (York et al. 2012)	GBM d'un berger australien, femelle stérilisée, de 2 ans (York et al. 2012)	Oligodendrogliome anaplasique d'un boxer de 7 ans (Dupont-Monod, 2014)
Caractérisation						
<i>(I) Méthodes pour démontrer l'identité d'une lignée cellulaire</i>	Empreinte ADN/ Profiling	-	-	-	-	-
	Analyse cytogénétique, caryotype	Nombre modal de chromosomes = 84 7 chromosomes métacentriques et submétacentriques + 1 petit chromosome acrocentrique non apparié	-	-	-	-
<i>(II) Méthodes pour mettre en évidence l'espèce d'origine de la lignée cellulaire</i>	-Analyse d'isoenzymes -Microsatellites -Caryotype	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine	-	-	-	-
<i>(III) Méthodes pour mettre en évidence les caractéristiques générales d'une lignée cellulaire</i>	Morphologie	Astrocytaire	-	-	-	-
	Temps de doublement	- 49 heures (Berens et al., 1993) - 28 heures (Rainov et al. 2000)	-	-	-	-
	Clonage sur plastique/En agar	-	-	-	-	-
	Profil d'expression de protéines	- 90 % des cellules sont fortement GFAP + - Quelques cellules sont très positives à EGFR, avec un pattern diffus	-	-	-	- Vimentine +++ - GFAP + et inconstant - Olig2 négatif - S100 négatif

		J3T	J3T-Bg	SDT-3	G06A	RAFFRAY
<i>(IV) Méthodes pour confirmer la tumorigénicité d'une lignée cellulaire</i>	Conservation du pattern histologique lors de transplantation sous-cutanée chez la souris	Même profil histologique mais devient faiblement GFAP + après transplantation	-	-	-	-
<i>(V) Méthodes pour déterminer le profil de sensibilité aux traitements d'une lignée cellulaire</i>	Evaluation de la chimiosensibilité	Hygromycine, puromycine, ganciclovir, G418 (Rainov et al. 2000)	Pt(iv)-prodrogue de cisplatine, cisplatine et carboplatine (Feldhaeusser, et al., 2015) CCNU, CPT-11 et TMZ (LeBlanc et al. 2016)	CCNU, CPT-11 (Boudreau et al. 2015)	CCNU, CPT-11 IL-13 canin couplé à une cytotoxine (Debinski et al. 2013)	Doxorubicine
	Evaluation de la radiosensibilité	-	-	-	-	-
Etude moléculaire						
		Pas de mutation des exons 3 à 9 sur <i>TP53</i> (York et al. 2012)				

La revue bibliographique sur les lignées cellulaires de gliome canin révèle que peu de données relatives à la caractérisation sont disponibles. Il sera donc nécessaire de pallier ce manque avant toute étude sur ces lignées cellulaires.

D'autre part, la réponse radio-induite de ces lignées n'a jamais été évaluée. Pourtant, dans la mesure où la RT est une modalité thérapeutique incontournable dans le traitement des gliomes et que les nouveaux traitements testés sont généralement associés à la RT, il semble indispensable d'évaluer l'homologie de réponse radio-induite entre gliomes canins et humains avant d'utiliser le chien comme modèle d'étude pour l'Homme. En effet, certaines nouvelles stratégies thérapeutiques qui sont actuellement développées visent à améliorer l'efficacité de l'effet cytotoxique de la RT. L'une de ces stratégies consiste à utiliser la virothérapie oncolytique de manière concomitante à la RT, ou seule lors de la rechute du patient (lors de récurrence locale post-RT).

Dans la partie qui suit, nous allons voir que, selon le résultat de nombreux essais cliniques, la virothérapie oncolytique permet de prolonger la vie des patients. Nous nous intéresserons plus particulièrement au virus de la myxomatose.

C. La virothérapie oncolytique

1. Définition

De nombreux cas de rémissions tumorales ont été observés au cours du XIX^{ème} et au début du XX^{ème} siècle lors d'infection ou de vaccination. Dock est l'un des premiers à rapporter des cas de rémissions transitoires de leucémies lors d'infections concomitantes chez ses patients. Avec la découverte des virus, de nombreux chercheurs ont fait le lien entre ces cas de rémission et d'infection par différents types viraux. En 1949, une étude note l'amélioration clinique d'un lymphome de Hodgkin (Hoster, Zanes, von Haam 1949). De même, en 1951, Bierman et son équipe relate des cas de rémission de leucémie chez des enfants lors d'infection par l'agent responsable de la varicelle, un herpèsvirus (Bierman 1951). Enfin pour dernier exemple, le virus de la rougeole, un paramyxovirus, est mis en cause dans l'amélioration clinique d'un enfant atteint d'un lymphome de Burkitt. En seulement deux semaines, l'infection virale a permis une réduction notable d'une masse rétro-orbitaire ainsi qu'une normalisation des paramètres hématologiques sur une période de 4 mois (Bluming, Ziegler 1971). Ces découvertes ont ainsi permis de focaliser l'attention des chercheurs sur les propriétés oncolytiques de certains virus. Les premiers essais cliniques de virothérapie ont débuté dès le milieu du XX^{ème} siècle avec l'utilisation de virus sauvages. Bien que certains cas de régressions tumorales aient été observés, les effets secondaires inhérents aux différents virus testés, ont été sévères. C'est pourquoi, des souches virales ont été atténuées et sélectionnées après de nombreux passages sur des cultures cellulaires (Kelly, Russel 2007). De plus, leurs génomes peuvent être modifiés dans le but de cibler particulièrement un certain type de cellules tumorales, de produire l'enzyme spécifique d'une prodrogue ou de rendre le virus plus immunogène : on parlera de virus armé.

Un virus oncolytique (VO) correspond donc d'une part, à un virus vivant modifié ou non, qui va spécifiquement cibler les cellules tumorales et entraîner leur mort directement ou indirectement, sans atteinte des cellules saines, et qui permet d'autre part, de réactiver le système immunitaire antitumoral.

2. Les virus oncolytiques possèdent ...

a) ... des voies d'entrée spécifiques

La délivrance des VO est majoritairement réalisée *in situ*, i.e. intra-tumoral directement. Dans le cadre d'essais cliniques avec le GBM, le dépôt de VO se fait en fin de chirurgie sur les marges saines. En effet, pour les tumeurs cérébrales, la voie intraveineuse présente des contraintes qui limitent le contact entre les cellules tumorales et les VO. Une fois dans le secteur sanguin, le VO peut être neutralisé par des anticorps circulants. Une partie des virions peut aussi être séquestrée au sein du foie ou de la rate. Enfin, la BHM représente une barrière que peu de virus peuvent franchir, dans des conditions naturelles. Cependant, certains gliomes de haut-grade tels que le GBM sont associés à des troubles vasculaires : le virus peut ainsi atteindre la tumeur par le secteur vasculaire (Russell, Peng, Bell 2012).

Chaque VO possède son propre mécanisme d'entrée spécifique. Les voies d'entrée dans la cellule tumorale reposent généralement sur la surexpression d'une protéine de surface. La voie d'entrée du poliovirus par exemple, repose sur la surexpression d'une protéine de surface : la protéine CD155. Cette protéine est présente à la surface de nombreuses cellules tumorales (Hogle 2002). L'adénovirus, quant à lui, passe dans la cellule par le récepteur CAR (Coxsackie et Adenovirus Récepteur), exprimé de façon variable selon le type tumoral.

De plus, l'entrée et la multiplication dans la cellule des principaux VO sont permises par la déficience des mécanismes de défense des cellules cancéreuses : de nombreuses cellules tumorales présentent des déficiences dans la voie de signalisation antivirale des interférons de type I (Stojdl et al. 2000). Les VO vont donc cibler les cellules tumorales, tout en épargnant les cellules saines, dans lesquelles ils ne pourront pas pénétrer, ou effectuer leur cycle lytique (Prestwich et al. 2008).

Les VO peuvent aussi être modifiés génétiquement afin d'améliorer leur sélectivité cellulaire. L'Herpès Simplex Virus de type 1 ou *Human Alphaherpesvirus 1*, (*HHV1*) est l'un des virus les plus couramment étudiés et modifiés. Certaines souches sont produites avec une délétion du gène ICP6, qui code pour une ribonucléotidase réductase. Cette délétion va permettre au virus de se multiplier dans les cellules qui possèdent une délétion du gène suppresseur de tumeur p16^{INK4A}, l'une des plus fréquentes au sein des cellules tumorales (Aghi et al. 2008).

Le tableau présenté ci-dessous récapitule les principales voies d'entrée pour chacun des principaux virus étudiés.

Tableau 5 Récapitulatif des voies d'entrées et des avantages présentés par les principaux virus oncolytiques (d'après Lawler et al., 2016)

Type viral	Hôte naturel	Voie d'entrée	Avantages
Adénovirus	Homme	CAR	Manipulation génétique possible – très étudié
HHV1	Homme	Fraction héparane-sulfate	Large génome - Manipulation génétique possible
Réovirus	Homme	Fixation sur carbohydrate et JAM-A	Faiblement pathogène et réplication sélective dans les cellules tumorales
Virus Newcastle	Volaille	Fusion enveloppe virale avec membrane cellulaire par liaison aux acides sialiques	Non-pathogène pour l'homme
Poliovirus	Homme	Fixation au récepteur CD155	Induit une réponse anti-tumorale puissante

b) ... des mécanismes oncolytiques direct et indirect

Suite à son entrée dans la cellule, le virus va ainsi pouvoir réaliser son cycle lytique. Le VO produit des effets oncolytiques directs et indirects représentés sur la figure 14. En effet, au sein de la cellule, le virus va dériver la machinerie cellulaire à son profit. De plus, ces cellules ont un métabolisme cellulaire élevé par rapport aux cellules normales, ce qui profite à la réplication virale. La lyse cellulaire peut s'expliquer par les propriétés lytiques propres du virus qui vont amener à la mort de son hôte, ou le virus peut exploiter l'ensemble des réserves cellulaires jusqu'à épuisement et mort de celle-ci. L'infection d'une cellule tumorale amène donc à la production de nombreux virions qui seront à leur tour capables d'infecter de nouvelles cellules tumorales : on a donc un phénomène d'auto-amplification qui présente l'un des atouts majeurs à la virothérapie oncolytique. Toutes les cellules tumorales n'ont pas besoin d'être infectées pour créer une lyse de l'ensemble des cellules tumorales.

L'induction de la mort cellulaire se fait selon trois voies principales qui ont un rôle important dans le pouvoir immunogène des VO. Ces trois voies de mort cellulaires sont l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. Ces deux dernières sont connues pour être

inflammatoires et immunogènes. Cependant, des études récentes ont par ailleurs montré que la mort cellulaire par apoptose, dans certaines conditions peut aussi être immunogène : on parle d'ICD (*Immunogenic Cell Death*). Les modifications cellulaires lors des différentes étapes de l'apoptose libèrent des molécules telles que la calréticuline ou des histones qui vont être captées par les cellules dendritiques, entraînant leur activation. Ainsi ces morts cellulaires vont libérer dans le milieu extracellulaire des nombreuses molécules immunogènes et inflammatoires qui vont stimuler le système immunitaire (Tesniere et al. 2008).

Indirectement, les VO peuvent aussi entraîner la mort des cellules tumorales. La libération de molécules inflammatoires et immunogènes consécutives à la lyse cellulaire peut engendrer des modifications dans le métabolisme et le fonctionnement des cellules présentes en périphérie. Par ailleurs, les VO peuvent aussi cibler les cellules endothéliales induites par la tumeur et causer ainsi une destruction de la vascularisation tumorale et une hypoxie tumorale. La destruction des cellules cancéreuses produisant le VEGF et l'EGFR a les mêmes effets (Breitbach et al. 2013).

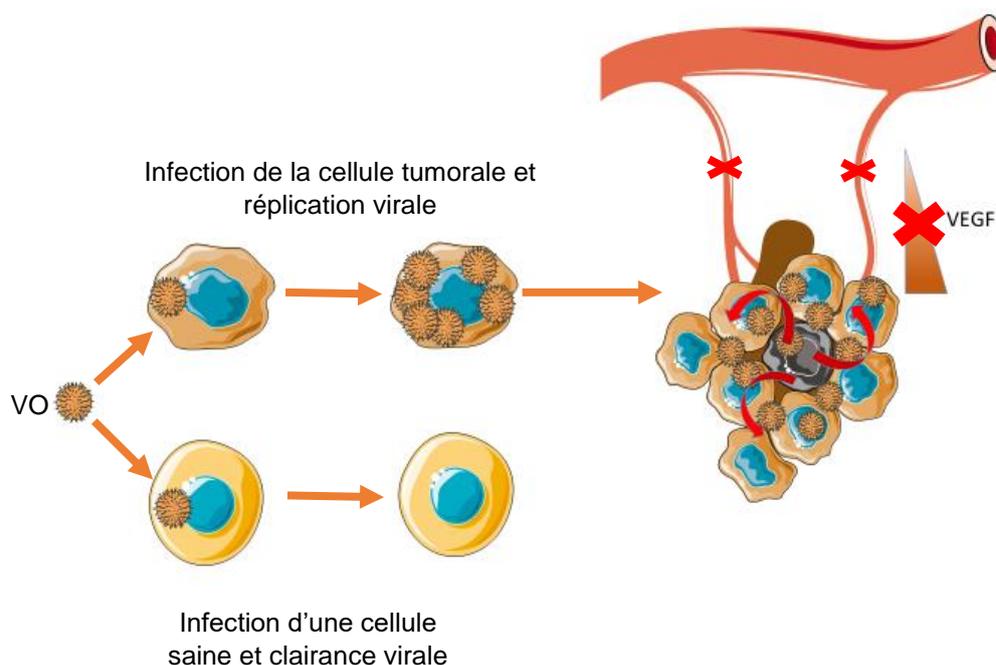


Figure 14 Représentation schématique de la dynamique d'infection virale d'un VO de cellules tumorales (d'après la thèse de JB Tanis, 2015) Le VO pénètre dans la cellule tumorale, se réplique, entraîne sa mort et infecte les cellules tumorales périphériques. Par ailleurs, le VO affecte la vascularisation tumorale en infectant les cellules endothéliales et en modifiant le gradient de VEGF.

c) ... la capacité de stimuler un système immunitaire immunodéprimé

L'oncolyse virale est connue pour stimuler le système immunitaire depuis plusieurs décennies. Dès 1967, une étude américaine a démontré cette capacité immunostimulatrice de l'immunité anti-tumorale par le virus Influenza (Lindenmann, Klein 1967). Le développement tumoral est permis par la mise en place d'un environnement péri-tumoral immunosuppresseur. En premier lieu, la croissance tumorale est un phénomène lent qui peut prendre de nombreuses années avant d'être détectable par le SI, similaire à une infection chronique. Ainsi, l'absence de phase aiguë lors du développement tumoral modifie la capacité du système à reconnaître la tumeur et à lutter contre celle-ci.

Le microenvironnement tumoral se compose de cellules immunitaires, de cellules tumorales, et de la matrice extracellulaire : celui-ci est sous l'influence des cellules cancéreuses qui créent un milieu « tolérant », permettant à la tumeur d'échapper au SI antitumoral. D'une part, le stroma tumoral limite une libération suffisante de TAA (*Tumour-Associated Antigens*) qui ne peuvent en conséquence être reconnus par les cellules dendritiques, cellules de front du système immunitaire dans le SNC (Zhang 2008). D'autre part, les cellules cancéreuses synthétisent des molécules qui impactent négativement le SI. Le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) est une molécule qui joue un rôle important dans le développement tumoral : elle permet la progression tumorale en ayant un rôle immunosuppresseur et elle limite aussi l'infiltration des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral. Elle inhibe le fonctionnement des lymphocytes T CD4+ et des cellules NK (Natural Killer) et favorise le développement des lymphocytes T régulateur (Treg). Ces Treg jouent un rôle important dans la régulation de la réponse du SI.

Le TGF- β et les Treg sont donc des cibles potentielles dans les traitements antitumoraux. Le blocage du TGF- β est associé à une diminution significative de la croissance tumorale. Le cyclophosphamide est une molécule qui peut être utilisée en association avec d'autres traitement antitumoraux, qui supprime l'action des Treg sur les autres cellules du SI (Le, Jaffee 2012; Yang, Pang, Moses 2010; Zou 2005).

Les VO sont des éléments qui sont naturellement reconnus par le système immunitaire, qui va s'activer afin de lutter contre leur présence dans le corps. Le site tumoral offre un milieu favorable à leur développement du fait de la tolérance locale du SI. La mort des cellules tumorales, suite à la réplication virale, libère dans le milieu

extracellulaire de nombreuses molécules inflammatoires et immunogènes qui sont des signaux de danger (figure 15) :

- DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) : ces molécules sont normalement exclusivement intracytoplasmiques ou intranucléaires. Leur présence dans le milieu extracellulaire traduit donc l'existence du phénomène lytique et donc d'un danger potentiel. Ces molécules sont libérées dans le milieu extérieur avec les 3 types de morts cellulaires. Parmi ces molécules, on retrouve l'ATP, l'acide urique, la calréticuline, l'HGMB1 (*High Mobility Group protein B1*) ou les protéines HSP (*Heat Shock Protein*). Ces protéines HSP 70 et HSP90 sont des protéines intéressantes car elles agissent comme des protéines chaperonnes et sont libérées lors du stress cellulaire. Ainsi, elles peuvent capter des antigènes tumoraux et les présenter aux cellules immunitaires.
- PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) : ces molécules correspondent à des fragments de protéines virales qui sont reconnues par le SI. Chaque VO libère donc des PAMP spécifiques, selon les protéines qui le composent.

- TAAs (*Tumor-Associated Antigens*) : ces molécules représentent une grande variété de protéines tumorales dont des protéines mutées, des protéines de fusion ou des protéines surexprimées par le tissu cancéreux. Certains TAA sont exprimés communément au sein de nombreux cancers tels que survivin, *tyrosinase-related protein 1* ou *B-cyclin 1*. D'autres TAA sont spécifiques d'un type de tumeur donné : les fragments du récepteur $\alpha 2$ de l'interleukine-13 sont spécifiques des gliomes (Zhang et al. 2007).

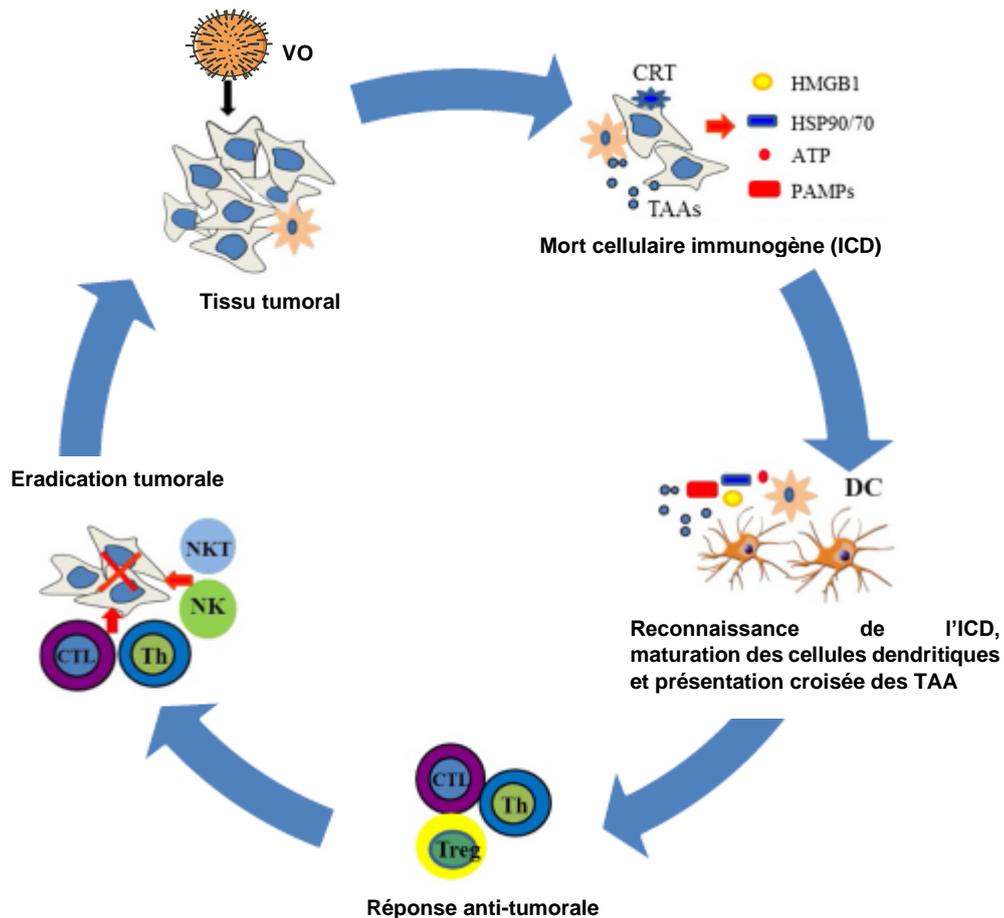


Figure 15 Rôle des VO dans la réactivation du SI. Le VO pénètre dans les cellules cancéreuses et entraîne leur lyse, libérant des DAMPs, PAMPs et TAAs. Ces molécules sont reconnues par le SI, qui reconnaît les antigènes tumoraux et met en place une réponse anti-tumorale (d'après Bartlett et al., 2013).

Cette propriété immunogène des VO peut être améliorée selon différentes voies. En effet, les VO peuvent être modifiés génétiquement afin d'améliorer la stimulation immunitaire. Le gène GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) a été introduit dans le génome de certains virus tels que l'Herpes Virus Simplex ou le virus de la vaccine. Ce gène code pour une cytokine pro-inflammatoire qui est immunostimulatrice. Il permet ainsi le recrutement de cellules NK et de lymphocytes T cytotoxiques antitumoraux. Le Pexa-Vec est un virus de la vaccine

modifié auquel le gène GM-CSF a été intégré, qui est actuellement dans un essai de phase 1b (Park et al. 2015). Un adénovirus a été modifié pour surexprimer la protéine HSP70, afin d'améliorer la présentation de TAA (Li et al. 2009). Des études se sont intéressées aussi à l'attaque d'une tumeur par l'association de deux VO qui utilisent des mécanismes viraux différents. La combinaison du VSV (Virus de la Stomatite Vésiculaire) et du VACV (Virus de la Vaccine) associe deux virus suffisamment génétiquement éloignés pour limiter les risques de recombinaison. L'activité anti-tumorale du VSV est alors améliorée grâce à l'activité de la protéine B18R du VACV (Le Boeuf et al. 2010 ; Lawler et al. 2016 ; Bartlett et al. 2013).

En dernier lieu, il existe des ligands synthétisés par les cellules tumorales qui sont présents dans le microenvironnement tumoral, appelés *checkpoint inhibitors*, tels que PD-1, PD-L1 et PD-L2. Ces ligands sont responsables de la déplétion en LT au niveau de la tumeur. La maturation des LT est stoppée à cause de l'action de ces molécules. Des études sont en cours afin de tester l'efficacité de la combinaison de *checkpoint stimulators* ou d'anticorps monoclonaux anti-*checkpoint inhibitors* avec les VO. Le Delta-24-RGDOX est un adénovirus génétiquement modifié qui exprime une molécule « checkpoint stimulatrice ». Ce VO modifié permet d'améliorer la réponse du SI (Lawler et al. 2016).

3. Trois exemples de virus utilisés en thérapie oncolytiques

a) *Human α Herpes Virus de type 1*

Le *Human α -Herpes Virus* de type 1 (HHV1) est un virus enveloppé, à ADN double brin, de la famille des *Herpesviridae*. Ce virus peut causer des infections aiguës généralement bénignes chez l'homme, telles que des stomatites, communément appelées « boutons de fièvre ». Ce virus entre aussi en latence et peut se réactiver plus tardivement au cours de la vie. On estime que 3.7 milliards de personnes de moins de 50 ans sont infectées dans le monde (OMS | *Le virus de l'herpès*, 2016). Ce virus possède un tropisme pour le SNC et peut rarement causer des encéphalites. Ce neurotropisme fait de ce virus un candidat VO intéressant pour les gliomes. Par ailleurs, la taille importante de son génome (>150kb) permet d'effectuer aisément des manipulations génétiques de l'HHV-1.

L'HHV-1 fut le premier VO génétiquement modifié (thymidine kinase négatif) en 1991, dans l'étude du gliome chez l'homme (Martuza et al., 1991). Ce VO est aussi le premier à obtenir l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) de la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis en 2015, pour le traitement des mélanomes inopérables et métastatiques. De surcroît, il a récemment obtenu son AMM dans l'Union Européenne en Février 2016. La souche virale utilisée est le « *talimogene laherparepvec* », et correspond à un HHV-1 dérivé d'une souche oncolytique atténuée (JS1) qui a subi des modifications génétiques :

- La perte de 2 gènes d'intérêts, ICP 34.5 et ICP 47 qui normalement bloquent la présentation des antigènes viraux à la surface des cellules infectées, et permettent l'échappement au système immunitaire. La perte de ces gènes augmente ainsi l'immunogénicité de l'HHV-1.
- L'ajout du gène GM-CSF qui est une CK pro-inflammatoire et immunostimulatrice.

L'injection intratumorale de cet HHV-1 a permis d'augmenter de manière significative un taux de réponse durable (supérieur à 6 mois) par rapport au contrôle, (injection sous-cutanée de GM-CSF) : 16.3% vs 2.1% (Andtbacka et al. 2015). Par ailleurs, des régressions tumorales au niveau des métastases sont observées sans injection intra-métastatique du VO ce qui traduit la mise en place d'une immunité anti-tumorale systémique.

b) Adénovirus

Les adénovirus (Ad) sont des virus à ADN double brin, non enveloppés, fortement immunogéniques, responsables de signes respiratoires modérés chez l'homme. Ils sont responsables d'ECP sur les cellules épithéliales, en reconnaissant le récepteur CAR. Du fait de leur forte infectiosité et de leur pouvoir lytique, les Ad ont été modifiés afin de pouvoir pénétrer dans les cellules tumorales, y compris les gliomes. L'Adénovirus de sérotype-5 (Ad5) est le plus couramment utilisé en tant que VO, après modifications génétiques. Les gènes E1 sont primordiaux pour la réplication virale : E1A se fixe sur Rb et induit l'entrée de la cellule dans la phase S du cycle cellulaire, tandis qu'E1B se fixe que la protéine p53, diminuant ainsi les signaux pro-apoptotiques et favorisant la réplication virale. Les Ad5 présentant des anomalies sur ces gènes ne pourront donc pas se répliquer au sein de cellules saines.

