Conséquences de l'érythropoiétine recombinante humaine sur l'hypoxie tumorale et l'efficacité de la radiothérapie sur deux gliomes malins humains xénogregreffés

Sophie Pinel

▶ **To cite this version:**

Sophie Pinel. Conséquences de l'érythropoiétine recombinante humaine sur l'hypoxie tumorale et l'efficacité de la radiothérapie sur deux gliomes malins humains xénogregreffés. Sciences pharmaceutiques. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2004. Français. NNT : 2004NAN12505 . tel-01777288

HAL Id: tel-01777288

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777288

Submitted on 24 Apr 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

2004

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE-SANTE-ENVIRONNEMENT"

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 7 Juin 2004

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I

Mention SCIENCES DU MEDICAMENT

par **Sophie PINEL**

Née le **21 Janvier 1976**

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies de Pharmacologie Clinique

CONSEQUENCES DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR L'HYPOXIE TUMORALE ET L'EFFICACITE DE LA RADIOTHERAPIE SUR DEUX GLIOMES MALINS HUMAINS XENOGREFFES

D6 3e536

MEMBRES DU JURY

Juges :
- Mr le Professeur P. CHASTAGNER — Directeur de thèse
- Mme le Docteur M. BARBERI-HEYOB — Co-Directrice de thèse
- Mme le Docteur E. COHEN-JONATHAN MOYAL
- Mme le Docteur G. GRIFFON-ETIENNE

Rapporteurs :
- Mr le Professeur A. TAGHIAN
- Mr le Professeur P. VERRELLE

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Pascal Chastagner,

Malgré ma peur des souris, vous avez choisi de me faire confiance et avez accepté de diriger cette thèse. Vous m'avez toujours écoutée avec une oreille attentive, et ce, en dépit de votre emploi du temps chargé. Par vos qualités humaines, et par vos compétences médicales, scientifiques et pédagogiques, vous m'avez beaucoup appris.
Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de ma profonde reconnaissance et de toute mon estime.

Madame le Docteur Muriel Barberi-Heyob,

Je souhaiterais vous remercier à la hauteur de tout ce que vous avez fait pour moi, mais cette page n'y suffirait pas. Je vous dirai donc simplement «Merci» pour l'encadrement de ce travail et surtout, pour tout ce que vous m'avez apporté, bien au-delà du travail.....

Messieurs les Professeurs Alphonse Taghian et Pierre Verrelle,

Je tiens à vous exprimer mes sincères remerciements pour l'enthousiasme avec lequel vous avez accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, malgré vos nombreuses obligations. Je vous prie de croire en ma haute considération.

Madame le Docteur Geneviève Griffon-Etienne,

Même si je n'ai pas eu l'occasion de vous connaître lors de votre passage au CAV, votre parcours, qui m'a longuement été rapporté par Muriel, est pour moi un exemple. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail.

Madame le Docteur Elizabeth Moyal,

Tu as accueilli l'idée d'une collaboration autour de l'hypoxie et de l'EPO avec beaucoup d'enthousiasme. C'est avec ce même enthousiasme que tu as accepté, il y a deux ans, de juger ma thèse de Doctorat en Pharmacie. Aujourd'hui encore, tu acceptes de participer à ce jury. Je te remercie vivement pour l'intérêt que tu portes à mon travail.

Monsieur le Docteur Jean-Louis Merlin,

Voilà exactement 5 ans que vous avez chaleureusement accepté de m'accueillir dans votre laboratoire. C'est grâce à vous que, malgré un sujet à part, je suis parvenue à m'intégrer aussi aisément dans l'équipe. Vos conseils, votre soutien, vos encouragements et la confiance que vous m'avez accordée ont été pour moi un moteur, et m'ont permis d'oublier la distance qui me séparait de Toulouse. Pour tout cela, je vous remercie sincèrement.

Monsieur le Professeur Plénat

Tout d'abord, je tiens à vous remercier pour m'avoir donné l'occasion de m'initier aux techniques d'immunohistochimie. Mais, je souhaiterais surtout vous remercier car vos compétences et vos conseils m'ont été précieux tout au long de la réalisation de ce travail.