L'ONYX-015 est un Ad5 avec une délétion du gène E1B. Il correspond au premier Ad modifié qui a été testé dans les tumeurs de la tête et du cou. D'après une étude clinique de phase 1 de Chiocca en 2004, l'injection intratumorale du VO n'a pas montré d'effets toxiques chez les patients. Cependant, elle n'a pas mis en évidence d'efficacité anti-tumorale nette (Chiocca et al. 2004).

L'Ad- Δ 24 correspond à un Ad5 qui a subi une perte de 24pb sur le gène E1A. Le pouvoir oncolytique de ce vecteur est plus important que l'ONYX-015 et il semble plus efficace pour limiter la croissance tumorale (Jiang et al. 2005). Ce VO a par la suite servi de référence pour fabriquer d'autres vecteurs viraux par transgénèse ou en modifiant le motif RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) de ce virus afin d'améliorer sa sélectivité tumorale, ainsi que son potentiel immunostimulateur. Le motif RGD permet au virus, secondairement à la liaison au récepteur CAR, la fixation aux intégrines présentées par la cellule. Cependant, peu de tumeurs dont les gliomes, expriment ces récepteurs CAR ; l'expression des intégrines par les cellules tumorales est quant à elle élevée. Ainsi, le peptide RGD a été intégré dans la protéine virale reconnaissant les récepteurs CAR permettant une réorientation du VO vers les cellules tumorales. L'Ad- Δ 24-RGD est alors capable d'infecter et de lyser de nombreux types de tumeurs dont les gliomes. Une étude de 2007, montre que ce VO est capable d'infecter les CSC, issues de GBM récurrents *in vitro* et cause leur apoptose (Jiang et al. 2007).

Enfin, l'Adénovirus a aussi subi une modification génétique où l'expression du gène E1B est sous le contrôle d'un promoteur qui a été intégré dans son génome, celui du gène *survivin*. Ce gène, aussi appelé BIRC5, est normalement exprimé durant une courte période, lors du développement embryonnaire et n'est plus exprimé au cours de la vie adulte. Ce gène a un rôle anti-apoptotique. Lors de l'oncogenèse, la protéine survivin est de nouveau produite, par de nombreux cancers. Une méta-analyse publiée en 2014 a montré que la surexpression de ce gène au sein des gliomes est associée à un facteur pronostic négatif, et est plus fréquemment présent au sein des gliomes de haut grade. L'Ad-survivin est un VO dont le cycle de réplication ne peut se faire que dans les cellules exprimant fortement *survivin*, ce qui permet de cibler spécifiquement les cellules tumorales (Lv et al. 2015).

Ainsi, les deux virus présentés ci-dessus sont des VO qui présentent des propriétés intéressantes dans le cadre de la virothérapie. Cependant, des modifications génomiques sont nécessaires afin d'améliorer le pouvoir oncolytique et la spécificité de ces VO envers les cellules tumorales. Le virus suivant est utilisé en virothérapie oncolytique sans modification génétique.

c) *Virus de la maladie de Newcastle*

Le virus de la maladie de Newcastle (NDV) est un virus enveloppé à ARN simple brin négatif, qui est pathogène pour la volaille. Sa pathogénicité est considérée comme nulle pour l'homme. Ce virus possède trois types de souches : les souches vélogènes sont hautement pathogènes pour la volaille et sont responsables d'une mortalité de 100% dans les élevages touchés. Les symptômes sont similaires à ceux de l'Influenza Aviaire Hautement Pathogène (IAHP) et correspondent à des troubles respiratoires et systémiques. Les souches mésogènes sont faiblement pathogènes, tandis que les souches lentogènes sont non pathogènes pour la volaille. Ces dernières sont utilisées comme souches vaccinales pour immuniser la volaille.

Les souches mésogènes (73-T, MTH68, PV701) présentent des propriétés oncolytiques intéressantes, testées dans des essais cliniques de phase I sur différentes tumeurs solides (Pecora 2002, p. 701). Le NDV induit l'apoptose dans les cellules infectées et stimule la production de TNF- α par les cellules du SI (Lorence,

Rood, Kelley 1988). Les souches lentogènes ne sont pas pathogènes pour la volaille, mais présentent des propriétés oncolytiques (Schirmacher et al. 2001). HUU, une souche lentogène du NDV (NDV-HUU) a été sélectionnée pour ses propriétés oncolytiques sur différentes lignées tumorales de l'homme. Un essai clinique de phase I/II du NDV-HUU sur des GBM récurrents a présenté des résultats intéressants.

Effectivement, l'administration intraveineuse de ce VO a présenté peu d'effets secondaires, y compris aux

doses les plus élevées (11×10^9 Unités infectieuses). De plus, un patient a montré une rémission complète du GBM durant un minimum de 35 semaines après l'initiation de la virothérapie, confirmée par les images IRM présentée sur la figure 16 ci-contre.

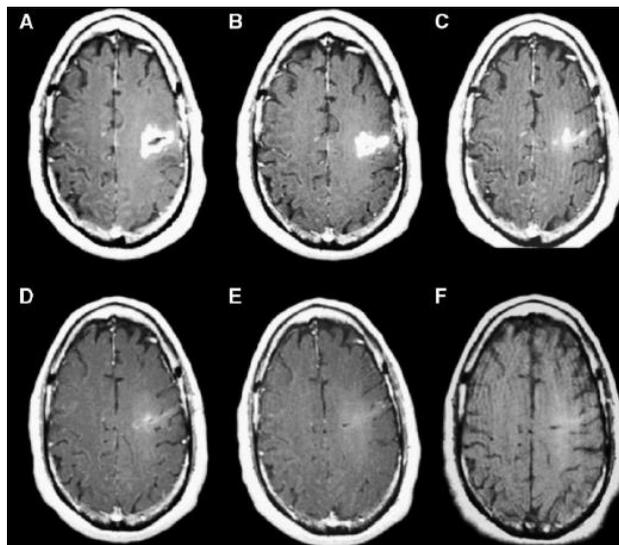


Figure 16 Images IRM en T1 avec PDC. (A) IRM avant traitement (B) Stabilisation de la maladie au premier contrôle (C-D) Réponse partielle à 15 et 20 semaines (E-F) Réponse complète à 25 et 30 semaines, d'après Schirmacher et al. 2001

Le NDV apporte des avantages dans la virothérapie oncolytique, par sa sécurité d'emploi d'une part mais aussi avec ses propriétés oncolytiques d'autre part. Le virus myxomateux que nous allons étudier par la suite présente des similarités intéressantes, qui en font un candidat intéressant pour une prise en charge thérapeutique innovante.

4. Le virus myxomateux : vers une thérapie innovante

a) Description du virus myxomateux

Le virus myxomateux (MYXV) est un virus de la famille des *Poxviridae* (POXV) auxquels appartiennent aussi pour exemple, le virus du *Molluscum contagiosum*, ou le virus de la vaccine. Le virus de la variole, responsable de la maladie éponyme mortelle éradiquée en 1977, est aussi apparenté à cette famille virale. Les *Poxviridae* se subdivisent en deux-sous familles : les *Chordopoxvirinae* et les *Entomopoxvirinae* qui infectent respectivement les vertébrés et les invertébrés. La sous-famille des

Chordopoxvirinae regroupe 10 genres les *Orthopoxvirus* où l'on retrouve le virus de la variole et le virus de la vaccine (VACV) et les *Leporipoxvirus* auquel appartient le MYXV. Le VACV est le virus modèle de cette famille et la description des *Poxviridae* se basera sur celle de cette entité virale. Le spectre d'hôte correspond en général pour chaque virus à une espèce animale spécifique (Moss et al., 2007).

(1) Morphologie générale

Les POXV sont des virus de grande taille (~360*270*250 nm), ovoïde et ont une organisation complexe. On peut distinguer plusieurs structures, mises en évidence sur la figure 17 ci-contre :

- Le core est une coque épaisse contenant la nucléoprotéine *i.e.* le matériel génétique viral et les enzymes primordiales à l'initiation de la réplication
- Les corps latéraux sont situés dans les concavités du core
- La membrane externe est composée une ou deux enveloppes lipidiques selon la forme infectieuse produite par le POXV.

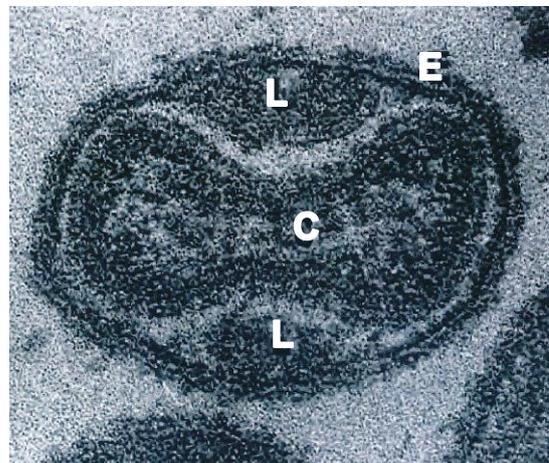


Figure 17 Image par microscopie électronique d'une fine section intracellulaire de VACV d'un virion mature (MV) montrant le core (C), les corps latéraux (L) et la membrane externe (E) (d'après Moss et al., 2007)

Les POXV présentent deux formes infectieuses enveloppées, la forme MV (*intracellular mature virion*) et la forme EV (*extracellular envelopped virion*). La forme EV correspond à une MV entourée d'une enveloppe supplémentaire. Les virions EV sont essentiels pour la transmission de cellule à cellule et la dissémination dans l'hôte, tandis que les MV permettent la transmission du virus d'un hôte à l'autre, selon diverses modalités (Roberts, Smith 2008).

(2) Génome du MYXV

Le MYXV possède un ADN linéaire bicaténaire typique des poxvirus (figure 18) de 161.8 kb (la taille de l'ADN des POXV varie de 140 kb à 300 kb), dont les extrémités sont constituées de régions répétées inversées terminales (TIR) d'environ 11 kb, formant une boucle terminale. Il code pour 158 ORF (*Open Reading Frame*) uniques et 12 ORF en double copies (Bertagnoli et al., 2015).

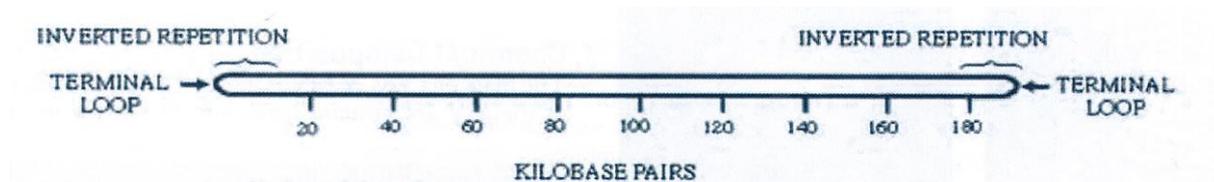


Figure 18 Représentation schématique du génome caractéristique des poxvirus (ici exemple du VACV) (d'après Moss et al., 2007)

(3) Cycle viral

L'entrée dans la cellule cible se fait par fusion directe ou par endocytose/macropinocytose (Roberts, Smith 2008). Deux protéines virales, M062 et M063 s'associent et forment un complexe protéique. Lors de l'infection, ce complexe s'associe à la protéine SAMD9 (*Sterile Alpha Motif Domain containing 9 protein*), facteur antiviral inné, l'inhibe et rend par conséquent, la cellule tolérante à l'infection (Liu et al. 2011). Dès son entrée dans la cellule et avant sa décapsidation, des enzymes virales et des protéines virales sont libérées dans le cytoplasme. Des ARNm précoces sont traduits et permettent la synthèse d'ADN polymérase, d'ARN polymérase et de facteurs de transcription intermédiaires. Parmi les protéines virales libérées, la protéine virale MT5, joue un rôle central dans l'infection. En effet, les virus délétés pour la protéine MT5 ne sont pas capables de réaliser un cycle viral complet en lymphocytes de lapin, les cellules entrent rapidement en apoptose après la pénétration du MYXV. MT5 est donc un facteur de virulence majeur du MYXV anti-apoptotique, permettant la mise en place d'un cycle viral durable (Mossman et al. 1996).

La morphogenèse se situe en périphérie du noyau dans les « *virus factory* » appelées virosomes, où a lieu la réplication de l'ADN, la transcription des gènes intermédiaires et tardifs. Les gènes intermédiaires codent pour les facteurs de transcription des gènes tardifs. Ces gènes tardifs codent pour les protéines structurales, les enzymes, les facteurs de transcription précoces nécessaires à l'initiation des futures infections cellulaires. L'assemblage des virions se fait au sein du virosome et donne des MV simplement enveloppés. Une partie de ces MV est ensuite enveloppée par une double membrane par l'appareil de Golgi, formant des WV (*Wrapped Virions*), et sont acheminés vers la membrane cellulaire par les microtubules. La fusion des WV avec la membrane plasmique libère dans le milieu extérieur les EV. La transmission efficace du MYXV de cellule à cellule repose sur la capacité de celui-ci à induire des microvillosités d'actines (Figure 19). Sans ces filaments d'actines, seules des petites plaques de lyse cellulaire se forment sur le tapis cellulaire *in vitro*. Le cycle viral du MYXV est schématisé sur la figure 20.

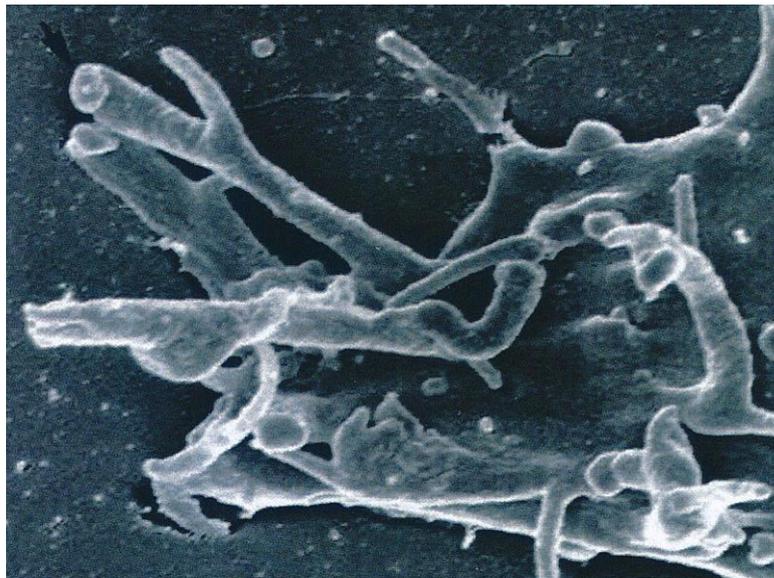


Figure 19 Microscopie électronique à balayage des microvillosités d'actines viro-induites par le VACV. La flèche montre un EV au sommet d'une microvillosité (Moss et al., 2007)

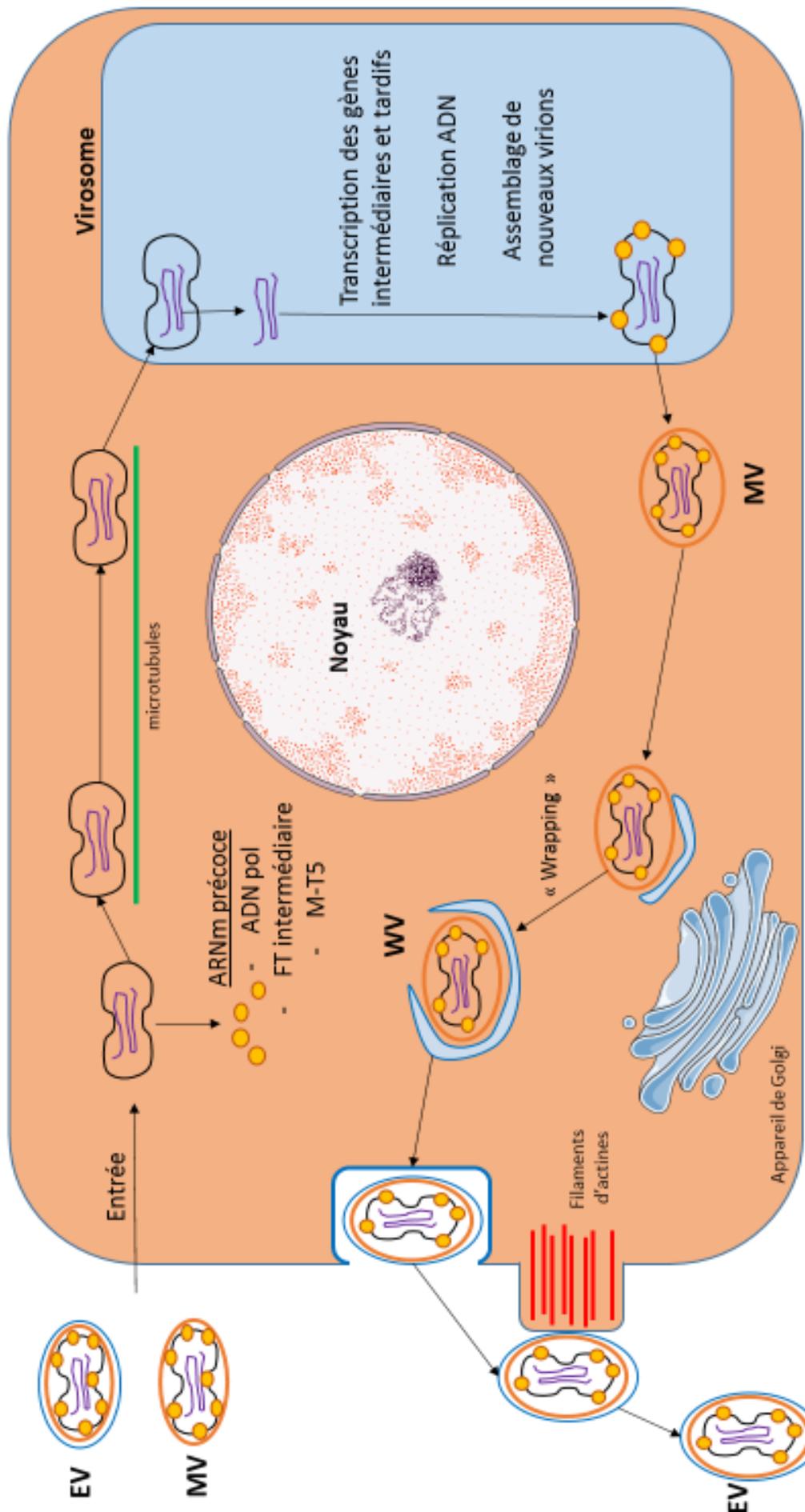


Figure 20 Cycle de réplication du MYXV (d'après Moss et al, 2007). Suite à l'entrée du l'EV ou MV par fusion avec la membrane cellulaire, des ARNm précoces sont libérés dans le cytoplasme et sont traduits en ADN polymérase et en virokinase permettant l'échappement au SI. Le core est transporté dans le virosome, où l'ADN est répliqué et les gènes intermédiaires et tardifs sont transcrits. Le virion est assemblé dans le virosome et donne la forme MV qui peut être enveloppée par une membrane bicouche de l'appareil de Golgi. La sortie dans le milieu extérieur est permise par fusion et la transmission de cellule à cellule est favorisée par la mise en place de microvillosités d'actines viro-induites.

Lors de son cycle cellulaire, le MYXV synthétise de nombreuses protéines qui permettent l'échappement au système immunitaire. Parmi ces protéines, il produit des « virokines » : ce sont des chémokines qui vont interagir avec les défenses de l'hôte en bloquant des molécules immunostimulatrices telles que le TNF. Par exemple, Serp1 est une virokine qui altère la réponse inflammatoire durant l'infection et MGF (*Myxoma Growth Factor*) (Opgenorth et al, 1992) promeut la division des cellules infectées et non-infectées, formant un milieu favorable à la diffusion du virus (Barrett et McFadden, 2007).

b) *La myxomatose*

La myxomatose est une maladie virulente et contagieuse, à transmission essentiellement vectorielle pour sa forme classique, par des arthropodes piqueurs et des puces, qui touche le lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*. Elle a été décrite pour la première fois en 1898 en Uruguay sur des lapins de laboratoire par Giuseppe Sanarelli (Sanarelli, 1898). Le MYXV est l'agent étiologique en cause, dont l'hôte naturel est le tapeti, lapin sauvage d'Amérique du Sud, *Sylvilagus brasiliensis*, chez qui il peut causer des fibromes bénins. Il existe deux types de souches de MYXV : les souches sud-américaines et les souches Californiennes, qui semblent plus létales pour le lapin d'Europe (Barrett et McFadden, 2007). Le MYXV est le premier agent viral à avoir été utilisé pour éradiquer un nuisible vertébré, le lapin d'Europe en Australie en 1950. En effet, le lapin d'Europe a été introduit en 1859 et s'est rapidement étendu à l'ensemble du territoire australien, causant des pertes agricoles massives et des dégâts écologiques et économiques considérables (Williams et al. 1995). En 1952, le MYXV a été introduit volontairement en France par un propriétaire terrien. Rapidement, la maladie s'est étendue à toute l'Europe. A l'heure actuelle, la maladie est enzootique en Europe, avec des pics épizootiques saisonniers, concomitant avec les pics de populations des arthropodes piqueurs. La myxomatose est l'une des principales causes de décès du lapin sauvage et est responsable de la diminution de leur population depuis de nombreuses années (Bertagnoli et al., 2015).

La maladie peut prendre deux formes : une forme nodulaire et une forme dite « amygomateuse ». La forme nodulaire classique est une maladie pouvant atteindre 100% de mortalité chez le lapin européen. Elle se traduit par l'apparition d'un myxome au point d'inoculation qui devient protubérant et ulcéré. Un œdème anogénital et une blépharo-conjonctivite aiguë et sévère se mettent en place rapidement et des myxomes



Figure 21 Lapin domestique atteint par la souche Toulouse 1 (grade1) 10 jours post-inoculation. On peut noter la conjonctivite sévère, l'œdème de la face et les myxomes secondaires localisés sur la face et les oreilles (d'après Bertagnoli et al., 2015)

secondaires apparaissent à partir du sixième ou du septième jour (figure 21). Parallèlement, une immunodépression sévère se met en place, responsable d'infections bactériennes secondaires du tractus respiratoire et des conjonctives, particulièrement à *Pasteurella multocida* et *Bordetella bronchiseptica*. En effet, lors de l'inoculation, le MYXV infecte les cellules dendritiques présentes dans le derme. Ces cellules vont migrer dans les nœuds lymphatiques où le virus va infecter de façon massive les lymphocytes T CD4+ et entraîner une chute drastique de cette population cellulaire. Ces surinfections bactériennes contribuent fortement à la forte létalité de la maladie et la mort survient entre 8 et 15 jours post-inoculation pour les grades les plus sévères (Stanford, Werden, McFadden 2007). La forme nodulaire se classe en cinq grades de virulence selon le taux de létalité et le temps moyen de survie (tableau 6). Cette gradation s'explique par l'atténuation de la létalité virale et la sélection de lapin résistants au MYXV. Suite aux épizooties massives en Australie et en Europe dans les années 1950, la fréquence des grades hautement pathogènes a diminué tandis qu'à l'inverse, celle des grades faiblement pathogènes a augmenté (Kerr 2012).

Tableau 6 Gradation de la virulence du MYXV (d'après Bertagnoli, 2015)

Grade de virulence	Taux de létalité (%)	Temps moyen de survie (jours)
I	> 99	< 13
II	95+99	14-16
IIIa	90-95	17-22
IIIb	70-90	23-28
IV	50-70	29-50
V	< 50	-

La forme amyxomateuse est responsable de signes respiratoires principalement avec une atteinte cervico-faciale : œdème de la face, rhinite, blépharo-conjonctivite. Cette forme serait une adaptation du virus à la transmission directe en l'absence de vecteurs ; elle touche principalement les lapins de production. Il semblerait que la virulence de la maladie soit inhérente à la présence de bactéries pathogènes telles que *Pasteurella multocida* (Marlier et al. 2000).

c) *Le MYXV, un virus oncolytique*

Plusieurs exemples de VO ont été décrits précédemment avec leurs avantages mais aussi leurs inconvénients. Pour rappel, le « virus oncolytique idéal » serait un virus hautement sélectif pour les cellules tumorales, incapable de développer une infection dans les tissus sains, dont l'ADN peut être manipulé par génie génétique. Le MYXV semble répondre à nombre de ces critères, que nous allons démontrer par la suite.

(1) *Un virus au spectre d'hôte limité aux léporidés...*

Le spectre d'hôte du MYXV est étroit et est limité aux léporidés : il est non-pathogène pour les autres espèces, y compris pour l'homme. En effet, dans les années 50 en Australie, des volontaires se sont fait injecter le virus myxomateux et aucune répllication virale, ni aucun signe de maladie n'ont été observés (Burnet, 1968). De plus, lors d'une épidémie de myxomatose en Californie en 1963, une étude menée par Jackson a conclu que l'homme ne pouvait pas être infecté par ce virus du fait de l'absence de séroconversion vis-à-vis du MYXV (Jackson et al., 1966). Les mécanismes précis de cette spécificité d'hôte ne sont pas encore clairement connus. Lorsque le virus MYXV pénètre dans une cellule, autre que celle d'un léporidé, il déclenche la cascade de signalisation Erk1/2-IFN-STAT1, responsable de l'inhibition de la répllication virale. En effet, des souris mutantes, déficientes en STAT1, peuvent être alors infectées par le MYXV (Wang et al. 2004). Chez l'homme, une autre étude de Wang publiée en 2008, montrait que l'inhibition de l'infection par le MYXV *in vitro* de fibroblastes humains était sous l'influence conjointe de l'IFN1 mais aussi du TNF- α (Wang et al. 2008).

(2) ... capable d'infecter les cellules tumorales

Cependant, en 2004, il a été démontré que le MYXV est capable d'infecter productivement et de lyser une majorité de lignées tumorales humaines (Sypula, 2004). La protéine MT5, facteur de virulence décrit précédemment qui joue un rôle anti-apoptotique semble alors déterminante, en particulier par sa liaison avec la protéine Akt.

Akt est une kinase qui entre dans la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) et une fois phosphorylée, elle stimule la prolifération, la croissance et la survie cellulaire. Ainsi, la dérégulation de cette voie de signalisation amplifie les processus oncogéniques en cours. Or, la concentration d'Akt phosphorylée au sein des cellules tumorales est anormalement élevée, gliome compris. La protéine MT5, après l'entrée du MYXV dans une cellule tumorale, se fixe sur l'Akt et entraîne sa phosphorylation ce qui limite l'apoptose cellulaire viro-induite (Werden, McFadden 2008, 2010), et détermine en partie la permissivité cellulaire.

En 2005, une étude préclinique réalisée par Lun a montré que l'infection *in vitro* de la plupart des gliomes est efficace et est lytique. Par ailleurs, l'injection intracérébrale du MYXV est bien tolérée par les rongeurs sans effets secondaires majeurs. Le traitement, par injection intratumorale de MYXV, de xénogreffes de gliomes humains sur rongeurs immunodéprimés montre une diminution nette de la masse tumorale et une survie prolongée pour le groupe traité par rapport au groupe contrôle. De plus, une persistance du virus est objectivée au sein des cellules tumorales jusqu'à 42 jours après l'inoculation. Cependant, l'une des limites majeures imputable à cette étude est l'utilisation d'un modèle immunodéprimé qui supprime les interactions du SI inné et acquis avec l'infection par le MYXV (Lun 2005).

(3) Limites actuelles et amélioration du potentiel oncolytique

Par ailleurs, une étude plus récente de Lun, publiée en 2010 a montré que l'utilisation seule du MYXV sur des souris immunocompétentes était insuffisante car le SI éliminait le virus en produisant de l'IFN de type I. La rapamycine est un médicament immunosuppresseur qui inhibe la protéine mTOR. L'utilisation conjointe de la

rapamycine permet de favoriser l'infection des cellules par le MYXV en activant Akt et l'effet antiprolifératif diminue la réponse du SI (Lun et al. 2010).

De plus, cette étude évalue la CED (Convection-Enhanced Delivery) pour augmenter la délivrance du MYXV au sein de la tumeur (Dickinson et al. 2010). Cette technique permet d'injecter sous pression positive un fluide dans la zone tumorale et péri-tumorale (figure 22). Par rapport à l'injection intratumorale de MYXV, l'administration de MYXV par CED, en association avec la rapamycine, augmente la médiane de survie de souris immunocompétentes : 42 jours avec CED vs 28 jours lors d'injection intratumorale.

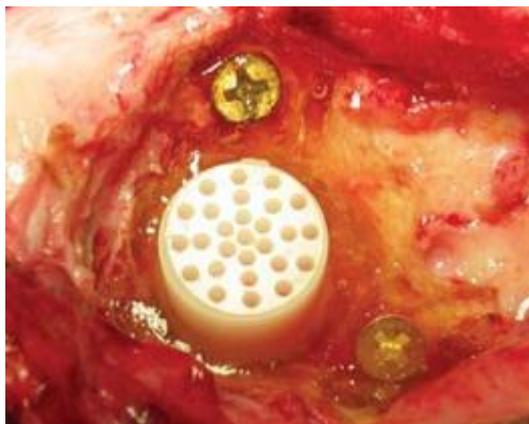


Figure 22 Dispositif CED implanté chirurgicalement (d'après Dickinson, 2010)

La délivrance du virus peut être améliorée par une technique différente qui repose sur l'utilisation de cellules souches dérivées d'adipocytes (ADSC). Ces cellules ont la particularité d'avoir un tropisme pour les cellules tumorales et migrent vers celles-ci. De plus, elles peuvent être infectées par le MYXV sans être lysées. Ces cellules permettent ainsi de transporter le MYXV et de le délivrer au GBM, qui peut alors infecter et détruire les cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Josiah et al. 2010).

Enfin, bien que les cellules NK soient des cellules efficaces contre les cellules tumorales, l'environnement tumoral inhibe leur activité. De plus, les gliomes malins surexpriment à leur surface la molécule CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type 1 qui inhibent les cellules NK. L'infection par le MYXV des cellules tumorales améliore l'efficacité anti-tumorale de ces cellules du SI inné, par l'intermédiaire de la protéine virale M153R qui diminue l'expression de CMH de type 1 et lève ainsi l'inhibition initiale. Cette étude ouvre la voie à un essai clinique associant le MYXV et des cellules NK dans la lutte contre les gliomes (Ogbomo et al. 2013)

II. Etude expérimentale

Les gliomes diffus sont des tumeurs qui présentent le plus faible taux de guérison malgré un traitement multimodal associant chirurgie, RT et chimiothérapie. Plusieurs axes de recherche sont donc aujourd'hui consacrés au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à améliorer le pronostic associé à ces tumeurs. Parmi celles-ci, l'utilisation de VO qui ciblent et détruisent spécifiquement les cellules cancéreuses, seuls ou en association à la RT pour obtenir un effet antitumoral synergique, apparaît comme une option prometteuse.

Lors de l'évaluation préclinique de thérapies innovantes destinées au traitement des gliomes diffus, la capacité des modèles animaux utilisés à reproduire la pathologie humaine revêt un caractère fondamental. Le chien semble être un modèle d'étude pertinent et complémentaire au modèle murin actuellement utilisé. En effet, nous avons démontré au cours de la partie bibliographique, que les tumeurs du chien présentent de nombreuses similarités avec celles de l'Homme.

L'utilisation du chien pour évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement destiné à l'Homme nécessite la validation de preuves de concept que sont (i) l'efficacité de ce nouveau traitement sur les cellules gliomateuses canines et (ii) l'homologie de réponse au traitement et de mécanismes moléculaires sous-jacents entre cellules gliomateuses humaines et canines. La validation de ces preuves de concept doit se faire *in vitro* sur un large spectre de lignées cellulaires de gliomes diffus canins. Ces lignées cellulaires sont généralement obtenues à partir d'une pièce d'exérèse trypsinée puis mise en suspension dans un milieu composé de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2mM de L-glutamine et 1M de pénicilline-streptomycine (Mullins et al. 2013).

La caractérisation de ces différentes lignées est primordiale à effectuer. Différentes étapes sont ainsi nécessaires à la caractérisation complète de cellules tumorales, détaillées dans le livre *Cancer Cell Culture* (Langdon 2004). Ainsi, les caractéristiques des cellules tumorales qui sont recherchées sont les suivantes :

(i) caractérisation phénotypique : morphologie des cellules tumorales, temps de doublement, capacité à former des clones (test de clonalité, expression des marqueurs moléculaires, vérification de l'espèce d'origine des cellules)

(ii) caractérisation génotypique : réalisation d'un caryotype par exemple

(iii) évaluation de la tumorigénicité des lignées cellulaires

Bien que les gliomes diffus présentent des propriétés de radiorésistance responsables de récurrences locales dans les champs irradiés, la RT est utilisée de manière systématique pour le traitement de ces tumeurs car elle prolonge significativement la survie des patients. Les traitements innovants actuellement en cours d'élaboration seront destinés soit à être administrés en association à la RT (si traitement de première intention), soit à être administrés dans les mois qui suivent la fin de la RT (si traitement à la rechute). Dans un cas comme dans l'autre, le modèle animal sur lequel sera testé le nouveau traitement devra suivre un protocole thérapeutique similaire au patient humain, et donc subir des séances de RT. Ainsi, dans le cas d'une étude préclinique sur le chien, il est primordial de vérifier dans un premier temps que celui-ci constitue effectivement un bon modèle en radio-oncologie comparative. Pour cela, la réponse radio-induite des gliomes diffus canins doit être évaluée *in vitro* sur lignées cellulaires.

Cette évaluation repose sur :

- la réalisation de tests de clonogénie. Cette étude fournit différentes données telles que la Mean Inactivation Dose (MID). Cette mesure fournit une évaluation de la radiorésistance des cellules aux RI : elle correspond à la dose de RI nécessaires pour tuer la moitié de la population, et s'exprime en Gray. Les MID présentes dans la littérature pour les GBM humains varient de 1.6 à 4.6 Gy (Fertil et al. 1984 ; Malaise et al., 1986 ; Taghian et al., 1992).
- la recherche de marqueurs impliqués dans la radiorésistance tels que la survivine, HIF, CD133. CD133 est un marqueur de CSC et la présence de ces cellules est l'une des principales causes de résistance et de rechute des GBM. La capacité à entrer en quiescence et un nombre important d'enzymes réparant les dommages causés à l'ADN sont d'autres éléments pouvant expliquer les propriétés de radiorésistance des CSC au sein des GBM (Rycaj, Tang 2014).

Ainsi, au cours de cette thèse vétérinaire, j'ai effectué une caractérisation de 5 lignées cellulaires de gliomes canins (J3T, J3T-Bg, G06A, SDT3, RAFFRAY), étudié la radiosensibilité de celles-ci et évalué la thérapie oncolytique par le MYXV SG33.

A. Matériel et méthodes

1. Lignées cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires de gliomes canins ont été utilisées au cours de l'étude (cf. tableau 4) :

- La lignée J3T est une lignée cellulaire canine dont la description histologique initiale est proche d'un astrocytome anaplasique provenant d'un Boston Terrier de 10 ans. Cette lignée a été fournie par le Dr Michael Berens (*Translation Genomics Research Institute, Phoenix*),
- La lignée RAFFRAY, issue d'un oligodendrogliome anaplasique provenant d'un Boxer de 10 ans, a été fournie par le Dr Jérôme Abadie (Oniris, France),
- La lignée J3T-Bg est issue de la lignée J3T qui a subi plusieurs passages au sein du cerveau de souris Beige Nude XID. La lignée cellulaire est alors plus agressive que les J3T originelles : *in vivo*, elle est capable, à l'inverse des J3T, de former facilement des tumeurs sur les modèles rongeurs,
- G06A est une lignée cellulaire canine issue d'un GBM provenant d'un berger australien de 2 ans,
- SDT-3 est une lignée cellulaire canine issue d'un GBM provenant d'un Bouledogue Anglais de 12 ans.

Les trois lignées précédemment décrites ont été fournies par le Dr Peter Dickinson (UC Davis, USA).

Toutes ces cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans un milieu de culture à base de DMEM (Gibco™) complété avec 10% de SVF et 100 unité/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco-BRL). Ce milieu sera par la suite identifié comme du DMEM complet.

2. Virus

La souche virale de virus myxomateux est la souche SG33. Celle-ci provient d'un lapin mort en 1973 dans la région toulousaine, et a subi un grand nombre de passages en série à 33°C sur des cellules rénales de lapin et des cellules d'embryon de poulet, afin d'obtenir un vaccin atténué contre la myxomatose. Ces passages sériés

ont entraîné une délétion importante de 13.5 kbp de l'extrémité droite du génome du virus (Camus-Bouclainville et al. 2011).

La souche virale SG33-GFP correspond au virus SG33 auquel a été intégré le gène GFP (*Green Fluorescent Protein*) : le virus exprime donc une fluorescence verte lors de son cycle de réplication. Il a été modifié au sein du laboratoire UMR 1225.

3. Infection virale des lignées cellulaires

L'infection virale est réalisée à la MOI (*Multiplicity Of Infection*) de 2, avec une incubation de 2 heures à la température de 37°C, sous une atmosphère de 5 % de CO₂. Après l'infection, le milieu contenant le virus est retiré et un milieu de culture Opti-MEM™ (*Eagle's Minimum Essential Media*), avec 2% de SVF et 1% de Pénicilline-Streptomycine (PS) est ajouté. Pour la suite de l'étude, on parlera d'Opti-MEM complet. Le protocole d'infection est décrit dans l'annexe 1.

4. Immunohistochimie des lignées cellulaires

- Les cellules cultivées ont été incluses en HistoGel™, les blocs ainsi obtenus ont ensuite été coupés en sections de 5-µm d'épaisseur puis montées sur lames pour traitement immunohistochimique.

L'HistoGel™ est un gel aqueux qui permet d'encapsuler et de mettre en suspension des éléments cytologiques ou histologiques, dans un milieu solide. Celui-ci est principalement utilisé en médecine humaine pour les échantillons difficiles à traiter avec les méthodes usuelles car trop friables et trop fragiles. L'HistoGel™ permet une meilleure conservation de l'organisation structurale des tissus prélevés, par rapport à la simple mise en formol 10%. Son utilisation est une option intéressante (Joiner, Spangler 2012) pour les cultures cellulaires. L'annexe n°2 présente le protocole d'inclusion des lignées cellulaires dans l'HistoGel™.

- L'étude immunohistochimique a été réalisée à l'Université Autonome de Barcelone (UAB) par l'équipe du Pr. Marti Pumarola, qui a mis au point l'ensemble des techniques pour les marqueurs neuronaux et gliaux (Fernández et al. 2016) (figure 23). Les marqueurs utilisés sont caractéristiques des différentes étapes de la différenciation des lignées gliale et neuronale :

- CD133 est un marqueur spécifique des cellules souches,
- DCx (Doublecortine) est un marqueur des cellules progénitrices neuronales,
- Olig2 est un marqueur antigénique des cellules progénitrices gliales,
- GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et Vimentine sont spécifiquement présents à la surface des astrocytes matures,
- β III-tubuline et NeuN (Neuronal Nuclei) sont des marqueurs de neurones matures.

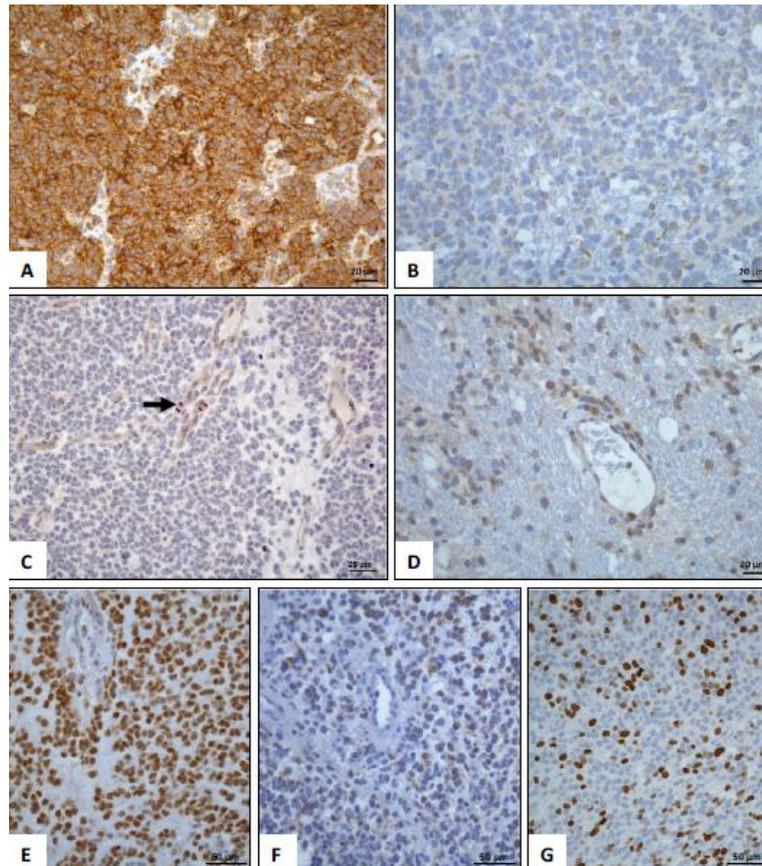


Figure 23 IHC sur du GBM a) Nestin, b) faible expression de Nestin c&d) CD133, e) Olig2, f) DCx, g) Ki-67 (d'après Fernández et al. 2016)

Les particularités spécifiques à chaque anticorps sont récapitulées dans le tableau présenté ci-dessous (tableau 7) et le protocole immunohistochimique est présenté dans l'annexe 3.

Tableau 7 Particularités spécifiques des anticorps primaires utilisés en IHC (d'après Fernandez et al. 2016)

	Nom de l'anticorps	Compagnie	Dilution
CD133	Rabbit anti-CD133 polyclonal antibody	Abcam 19898	1/200
DCx	Rabbit anti-doublecortin polyclonal antibody	Abcam ab18723	1/1000
Olig2	Rabbit anti-Olig2 polyclonal antibody	Chemicon AB9610	1/500
GFAP	Rabbit anti-glial fibrillary acid protein polyclonal antibody	Dako Z0334	1/500
Vimentine	Mouse anti-vimentin clone V9 monoclonal antibody	Dako M0725	1/200
βIII-tubuline	Mouse anti- β 3-tubulin monoclonal antibody	Chemicon MAB1637	1/200
NeuN	Mouse anti-neuronal nuclei monoclonal antibody	Chemicon MAB377	1/500

- Evaluation des résultats immunohistochimiques

Un score de proportion (correspondant au pourcentage de cellules marquées par échantillon) et un score d'intensité (correspondant à l'intensité de marquage) ont été évalués à la lecture des lames. Le score immunohistochimique a ensuite été calculé (tableau 8).

Tableau 8 Evaluation des scores de proportion, d'intensité et immunohistochimique

Score de proportion (SP)	Pourcentage de cellules positives	Score d'intensité (SI)	Intensité du marquage	Score immunohistochimique	SP x SI
0	<5%	0	absent	Négatif	0
1	5-30%	1	faible	+	de 1 à 3
2	30-60%	2	moyen	++	de 4 à 6
3	60-90%	3	intense	+++	de 7 à 9
4	>90%	-	-	++++	de 10 à 12

5. Temps de doublement

Le temps de doublement permet de calculer le temps nécessaire à une population pour doubler sa population initiale. Afin de pouvoir le calculer, un total de 10^5 cellules/puits sont mises en culture dans une plaque 6 puits, en présence de

DMEM complet. Chaque jour, pour une durée totale de 5 jours, deux puits sont trypsinés, les cellules sont comptées sur une cellule de Thomas et la moyenne est réalisée entre les deux puits. Puis le calcul du temps de doublement est réalisé par un logiciel libre en ligne (Roth V.2006).

Le protocole appliqué à cette étude est présenté dans l'annexe 4.

6. Test de clonalité et morphologie cellulaire

Ce test correspond à la mise en culture de 1500 cellules dans une boîte de culture F25, en présence de DMEM complet sur une période de 4 à 7 jours selon la vitesse de croissance des populations cellulaires. L'observation des îlots de clonalité est réalisée toutes les 24h. Le protocole est détaillé dans l'annexe 5.

La morphologie cellulaire consiste à décrire les cellules *in vitro* : forme, taille, mode de croissance.

7. Caryotype des lignées cellulaires

Les caryotypes ont été réalisés au sein de l'ENVT, par l'équipe de génétique. Les cultures cellulaires sont mises en présence de colchicine qui a pour intérêt de perturber les fuseaux mitotiques et de bloquer les cellules en métaphase au cours de la mitose. Puis les cellules sont placées dans un milieu hypotonique où elles gonflent, puis elles sont fixées avec de l'alcool à 90 % sur une lame en verre et observée au microscope photonique. Pour chaque lignée, 20 cellules sont comptées, pour lesquelles le nombre de chromosomes est dénombré. Ceci donne une distribution de type Gaussienne ce qui fournit un nombre de chromosomes avec un pourcentage de certitude élevé.

8. Irradiation des lignées cellulaires

Pour chaque lignée cellulaire, 1500 cellules par flasque T25 ont été mises en culture durant 12 h pour permettre la disposition en clones cellulaires, puis ont été irradiées. Chaque lignée cellulaire a subi 5 sets d'irradiation, un set correspondant à

la réalisation d'une dose unique de 0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10 Gy par une machine Cobalt-60. Les irradiations ont été réalisées au CRCT (Centre de Cancérologie de Toulouse) en collaboration avec l'équipe du Pr. Elizabeth Moyal (INSERM 1037). Pour chaque dose, deux flasques ont été irradiés afin d'éviter les biais statistiques. Lors des 4^{èmes} et 5^{èmes} sets d'irradiation, les doses de 12 et 14 Gy ont été rajoutées à l'étude. Ainsi, pour chaque lignée cellulaire, le nombre de flasques T25 préparées par set d'irradiation était de 14 pour les 3 premiers sets, et 18 pour les deux derniers sets. Au total, 390 flasques T25 ($5 \times ((14 \times 3) + (18 \times 2))$) ont été préparées.

Après irradiation et une fois la taille des colonies cellulaires suffisamment grandes pour permettre un comptage précis, les cellules ont été fixées à l'AFA (Alcool-Formol-Acide acétique) puis colorées avec du Crystal violet 0.025% (Figure 23). Les 390 flasques ont ensuite été analysées pour compter le nombre de colonies survivantes, i.e. les colonies avec plus de 50 cellules. Pour chaque niveau de dose, la moyenne des colonies survivantes a été faite pour les sets d'irradiation N°1, N°4 et N°5. Les résultats concernant les sets d'irradiation N°2 et 3 n'ont pas été pris en compte car les résultats étaient aberrants (cf. résultats). A partir de ces moyennes et pour chaque lignée cellulaire, une courbe de survie a été réalisée à partir de laquelle a été extrait le MID. Le calcul de cet index biologique de radiosensibilité a été fait à l'aide d'un algorithme décrit par Fertil (Fertil et al. 1984).



Figure 24 Test de clonogénie : Les colonies cellulaires ont été colorées après irradiation avec des doses de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 14 Gy, puis ont été comptées.

B. Résultats

1. Caractérisation phénotypique et génotypique des lignées de gliomes canins

a) Morphologie cellulaire

La morphologie des cellules est variable selon la lignée dont elles sont issues. En effet, les cellules J3T, J3T-Bg, G06A et Raffray 2 ont une morphologie allongée, en forme d'étoile. Les cellules SDT3 présente un phénotype différent : elles sont plus petites et plus rondes que les cellules précédentes (figure 25).

L'ensemble des cellules poussent en amas et sont adhérentes à la boîte de culture.

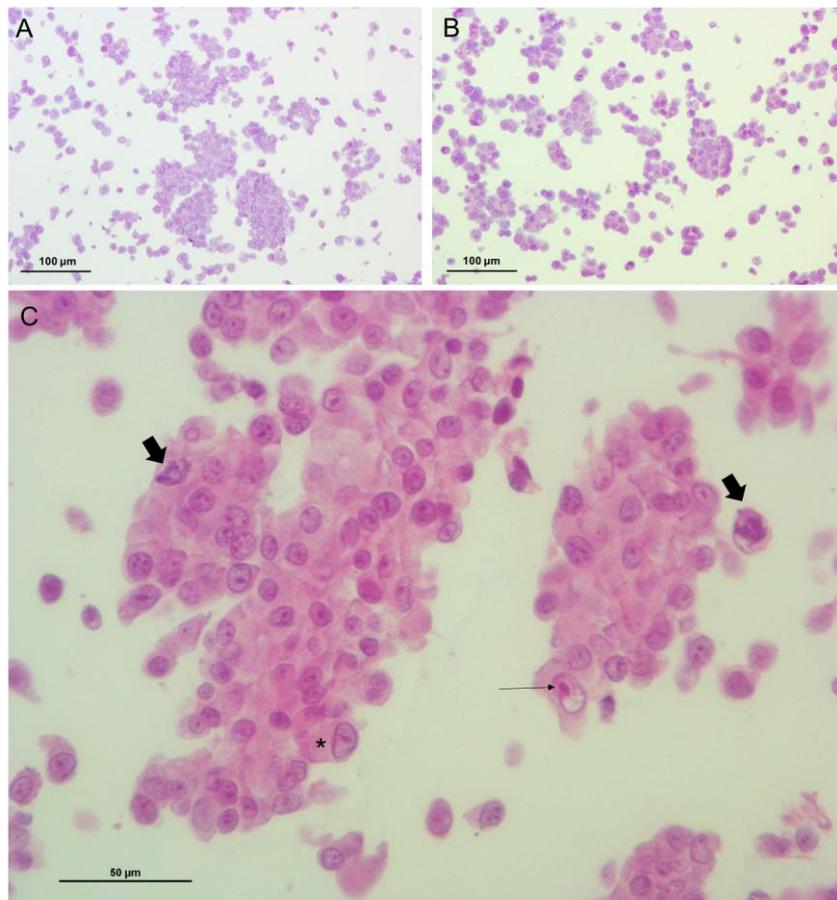


Figure 25 Morphologie de 3 lignées cellulaires incluses en Histogel™ et colorées à l'Hémalun-Eosine (A : J3T-Bg ; B : G06A ; C : J3T). Les cellules sont rondes à fusiformes et majoritairement regroupées en amas. Elles présentent de sévères atypies cytonucléaires (variations de formes, de taille et important volume nucléolaire ; flèche noire). Certaines d'entre elles ont une morphologie similaire à celle d'un astrocyte gémistocytaire (étoile). De nombreuses figures mitotiques sont également présentes (grosses flèches)

b) Temps de doublement

Le temps de doublement permet de calculer le temps nécessaire à une population pour doubler sa population initiale. Les résultats des données brutes sont présentés dans la figure 26.