Carole,

Quand je suis arrivée au laboratoire, le seul matériel que je maîtrisais était le stylo et la feuille de papier. Vous avez eu la patience et la gentillesse de tout m'apprendre, du simple maniement de la pipette jusqu'aux techniques de biologie moléculaire. Votre rigueur et votre goût du travail bien fait seront toujours pour moi un exemple. Un immense merci.

Stéphanie et Marie-Laure,

Stagiaires exemplaires, vous avez largement contribué à l'avancée de ce travail. Merci pour votre rigueur, votre engouement, votre efficacité et votre sympathie.

Tous les membres du Laboratoire de Recherche en Oncologie du Centre A. Vautrin

Ces quatre années passées en votre compagnie ont été pour moi une belle aventure. Sachez que votre accueil sympathique et votre soutien permanent m'ont aidée à concrétiser ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à :

Monsieur le Professeur Guillemin

En m'autorisant à travailler dans le laboratoire du Centre Alexis Vautrin, vous avez rendu possible la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions. Veuillez trouver ici, l'expression de ma reconnaissance et de toute ma considération.

***Messieurs les Docteurs Christian Marchal et Alain Noël**, toujours disponibles et enthousiastes lorsque j'ai eu besoin d'irradier mes souris sans poil ou mes boîtes de cellules.*

Madame le Docteur Christine Toulas et toute l'équipe de radiobiologie de l'Unité INSERM U563

Grâce à votre accueil chaleureux et sympathique, mon séjour à Toulouse fut une expérience très enrichissante et très positive.
En particulier, un grand merci à toi, Caroline, pour ton aide, tes conseils et ta disponibilité.

Les membres du Laboratoire de d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire de la Faculté de Médecine et du Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU de Nancy

Je tenais à vous remercier pour votre participation active à ce travail, pour votre efficacité et votre savoir-faire qui m'ont beaucoup aidée.

A Bertrand,

Cette thèse est aussi un peu la tienne...Je te la dédie...

A mes parents,

Sans vous, je ne serais jamais parvenue jusqu'à l'écriture de ces pages...

A mes amis....

Vous qui répondez toujours présents...

Mesdemoiselles les souris nude,

Si Mickey vous avait connues, comme moi, il aurait appris à vous apprécier. Minnie lui aurait alors semblé bien fade à vos côtés.....

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 3

LES GLIOMES MALINS 3

LA RADIOTHERAPIE 10

L'HYPOXIE TUMORALE 22

L'ERYTHROPOIETINE 63

PARTIE EXPERIMENTALE 88

OBJECTIFS DE L'ETUDE 88

MATERIEL ET METHODES 89

RESULTATS ET DISCUSSION 119

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 173

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 176

ANNEXES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les gliomes malins de haut grade sont caractérisés par la présence de zones d'hypoxie, voire d'anoxie, résultant initialement d'une néo-vascularisation inadaptée, tant sur le plan structural que fonctionnel *(1)*. Différents facteurs associés (tabac, diminution des capacités respiratoires, anémie,...) peuvent secondairement aggraver l'hypoxie tumorale.

Fréquemment rencontrée chez les patients atteints de pathologie néoplasique, l'anémie induit, par diminution du transport de l'oxygène, une altération de la disponibilité en oxygène pour les tissus et constitue l'une des principales causes aggravantes de l'hypoxie tumorale. Des études cliniques récentes ont montré une relation étroite entre la diminution du taux d'hémoglobine et celle de la pression partielle en oxygène intratumorale *(2, 3)*.

Il est désormais établi que l'hypoxie tumorale favorise la prolifération et l'agressivité tumorale : les tumeurs les plus hypoxiques présentent une plus grande propension à l'invasion locale et à former des métastases à distance *(4, 5)*. L'hypoxie tumorale constitue également un facteur majeur de résistance aux traitements anticancéreux. Elle limite principalement l'efficacité de la radiothérapie. Ainsi, il a été montré *in vitro* que la dose de radiations ionisantes nécessaire en conditions hypoxiques, pour obtenir un effet cytotoxique donné, était 2,5 à 3 fois plus importante que celle nécessaire en présence d'oxygène *(6, 7)*. En clinique, plusieurs études ont montré chez des patients cancéreux traités par radiothérapie, que la faible oxygénation intra-tumorale, mesurée directement à l'aide d'une micro-électrode sensible à l'oxygène, était associée à un taux de contrôle tumoral local et à un taux de survie globale significativement plus faibles *(8-11)*.

Lutter contre l'hypoxie tumorale constitue par conséquent une préoccupation majeure en vue de potentialiser l'effet de la radiothérapie. Ainsi, de nombreux travaux de recherche ont été entrepris (utilisant l'oxygène hyperbare, l'inhalation de gaz enrichis en oxygène avec ou sans nicotinamide, les sensibilisants sélectifs des cellules hypoxiques, *etc*...), pour tenter de diminuer l'hypoxie dans les tumeurs et améliorer l'effet antitumoral des radiations ionisantes *(12, 13)*.

Les relations établies entre l'anémie, l'hypoxie tumorale et la réponse à la radiothérapie ont conduit naturellement à envisager l'érythropoïétine recombinante humaine (rHuEPO), facteur de croissance hématopoïétique classiquement administré dans le traitement des anémies associées aux cancers, comme un moyen de moduler l'hypoxie tumorale.

Les premières expérimentations étudiant l'effet de l'rHuEPO sur l'oxygénation tumorale ont utilisé principalement l'rHuEPO pour prévenir l'installation d'une anémie *(14)*. A l'inverse, nous avons envisagé d'utiliser l'rHuEPO en l'absence d'anémie, pour tenter de réduire l'hypoxie tumorale, *via* l'augmentation du transport de l'oxygène, et tenter d'améliorer secondairement la réponse à la radiothérapie fractionnée sur deux modèles de gliomes malins humains greffés chez la souris *nude*.

Nos expérimentations ont pour but de déterminer si l'rHuEPO peut être proposée comme agent radiosensibilisant non cytotoxique, en vue d'améliorer l'index thérapeutique de la radiothérapie.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

LES GLIOMES MALINS

LES GLIOMES MALINS

I- EPIDEMIOLOGIE

A- Epidémiologie descriptive

Les tumeurs cérébrales primitives représentent environ 2% de l'ensemble des cancers chez l'adulte et 20% chez l'enfant, et leur incidence est estimée à 10 nouveaux cas pour 100000 habitants par an. Toutefois, la rareté de la maladie, les difficultés diagnostiques, et la grande variété histologique et topographique de ces tumeurs rendent délicates les évaluations épidémiologiques et statistiques *(15)*.

Dans la plupart des pays industrialisés, la fréquence de survenue des tumeurs cérébrales primitives augmente considérablement depuis les années 70, particulièrement chez les patients de plus de 65 ans *(15, 16)*.

En 1995, en France, les tumeurs cérébrales primitives ont été la cause de 2566 décès *(15)*. Elles constituent la première cause de décès par cancer chez les enfants de moins de 15 ans, et la troisième cause de décès par cancer chez les adultes âgés de 15 à 34 ans *(17)*.

Les gliomes malins, qui dérivent des cellules gliales, sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et leur pronostic est le plus péjoratif. Selon les études, leur incidence spécifique varie de 1,45 à 6,5 pour 100000 habitants par an, avec une légère prédominance masculine *(18, 19)*. Les gliomes malins concernent toutes les classes d'âge avec un pic d'incidence situé entre 65 et 75 ans *(16)*.

B- Facteurs de risque des gliomes cérébraux

Les nitrosoguanines et les nitrosourées, le virus SV40, les irradiations cérébrales, notamment pendant l'enfance, sont les seuls facteurs de risque clairement identifiés dans le développement des tumeurs cérébrales primitives *(17, 18)*.

Toutefois, même si la preuve n'a pas été clairement apportée, un certain nombre d'autres facteurs de risque d'ordre professionnels ou environnementaux sont soupçonnés d'intervenir dans la genèse de ces tumeurs. En particulier, l'exposition à des pesticides organochlorés, l'exposition aux émanations de solvants organiques et de composés phénoliques dans l'industrie pétrochimique ou l'industrie du caoutchouc, ainsi que l'exposition aux champs électriques ou électromagnétiques puissants *(18)*.

II- DESCRIPTION HISTO-PATHOLOGIQUE ET BIOLOGIQUE DES GLIOMES

Les gliomes, qui regroupent les tumeurs dérivant des cellules gliales, c'est-à-dire des astrocytes, des oligodendrocytes ou des épendymocytes, constituent un groupe hétérogène de tumeurs. Ils sont classés respectivement en astrocytomes, oligodendrogliomes et gliomes mixtes (ou oligoastrocytomes). La plupart des données répertoriées ici ne concerneront que les astrocytomes de haut grade, qui représentent les gliomes les plus fréquemment rencontrés et les plus agressifs *(20, 21)*.