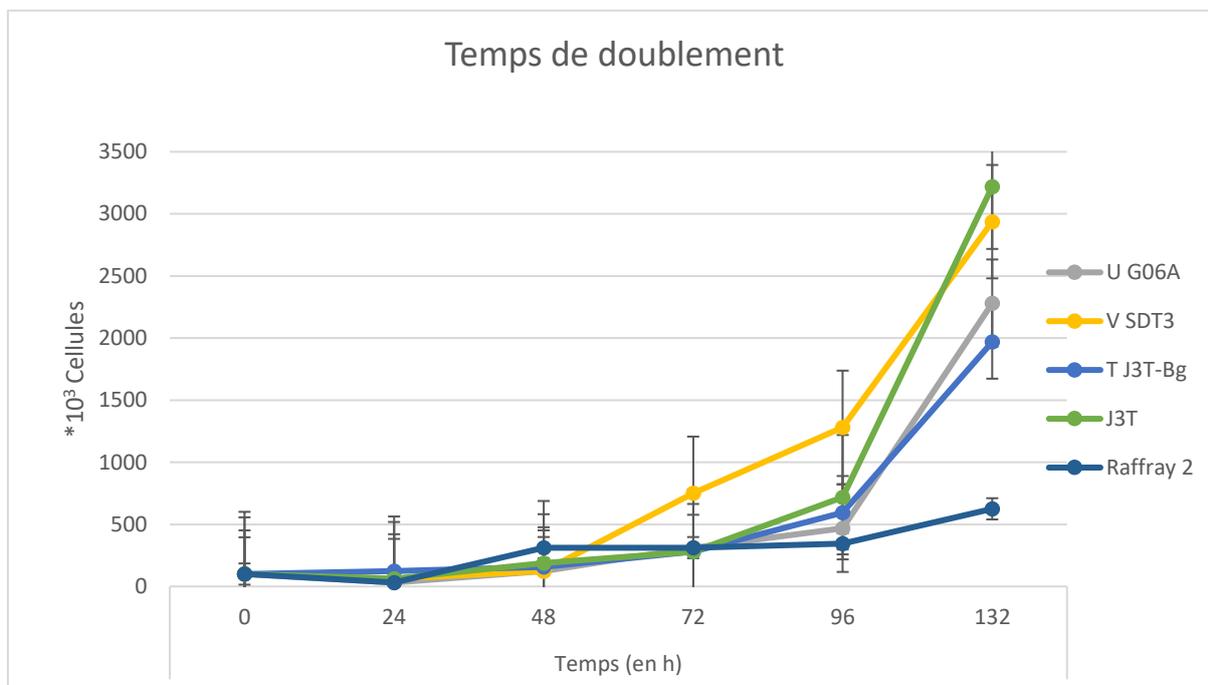


Figure 26 Résultats bruts du temps de doublement pour chaque lignée cellulaire

Après le traitement des données brutes par un logiciel, les données de temps de doublement sont résumées dans le tableau 9 :

Tableau 9 Temps de doublement pour chaque lignée cellulaire

Souche	TD (en heures)
G06A	22,4
SDT3	25,6
J3T-Bg	25,8
J3T	20,6
RAFFRAY	55,9

c) Test de clonalité

Le test de clonalité vise à mettre en évidence qu'une cellule tumorale a le pouvoir de former une colonie de cellules : ces cellules dériveraient donc d'une seule et même cellule. On parle de clone cellulaire. Sur la figure 27, on peut observer deux amas, composés chacun d'une vingtaine de cellules. Chaque îlot cellulaire dérive d'une seule cellule qui a la capacité de se multiplier.

Toutes les lignées cellulaires ont démontré leur capacité à former des clones cellulaires. Cette caractéristique a rendu la réalisation de tests de clonogénie possible pour toutes les lignées.

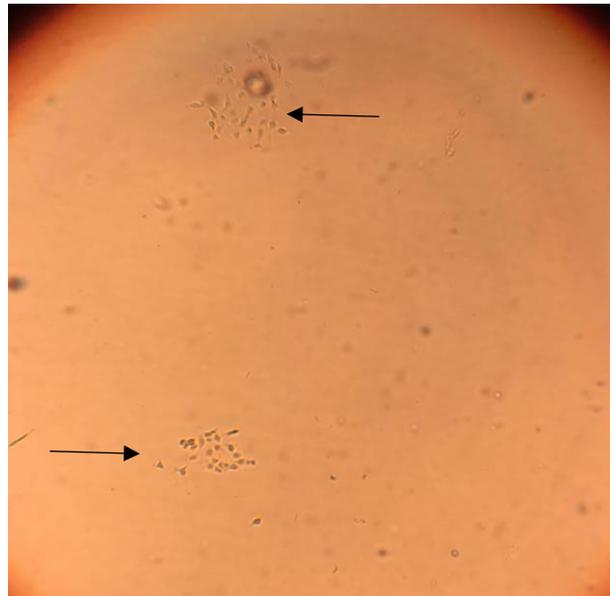


Figure 27 Microscopie photonique au grossissement X40 montrant deux clones cellulaires (flèches noires) (image personnelle).

d) Immunohistochimie

Les résultats d'immunohistochimie sont présentés dans le tableau 10 et la figure 28. Les cellules étudiées présentent des caractéristiques de cellules peu différenciées d'après les résultats immunohistochimiques. En effet, le marqueur CD133, marqueur de cellules souches est fortement positif. Les marqueurs spécifiques aux astrocytes (GFAP, Vimentine) sont positifs tandis que ceux des neurones (DCX, NeuN et β 3 tubuline) sont négatifs ce qui confirme bien le fait que les cellules soient issues d'astrocytes.

Tableau 10 Score immunohistochimique pour les différentes lignées cellulaires de chien

	CD133	DCx	Olig2	GFAP	Vim	BIII tub	NeuN
G06A	++++	Neg	++++	+	++++	Neg	Neg
SDT3	+++	Neg	++++	Neg	+++	Neg	Neg
J3T-Bg	++++	Neg	+++	+	++++	Neg	Neg
J3T	+++	Neg	+++	++	+++	Neg	Neg
RAFFRAY	+++	Neg	+++	+	++++	Neg	Neg

BIII tub : BIII-tubuline, *Neg* : Négatif, *Vim* : Vimentine

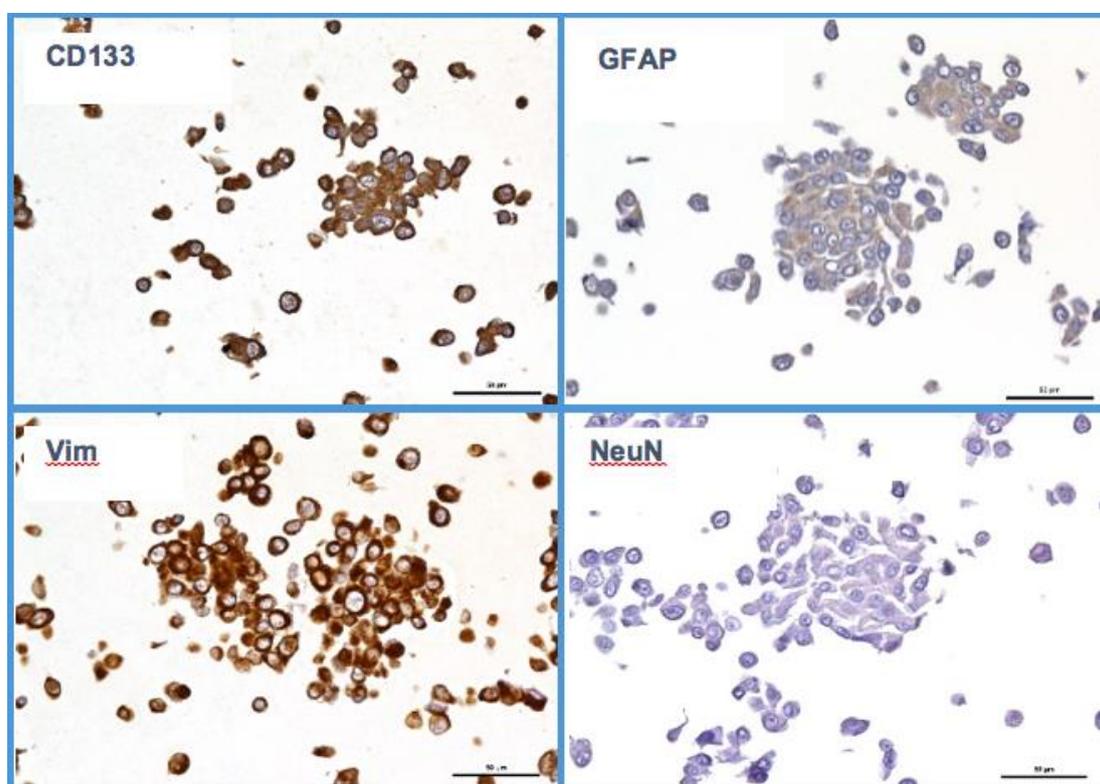


Figure 28 Exemple de résultats immunohistochimiques pour 4 marqueurs de différenciation, obtenu sur la lignée cellulaire J3T-Bg. Barre d'échelle = 50 µm (image personnelle)

Le marquage Olig2 (figure 29) est normalement nucléaire alors que sur les préparations, il n'apparaît que dans le cytoplasme.

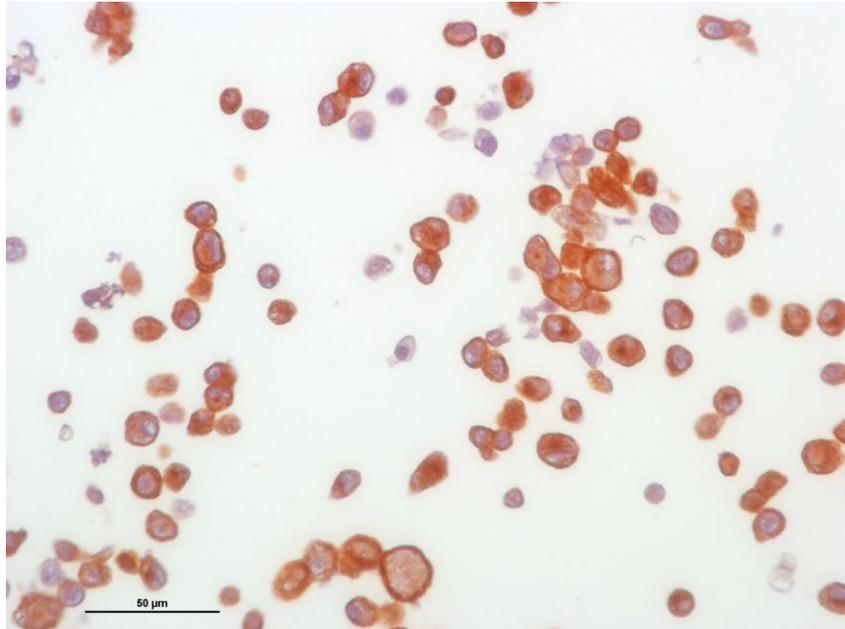


Figure 29 Immunohistochimie des cellules RAFFRAY incluses en Histogel™, pour le marqueur Olig2. Les cellules présentent un marquage cytoplasmique diffus.

e) Caryotype

La réalisation du caryotype a permis à la fois de vérifier l'espèce d'origine des lignées cellulaires et d'évaluer la présence d'éventuelles anomalies chromosomiques. Le caryotype du chien comprend normalement un total de 78 chromosomes : 76 autosomes et 2 gonosomes.

Toutes les lignées cellulaires analysées ont démontré une modification du nombre total de chromosomes, allant de 76 à 82. Certains chromosomes n'ont pas été caractérisés suite à des remaniements. Concernant les cellules SDT3, nous pouvons observer que le nombre total de chromosomes est très éloigné du nombre escompté. Ce résultat peut s'expliquer par une forte modification des chromosomes, entraînant des pertes chromosomiques. Une autre hypothèse ne pouvant être écartée avec ces résultats, est une contamination de la lignée, soit pendant la culture, soit durant la réalisation du caryotype. Les résultats des caryotypes sont présentés dans le tableau 11 ci-dessous et la figure 30.

Tableau 11 Principales informations issues des caryotypes des lignées cellulaires

	Nombre total de chromosomes	Nombre de chromosomes métacentriques	Nombre et nature des chromosomes sexuels	Nombre de chromosomes issus remaniements
G06A	78 et 82	3	2, XX	1
SDT3	59 et 61	NE	NE	NE
J3T-Bg	78 et 81	4	2, XX	2
J3T	78 et 82	4	2, XX	2
RAFFRAY	76 et 81	4	2, XX	2

NE : Non Evaluable du fait de l'importance des remaniements

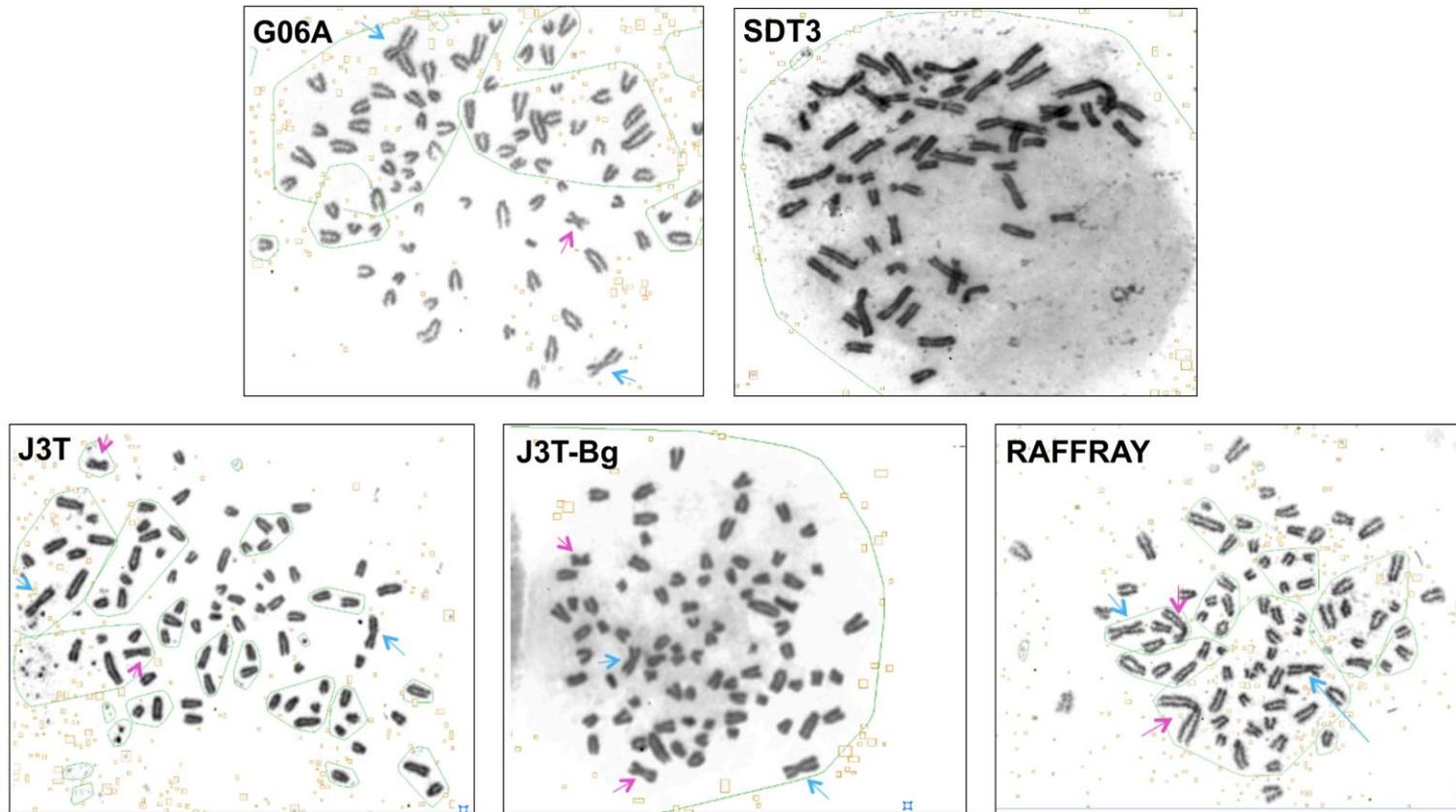


Figure 30 Caryotype des différentes lignées cellulaires. Flèche rose : chromosome issu de remaniement, Flèche bleue : chromosome sexuel

2. Evaluation de la réponse radio-induite des lignées de gliome canin

Les données brutes concernant le nombre de colonies survivantes après irradiation sont présentées dans le tableau 12.

Tableau 12 Moyenne (+/- écart-type) du nombre de colonies survivantes en fonction de la dose d'irradiation. La moyenne a été faite sur les résultats de 3 sets d'irradiation indépendants.

Lignée cellulaire	DOSE (Gy)					
	0	2	4	6	8	10
G06A	344 +/- 1	291 +/- 50	208 +/- 69	128 +/- 68	52 +/- 12	10 +/- 4
SDT3	325 +/- 52	303 +/- 55	247 +/- 56	182 +/- 51	70 +/- 39	27 +/- 21
J3T-Bg	296 +/- 9	270 +/- 26	202 +/- 45	128 +/- 31	35 +/- 7	10 +/- 5
J3T	315 +/- 47	230 +/- 64	156 +/- 73	94 +/- 59	27 +/- 7	4 +/- 2
RAFFRAY	246 +/- 43	194 +/- 23	159 +/- 9	132 +/- 21	57 +/- 23	11 +/- 5

A partir de ces résultats, les courbes de survie clonogénique ont été générées. Elles sont présentées dans la figure 31.

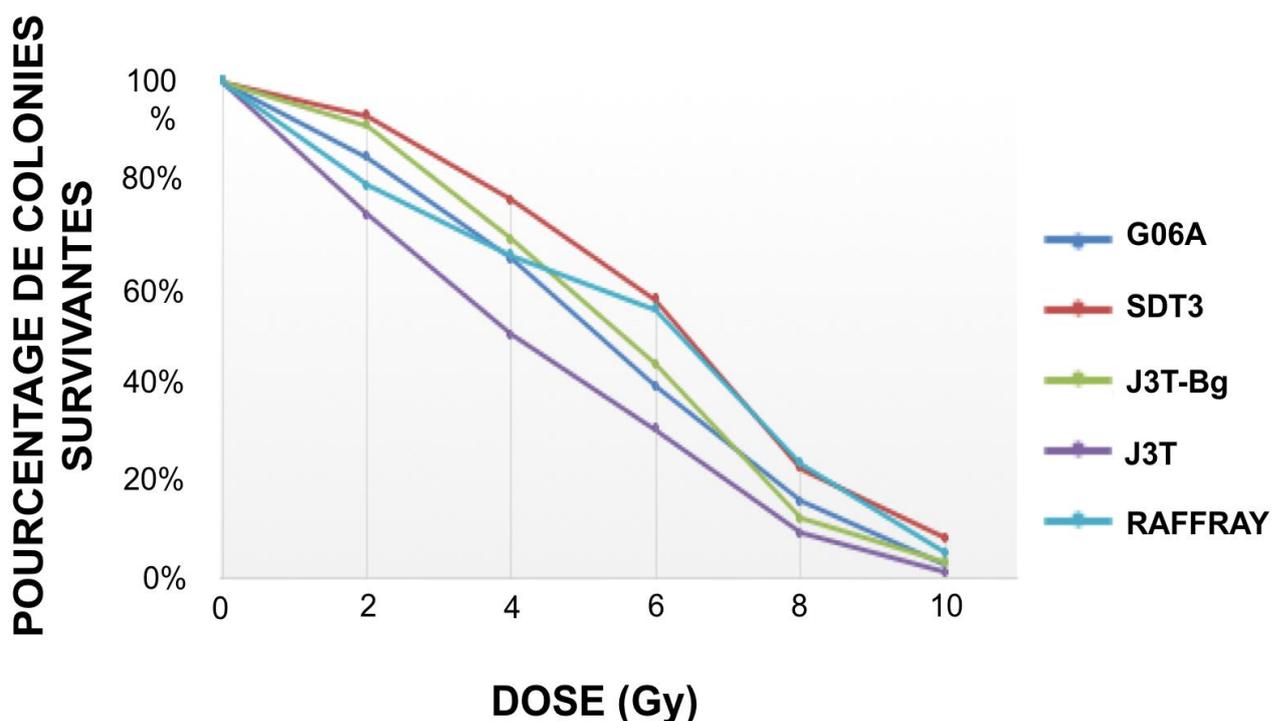


Figure 31 Courbes de survie clonogénique des différentes lignées cellulaires

Les courbes de survie montrent des réponses radio-induites similaires entre les lignées cellulaires, avec les J3T les plus radiosensibles et les SDT3 les plus radorésistantes. Ceci est confirmé par la MID extraite de ces courbes de survie et présentée dans le tableau 13.

Tableau 13 Mean Inactivation Dose (MID), exprimée en Gy, des différentes lignées de gliome canin

	G06A	SDT3	J3T-Bg	J3T	RAFFRAY
MID (Moyenne +/- écart-type)	4,7 +/- 0,58	5,7 +/- 0,57	4,6 +/- 0,49	4 +/- 0,70	5,2 +/- 0,36

Remarque : Comme il l'a été indiqué dans la section « Matériel et Méthodes », les résultats concernant les sets d'irradiation N° 2 et 3 n'ont pas été pris en compte car les résultats étaient aberrants : la radorésistance était multipliée par un facteur 1000 pour certaines souches. L'explication la plus plausible est une infection par des mycoplasmes, car il a été montré que l'infection par des mycoplasmes de lignées cellulaires, entraîne une augmentation de la radorésistance des cellules *in vitro* (tableau 14).

Tableau 14 Résultats obtenus pour les 2^{ème} et 3^{ème} expériences

	G06A	SDT3	J3T-Bg	J3T	RAFFRAY
MID deuxième expérience	1391	17	15306	1125	20109
MID troisième expérience	8.3	11	8.6	18.6	49834

3. Infection des lignées cellulaires de gliome canin par le MYXV

Cette étude s'inscrit dans la continuité d'une thèse vétérinaire réalisée en 2015 qui étudiait la permissivité et la sensibilité des cellules de gliome canin au MYXV en fonction de la souche virale employée (SG33 ou T1). Elle démontrait un meilleur effet cytotoxique de la souche SG33 par rapport à T1 (une autre souche de MYXV) sur les différentes lignées cellulaires, d'où la restriction de mon étude à l'utilisation du SG33 seulement.

a) Infection des J3T

Les J3T ont été infectées selon le protocole de l'annexe 1. L'infection a été réalisée à la MOI de 2, sur un tapis cellulaire à confluence. Dès les 24-48 premières heures, des plages de lyses commencent à apparaître. Un ECP de 100 % est observé entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour post-infection par le virus SG33. Cette première partie confirme donc le pouvoir oncolytique du SG33 à la MOI de 2 sur la lignée J3T.

Une fois la lyse de l'ensemble du tapis observée, le surnageant est transféré dans un tube Falcon® de 10 ml, puis placé à -20°C. Au lieu de jeter la boîte de culture, 10ml de DMEM complet sont ajoutés à celle-ci pour apporter les éléments nutritifs aux dernières cellules adhérentes au plancher de la boîte F25. Il s'est avéré que ces cellules sont viables et elles se sont de nouveau multipliées. En l'espace d'une semaine à 10 jours, la confluence cellulaire est de nouveau atteinte.

Ces cellules ont de nouveau été infectées avec le SG33 à la MOI de 2 : la dynamique d'infection fut identique. Les délais entre l'apparition des premiers ECP et l'atteinte d'un ECP de 100% sont équivalents à la première infection. Seules quelques cellules ont survécu à cette infection et ont de nouveau repeuplé la boîte de culture, dans les jours qui ont suivis l'infection (figure 32).

C'est un total de 7 infections qui ont été réalisées sur une période de 4 mois, sur cette même lignée cellulaire. Aucune modification, en termes de dynamique d'infection, de sensibilité au virus, d'ECP n'a été observée. Il semble donc que l'infection récurrente des J3T par le SG33 n'entraîne pas de résistance intrinsèque de ces cellules à l'infection virale

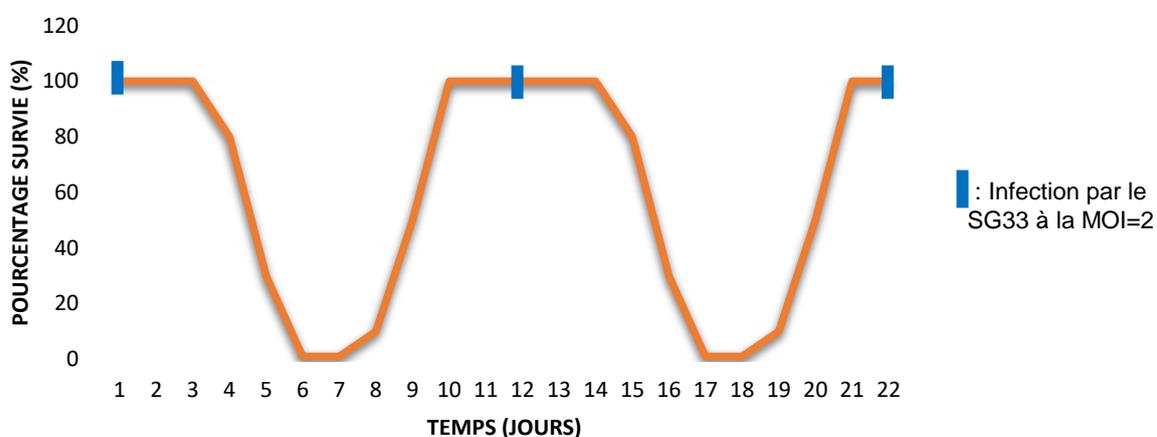


Figure 32 Représentation schématique de la dynamique d'infection de la lignée J3T par le SG33

b) Infection des SDT3 et des Raffray

Les deux lignées cellulaires SDT3 et RAFFRAY ont été infectées par le SG33 à la MOI de 2 selon le protocole de l'annexe 1. Pareillement à l'infection des J3T, les premiers ECP sont observés à partir de 48h. La cinétique de lyse tumorale est plus lente : l'ECP de 100% est atteint en 4 à 6 jours. Le surnageant est retiré et les cellules adhérentes sont remises en culture avec du DMEM complet.

Cependant, contrairement aux J3T, la confluence de 100% n'a pas pu être atteinte. Effectivement, une fois que la taille de la population atteint 40 à 50% de confluence, on observe de nouveau une chute de population avec l'apparition de nouvelles plages de lyse, sans l'ajout de nouveaux SG33.