A- La classification histo-pronostique des gliomes

Plusieurs auteurs ont successivement tenté d'établir une classification des différents astrocytomes qui relierait des critères histologiques objectifs, et le pronostic, défini par des grades. Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les tumeurs astrocytaires sont classées en quatre grades *(tableau 1) (21)*.

Tableau 1 : Types histologiques des tumeurs astrocytaires selon la classification de l'OMS *(21)* et données pronostiques *(22)*.

Grades	Descriptions	Pronostic
Astrocytomes grade I	-astrocytomes pylocytiques localisés principalement au niveau du cervelet et des voies optiques, - et, astrocytomes sous-épendymaires à cellules géantes.	Curable par chirurgie
Astrocytomes grade II	- tumeurs infiltrantes, - astrocytes bien différenciés (de type fibrillaire, protoplasmique ou gémistocytique), - densité cellulaire faible ou modérée, - présence de noyaux hyperchromatiques, - et, absence de mitose.	Médiane de survie : 10 à 15 ans
Astrocytomes Anaplasiques grade III	- présence de plages d'anaplasie focales ou diffuses, - augmentation de la densité cellulaire, - pléïomorphisme cellulaire et atypies nucléaires, - mitoses, - et, pas de nécrose ni de néovascularisation.	Médiane de survie : 2 à 3 ans
Glioblastomes grade IV	- forte densité cellulaire, pléïomorphisme cellulaire, - mitoses typiques ou atypiques, - présence d'une prolifération vasculaire endothéliale, - et, présence de nécrose avec ou sans pseudo-palissades.	Médiane de survie : environ 1 an

La classification histo-pronostique de l'OMS fait toutefois l'objet de nombreuses controverses car il s'agit d'une classification purement descriptive où les critères de quantification sont subjectifs, donnant lieu à des variations d'interprétations. De plus, elle ne

prend pas en compte les informations complémentaires apportées par l'imagerie. De ce fait, d'autres classifications alternatives ont été proposées et il est possible que des dénominations similaires se rapportent à des lésions différentes *(20, 23)*.

B- Profil moléculaire et biologique des gliomes malins de haut grade

1- Profil génétique des gliomes malins de haut grade

La tumorigenèse des gliomes est la conséquence de l'activation d'oncogènes et de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. A travers des profils génétiques différents, deux voies distinctes de développement des gliomes malins de haut grade ont été identifiées.

La première voie correspond à l'apparition d'un glioblastome *de novo (22, 24)*. Les altérations les plus fréquemment rencontrées concernent le récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor*) (amplification génomique et/ou remaniement chromosomique), la protéine MDM2 (*mouse double minute 2*) (amplification génomique), et la protéine PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) (mutation et/ou délétion homozygote) *(22, 24, 25)*.

A l'inverse, la seconde voie correspond à la formation d'un astrocytome de bas grade, qui se transforme secondairement par dédifférenciation en astrocytome de haut grade *(22, 24)*. Les glioblastomes secondaires sont caractérisés par des mutations fréquentes de la protéine p53 qui sont des événements précoces de leur tumorigenèse. L'activation de l'oncogène *CDK4 (cyclin-dependant kinase 4)* et l'inactivation du gène suppresseur de tumeur codant pour la protéine pRb (protéine du rétinoblastome) sont souvent rencontrées dans ces tumeurs.

Dans les deux cas, l'inactivation du gène *P16/CDK*2A qui appartient à la famille des inhibiteurs de CDK semble impliquée dans la progression tumorale *(24)*.

Des délétions concernant les chromosomes *10q, 1p,* et *19q* surviennent de façon récurrente sans que les gènes responsables ne soient encore identifiés *(22, 24, 26)*.

2- Propriétés biologiques des gliomes malins de haut grade

Les cellules de gliomes sont caractérisées par leur importante capacité à envahir le tissu cérébral normal voisin. Il s'agit d'un envahissement loco-régional où les cellules tumorales infiltrent progressivement les structures voisines en longeant les faisceaux de substance blanche et la membrane basale des vaisseaux. Il ne s'agit quasiment jamais d'une dissémination à distance par voie sanguine ou lymphatique, comme cela est classiquement décrit pour les autres types de tumeurs. Malgré leur expression massive dans les gliomes

malins de haut grade, le rôle des protéases habituellement responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, dans l'invasion par les cellules tumorales gliales est encore mal défini *(25)*.