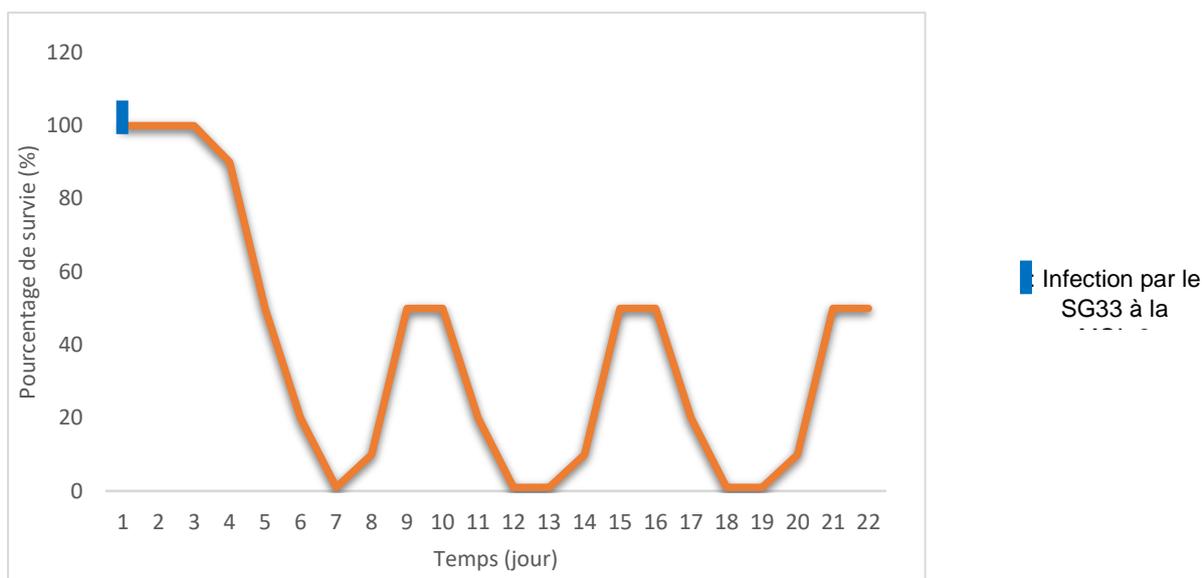


Figure 33 Représentation schématique de la dynamique d'infection des lignées V et Raffray 1 par le SG33

Il semble donc qu'il y ait une persistance suffisante du virus dans les cellules restantes pour permettre une nouvelle infection virale (figure 33). Ceci suppose que le VO SG33, bien que présent au sein de ces cellules, n'entraîne pas leur lyse.

c) Infection des cellules SDT3 par le virus SG33-GFP

Afin de mettre en évidence cette persistance virale au sein des cellules, les cellules SDT3 ont été infectées avec un virus SG33 génétiquement modifié, le SG33-GFP (Green Fluorescent Protein). Lors de la réplication virale, cette protéine GFP va être synthétisée et émettre une fluorescence verte.

Les échantillons sont visualisés par microscope confocal. La cinétique d'infection par le SG33-GFP est représentée dans le tableau 14. La fluorescence est observée dès deux jours post-infection sur la culture cellulaire, mettant en évidence l'infection par le SG33-GFP. La cinétique observée avec ce virus modifié est identique à celle observée avec le SG33. A partir du 4^{ème} jour post-infection, des plages de lyse et des débris cellulaires sont observés et sont visibles au microscope confocal (1). Après la lyse de la quasi-totalité des cellules, les dernières cellules survivantes présentent toujours une fluorescence intense, preuve d'une infection intense par le SG33-GFP (2). A partir de ces cellules, des colonies cellulaires se reforment, jusqu'à

une résurgence de l'infection virale, mise en évidence par la fluorescence marquée (3).

Un tableau récapitulatif de l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse vétérinaire est présenté dans le tableau 16.

Tableau 15 Tableau présentant les images obtenues par imagerie confocale avec la dynamique d'infection virale par le SG33-GFP. (1) J+4 post-infection : fluorescence intense d'un grand nombre de cellules, regroupement en amas et apparition de débris cellulaires (X10) (2) Peu de cellules vivantes, présentes après un rinçage au DMEM complet, avec de la fluorescence (X40) (3) Colonies cellulaires avec plages de lyse (X40)

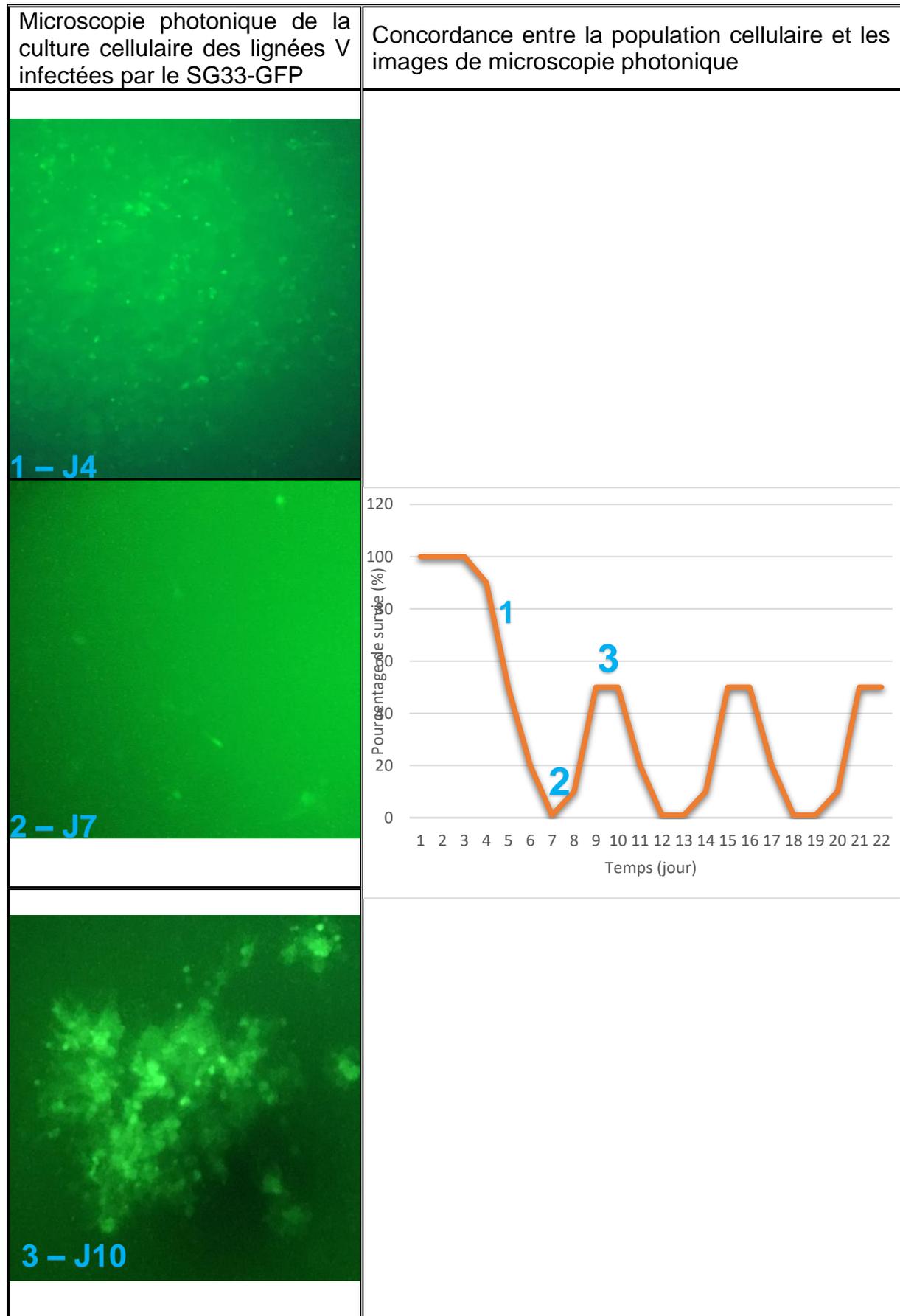


Tableau 16 Lignées cellulaires de gliome canin : synthèse bibliographique et des résultats obtenus concernant leur origine, caractéristiques générales et moléculaires (rouge : résultats obtenus ; bleu : expérimentation à réaliser).

		J3T	J3T-Bg	SDT-3	G06A	Raffray
Tumeur d'origine						
		Astrocytome anaplasique d'un Boston Terrier mâle de 10 ans (Berens et al., 1993)	Lignée dérivée à partir des J3T après un passage sous-cutané sur souris Beige Nude XID (York et al. 2012)	GBM d'un Bouledogue anglais mâle de 12 ans (York et al. 2012)	GBM d'un berger australien, femelle stérilisée, de 2 ans (York et al. 2012)	Oligodendrogliome anaplasique d'un boxer de 7 ans (Dupont-Monod, 2014)
Caractérisation						
	Empreinte ADN/ Profiling	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites	En prévision : Profil microsatellites
<i>(I) Méthodes pour démontrer l'identité d'une lignée cellulaire</i>	Analyse cytogénétique, caryotype	Nombre modal de chromosomes = 84/ Nombre de chromosomes < 82 sur 20 métaphases observées 7 chromosomes métacentriques et submétacentriques + 1 petit chromosome acrocentrique non apparié 2 chromosomes métacentriques issus de remaniement	Nombre de chromosomes : entre 78 et 81 sur 20 métaphases observées Présence de 2 chromosomes métacentriques issus de remaniements	Nombre de chromosomes : entre 59 et 61 sur 20 métaphases observées Chromosomes remaniés difficiles à identifier	Nombre de chromosomes : entre 78 et 82 sur 20 métaphases observées Présence de 3 chromosomes métacentriques issus de remaniements	Nombre de chromosomes : entre 78 et 82 sur 20 métaphases observées Présence de 2 chromosomes métacentriques issus de remaniements
<i>(II) Méthodes pour mettre en évidence l'espèce d'origine de la lignée cellulaire</i>	-Analyse d'isoenzymes -Microsatellites -Caryotype	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine/ idem	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine	Seulement caryotype réalisé, caryotype de chien très remanié ou espèce inconnue En prévision : PCR multiplex pour vérifier l'espèce	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine	Seulement caryotype réalisé, en faveur de l'espèce canine
<i>(III) Méthodes pour mettre en évidence les caractéristiques générales d'une lignée cellulaire</i>	Morphologie	Astrocytaire/ idem	Compatible avec cellule gliale tumorale	Compatible avec cellule gliale tumorale	Compatible avec cellule gliale tumorale	Compatible avec cellule gliale tumorale
	Temps de doublement	- 49 heures (Berens et al., 1993) - 28 heures (Rainov et al. 2000) - 21 heures	26 heures	26 heures	23 heures	56 heures
		J3T	J3T-Bg	SDT-3	G06A	Raffray

	Clonage sur plastique/En agar	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones	Capacité à former des clones
<i>(III) Méthodes pour mettre en évidence les caractéristiques générales d'une lignée cellulaire (suite)</i>	Profil d'expression de protéines	<ul style="list-style-type: none"> - GFAP : 90 % des cellules avec marquage intense/ >90% des cellules marquées faiblement - EGFR : quelques cellules sont très positives, avec un pattern diffus/ non évalué - DCx, NeuN et BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage moyen - Olig2 : > 90% des cellules avec marquage cytoplasmique moyen - CD133 : > 90% des cellules avec marquage moyen <p>En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GFAP : 60 à 90% des cellules marquées faiblement, - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage intense - Olig2 : 60 à 90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - CD133 : > 90% des cellules avec marquage intense <p>En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GFAP : négatif - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage moyen - Olig2 : > 90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - CD133 : > 90% des cellules avec marquage moyen <p>En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GFAP : 5 à 30% des cellules marquées faiblement, - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - Vim : >90% des cellules avec marquage intense - Olig2 : 60 à 90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - CD133 : > 90% des cellules avec marquage intense <p>En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot</p>	<ul style="list-style-type: none"> - GFAP + et inconstant/ idem : 5-30% des cellules avec maruage faible - Olig2 négatif/ 60-90% des cellules avec marquage cytoplasmique intense, - Vimentine : +++/idem : >90% des cellules avec marquage intense - S100 négatif/ non évalué - DCx, NeuN, BIII tubuline : négatif - CD133 : > 90% des cellules avec marquage moyen <p>En prévision : Evaluation de la Nestine, S100 (lames après inclusion en Histogel) et d'ATRx et Olig2 par Western-Blot</p>
<i>(IV) Méthodes pour confirmer la tumorigénicité d'une lignée cellulaire</i>	Conservation du pattern histologique lors de transplantation sous-cutanée chez la souris	<p>Même profil histologique mais devient faiblement GFAP + après transplantation</p> <p>Xélogreffe orthotopique sur souris Nude en prévision</p>	Xélogreffe orthotopique sur souris Nude en prévision	Xélogreffe orthotopique sur souris Nude en prévision	Xélogreffe orthotopique sur souris Nude en prévision	Xélogreffe orthotopique sur souris Nude en prévision

		J3T	J3T-Bg	SDT-3	G06A	Raffray
<i>(V) Méthodes pour déterminer le profil de sensibilité aux traitements d'une lignée cellulaire</i>	Evaluation de la chimiosensibilité	Hygromycine, puromycine, ganciclovir, G418 (Rainov et al. 2000)	Pt(iv)-prodrogue de cisplatine, cisplatine et carboplatine (Feldhaeusser, et al., 2015) CCNU, CPT-11 et TMZ (LeBlanc et al. 2016)	CCNU, CPT-11 (Boudreau et al. 2015)	CCNU, CPT-11 IL-13 canin couplé à une cytotoxine (Debinski et al. 2013)	Doxorubicine
	Evaluation de la radiosensibilité	MID = 4 Gy	MID = 4,6 Gy	MID = 5,7 Gy	MID = 4,7 Gy	MID = 5,2 Gy
	Evaluation de la sensibilité à l'effet oncolytique de SG33	Oui	Oui	Oui avec infection persistante	Oui	Oui avec infection persistante
Etude moléculaire						
		Pas de mutation des exons 3 à 9 sur <i>TP53</i> (York et al. 2012) En prévision : évaluation de l'expression de marqueurs de radiorésistance				

C. Discussion

Dans le cadre d'un projet visant à utiliser le chien comme modèle d'étude des gliomes diffus pour l'Homme, les objectifs de cette thèse étaient de caractériser cinq lignées établies de gliomes diffus canins (J3T, J3T-Bg, SDT-3, G06A, Raffray), d'évaluer leur réponse aux radiations ionisantes et d'étudier leur sensibilité à l'effet oncolytique de la souche SG33 du MYXV. Les résultats de ce travail de thèse montrent que les lignées cellulaires étudiées sont effectivement des cellules astrocytaires tumorales faiblement différenciées, radiorésistantes (MID >3 Gy) et sensibles à l'effet oncolytique de SG33.

1. Caractérisation cellulaire

Une grande partie de la caractérisation cellulaire de ces 5 lignées de gliomes canins a été réalisée au cours de de ma thèse vétérinaire et montre qu'il s'agit de cellules (i) astrocytaires (positives pour la Vimentine et GFAP et négatives pour les marqueurs neuronaux), (ii) tumorales malignes (montrant des aberrations chromosomiques et atypies cytonucléaires sévères), (iii) peu différenciées (CD133 positives), (iv) et avec des temps de doublement légèrement plus courts que ceux rapportés pour les lignées cellulaires de gliomes humains (30 à 35 heures, selon les études (Mullins et al. 2013).

La comparaison des résultats de ce travail de thèse avec les données de la littérature peut se faire pour les lignées cellulaires J3T et Raffray, les seules pour lesquelles les caractéristiques générales ont été publiées (Berens 1993, Rainov 2000, Dupond-Monod Juliette 2014).

Concernant les J3T, les points de discordance entre les données de la littérature et nos résultats concernent le caryotype et le temps de doublement. Berens et al. décrivent un temps de doublement de 49 heures et un caryotype comportant un nombre modal de 84 chromosomes avec 7 chromosomes métacentriques. Nos résultats révèlent quant à eux un temps de doublement de 21 heures. Bien que nous n'ayons pas calculé le nombre modal de chromosomes, l'observation de 20 métaphases a systématiquement amené à un nombre chromosomique inférieur à 82, et seulement 2 chromosomes métacentriques ont été retrouvés de manière constante. Le temps de doublement de 21 heures est par contre plus en accord avec l'étude de

Rainov et al. qui utilise les J3T et qui est plus récente (Berens et al. 1999). Une des explications possibles à ce différentiel de résultats est la présence de plusieurs clones cellulaires au sein de ce qui est considéré comme la lignée J3T : au fur et à mesure des passages, un clone différent de celui qui a été caractérisé a pu être sélectionné. Les publications de Inoue et al. et Maruo et al. seraient en faveur de cette hypothèse dans la mesure où ces auteurs ont isolé deux lignées cellulaires phénotypiquement distinctes après transplantation des J3T en sous-cutanée chez la souris, lignées qu'ils ont appelé J3T-1 et J3T-2 (Inoue et al. 2012; Maruo et al. 2013). La discordance de nos résultats avec la littérature souligne l'importance de la mise en place de méthodes permettant de réaliser une « empreinte digitale » de la lignée cellulaire lors de sa caractérisation, et ce afin de pouvoir s'assurer, avant d'initier une expérimentation, que la lignée cellulaire sur laquelle le manipulateur travaille correspond effectivement à la lignée cellulaire caractérisée. Dans ce contexte, le profilage microsatellite apparaît très utile puisqu'il permet d'établir l'identité d'une lignée (O'Donoghue, Rivest, Duval 2011). Nous avons prévu de réaliser un profilage microsatellite de toutes les lignées cellulaires que nous avons au laboratoire, ces données de base pourront ainsi servir de point de comparaison pour de futures expérimentations afin de s'assurer de l'absence de contaminations cellulaires ou de dérive génétique des lignées.

La morphologie et le profil immunohistochimique des J3T dans notre étude étant en faveur d'une tumeur astrocytaire de haut-grade de malignité et l'origine canine de la lignée cellulaire ayant été confirmée, il semblerait qu'il n'y ait pas eu de contamination cellulaire mais que ce soit plutôt une dérive génétique ou la sélection d'un clone qui explique la différence de caractéristiques des J3T entre l'étude de Berens et al. et la nôtre.

En ce qui concerne les Raffray, seuls les résultats immunohistochimiques avaient été publiés (Dupont-Monod Juliette) : le marquage de la GFAP et de la Vimentine sont identiques dans notre étude aux données de la littérature. Par contre, alors que ces cellules ont été décrites comme Olig-2 négatives, nous observons un marquage intense du cytoplasme de la majorité des cellules. Ce pattern de marquage, qui a été d'ailleurs retrouvé sur toutes les lignées cellulaires, est inhabituel. En effet, le marquage d'Olig-2 - qui est facteur de transcription retrouvé dans les oligodendrocytes immatures - est normalement intranucléaire pour les prélèvements tissulaires de gliomes inclus en paraffine. La présence d'Olig2 dans le cytoplasme ne

serait toutefois pas anormale, puisque selon l'étude de Setoguchi et al., il y a passage d'Olig2 du noyau jusqu'au cytoplasme dans les astrocytes en culture (Setoguchi, Kondo 2004). Afin de vérifier s'il y a effectivement expression d'Olig2 par les lignées cellulaires ou si le marquage intracytoplasmique observé est un artefact, nous projetons d'évaluer l'expression d'Olig2 par Western-Blot.

Le marquage d'Olig-2, même s'il est plus fréquent dans les oligodendrogliomes canins, se retrouve également dans les tumeurs astrocytaires de haut-grade de malignité du Chien (Fernandez et al. 2016). Ainsi, il n'est pas aberrant de trouver une expression d'Olig2 dans les lignées dérivées d'astrocytomes. Les Raffray, qui normalement dérivent d'un oligodendrogliome anaplasique, présentent un phénotype immunohistochimique compatible avec des cellules astrocytaires peu différenciées comme l'indique la positivité à la vimentine et la GFAP. Il semblerait donc que le passage en culture de ces cellules ait modifié leur phénotype, il sera intéressant de réaliser une xénotransplantation orthotopique de Raffray sur souris afin d'évaluer si elles sont capables de générer une tumeur et quel est le type histologique de la tumeur ainsi développée. Si la transplantation de ces lignées fournit des types histologiques différents de gliomes (astrocytomes et oligodendrogliomes), il sera intéressant d'évaluer s'il y a perte d'expression d'ATRx de manière spécifique pour les astrocytomes comme cela est constaté pour les gliomes humains (Louis et al. 2016).

La réalisation d'une injection orthotopique de cellules tumorales au sein du cerveau de souris immunodéprimées est prévue pour toutes les lignées, puisqu'il s'agit de l'ultime étape de caractérisation (Langdon 2004). Celle-ci permettra de savoir si les cellules tumorales, après de nombreux passages cellulaires, sont capables de recréer *in vivo* une tumeur (Schuster et al., 1991). Les lignées cellulaires tumorigènes permettront d'obtenir des modèles murins de gliomes (Mullins et al. 2013) qui sont essentiels pour les études précliniques et cliniques afin de tester différents agents antitumoraux. Ils visent à recréer au plus près les conditions de développement tumoral avec la formation de néovaisseaux et la mise en place de conditions hypoxiques. Cependant, comme nous avons pu le voir au cours de cette étude, le modèle murin présente de nombreuses limites qui n'affecte pas le chien (Frosina et al., 2013).

En ce qui concerne les lignées SDT-3, G06A et J3T-Bg, aucune caractéristique concernant les cellules n'avait été publiée, à l'exception de l'absence de mutation de TP53 que nous n'avons pas évaluée. Leur morphologie et leur pattern

immunohistochimique sont compatibles avec des cellules astrocytaires de haut-grade de malignité. Les cellules SDT-3 présentent de très forts remaniements du caryotype qui ont rendu impossible la reconnaissance de l'espèce d'origine. Il serait donc intéressant de refaire le caryotype de cette lignée pour s'assurer qu'il n'y a pas eu contamination cellulaire au moment de l'expérimentation. Le remplacement de la lignée cellulaire par celle d'une autre espèce pourrait être possible bien que peu probable. En effet, les espèces qui présentent un nombre de chromosomes compris entre 59 et 61 sont la vache et la chèvre (O'Brien et al., 2006), et aucun changement de morphologie cellulaire n'a été observé au cours de cette étude. Nous projetons d'autre part de réaliser une PCR multiplex afin de confirmer l'espèce d'origine.

2. Caractérisation radio-induite

La réponse des lignées cellulaires aux radiations ionisantes a été évaluée en réalisant la moyenne des résultats obtenus pour trois séries d'irradiation indépendantes. Toutes les lignées cellulaires testées sont fortement radiorésistantes avec des MID supérieures à ce qui a été décrit pour les gliomes humains de haut-grade de malignité : 1,11 à 3,94 Gy selon Taghian (Taghian et al., 1992). Il aurait été intéressant d'obtenir un différentiel de réponse important et pouvoir ainsi rechercher une différence d'expression de marqueurs de radiorésistance connus chez l'Homme entre lignées considérées comme « radiosensibles » et celles qui sont plus radiorésistantes. Nous projetons de réaliser une RT-PCR sur les lignées cellulaires pour évaluer l'expression des principaux marqueurs de radiorésistance chez l'Homme (Survivine, FGFR1, GSK3beta, intégrines alpha3, alpha5, beta3, HIF-1alpha, LDH, Notch). Une approche intéressante serait aussi d'inhiber l'expression de certains marqueurs de radiorésistance connus chez l'Homme et de vérifier si cette inhibition sensibilise les cellules aux radiations ionisantes.

Les résultats obtenus pour les sets d'irradiation n°2 et n°3 n'ont pas pu être pris en compte pour les calculs des MID. En effet, les MID obtenus lors de ces deux expérimentations sont largement supérieures aux résultats obtenus aux cours de la première irradiation et à ceux présents dans la littérature. L'une des explications possibles à ces anomalies serait la contamination des cultures cellulaires par des mycoplasmes. En effet, une infection par des mycoplasmes du laboratoire a été mise

en évidence peu de temps après la troisième série d'irradiation. Les mycoplasmes sont des bactéries commensales, résistantes dans le milieu extérieur, responsables de contaminations lors de culture cellulaire. Cette contamination peut avoir pour conséquence une modification de la morphologie cellulaire, une modification du métabolisme cellulaire, l'apparition d'aberrations chromosomiques. Cependant, cette infection bactérienne peut aussi passer totalement inaperçue ce qui rend son diagnostic difficile. Ce diagnostic se fait essentiellement par PCR, car la mise en évidence par culture cellulaire est longue et fastidieuse. De nombreuses études travaillant sur la radiothérapie de cellules cancéreuses *in vitro*, veillent à l'absence d'infection par des mycoplasmes afin de ne pas avoir de modification de la radiosensibilité (Hardee et al. 2012). Les 4^{ème} et 5^{ème} expériences de radiosensibilité ont été réalisées en Janvier 2016 sur les mêmes cellules qui ont été congelées à -80°C, décongelées et traitées avec un antibiotique anti-mycoplasmaïque (macrolides). Ces deux expériences n'ont pas présenté les anomalies précédentes ce qui est en faveur d'une radiorésistance induite par des mycoplasmes.

Une autre hypothèse pourrait expliquer, en partie du moins, cette radiorésistance transitoire observée avec ces lignées cellulaires. Le rythme circadien correspond à un battement du temps par la machinerie cellulaire sur un cycle de 24 heures. Il repose sur les interactions entre différentes protéines intracellulaires. Ce rythme circadien agit sur l'ensemble du corps humain et influe sur le métabolisme, le comportement et la physiologie des êtres vivants. Il agit aussi au sein même de la cellule et permet de réguler le passage des différentes phases du cycle cellulaire (G1, M, G2, S) (Stuart 2003). Or, la radiosensibilité est variable selon la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve les cellules. Les phases G2 et M sont plus radiosensibles que les phases G1 et S (Pawlik, Keyomarsi 2004). Par ailleurs, au sein des tumeurs, le rythme circadien est fréquemment modifié et est souvent raccourci : on parle de rythme ultradien (cycle inférieur à 20h) (Mormont et al., 1997). Ainsi, une *review* publiée en Décembre 2016 tente de démontrer que la radiothérapie peut être influencée par le rythme circadien (Chan et al. 2016). Des études supplémentaires doivent être menées pour montrer clairement le lien entre rythme circadien et radiothérapie, et ouvrir la voie à la chronothérapie *i.e.* une prise en charge thérapeutique du patient, en lien avec son rythme biologique (Chan et al. 2016).

Bien que ce phénomène ne puisse pas expliquer à lui seul l'écart de radiorésistance au sein des expériences, il serait important de prendre en considération la variation de la radiorésistance lors du cycle cellulaire.

3. Infection virale par le SG33

L'infection des cellules J3T par le SG33 montre une infection lytique avec un ECP avoisinant les 100%. Les cellules persistantes peuvent alors se multiplier de nouveau et arriver à confluence : le virus ne semble pas persister au sein de ces cellules. A l'inverse, l'infection des cellules SDT-3 et Raffray semble révéler l'existence d'une infection persistante des cellules tumorales à cause des résurgences virales qui apparaissent lors de la phase de croissance des cellules tumorales. L'infection par le virus SG33 marqué au GFP confirme cette infection persistante lors des récurrences virales. Des études ont montré que certains poxvirus peuvent causer des infections persistantes sur une longue période *in vivo*. L'étude de l'*Ectromelia virus* chez des souris immunocompétentes montre une persistance de l'infection virale, après normalisation de l'état clinique suite à la primo-infection, jusqu'à 100 jours post infection au sein de la moelle osseuse. Ainsi des souris qui semblaient guéries étaient infectées par une infection à bas bruit de ce virus. Une immunodépression, induite par le cyclophosphamide, entraînait une résurgence de l'infection virale, qui produisait de hauts titres viraux, capables d'infecter des souris naïves (Sakala et al. 2015).

De même, le virus du *molluscum contagiosum* (MCV) est un virus dont la culture cellulaire et l'infection virale *in vitro* sont laborieuses à obtenir. Le MCV ne crée une infection virale productive que sur les lignées primaires de fibroblaste humain ; sur les nombreuses autres lignées cellulaires, l'infection virale est abortive. Une étude publiée en 2000 a démontré que les ARNm précoces du MCV sont détectables par RT-PCR entre la première et la deuxième heure *post*-infection et restent détectables après plusieurs passages des cellules infectées.

Ainsi l'infection virale persistante des cellules SDT-3 et Raffray est possible et pourrait s'expliquer par une sensibilité différente au SG33 de ces cellules par rapport aux cellules J3T (Bugert, Melquiot, Kehm 2001).

4. Limites de l'étude

L'une des limites de cette étude correspond au mode de culture des lignées cellulaires. En effet, la culture cellulaire en monocouche n'est pas représentative de la tumeur *in vivo*. La tumeur intracrânienne s'entoure de matrice extracellulaire, de néovaisseaux qui ont un impact sur le développement de la tumeur dans son ensemble. L'un des exemples concrets de cette conformation en trois dimensions est la mise en place d'un gradient en dioxygène : plus les cellules sont proches du centre tumoral, plus la pression partielle en dioxygène est faible. Ainsi, ces cellules vont se retrouver dans des conditions hypoxiques. Or, on sait que l'hypoxie cellulaire modifie le métabolisme cellulaire et augmente la radiorésistance des cellules, par l'intermédiaire de gènes tels que le gène *HIF* (Zhao et al. 2015). L'étude de ces cellules en 3D serait donc plus proche de la réalité. Les CSC ont la capacité de former des neurosphères, dans des conditions de culture particulières, riches en facteurs de croissance et en vitamines. Ces neurosphères ont une structure 3D qui mime le comportement des cellules *in vivo*. Une étude publiée en 2015 par Kahlert montre que le passage d'une culture en monocouche à une culture en neurosphère d'une lignée de gliome humain s'accompagne d'une modification métabolique. L'utilisation de spectroscopie haute-résolution note une augmentation du ratio Choline/Créatinine et une augmentation des lactates par rapport à la culture monocouche, compatible avec un milieu hypoxique (Kahlert et al. 2015).

L'évaluation de la radiosensibilité devrait donc s'effectuer sur des neurosphères afin de travailler sur un modèle plus proche de la réalité.

Le travail sur lignée cellulaire *in vitro* est primordial dans l'étude des cancers. Cela correspond à la première étape lors de l'étude de nouveaux agents antitumoraux tels que des agents chimiothérapeutiques, des molécules radiosensibilisantes ou des VO. Cependant, les lignées cellulaires présentent certaines limites en tant que modèle d'étude *in vitro*. Le passage entre des tumeurs primaires et des lignées cellulaires établies montre des différences significatives concernant l'expression de protéines de surface, intracellulaires ou d'enzymes spécifiques de certaines molécules anticancéreuses. En effet, la mise en culture de cellules primaires montre une modification des protéines de surface telles que la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1). La surexpression de cette molécule est associée, au sein des mélanomes,

à un risque plus élevé de métastases tumorales, mais elle facilite aussi la reconnaissance de la tumeur par le SI antitumoral. La mise en culture de lignées de carcinome œsophagien a montré une réduction drastique de l'expression de cette molécule au sein des lignées cellulaires (Ichiki et al. 2012). De même, une étude publiée en 2010 a comparé le spectre d'expression d'enzymes et de transporteurs responsables de la métabolisation des médicaments entre des carcinomes hépatiques primaires et des lignées cellulaires hépatiques établies. Elle a démontré une très faible voire une absence d'expression de certaines de ces molécules au sein des lignées (Guo et al. 2011). Enfin, Vogel a étudié l'expression protéomique entre 8 GBM primaires et 4 lignées de GBM établies. L'étude des protéines intracellulaires sur gel d'électrophorèse bidimensionnel montre, de manière significative ($p < 0.05$), une expression largement supérieure de 7 protéines et une perte d'expression de 10 protéines au sein des lignées par rapport aux GBM primaires. Parmi ces protéines, on retrouve des facteurs de transcription, des protéines issues de gènes suppresseurs de tumeurs ou des protéines du métabolisme cellulaire (Vogel et al. 2005).

Ainsi, le passage de tumeurs primaires en culture cellulaire s'accompagne d'une modification dans l'expression des gènes et donc d'une modification phénotypique. On a donc un biais de sélection dont il faut tenir compte dans les études *in vitro*. C'est pourquoi le travail avec des cellules primaires doit aussi être envisagé à l'avenir, pour la caractérisation des lignées cellulaires de gliomes canins, l'étude de la radiosensibilité et de la virothérapie oncolytique.

5. Perspectives futures

Depuis la mise en place du protocole standard de Stupp en 2005 pour le traitement des GBM (radiochimiothérapie consécutive à une exérèse chirurgicale) (Stupp et al. 2005), les progrès en termes d'amélioration de la médiane de survie se sont révélés insuffisants. De plus, la radiothérapie se heurte à la radiorésistance d'un certain type de cellules qui sont responsables de l'échec thérapeutique (Rycaj, Tang 2014). La recherche sur les VO est une approche thérapeutique novatrice qui entre aujourd'hui dans l'arsenal thérapeutique, avec des essais cliniques de phases II/III conclusifs. Parallèlement à la recherche de nouveaux outils thérapeutiques, l'amélioration de la radiothérapie ouvre de nombreux champs de la recherche, dans lequel s'inscrivent les nanotechnologies. L'apport des nanotechnologies dans la recherche oncolytique connaît un essor fulgurant, dans l'amélioration du diagnostic par imagerie, ou du

traitement antitumoral par délivrance d'agents oncolytiques. Les nanotubes de carbone (NTC) font partie des nanoparticules d'intérêts dans la lutte contre le cancer, en tant qu'agent radiosensibilisant. En effet, différents travaux *in vitro* ont montré que ces éléments pénètrent facilement au sein des cellules tumorales (Neves et al., 2012), et sont aussi responsables d'une augmentation de la proportion de ces cellules en phase G2/M (Fiorito et al., 2014). Or, au cours de cette étude, nous avons pu remarquer que la phase G2/M correspondait à la phase la plus radiosensible du cycle cellulaire (Pawlik, Keyomarsi 2004). Ainsi, une fois la caractérisation des lignées cellulaires de gliomes canins terminées, il semble pertinent d'évaluer le pouvoir radiosensibilisant des NTC sur celles-ci, en parallèle de lignées humaines. Le modèle de GBM canin serait alors un modèle translationnel pertinent dans l'évaluation préclinique de l'association de la RT avec les NTC, en vue d'un développement chez l'homme.

Conclusion générale

A travers cette étude, nous avons pu démontrer que le chien pouvait être un modèle d'étude intéressant dans l'étude translationnelle des gliomes chez l'homme. En effet, l'étude bibliographique a permis de montrer que ce modèle semble plus pertinent que le modèle d'étude actuel, du fait de l'apparition de tumeur spontanée, de la taille conséquente du cerveau du chien qui permet d'utiliser les mêmes outils que les hommes et de l'immunocompétence du modèle canin. Or, il apparaît de plus en plus évident que le système immunitaire tient un rôle essentiel dans le micro-environnement tumoral et dans le développement tumoral. Par ailleurs, la première partie de cette étude expérimentale a démontré une forte similarité entre les caractéristiques de tumeurs gliales humaines et canines. Effectivement, l'ensemble des lignées canines étudiées présentent un temps de doublement, un caryotype, un test de clonalité équivalent aux éléments observés chez l'homme. De même pour la radorésistance, les lignées canines et humaines possèdent les mêmes critères de radorésistance. Enfin, l'expression des antigènes de surface est identique entre ces deux espèces. Ainsi, sur les plans cellulaires, moléculaires et sur le comportement cellulaire vis-à-vis de la thérapie ionisante, une forte similarité entre l'homme et le chien est présente et ces éléments sont en faveur du choix du chien comme modèle d'étude des gliomes chez l'homme. Des études complémentaires portant sur l'injection hétérotopique de cellules tumorales sous-cutanées et sur les profils moléculaires de radorésistance sont nécessaires afin de confirmer l'intérêt porté sur le chien comme nouveau modèle d'étude.

Dans la deuxième partie de cette étude expérimentale, l'étude du virus myxomateux a fourni des données encourageantes dans la virothérapie oncolytique médiée par ce type de virus. En effet, ce poxvirus présente des propriétés oncolytiques étudiées dans la littérature. Les résultats de cette étude ont montré que le virus de la myxomatose est capable de persister au sein de certaines cellules et d'entraîner une récurrence de l'infection des cellules virales. Par ailleurs, l'infection récurrente de certaines lignées de glioblastomes canins n'a pas permis de montrer de différences significatives dans l'infection virale et dans les effets cytopathiques. Ainsi, il ne semble pas apparaître de résistance des cellules tumorales à l'infection virale par le MYXV.

Cette donnée est un élément intéressant dans l'approche de la virothérapie oncolytique car c'est la première fois que la résistance à une infection virale récurrente de cellules tumorales est étudiée.

Cette thèse expérimentale a fourni des résultats intéressants qui nécessitent des investigations supplémentaires afin de confirmer les premiers éléments obtenus. Le chien semble donc être un bon candidat pour l'étude du gliome chez l'homme dans un cadre translationnel et le virus myxomateux est un candidat à privilégier dans l'approche du traitement du cancer par virothérapie oncolytique.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, Stéphane BERTAGNOLI, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CARTIAUX Benjamin** intitulée « **Caractérisation et étude de la radiosensibilité de lignées cellulaires de gliome canin et approche de la virothérapie oncolytique.** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 18 novembre 2016
Professeur Stéphane BERTAGNOLI
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
La Directrice de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Isabelle CHMITELIN



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Président de l'Université
Paul Sabatier
Monsieur Jean-Pierre VINEL

Le Président de l'Université Paul Sabatier
par délégation,
La Vice-Présidente de la CFVU
Régine ANDRE-OBRECHT



M. CARTIAUX Benjamin
a été admis(e) sur concours en : 2011
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2015
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Publications scientifiques

Communication scientifique à des congrès ou colloques

- **Congrès du Collège Européen de Pathologie Vétérinaire (ECVP) et de la Société Européenne de Pathologie Vétérinaire (ESVP), Bologne, Septembre 2016 (Poster) : prix du meilleur poster**

B. Cartiaux, J-B. Tanis, C. Delmas, M. Pumarola, A. Deviers, M. Delverdier, J. Abadie, C. Ibisch, P. Dickinson, G. Mogicato, S. Bertagnoli and E. Moyal-Cohen - Evaluation of the Sensitivity of Characterized Canine Glioblastoma Cell Lines to Radiation Therapy and to the Oncolytic Effect of an Attenuated Myxomavirus Strain

- **12^{èmes} journées du Cancéropôle Grand Sud-Ouest (CGSO), Novembre 2016 :**

B. Cartiaux, J-B. Tanis, C. Delmas, M. Pumarola, A. Deviers, M. Delverdier, J. Abadie, C. Ibisch, P. Dickinson, G. Mogicato, S. Bertagnoli and E. Moyal-Cohen - Évaluation de la sensibilité de cinq lignées de glioblastome canin à la radiothérapie et à l'effet oncolytique d'une souche sauvage atténuée de myxomavirus

Annexes

Annexe 1 : Protocole d'infection par la souche SG33 du MYXV

- 1- Décongeler le virus à température ambiante
- 2- Retirer le milieu de culture des boîtes de culture
- 3- Ajouter l'inoculum viral pur ou dilué dans de l'Opti-MEM complet
- 4- Laisser incuber durant 2 heures, à l'étuve à 37°C sous une atmosphère à 5 % de CO₂
- 5- Agiter toutes les 10 minutes
- 6- Retirer l'inoculum et ajouter de l'Opti-MEM complet en quantité suffisante
- 7- Placer la boîte à l'étuve à 37°C, sous atmosphère enrichie en CO₂ à 5%

Annexe 2 : Protocole d'inclusion d'une culture cellulaire en HistoGel™

- 1- Placer l'HistoGel™ au bain-marie à 66°C
- 2- Décoller mécaniquement les cellules de la boîte de culture à l'aide d'une raclette stérile
- 3- Transférer les cellules dans un tube Falcon stérile de 15ml
- 4- Centrifuger 5 minutes à 400g, puis jeter le surnageant
- 5- Ajouter 10 ml de PBS 1x
- 6- Centrifuger 5 minutes à 400g, puis jeter le surnageant
- 7- Ajouter 10 ml de PBS 1x
- 8- Centrifuger 5 minutes à 400g, puis jeter le surnageant
- 9- Ajouter 1 ml d'éthanol à 70 %, puis transférer la suspension cellulaire dans un tube eppendorf stérile de 1.5ml
- 10- Centrifuger 5 minutes à 400g, puis jeter le surnageant
- 11- Ajouter 50µL d'HistoGel™ et mettre en suspension la culture cellulaire
- 12- Déposer délicatement le mélange sur la mousse d'une cassette
- 13- Décoller délicatement la sphère d'HistoGel™, la recouvrir d'une deuxième mousse, fermer la cassette et la placer dans un pot de formol 10 %.

Annexe 3 : Protocole d'immunohistochimie

- 1- Déparaffiner et hydrater l'échantillon
- 2- Rincer à l'eau distillée
- 3- Inhibition de la peroxydase endogène :
3% H₂O₂ dans de l'eau distillée, 30 minutes sous agitation, à l'obscurité
- 4- Rincer à l'eau courante 30 minutes
- 5- Réaliser le prétraitement pour démasquer les antigènes

- Bain de tampon citraté 0.01 M, à pH6 durant 20 minutes, à 96-98°C puis 30 minutes à température ambiante pour GFAP, DCx, Olig 2, CD133, β 3-tubuline et NeuN
 - Aucun prétraitement pour Vimentine
- 6- Passer à l'eau distillée
 - 7- Rincer au PBS
 - 8- Monter les lames à la verticale
 - 9- Bloquer les unions non-spécifiques durant une heure à température ambiante avec une solution de blocage (SNC [Sérum normal de chèvre] à 30% dans du PBS 1x, pH=7,2, 1 heure à température ambiante)
 - 10- Incubation de l'anticorps primaire en présence de la solution de blocage, une nuit à +4°C Cf. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**
 - 11- Sortir les lames durant 1 heure à température ambiante
 - 12- Réaliser trois rinçages avec du PBS 1x espacés de 5 minutes
 - 13- Laisser incuber le deuxième anticorps avec le Kit En Vision (Dako) 1 heure à température ambiante
 - Lapin pour GFAP, DCx, Olig2, CD133
 - Souris pour β 3-tubuline, NeuN et Vimentine
 - 14- Réaliser trois rinçages avec du PBS 1x espacés de 5 minutes
 - 15- Révéler l'activité peroxydase : DAB kit En Vision (Dako) 10 minutes
 - 16- Rincer à l'eau distillée et démonter les lames
 - 17- Rincer à l'eau courante 10 minutes
 - 18- Colorer à l'hématoxyline de Mayer 3 secondes
 - 19- Rincer à l'eau courante 10 minutes
 - 20- Déshydrater : alcool 96° (2x10minutes), alcool 100°(2x10minutes), Xilol (3x10minutes)
 - 21- Montage de la lame et observation

Annexe 4 : Protocole d'évaluation du temps de doublement

1- Préparation des cellules

Placer DMEM, Trypsine, PBS, SVF, Penicilline/Streptomycine à 37°C

- Retirer le milieu
- Laver avec 3mL PBS à 37°C
- Ajouter 2mL de Trypsine/EDTA par flasque et laisser 5-10 minutes à l'étuve
- Ajouter 5 mL de DMEM complet
- Placer le mélange dans un tube Falcon 15 mL
- Centrifuger 5 min à 1500 rpm
- Vider le surnageant
- Ajouter 5mL de DMEM complet
- Compter les cellules avec cellule de Thomas après dilution 1 :1 dans le bleu trypan :

$$\text{Nombre de cellules} \left(\frac{\text{cellules}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{Nombre de cellules par carré} \times \text{Dilution}}{\text{Nombre de carrés comptés}} \times 2.5 \times 10^5$$

2- Préparation des plaques 6 puits pour le temps de doublement

Pour chaque lignée cellulaire :

- Préparer 30 mL avec $1 \cdot 10^6$ cellules (puits à $100 \cdot 10^3$ cellules/puit)
- Disposer 2mL de la préparation pour chaque lignée cellulaire comme suit :

A $1 \cdot 10^5$ cellules/puit



- Bien identifier les plaques 6 puits : lignée, concentration cellulaire, jour de comptage, date de mise en place

3- Comptage des cellules

Toutes les 24 heures pendant 4 jours :

- Observer les différents puits
- Vider le milieu à l'aide d'une pipette de 5mL
- Laver avec 500 μ L de trypsine à 37°C
- Ajouter 500 μ L de trypsine à 37°C et placer les plaques 6 puits à 37°C pendant 5 minutes à l'étuve
- Ajouter 1.5 mL de milieu DMEM complet
- Compter les cellules après dilution 1 :1 dans du bleu de trypan et reporter les valeurs dans le tableau

Nombre de cellules par puit

$$= \frac{\text{Nombre de cellules sur cellules de Thomas} * 2 * 2 * 2.5 * 10^5}{16}$$

Annexe 5 : Présentation du test de clonalité

- 1- Vider le milieu de culture à l'aide d'une pipette stérile de 10ml
- 2- Laver la boîte de culture avec 2ml de Trypsine à 37°C et le retirer
- 3- Ajouter 2ml de Trypsine à 37°C, et placer la boîte 7 minutes à l'étuve à 37°C, à 5 % de CO₂
- 4- Retirer la trypsine et ajouter 10 ml de DMEM complet
- 5- Réaliser un comptage cellulaire à une dilution 1 : 1 avec du bleu de trypan sur une cellule de Thomas
- 6- Transférer 1500 cellules dans une boîte de culture F25 et compléter à 10ml de DMEM complet. Placer à l'étuve à 37°C, à 5 % de CO₂

Bibliographie

2015 : toujours plus de chats que de chiens en France, [sans date]. *SantéVet* [en ligne]. [Consulté le 19 décembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://www.santevet.com/articles/2015-toujours-plus-de-chats-que-de-chiens-en-france>

AGHI, M., VISTED, T., DEPINHO, R. A. et CHIOCCA, E. A., 2008. Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene*. 2008. Vol. 27, n° 30, pp. 4249–4254.

ALIFIERIS, Constantinos et TRAFALIS, Dimitrios T., 2015. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*. août 2015. Vol. 152, pp. 63-82.

ALLEN PERKINS, MD et LIU, Gerald, 2016. Primary Brain Tumors in Adults: Diagnosis and Treatment. *American family physician* [en ligne]. 2016. [Consulté le 20 décembre 2016]. Disponible à l'adresse : <http://ccfmrp.com/assets/primary-brain-tumors-in-adults.pdf>

ANDTBACKA, R. H. I., KAUFMAN, H. L., COLLICHIO, F., AMATRUDA, T., SENZER, N., CHESNEY, J., DELMAN, K. A., SPITLER, L. E., PUZANOV, I., AGARWALA, S. S., MILHEM, M., CRANMER, L., CURTI, B., LEWIS, K., ROSS, M., GUTHRIE, T., LINETTE, G. P., DANIELS, G. A., HARRINGTON, K., MIDDLETON, M. R., MILLER, W. H., ZAGER, J. S., YE, Y., YAO, B., LI, A., DOLEMAN, S., VANDERWALDE, A., GANSERT, J. et COFFIN, R. S., 2015. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 1 septembre 2015. Vol. 33, n° 25, pp. 2780-2788. DOI 10.1200/JCO.2014.58.3377.

ARMSTRONG, T. S. et GILBERT, M. R., 2012. Practical strategies for management of fatigue and sleep disorders in people with brain tumors. *Neuro-Oncology*. 1 septembre 2012. Vol. 14, n° suppl 4, pp. iv65-iv72.

BAO, Shideng, WU, Qiulian, MCLENDON, Roger E., HAO, Yueling, SHI, Qing, HJELMELAND, Anita B., DEWHIRST, Mark W., BIGNER, Darell D. et RICH, Jeremy N., 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 7 décembre 2006. Vol. 444, n° 7120, pp. 756-760. DOI 10.1038/nature05236.

BARTLETT, David L., LIU, Zuqiang, SATHAIAH, Magesh, RAVINDRANATHAN, Roshni, GUO, Zongbi, HE, Yukai et GUO, Zong Sheng, 2013. Oncolytic viruses as therapeutic cancer vaccines. *Molecular cancer*. 2013. Vol. 12, n° 1, pp. 1.

BENTLEY, R. Timothy, AHMED, Atique U., YANKE, Amy B., COHEN-GADOL, Aaron A. et DEY, Mahua, 2016. Dogs are man's best friend: in sickness and in health. *Neuro-Oncology*. 13 juin 2016. pp. now109.

BENTLEY, R.T., OBER, C.P., ANDERSON, K.L., FEENEY, D.A., NAUGHTON, J.F., OHLFEST, J.R., O'SULLIVAN, M.G., MILLER, M.A., CONSTABLE, P.D. et PLUHAR, G.E., 2013. Canine intracranial gliomas: Relationship between magnetic resonance

imaging criteria and tumor type and grade. *The Veterinary Journal*. novembre 2013. Vol. 198, n° 2, pp. 463-471. DOI 10.1016/j.tvjl.2013.08.015.

BERENS, Michael E., GIESE, Alf, SHAPIRO, Joan R. et COONS, Stephen W., 1999. Allogeneic Astrocytoma In Immune Competent Dogs. *Neoplasia*. juin 1999. Vol. 1, n° 2, pp. 107-112. DOI 10.1038/sj.neo.7900020.

BLUMING, AvrumZ et ZIEGLER, JohnL, 1971. Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. *The Lancet*. 1971. Vol. 298, n° 7715, pp. 105–106.

BOUDREAU, C. E., YORK, D., HIGGINS, R. J., LECOUTEUR, R. A. et DICKINSON, P. J., 2015. Molecular signalling pathways in canine gliomas: Glioma pathways. *Veterinary and Comparative Oncology*. mars 2015. pp. n/a-n/a. DOI 10.1111/vco.12147.

BREITBACH, C. J., ARULANANDAM, R., DE SILVA, N., THORNE, S. H., PATT, R., DANESHMAND, M., MOON, A., ILKOW, C., BURKE, J., HWANG, T.-H., HEO, J., CHO, M., CHEN, H., ANGARITA, F. A., ADDISON, C., MCCART, J. A., BELL, J. C. et KIRN, D. H., 2013. Oncolytic Vaccinia Virus Disrupts Tumor-Associated Vasculature in Humans. *Cancer Research*. 15 février 2013. Vol. 73, n° 4, pp. 1265-1275. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-12-2687.

BUGERT, Joachim J., MELQUIOT, Nadja et KEHM, Roland, 2001. Molluscum contagiosum virus expresses late genes in primary human fibroblasts but does not produce infectious progeny. *Virus genes*. 2001. Vol. 22, n° 1, pp. 27–33.

CAIVANO, R., LOTUMOLO, A., RABASCO, P., ZANDOLINO, A., D'ANTUONO, F., VILLONIO, A., LANCELLOTTI, M. I., MACARINI, L. et CAMMAROTA, A., 2013. 3 Tesla magnetic resonance spectroscopy: cerebral gliomas vs. metastatic brain tumors. Our experience and review of the literature. *International Journal of Neuroscience*. août 2013. Vol. 123, n° 8, pp. 537-543.

CAMUS-BOUCLAINVILLE, Christelle, GRETILLAT, Magalie, PY, Robert, GELFI, Jacqueline, GUÉRIN, Jean-Luc et BERTAGNOLI, Stéphane, 2011. Genome Sequence of SG33 Strain and Recombination between Wild-Type and Vaccine Myxoma Viruses. . avril 2011.

CANDOLFI, Marianela, CURTIN, James F., NICHOLS, W. Stephen, MUHAMMAD, AKM G., KING, Gwendalyn D., PLUHAR, G. Elizabeth, MCNIEL, Elizabeth A., OHLFEST, John R., FREESE, Andrew B., MOORE, Peter F. et OTHERS, 2007. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. *Journal of neuro-oncology*. 2007. Vol. 85, n° 2, pp. 133–148.

CHACKO, Ari George, THOMAS, Santhosh George, BABU, K. Srinivasa, DANIEL, Roy Thomas, CHACKO, Geeta, PRABHU, Krishna, CHERIAN, Varghese et KORULA, Grace, 2013. Awake craniotomy and electrophysiological mapping for eloquent area tumours. *Clinical Neurology and Neurosurgery*. mars 2013. Vol. 115, n° 3, pp. 329-334.

CHAMBLESS, Lola B., KISTKA, Heather M., PARKER, Scott L., HASSAM-MALANI, Laila, MCGIRT, Matthew J. et THOMPSON, Reid C., 2015. The relative value of postoperative versus preoperative Karnofsky Performance Scale scores as a predictor

of survival after surgical resection of glioblastoma multiforme. *Journal of Neuro-Oncology*. janvier 2015. Vol. 121, n° 2, pp. 359-364.

CHAN, S., ROWBOTTOM, L., MCDONALD, R., BJARNASON, G.A., TSAO, M., DANJOUX, C., BARNES, E., POPOVIC, M., LAM, H., DEANGELIS, C. et CHOW, E., 2016. Does the Time of Radiotherapy Affect Treatment Outcomes? A Review of the Literature. *Clinical Oncology* [en ligne]. décembre 2016. [Consulté le 8 janvier 2017]. DOI 10.1016/j.clon.2016.12.005. Disponible à l'adresse : <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0936655516304642>

CHINOT, Olivier L., WICK, Wolfgang, MASON, Warren, HENRIKSSON, Roger, SARAN, Frank, NISHIKAWA, Ryo, CARPENTIER, Antoine F., HOANG-XUAN, Khe, KAVAN, Petr, CERNEA, Dana, BRANDES, Alba A., HILTON, Magalie, ABREY, Lauren et CLOUGHESY, Timothy, 2014. Bevacizumab plus Radiotherapy–Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 20 février 2014. Vol. 370, n° 8, pp. 709-722. DOI 10.1056/NEJMoa1308345.

CHIOCCA, E. Antonio, ABBED, Khalid M., TATTER, Stephen, LOUIS, David N., HOCHBERG, Fred H., BARKER, Fred, KRACHER, Jean, GROSSMAN, Stuart A., FISHER, Joy D., CARSON, Kathryn, ROSENBLUM, Mark, MIKKELSEN, Tom, OLSON, Jeff, MARKERT, James, ROSENFELD, Steven, NABORS, L. Burt, BREM, Steven, PHUPHANICH, Surasak, FREEMAN, Scott, KAPLAN, Rick et ZWIEBEL, James, 2004. A Phase I Open-Label, Dose-Escalation, Multi-Institutional Trial of Injection with an E1B-Attenuated Adenovirus, ONYX-015, into the Peritumoral Region of Recurrent Malignant Gliomas, in the Adjuvant Setting. *Molecular Therapy*. novembre 2004. Vol. 10, n° 5, pp. 958-966. DOI 10.1016/j.ymthe.2004.07.021.

CROSSEN, J. R., GARWOOD, D., GLATSTEIN, E. et NEUWELT, E. A., 1994. Neurobehavioral sequelae of cranial irradiation in adults: a review of radiation-induced encephalopathy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. mars 1994. Vol. 12, n° 3, pp. 627-642.

DARLIX, Amelie, BAUMANN, Cedric, LORGIS, Veronique, GHIRINGHELLI, Francois, BLONSKI, Marie, CHAUFFERT, Bruno, ZOUAOUI, Sonia, PINELLI, Catherine, RECH, Fabien, BEAUCHESNE, Patrick et OTHERS, 2013. Prolonged administration of adjuvant temozolomide improves survival in adult patients with glioblastoma. *Anticancer research*. 2013. Vol. 33, n° 8, pp. 3467–3474.

DE FARIA, Giselle Pinto, DE OLIVEIRA, José Antônio, DE OLIVEIRA, José Gustavo Pugliese, ROMANO, Sérgio de Oliveira, NETO, Vivaldo Moura et MAIA, Raquel Ciivalschi, 2008. Differences in the Expression Pattern of P-Glycoprotein and MRP1 in Low-Grade and High-Grade Gliomas. *Cancer Investigation*. janvier 2008. Vol. 26, n° 9, pp. 883-889.

DEAN, Michael, FOJO, Tito et BATES, Susan, 2005. Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Reviews Cancer*. avril 2005. Vol. 5, n° 4, pp. 275-284.

DEBINSKI, Waldemar, DICKINSON, Peter, ROSSMEISL, John H., ROBERTSON, John et GIBO, Denise M., 2013. New Agents for Targeting of IL-13RA2 Expressed in Primary Human and Canine Brain Tumors. *PLoS ONE*. 16 octobre 2013. Vol. 8, n° 10, pp. e77719. DOI 10.1371/journal.pone.0077719.

DEVIERS, Alexandra, KEN, Soléakhéna, FILLERON, Thomas, ROWLAND, Benjamin, LARUELO, Andrea, CATALAA, Isabelle, LUBRANO, Vincent, CELSIS, Pierre,

BERRY, Isabelle, MOGICATO, Giovanni, COHEN-JONATHAN MOYAL, Elizabeth et LAPRIE, Anne, 2014. Evaluation of the Lactate-to-N-Acetyl-aspartate Ratio Defined With Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging Before Radiation Therapy as a New Predictive Marker of the Site of Relapse in Patients With Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. octobre 2014. Vol. 90, n° 2, pp. 385-393. DOI 10.1016/j.ijrobp.2014.06.009.

DICKINSON, P. J., LECOUTEUR, R. A., HIGGINS, R. J., BRINGAS, J. R., LARSON, R. F., YAMASHITA, Y., KRAUZE, M. T., FORSAYETH, J., NOBLE, C. O., DRUMMOND, D. C., KIRPOTIN, D. B., PARK, J. W., BERGER, M. S. et BANKIEWICZ, K. S., 2010. Canine spontaneous glioma: A translational model system for convection-enhanced delivery. *Neuro-Oncology*. 1 septembre 2010. Vol. 12, n° 9, pp. 928-940. DOI 10.1093/neuonc/noq046.

DICKINSON, Peter J., STURGES, B. K., HIGGINS, R. J., ROBERTS, B. N., LEUTENEGGER, C. M., BOLLEN, A. W. et LECOUTEUR, Richard A., 2008. Vascular endothelial growth factor mRNA expression and peritumoral edema in canine primary central nervous system tumors. *Veterinary Pathology Online*. 2008. Vol. 45, n° 2, pp. 131–139.

DIMOU, L. et GOTZ, M., 2014. Glial Cells as Progenitors and Stem Cells: New Roles in the Healthy and Diseased Brain. *Physiological Reviews*. 1 juillet 2014. Vol. 94, n° 3, pp. 709-737.

DOBSON, J. M., SAMUEL, S., MILSTEIN, H., ROGERS, K. et WOOD, J. L. N., 2002. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of small animal practice*. 2002. Vol. 43, n° 6, pp. 240–246.

DOLECEK, T. A., PROPP, J. M., STROUP, N. E. et KRUCHKO, C., 2012. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-Oncology*. 1 novembre 2012. Vol. 14, n° suppl 5, pp. v1-v49. DOI 10.1093/neuonc/nos218.

DUNN, Gavin P., ANDRONESI, Ovidiu C. et CAHILL, Daniel P., 2013. From genomics to the clinic: biological and translational insights of mutant IDH1/2 in glioma. *Neurosurgical focus*. 2013. Vol. 34, n° 2, pp. E2.

EYLER, C. E. et RICH, J. N., 2008. Survival of the Fittest: Cancer Stem Cells in Therapeutic Resistance and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 10 juin 2008. Vol. 26, n° 17, pp. 2839-2845.

FAN, Xiaohui, SHAO, Li, FANG, Hong, TONG, Weida et CHENG, Yiyu, 2010. Bevacizumab and radiotherapy for the treatment of glioblastoma: brothers in arms or unholy alliance? . 2010.

FERNÁNDEZ, Francisco, DEVIERS, Alexandra, DALLY, Claire, MOGICATO, Giovanni, DELVERDIER, Maxence, CAUZINILLE, Laurent, GNIRS, Kirsten, AÑOR, Sònia, DE LA FUENTE, Cristian, FONDEVILA, Dolors et PUMAROLA, Martí, 2016. Presence of neural progenitors in spontaneous canine gliomas: A histopathological and immunohistochemical study of 20 cases. . mars 2016.

FERTIL, B., DERTINGER, H., COURDI, A. et MALAISE, E. P., 1984. Mean Inactivation Dose: A Useful Concept for Intercomparison of Human Cell Survival Curves. *Radiation Research*. juillet 1984. Vol. 99, n° 1, pp. 73. DOI 10.2307/3576448.

GARCIA-BARROS, Monica et PARIS, Francois, 2003. Tumor Response to Radiotherapy Regulated by Endothelial Cell Apoptosis. *Science*. 2003. Vol. 300, n° 5622, pp. 1152–1155.

GUO, L., DIAL, S., SHI, L., BRANHAM, W., LIU, J., FANG, J.-L., GREEN, B., DENG, H., KAPUT, J. et NING, B., 2011. Similarities and Differences in the Expression of Drug-Metabolizing Enzymes between Human Hepatic Cell Lines and Primary Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition*. 1 mars 2011. Vol. 39, n° 3, pp. 528-538. DOI 10.1124/dmd.110.035873.

HARDEE, M. E., MARCISCANO, A. E., MEDINA-RAMIREZ, C. M., ZAGZAG, D., NARAYANA, A., LONNING, S. M. et BARCELLOS-HOFF, M. H., 2012. Resistance of Glioblastoma-Initiating Cells to Radiation Mediated by the Tumor Microenvironment Can Be Abolished by Inhibiting Transforming Growth Factor-. *Cancer Research*. 15 août 2012. Vol. 72, n° 16, pp. 4119-4129. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-12-0546.

HARDELL, L., CARLBERG, M., SODERQVIST, F., MILD, K. H. et MORGAN, L. L., 2007. Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for >=10 years. *Occupational and Environmental Medicine*. 16 janvier 2007. Vol. 64, n° 9, pp. 626-632.

HEGI, Monika E., DISERENS, Annie-Claire, GORLIA, Thierry, HAMOU, Marie-France, DE TRIBOLET, Nicolas, WELLER, Michael, KROS, Johan M., HAINFELLNER, Johannes A., MASON, Warren, MARIANI, Luigi et OTHERS, 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005. Vol. 352, n° 10, pp. 997–1003.

HERVEY-JUMPER, Shawn L. et BERGER, Mitchel S., 2016. Maximizing safe resection of low- and high-grade glioma. *Journal of Neuro-Oncology*. 12 mai 2016.

HICKOK, Jane T., ROSCOE, Joseph A., MORROW, Gary R., MUSTIAN, Karen, OKUNIEFF, Paul et BOLE, Christopher W., 2005. Frequency, severity, clinical course, and correlates of fatigue in 372 patients during 5 weeks of radiotherapy for cancer. *Cancer*. 15 octobre 2005. Vol. 104, n° 8, pp. 1772-1778.

HIGGINS, Robert J., DICKINSON, Peter J., LECOUTEUR, Richard A., BOLLEN, Andrew W., WANG, Huamin, WANG, Hua, CORELY, Linda J., MOORE, Lynnette M., ZANG, Wei et FULLER, Gregory N., 2010. Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFR α and IGF2BP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *Journal of Neuro-Oncology*. mai 2010. Vol. 98, n° 1, pp. 49-55. DOI 10.1007/s11060-009-0072-5.

HOGLE, James M., 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annual review of microbiology*. 2002. Vol. 56, pp. 677.

HOSTER, Herman A., ZANES, Robert P. et VON HAAM, Emmerich, 1949. Studies in Hodgkin's Syndrome IX. The Association of « Viral » Hepatitis and Hodgkin's Disease (A Preliminary Report). *Cancer research*. 1949. Vol. 9, n° 8, pp. 473–480.

ICHIKI, Yoshinobu, HANAGIRI, Takeshi, TAKENOYAMA, Mitsuhiro, BABA, Tetsuro, NAGATA, Yoshika, MIZUKAMI, Makiko, SO, Tetsuya, SUGAYA, Masakazu, YASUDA, Manabu, URAMORO, Hidetaka et YASUMOTO, Kosei, 2012. Differences in sensitivity to tumor-specific CTLs between primary and metastatic esophageal cancer cell lines

derived from the same patient. *Surgery Today*. mars 2012. Vol. 42, n° 3, pp. 272-279. DOI 10.1007/s00595-011-0083-7.

INOUE, Satoshi, ICHIKAWA, Tomotsugu, KUROZUMI, Kazuhiko, MARUO, Tomoko, ONISHI, Manabu, YOSHIDA, Koichi, FUJII, Kentaro, KAMBARA, Hirokazu, CHIOCCA, E. Antonio et DATE, Isao, 2012. Novel Animal Glioma Models that Separately Exhibit Two Different Invasive and Angiogenic Phenotypes of Human Glioblastomas. *World Neurosurgery*. décembre 2012. Vol. 78, n° 6, pp. 670-682. DOI 10.1016/j.wneu.2011.09.005.

ISHII, Aya, KIMURA, Tokuhiro, SADAHIRO, Hirokazu, KAWANO, Hiroo, TAKUBO, Keiyo, SUZUKI, Michiyasu et IKEDA, Eiji, 2016. Histological Characterization of the Tumorigenic « Peri-Necrotic Niche » Harboring Quiescent Stem-Like Tumor Cells in Glioblastoma. *PLOS ONE*. 22 janvier 2016. Vol. 11, n° 1, pp. e0147366. DOI 10.1371/journal.pone.0147366.

JELLISON, Brian J., FIELD, Aaron S., MEDOW, Joshua, LAZAR, Mariana, SALAMAT, M. Shariar et ALEXANDER, Andrew L., 2004. Diffusion tensor imaging of cerebral white matter: a pictorial review of physics, fiber tract anatomy, and tumor imaging patterns. *American Journal of Neuroradiology*. 2004. Vol. 25, n° 3, pp. 356–369.

JENKINS, E. O., SCHIFF, D., MACKMAN, N. et KEY, N. S., 2010. Venous thromboembolism in malignant gliomas. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. février 2010. Vol. 8, n° 2, pp. 221-227.

JIANG, H., GOMEZ-MANZANO, C., AOKI, H., ALONSO, M. M., KONDO, S., MCCORMICK, F., XU, J., KONDO, Y., BEKELE, B. N., COLMAN, H., LANG, F. F. et FUEYO, J., 2007. Examination of the Therapeutic Potential of Delta-24-RGD in Brain Tumor Stem Cells: Role of Autophagic Cell Death. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 19 septembre 2007. Vol. 99, n° 18, pp. 1410-1414. DOI 10.1093/jnci/djm102.

JIANG, Hong, GOMEZ-MANZANO, Candelaria, ALEMANY, Ramon, MEDRANO, Diana, ALONSO, Marta, BEKELE, B. Nebiyou, LIN, E, CONRAD, Charles C., YUNG, W.K. Alfred et FUEYO, Juan, 2005. Comparative Effect of Oncolytic Adenoviruses with E1 A or E113-55 kDa Deletions in Malignant Gliomas. *Neoplasia*. janvier 2005. Vol. 7, n° 1, pp. 48-56. DOI 10.1593/neo.04391.

JOINER, Kellye S. et SPANGLER, Elizabeth A., 2012. Evaluation of HistoGel™-embedded specimens for use in veterinary diagnostic pathology. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2012. Vol. 24, n° 4, pp. 710–715.

JOSIAH, Darnell T, ZHU, Dongqin, DREHER, Fernanda, OLSON, John, MCFADDEN, Grant et CALDAS, Hannah, 2010. Adipose-derived Stem Cells as Therapeutic Delivery Vehicles of an Oncolytic Virus for Glioblastoma. *Molecular Therapy*. février 2010. Vol. 18, n° 2, pp. 377-385. DOI 10.1038/mt.2009.265.

KAHLERT, Ulf Dietrich, KOCH, Katharina, SUWALA, Abigail Kora, HARTMANN, Rudolf, CHENG, Menglin, MACIACZYK, Donata, WILLBOLD, Dieter, EBERHART, Charles G., GLUNDE, Kristine et MACIACZYK, Jarek, 2015. The effect of neurosphere culture conditions on the cellular metabolism of glioma cells. *Folia Neuropathologica*. 2015. Vol. 3, pp. 219-225. DOI 10.5114/fn.2015.54422.

KEN, Soléakhéna, DEVIERS, Alexandra, FILLERON, Thomas, CATALAA, Isabelle, LOTTERIE, Jean-Albert, KHALIFA, Jonathan, LUBRANO, Vincent, BERRY, Isabelle,

PÉRAN, Patrice, CELSIS, Pierre, MOYAL, Elizabeth Cohen-Jonathan et LAPRIE, Anne, 2015. Voxel-based evidence of perfusion normalization in glioblastoma patients included in a phase I–II trial of radiotherapy/tipifarnib combination. *Journal of Neuro-Oncology*. septembre 2015. Vol. 124, n° 3, pp. 465-473. DOI 10.1007/s11060-015-1860-8.

KERR, Peter J, 2012. Myxomatosis in Australia and Europe: A model for emerging infectious diseases. *Antiviral Research*. mars 2012. Vol. 93, n° 3, pp. 387-415.

KETTENMANN, Helmut, 2013. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*. janvier 2013. Vol. 77, n° 1, pp. 10-18.

KLEIHUES, Paul, BURGER, Peter C. et SCHEITHAUER, Bernd W., 1993. The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology*. 1993. Vol. 3, n° 3.

KLEIHUES, Paul, LOUIS, David N., SCHEITHAUER, Bernd W., RORKE, Lucy B., REIFENBERGER, Guido, BURGER, Peter C. et CAVENEE, Webster K., 2002. The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2002. Vol. 61, n° 3, pp. 215–225.

KREX, D., KLINK, B., HARTMANN, C., VON DEIMLING, A., PIETSCH, T., SIMON, M., SABEL, M., STEINBACH, J. P., HEESE, O., REIFENBERGER, G., WELLER, M., SCHACKERT, G. et FOR THE GERMAN GLIOMA NETWORK, 2007. Long-term survival with glioblastoma multiforme. *Brain*. 1 octobre 2007. Vol. 130, n° 10, pp. 2596-2606.

LANGDON, Simon P, 2004. *Cancer cell culture: methods and protocols* [en ligne]. Totowa, N.J. : Humana Press. [Consulté le 5 janvier 2017]. ISBN 978-1-58829-079-3. Disponible à l'adresse : <http://site.ebrary.com/id/10181489OCLC:54464006>

LAWLER, Sean E., SPERANZA, Maria-Carmela, CHO, Choi-Fong et CHIOCCA, E. Antonio, 2016. Oncolytic Viruses in Cancer Treatment: A Review. *JAMA Oncology*. 21 juillet 2016.

LE, D. T. et JAFFEE, E. M., 2012. Regulatory T-cell Modulation Using Cyclophosphamide in Vaccine Approaches: A Current Perspective. *Cancer Research*. 15 juillet 2012. Vol. 72, n° 14, pp. 3439-3444. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-3912.

LE BOEUF, Fabrice, DIALLO, Jean-Simon, MCCART, J Andrea, THORNE, Steve, FALLS, Theresa, STANFORD, Marianne, KANJI, Femina, AUER, Rebecca, BROWN, Christopher W, LICHTY, Brian D, PARATO, Kelley, ATKINS, Harold, KIRN, David et BELL, John C, 2010. Synergistic Interaction Between Oncolytic Viruses Augments Tumor Killing. *Molecular Therapy*. mai 2010. Vol. 18, n° 5, pp. 888-895. DOI 10.1038/mt.2010.44.

LEBLANC, Amy K., MAZCKO, Christina, BROWN, Diane E., KOEHLER, Jennifer W., MILLER, Andrew D., MILLER, C. Ryan, BENTLEY, R. Timothy, PACKER, Rebecca A., BREEN, Matthew, BOUDREAU, C. Elizabeth, LEVINE, Jonathan M., SIMPSON, R. Mark, HALSEY, Charles, KISSEBERTH, William, ROSSMEISL, John H., DICKINSON, Peter J., FAN, Timothy M., CORPS, Kara, ALDAPE, Kenneth, PUDUVALLI, Vinay, PLUHAR, G. Elizabeth et GILBERT, Mark R., 2016. Creation of an NCI comparative brain tumor consortium: informing the translation of new knowledge from canine to human brain tumor patients. *Neuro-Oncology*. septembre 2016.

LÉVY, S., CHAPET, S. et MAZERON, J.-J., 2014. Prise en charge des gliomes. *Cancer/Radiothérapie*. octobre 2014. Vol. 18, n° 5-6, pp. 461-467. DOI 10.1016/j.canrad.2014.07.147.

LI, J. L., LIU, H. L., ZHANG, X. R., XU, J. P., HU, W. K., LIANG, M., CHEN, S. Y., HU, F. et CHU, D. T., 2009. A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients. *Gene therapy*. 2009. Vol. 16, n° 3, pp. 376–382.

LINDENMANN, Jean et KLEIN, Paul A., 1967. Viral oncolysis: increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *The Journal of experimental medicine*. 1967. Vol. 126, n° 1, pp. 93–108.

LIPSITZ, D., HIGGINS, R. J., KORTZ, G. D., DICKINSON, Peter J., BOLLEN, A. W., NAYDAN, D. K. et LECOUTEUR, Richard A., 2003. Glioblastoma multiforme: clinical findings, magnetic resonance imaging, and pathology in five dogs. *Veterinary Pathology Online*. 2003. Vol. 40, n° 6, pp. 659–669.

LITTLE, M. P., RAJARAMAN, P., CURTIS, R. E., DEVESA, S. S., INSKIP, P. D., CHECK, D. P. et LINET, M. S., 2012. Mobile phone use and glioma risk: comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. . 8 mars 2012.

LIU, J., WENNIER, S., ZHANG, L. et MCFADDEN, G., 2011. M062 Is a Host Range Factor Essential for Myxoma Virus Pathogenesis and Functions as an Antagonist of Host SAMD9 in Human Cells. *Journal of Virology*. 1 avril 2011. Vol. 85, n° 7, pp. 3270-3282.

LORENCE, Robert M., ROOD, Pamela A. et KELLEY, Keith W., 1988. Newcastle disease virus as an antineoplastic agent: induction of tumor necrosis factor- α and augmentation of its cytotoxicity². *Journal of the National Cancer Institute*. 1988. Vol. 80, n° 16, pp. 1305–1312.

LOUIS, David N., OHGAKI, Hiroko, WIESTLER, Otmar D., CAVENEE, Webster K., BURGER, Peter C., JOUVET, Anne, SCHEITHAUER, Bernd W. et KLEIHUES, Paul, 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*. 12 juillet 2007. Vol. 114, n° 2, pp. 97-109.

LOUIS, David N., PERRY, Arie, REIFENBERGER, Guido, VON DEIMLING, Andreas, FIGARELLA-BRANGER, Dominique, CAVENEE, Webster K., OHGAKI, Hiroko, WIESTLER, Otmar D., KLEIHUES, Paul et ELLISON, David W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. juin 2016. Vol. 131, n° 6, pp. 803-820.

LUN, X., ALAIN, T., ZEMP, F. J., ZHOU, H., RAHMAN, M. M., HAMILTON, M. G., MCFADDEN, G., BELL, J., SENGER, D. L. et FORSYTH, P. A., 2010. Myxoma Virus Virotherapy for Glioma in Immunocompetent Animal Models: Optimizing Administration Routes and Synergy with Rapamycin. *Cancer Research*. 15 janvier 2010. Vol. 70, n° 2, pp. 598-608.

LUN, X., 2005. Myxoma Virus Is a Novel Oncolytic Virus with Significant Antitumor Activity against Experimental Human Gliomas. *Cancer Research*. 1 novembre 2005. Vol. 65, n° 21, pp. 9982-9990.

LV, Shunzeng, DAI, Congxin, LIU, Yuting, SHI, Ranran, TANG, Zhenyu, HAN, Mingzhi, BIAN, Ruixiang, SUN, Bowen et WANG, Renzhi, 2015. The Impact of Survivin on Prognosis and Clinicopathology of Glioma Patients: A Systematic Meta-Analysis. *Molecular Neurobiology*. juin 2015. Vol. 51, n° 3, pp. 1462-1467. DOI 10.1007/s12035-014-8823-5.

MAMON, Harvey J., WEN, Patrick Y., BURNS, Anne C. et LOEFFLER, Jay S., 1999. Allergic skin reactions to anticonvulsant medications in patients receiving cranial radiation therapy. *Epilepsia*. 1999. Vol. 40, n° 3, pp. 341–344.

MANNINO, Mariella et CHALMERS, Anthony J., 2011. Radioresistance of glioma stem cells: Intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Molecular Oncology*. août 2011. Vol. 5, n° 4, pp. 374-386. DOI 10.1016/j.molonc.2011.05.001.

MARLIER, D., MAINIL, J., LINDE, A. et VINDEVOGEL, H., 2000. Infectious Agents Associated with Rabbit Pneumonia: Isolation of Amyxomatous Myxoma Virus Strains. *The Veterinary Journal*. mars 2000. Vol. 159, n° 2, pp. 171-178.

MARRAS, L. Connie, GEERTS, William H. et PERRY, James R., 2000. The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma. *Cancer*. 2000. Vol. 89, n° 3, pp. 640–646.

MARUO, Tomoko, ICHIKAWA, Tomotsugu, KANZAKI, Hirotaka, INOUE, Satoshi, KUROSUMI, Kazuhiko, ONISHI, Manabu, YOSHIDA, Koichi, KAMBARA, Hirokazu, OUCHIDA, Mamoru, SHIMIZU, Kenji, TAMARU, Seiji, CHIOCCA, E. Antonio et DATE, Isao, 2013. Proteomics-based analysis of invasion-related proteins in malignant gliomas: Proteomics-based analysis of glioma invasion. *Neuropathology*. juin 2013. Vol. 33, n° 3, pp. 264-275. DOI 10.1111/j.1440-1789.2012.01361.x.

MEYER, Fredric B., BATES, Lisa M., GOERSS, Stephan J., FRIEDMAN, Jonathan A., WINDSCHITL, Wanda L., DUFFY, Joseph R., PERKINS, William J. et O'NEILL, Brian P., 2001. Awake craniotomy for aggressive resection of primary gliomas located in eloquent brain. In : *Mayo clinic proceedings*. Elsevier. 2001. pp. 677–687.

MOSSMAN, Karen, LEE, Siow Fong, BARRY, Michele, BOSHKOV, Lynn et MCFADDEN, Grant, 1996. Disruption of M-T5, a novel myxoma virus gene member of poxvirus host range superfamily, results in dramatic attenuation of myxomatosis in infected European rabbits. *Journal of virology*. 1996. Vol. 70, n° 7, pp. 4394–4410.

MULLINS, Christina Susanne, SCHNEIDER, Björn, STOCKHAMMER, Florian, KROHN, Mathias, CLASSEN, Carl Friedrich et LINNEBACHER, Michael, 2013. Establishment and Characterization of Primary Glioblastoma Cell Lines from Fresh and Frozen Material: A Detailed Comparison. *PLoS ONE*. 7 août 2013. Vol. 8, n° 8, pp. e71070. DOI 10.1371/journal.pone.0071070.

MURUGANANDHAM, Manickam, CLERKIN, Patrick P., SMITH, Brian J., ANDERSON, Carryn M., MORRIS, Ann, CAPIZZANO, Aristides A., MAGNOTTA, Vincent, MCGUIRE, Sarah M., SMITH, Mark C., BAYOUTH, John E. et BUATTI, John M., 2014. 3-Dimensional Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging at 3 Tesla for

Early Response Assessment of Glioblastoma Patients During External Beam Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. septembre 2014. Vol. 90, n° 1, pp. 181-189.

NIKIFOROVA, Marina N. et HAMILTON, Ronald L., 2011. Molecular diagnostics of gliomas. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011. Vol. 135, n° 5, pp. 558–568.

O'DONOGHUE, Liza E., RIVEST, Jason P. et DUVAL, Dawn L., 2011. Journal of Veterinary Diagnostic. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011. Vol. 23, n° 4, pp. 780–785.

OGBOMO, Henry, ZEMP, Franz J., LUN, Xueqing, ZHANG, Jiqing, STACK, Danuta, RAHMAN, Masmudur M., MCFADDEN, Grant, MODY, Christopher H. et FORSYTH, Peter A., 2013. Myxoma Virus Infection Promotes NK Lysis of Malignant Gliomas In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*. 10 juin 2013. Vol. 8, n° 6, pp. e66825. DOI 10.1371/journal.pone.0066825.

OMS | Le virus de l'herpès, [sans date]. WHO [en ligne]. [Consulté le 29 décembre 2016]. Disponible à l'adresse : [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/fr/Les infections par le virus de l'herpès, appelées couramment herpès, sont dues à deux types de virus, le virus *Herpes simplex* de type 1 \(HSV-1\) et le virus *Herpes simplex* de type 2 \(HSV-2\).](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/fr/Les_infections_par_le_virus_de_l'herpes_appelées_couramment_herpès_sont_dues_à_deux_types_de_virus_le_virus_Herpes_simplex_de_type_1_(HSV-1)_et_le_virus_Herpes_simplex_de_type_2_(HSV-2).)

OPPENLANDER, Mark E., WOLF, Andrew B., SNYDER, Laura A., BINA, Robert, WILSON, Jeffrey R., COONS, Stephen W., ASHBY, Lynn S., BRACHMAN, David, NAKAJI, Peter, PORTER, Randall W. et OTHERS, 2014. An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity: clinical article. *Journal of neurosurgery*. 2014. Vol. 120, n° 4, pp. 846–853.

OSTROM, Quinn T., GITTLEMAN, Haley, FULOP, Jordonna, LIU, Max, BLANDA, Rachel, KROMER, Courtney, WOLINSKY, Yingli, KRUCHKO, Carol et BARNHOLTZ-SLOAN, Jill S., [sans date]. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. -*Oncology* [en ligne]. [Consulté le 14 novembre 2016]. DOI 10.1093/neuonc/nov189. Disponible à l'adresse : <http://neuro-oncology.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/neuonc/nov189>

PANET-RAYMOND, Valerie, SOUHAMI, Luis, ROBERGE, David, KAVAN, Petr, SHAKIBNIA, Lily, MUANZA, Thierry, LAMBERT, Christine, LEBLANC, Richard, DEL MAESTRO, Rolando, GUIOT, Marie-Christine et SHENOUDA, George, 2009. Accelerated Hypofractionated Intensity-Modulated Radiotherapy With Concurrent and Adjuvant Temozolomide for Patients With Glioblastoma Multiforme: A Safety and Efficacy Analysis. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*. février 2009. Vol. 73, n° 2, pp. 473-478. DOI 10.1016/j.ijrobp.2008.04.030.

PARK, Se Hoon, BREITBACH, Caroline J, LEE, Jeeyun, PARK, Joon Oh, LIM, Ho Yeong, KANG, Won Ki, MOON, Anne, MUN, Jae-Hee, SOMMERMANN, Erica M, MARURI AVIDAL, Liliana, PATT, Rick, PELUSIO, Adina, BURKE, James, HWANG, Tae-Ho, KIRN, David et PARK, Young Suk, 2015. Phase 1b Trial of Biweekly Intravenous Pexa-Vec (JX-594), an Oncolytic and Immunotherapeutic Vaccinia Virus in Colorectal Cancer. *Molecular Therapy*. septembre 2015. Vol. 23, n° 9, pp. 1532-1540. DOI 10.1038/mt.2015.109.

- PAWLIK, Timothy M. et KEYOMARSI, Khandan, 2004. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. juillet 2004. Vol. 59, n° 4, pp. 928-942.
- PECORA, A. L., 2002. Phase I Trial of Intravenous Administration of PV701, an Oncolytic Virus, in Patients With Advanced Solid Cancers. *Journal of Clinical Oncology*. 1 mai 2002. Vol. 20, n° 9, pp. 2251-2266. DOI 10.1200/JCO.2002.08.042.
- PELLETIER, Guy, VERHOEF, Marja J., KHATRI, Nasreen et HAGEN, Neil, 2002. Quality of life in brain tumor patients: the relative contributions of depression, fatigue, emotional distress, and existential issues. *Journal of Neuro-oncology*. 2002. Vol. 57, n° 1, pp. 41–49.
- PERRY, James R., 2012. Thromboembolic disease in patients with high-grade glioma. *Neuro-oncology*. 2012. Vol. 14, n° suppl 4, pp. iv73–iv80.
- PRESTWICH, Robin J., ERRINGTON, Fiona, HARRINGTON, Kevin J., PANDHA, Hardev S., SELBY, Peter et MELCHER, Alan, 2008. Oncolytic viruses: do they have a role in anti-cancer therapy? *Clinical Medicine Insights. Oncology*. 2008. Vol. 2, pp. 83.
- PRUITT, Amy A., 2011. Medical Management of Patients With Brain Tumors. *Current Treatment Options in Neurology*. août 2011. Vol. 13, n° 4, pp. 413-426.
- RAINOV, N. G., KOCH, S., SENA-ESTEVEZ, M. et BERENS, M. E., 2000. Characterization of a canine glioma cell line as related to established experimental brain tumor models. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2000. Vol. 59, n° 7, pp. 607–613.
- REBETZ, Johan, TIAN, Dongping, PERSSON, Annette, WIDEGREN, Bengt, SALFORD, Leif G., ENGLUND, Elisabet, GISSELSSON, David et FAN, Xiaolong, 2008. Glial Progenitor-Like Phenotype in Low-Grade Glioma and Enhanced CD133-Expression and Neuronal Lineage Differentiation Potential in High-Grade Glioma. *PLoS ONE*. 9 avril 2008. Vol. 3, n° 4, pp. e1936. DOI 10.1371/journal.pone.0001936.
- REITMAN, Zachary J., OLBY, Natasha J., MARIANI, Christopher L., THOMAS, Rachael, BREEN, Matthew, BIGNER, Darell D., MCLENDON, Roger E. et YAN, Hai, 2010. IDH1 and IDH2 hotspot mutations are not found in canine glioma. *International Journal of Cancer*. 1 juillet 2010. Vol. 127, n° 1, pp. 245-246. DOI 10.1002/ijc.25017.
- REYA, Tannishtha, MORRISON, Sean J., CLARKE, Michael F. et WEISSMAN, Irving L., 2001. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *nature*. 2001. Vol. 414, n° 6859, pp. 105–111.
- RIDOLA, Vita, BARONE, Giuseppe, LAZZARESCHI, Ilaria, RUGGIERO, Antonio, RIZZO, Daniela et RICCARDI, Riccardo, 2011. Feasibility study of 21-day-on/7-day-off temozolomide in children with brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*. mai 2011. Vol. 103, n° 1, pp. 147-153.
- ROBERTS, Kim L. et SMITH, Geoffrey L., 2008. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in Microbiology*. octobre 2008. Vol. 16, n° 10, pp. 472-479. DOI 10.1016/j.tim.2008.07.009.
- RUDA, R., BELLO, L., DUFFAU, H. et SOFFIETTI, R., 2012. Seizures in low-grade gliomas: natural history, pathogenesis, and outcome after treatments. *Neuro-*

Oncology. 1 septembre 2012. Vol. 14, n° suppl 4, pp. iv55-iv64. DOI 10.1093/neuonc/nos199.

RUSSELL, Stephen J, PENG, Kah-Whye et BELL, John C, 2012. Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*. 10 juillet 2012. Vol. 30, n° 7, pp. 658-670.

RYCAJ, Kiera et TANG, Dean G., 2014. Cancer stem cells and radioresistance. *International Journal of Radiation Biology*. août 2014. Vol. 90, n° 8, pp. 615-621. DOI 10.3109/09553002.2014.892227.

SAKALA, Isaac G., CHAUDHRI, Geeta, SCALZO, Anthony A., ELDI, Preethi, NEWSOME, Timothy P., BULLER, Robert M. et KARUPIAH, Gunasegaran, 2015. Evidence for Persistence of Ectromelia Virus in Inbred Mice, Recrudescence Following Immunosuppression and Transmission to Naïve Mice. *PLOS Pathogens*. 23 décembre 2015. Vol. 11, n° 12, pp. e1005342. DOI 10.1371/journal.ppat.1005342.

SCHIFF, D., LEE, E. Q., NAYAK, L., NORDEN, A. D., REARDON, D. A. et WEN, P. Y., 2015. Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment. *Neuro-Oncology*. 1 avril 2015. Vol. 17, n° 4, pp. 488-504.

SCHIFFMAN, Joshua D. et BREEN, Matthew, 2015. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 19 juillet 2015. Vol. 370, n° 1673, pp. 20140231. DOI 10.1098/rstb.2014.0231.

SCHIRRMACHER, V., GRIESBACH, A., AHLERT, T. et OTHERS, 2001. Antitumor effects of Newcastle Disease Virus in vivo: local versus systemic effects. *International journal of oncology*. 2001. Vol. 18, n° 5, pp. 945–952.

SCHWARTZBAUM, J. A., HUANG, K., LAWLER, S., DING, B., YU, J. et CHIOCCA, E. A., 2010. Allergy and inflammatory transcriptome is predominantly negatively correlated with CD133 expression in glioblastoma. . 2010.

SETOGUCHI, Takao et KONDO, Toru, 2004. Nuclear export of OLIG2 in neural stem cells is essential for ciliary neurotrophic factor–induced astrocyte differentiation. *The Journal of Cell Biology*. 27 septembre 2004. Vol. 166, n° 7, pp. 963-968. DOI 10.1083/jcb.200404104.

SINGLA, Navneet, AGGARWAL, Ashish, VYAS, Sameer, SANGHVI, Ankur, SALUNKE, Pravin et GARG, Ravi, 2016. Glioblastoma Multiforme with Hemorrhage Mimicking an Aneurysm: Lessons Learnt. *Annals of Neurosciences*. 2016. Vol. 23, n° 4, pp. 263-265. DOI 10.1159/000449488.

SMITH, Justin S. et JENKINS, Robert B., 2000. Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front Biosci*. 2000. Vol. 5, n° 1, pp. 213–231.

SNYDER, Jessica M., SHOFER, Frances S., WINKLE, Thomas J. et MASSICOTTE, Christiane, 2006. Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986–2003). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2006. Vol. 20, n° 3, pp. 669–675.

SONG, R.B., VITE, C.H., BRADLEY, C.W. et CROSS, J.R., 2013. Postmortem Evaluation of 435 Cases of Intracranial Neoplasia in Dogs and Relationship of

- Neoplasm with Breed, Age, and Body Weight. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. septembre 2013. Vol. 27, n° 5, pp. 1143-1152.
- SPENCER, Drew A, YOUNG, Jacob S, KANOJIA, Deepak, KIM, Julius W, POLSTER, Sean P, MURPHY, Jason P et LESNIAK, Maciej S, 2015. Unlocking the promise of oncolytic virotherapy in glioma: combination with chemotherapy to enhance efficacy. *Therapeutic Delivery*. avril 2015. Vol. 6, n° 4, pp. 453-468.
- SPUGNINI, Enrico P., THRALL, Donald E., PRICE, G. Sylvester, SHARP, Nicholas J., MUNANA, Karen et PAGE, Rodney L., 2000. Primary irradiation of canine intracranial masses. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 2000. Vol. 41, n° 4, pp. 377–380.
- STANFORD, Marianne M., WERDEN, Steven J. et MCFADDEN, Grant, 2007. Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Veterinary Research*. mars 2007. Vol. 38, n° 2, pp. 299-318. DOI 10.1051/vetres:2006054.
- STOICA, G., KIM, H.-T., HALL, D. G. et COATES, J. R., 2004. Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Veterinary Pathology Online*. 2004. Vol. 41, n° 1, pp. 10–19.
- STOICA, G., LUNGU, G., MARTINI-STOICA, H., WAGHELA, S., LEVINE, J. et SMITH, R., 2009. Identification of Cancer Stem Cells in Dog Glioblastoma. *Veterinary Pathology*. 1 mai 2009. Vol. 46, n° 3, pp. 391-406. DOI 10.1354/vp.08-VP-0218-S-FL.
- STOJDL, David F., LICHTY, Brian, KNOWLES, Shane, MARIUS, Ricardo, ATKINS, Harold, SONENBERG, Nahum et BELL, John C., 2000. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nature medicine*. 2000. Vol. 6, n° 7, pp. 821–825.
- STUART, J. M., 2003. A Gene-Coexpression Network for Global Discovery of Conserved Genetic Modules. *Science*. 10 octobre 2003. Vol. 302, n° 5643, pp. 249-255. DOI 10.1126/science.1087447.
- STUMMER, Walter, PICHLMEIER, Uwe, MEINEL, Thomas, WIESTLER, Otmar Dieter, ZANELLA, Friedhelm, REULEN, Hans-Jürgen, GROUP, ALA-Glioma Study et OTHERS, 2006. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *The lancet oncology*. 2006. Vol. 7, n° 5, pp. 392–401.
- STUPP, R., BRADA, M., VAN DEN BENT, M. J., TONN, J.- C., PENTHEROUDAKIS, G. et ON BEHALF OF THE ESMO GUIDELINES WORKING GROUP, 2014. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 1 septembre 2014. Vol. 25, n° suppl 3, pp. iii93-iii101. DOI 10.1093/annonc/mdu050.
- STUPP, Roger, MASON, Warren P., VAN DEN BENT, Martin J., WELLER, Michael, FISHER, Barbara, TAPHOORN, Martin JB, BELANGER, Karl, BRANDES, Alba A., MAROSI, Christine, BOGDAHN, Ulrich et OTHERS, 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. 2005. Vol. 352, n° 10, pp. 987–996.

STYLLI, Stanley S., LUWOR, Rodney B., WARE, Thomas M.B., TAN, Fiona et KAYE, Andrew H., 2015. Mouse models of glioma. *Journal of Clinical Neuroscience*. avril 2015. Vol. 22, n° 4, pp. 619-626.

SULMAN, Erik P., ISMAILA, Nofisat, ARMSTRONG, Terri S., TSIEN, Christina, BATCHELOR, Tracy T., CLOUGHESY, Tim, GALANIS, Evanthia, GILBERT, Mark, GONDI, Vinai, LOVELY, Mary et OTHERS, 2016. Radiation Therapy for Glioblastoma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. 2016. pp. JCO–2016.

TESNIERE, Antoine, APETOH, Lionel, GHIRINGHELLI, Francois, JOZA, Nicholas, PANARETAKIS, Theocharis, KEPP, Oliver, SCHLEMMER, Frederic, ZITVOGEL, Laurence et KROEMER, Guido, 2008. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Current Opinion in Immunology*. octobre 2008. Vol. 20, n° 5, pp. 504-511. DOI 10.1016/j.coi.2008.05.007.

THOMAS, Rachael, DUKE, Shannon E., WANG, Huixia J., BREEN, Tessa E., HIGGINS, Robert J., LINDER, Keith E., ELLIS, Peter, LANGFORD, Cordelia F., DICKINSON, Peter J., OLBY, Natasha J. et BREEN, Matthew, 2009. 'Putting our heads together': insights into genomic conservation between human and canine intracranial tumors. *Journal of Neuro-Oncology*. septembre 2009. Vol. 94, n° 3, pp. 333-349. DOI 10.1007/s11060-009-9877-5.

TRIEBEL, Kristen L., MARTIN, Roy C., NABORS, Louis B. et MARSON, Daniel C., 2009. Medical decision-making capacity in patients with malignant glioma. *Neurology*. 2009. Vol. 73, n° 24, pp. 2086–2092.

TRUVÉ, Katarina, DICKINSON, Peter, XIONG, Anqi, YORK, Daniel, JAYASHANKAR, Kartika, PIELBERG, Gerli, KOLTOOKIAN, Michele, MURÉN, Eva, FUXELIUS, Hans-Henrik, WEISHAUP, Holger, SWARTLING, Fredrik J., ANDERSSON, Göran, HEDHAMMAR, Åke, BONGCAM-RUDLOFF, Erik, FORSBERG-NILSSON, Karin, BANNASCH, Danika et LINDBLAD-TOH, Kerstin, 2016. Utilizing the Dog Genome in the Search for Novel Candidate Genes Involved in Glioma Development—Genome Wide Association Mapping followed by Targeted Massive Parallel Sequencing Identifies a Strongly Associated Locus. *PLOS Genetics*. 12 mai 2016. Vol. 12, n° 5, pp. e1006000. DOI 10.1371/journal.pgen.1006000.

VILLANO, J. Lee, SEERY, Tara E. et BRESSLER, Linda R., 2009. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. septembre 2009. Vol. 64, n° 4, pp. 647-655.

VOGEL, Timothy W., ZHUANG, Zhengping, LI, Jie, OKAMOTO, Hiroaki, FURUTA, Makoto, LEE, Youn-Soo, ZENG, Weifen, OLDFIELD, Edward H., VORTMEYER, Alexander O. et WEIL, Robert J., 2005. Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*. 2005. Vol. 11, n° 10, pp. 3624–3632.

WANG, Fuan, GAO, Xiujuan, BARRETT, John W., SHAO, Qing, BARTEE, Eric, MOHAMED, Mohamed R., RAHMAN, Masmudur, WERDEN, Steve, IRVINE, Timothy, CAO, Jingxin, DEKABAN, Gregory A. et MCFADDEN, Grant, 2008. RIG-I Mediates the Co-Induction of Tumor Necrosis Factor and Type I Interferon Elicited by Myxoma Virus in Primary Human Macrophages. *PLoS Pathogens*. 11 juillet 2008. Vol. 4, n° 7, pp. e1000099. DOI 10.1371/journal.ppat.1000099.

WANG, Fuan, MA, Yiyue, BARRETT, John W, GAO, Xiujuan, LOH, Joy, BARTON, Erik, VIRGIN, Herbert W et MCFADDEN, Grant, 2004. Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nature Immunology*. décembre 2004. Vol. 5, n° 12, pp. 1266-1274. DOI 10.1038/ni1132.

WERDEN, S. J. et MCFADDEN, G., 2010. Pharmacological Manipulation of the Akt Signaling Pathway Regulates Myxoma Virus Replication and Tropism in Human Cancer Cells. *Journal of Virology*. 1 avril 2010. Vol. 84, n° 7, pp. 3287-3302. DOI 10.1128/JVI.02020-09.

WERDEN, Steven J. et MCFADDEN, Grant, 2008. The role of cell signaling in poxvirus tropism: The case of the M-T5 host range protein of myxoma virus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. janvier 2008. Vol. 1784, n° 1, pp. 228-237. DOI 10.1016/j.bbapap.2007.08.001.

WESTPHAL, Manfred, HILT, Dana C., BORTEY, Enoch, DELAVault, Patrick, OLIVARES, Robert, WARNKE, Peter C., WHITTLE, Ian R., JÄÄSKELÄINEN, Juha et RAM, Zvi, 2003. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-oncology*. 2003. Vol. 5, n° 2, pp. 79–88.

WILLIAMS, Kent, AUSTRALIA, DEPARTMENT OF PRIMARY INDUSTRIES AND ENERGY, BUREAU OF RESOURCE SCIENCES, CSIRO (AUSTRALIA) et DIVISION OF WILDLIFE AND ECOLOGY, 1995. *Managing vertebrate pests: rabbits*. Canberra : Australian Govt. Pub. Service. OCLC: 153977337

WILSON, Robert J., THOMAS, Chris D., FOX, Richard, ROY, David B. et KUNIN, William E., 2004. Spatial patterns in species distributions reveal biodiversity change. *Nature*. 18 novembre 2004. Vol. 432, n° 7015, pp. 393-396. DOI 10.1038/nature03031.

WRENSCH, Margaret, LEE, Marion, MIKE, Rei, NEWMAN, Beth, BARGAR, Geoffrey, DAVIS, Richard, WIENCKE, John et NEUHAUS, John, 1997. Familial and personal medical history of cancer and nervous system conditions among adults with glioma and controls. *American Journal of Epidemiology*. 1997. Vol. 145, n° 7, pp. 581–593.

YANG, Li, PANG, Yanli et MOSES, Harold L., 2010. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology*. juin 2010. Vol. 31, n° 6, pp. 220-227. DOI 10.1016/j.it.2010.04.002.

YORK, D., HIGGINS, R. J., LECOULTEUR, R. A., WOLFE, A. N., GRAHN, R., OLBY, N., CAMPBELL, M. et DICKINSON, P. J., 2012. TP53 Mutations in Canine Brain Tumors. *Veterinary Pathology*. septembre 2012. Vol. 49, n° 5, pp. 796-801. DOI 10.1177/0300985811424734.

YOUNG, Richard M., JAMSHIDI, Aria, DAVIS, Gregory et SHERMAN, Jonathan H., 2015. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of translational medicine*. 2015. Vol. 3, n° 9.

ZANGARI, M., FINK, L. M., ELICE, F., ZHAN, F., ADCOCK, D. M. et TRICOT, G. J., 2009. Thrombotic Events in Patients With Cancer Receiving Antiangiogenesis Agents. *Journal of Clinical Oncology*. 10 octobre 2009. Vol. 27, n° 29, pp. 4865-4873.

ZHANG, Bin, 2008. Targeting the stroma by T cells to limit tumor growth. *Cancer research*. 2008. Vol. 68, n° 23, pp. 9570–9573.

ZHANG, H., LIU, N., GAO, S., HU, X., ZHAO, W., TAO, R., CHEN, Z., ZHENG, J., SUN, X., XU, L., LI, W., YU, J. et YUAN, S., 2016. Can an 18F-ALF-NOTA-PRGD2 PET/CT Scan Predict Treatment Sensitivity to Concurrent Chemoradiotherapy in Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma? *Journal of Nuclear Medicine*. 1 avril 2016. Vol. 57, n° 4, pp. 524-529. DOI 10.2967/jnumed.115.165514.

ZHANG, J. G., EGUCHI, J., KRUSE, C. A., GOMEZ, G. G., FAKHRAI, H., SCHROTER, S., MA, W., HOA, N., MINEV, B., DELGADO, C., WEPSIC, H. T., OKADA, H. et JADUS, M. R., 2007. Antigenic Profiling of Glioma Cells to Generate Allogeneic Vaccines or Dendritic Cell-Based Therapeutics. *Clinical Cancer Research*. 15 janvier 2007. Vol. 13, n° 2, pp. 566-575. DOI 10.1158/1078-0432.CCR-06-1576.

ZHAO, Jiuda, DU, Feng, LUO, Yang, SHEN, Guoshuang, ZHENG, Fangchao et XU, Binghe, 2015. The emerging role of hypoxia-inducible factor-2 involved in chemo/radioresistance in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews*. juillet 2015. Vol. 41, n° 7, pp. 623-633. DOI 10.1016/j.ctrv.2015.05.004.

ZOU, Weiping, 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer*. avril 2005. Vol. 5, n° 4, pp. 263-274. DOI 10.1038/nrc1586.

Caractérisation et étude de la radiosensibilité de lignées cellulaires de gliome canin et approche de la virothérapie oncolytique

Résumé :

Les gliomes représentent les tumeurs primaires les plus fréquentes du système nerveux central avec le pronostic le plus mauvais, malgré un traitement agressif et multimodal. De nouvelles thérapies sont donc à l'étude afin d'améliorer la médiane de survie des patients. Le virus myxomateux est un virus oncolytique dont l'efficacité envers les gliomes chez l'homme a été démontrée. Le modèle d'étude privilégié pour les gliomes est le rongeur, bien qu'il présente un certain nombre de limites, absentes chez le chien. Cette étude vise donc à évaluer le modèle canin en caractérisant 5 lignées cellulaires de gliome canin et à étudier la capacité oncolytique du virus myxomateux sur ces cellules.

L'étude de ces 5 lignées cellulaires canines a montré de nombreuses analogies entre le chien et l'homme. La morphologie des cellules est identique, de même que le temps de doublement, le test de clonalité et le caryotype. L'étude immunohistochimique des protéines de surface révèle aussi une similarité étroite. Les cellules gliales canines et humaines ont un profil de radiosensibilité similaire. Par ailleurs, l'infection récurrente de ces différentes lignées par la souche SG33 du MYXV présente une efficacité oncolytique proche de 100 % *in vitro* et l'absence de résistance à l'infection par ce poxvirus. Le modèle canin et le virus myxomateux ont fourni des résultats intéressants, qui en font des éléments d'intérêt dans l'étude des gliomes.

Mots clés : virus myxomateux, gliome, modèle chien, radiosensibilité.

Characterization and Study of Canine Glioma Cell Lines Radiosensitivity and Approach to Oncolytic Virotherapy

Abstract:

Despite several aggressive treatments, gliomas represent the most frequent brain tumor with the worst prognostic associated. To enhance median survival, researchers are looking for new therapeutics such as oncolytic viruses. Myxoma virus is one of oncolytic virus whose efficiency against human gliomas has already been studied. Murine model is the animal model studied for glioma, though some limits exist: dogs do not present such problems. Consequently, the aim of this study is to evaluate canine model by giving characteristics of 5 canine glioma cell lines and to evaluate oncolytic capacity of myxoma virus upon these cells.

Study of these 5 canine cell lines shows numerous analogies between man and dog. Cell morphology is identical, such as doubling time, clonality test and karyotype. Immunohistochemistry study of surface proteins reveals a close similarity. Radiosensitivity profile of glial cells between human and dog is alike. Recurrent infection of different cell lines by SG33 strain of myxomavirus offers an oncolytic efficiency close to 100% and a lack of resistance to the infection. Canine model and myxomavirus give us some interesting results which are elements of interest in the study of gliomas.

Key words: Myxoma Virus, Glioma, Canine Model, Radiosensitivity