Les glioblastomes sont définis histologiquement par la présence d'une forte angiogenèse. Celle-ci semble être sous la dépendance essentiellement du VEGF (***vascular endothelial growth factor***) largement surexprimé dans ces tumeurs *(27)*. L'augmentation de l'expression de ce facteur semble résulter d'une part de certaines altérations oncogéniques (amplification du R-EGF) et d'autre part, de l'hypoxie tumorale *(28)*, classiquement décrite dans les gliomes de haut grade *(29, 30)*.

III- PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE ET LIMITES DES TRAITEMENTS

Le traitement des gliomes malins de haut grade relève avant tout de la chirurgie, mais également de la radiothérapie et éventuellement d'une chimiothérapie adjuvante. Cependant, du fait des particularités anatomiques et fonctionnelles des localisations cérébrales, la mise en œuvre d'actions thérapeutiques efficaces est plus difficile que dans les autres types de cancer.

A- Particularités des tumeurs cérébrales

La tumeur se forme au sein de l'organe fonctionnellement le plus important, et parallèlement, le plus fragile *(31)*. Ceci implique que le clinicien, avant de débuter tout traitement curatif, mette longuement en balance le bénéfice attendu et le risque encouru.

L'intégrité du cerveau étant essentielle à une vie normale, des structures anatomiques adaptées telles que le crâne, les méninges et la barrière hémato-encéphalique (BHE) le protègent très efficacement.

L'expansion tumorale engendre donc à terme un effet compressif, associé à une hypertension intra-crânienne. Ce phénomène est amplifié par l'œdème qui accompagne la croissance tumorale, et dont le drainage est difficile en raison de l'absence de vaisseaux lymphatiques dans le cerveau. La compression aboutit à une diminution du débit sanguin cérébral régional *(31)*.

La BHE est constituée de cellules endothéliales jointives à perméabilité très sélective. La BHE est en général altérée au sein de la néoformation, mais conserve son intégrité à la périphérie de la tumeur. Cette zone périphérique est le siège habituel des récidives. En effet, elle est fréquemment infiltrée par quelques cellules cancéreuses dont la prolifération est difficile à contrôler par la chimiothérapie du fait de la perméabilité limitée.

B- Traitements des gliomes malins

1- La chirurgie

La première prise en charge d'une tumeur cérébrale correspond à la chirurgie car l'analyse anatomo-pathologique de la pièce opératoire permet de poser le diagnostic et d'établir le pronostic. D'un point de vue thérapeutique, la résection, aussi étendue que possible, a trois intérêts :

- elle lève rapidement l'effet compressif de la masse tumorale et atténue ainsi les symptômes locaux (céphalées) et généraux (déficits neurologiques, convulsions) associés ;
- elle peut faire bénéficier aux patients d'un taux de survie supérieur, et ce, d'autant plus que l'exérèse est complète *(32, 33)*;
- en réduisant au maximum la masse tumorale, elle permet de maintenir le patient dans un état de santé acceptable, de sorte qu'il puisse supporter les traitements adjuvants que sont la radiothérapie et la chimiothérapie.

Malgré les avancées techniques en neuro-imagerie et en neuro-chirurgie, l'exérèse reste presque toujours palliative puisque les gliomes malins récidivent généralement à partir des cellules tumorales qui ont déjà envahi les structures voisines *(33)*.

Afin de supprimer le risque de récidives, une chirurgie curative nécessiterait une résection passant au large de la tumeur, mais une telle pratique s'accompagnerait de l'altération de zones fonctionnelles importantes, et d'une réduction de la qualité de vie des patients.

2- La radiothérapie

La radiothérapie est une arme thérapeutique importante dans la prise en charge des gliomes malins *(23)*. En effet, plusieurs études ont montré un bénéfice significatif en terme de survie pour les patients recevant une radiothérapie post-opératoire, même si l'irradiation aboutit rarement à un contrôle de la maladie à long terme *(34, 35)*.

La radiothérapie externe conventionnelle comprend l'irradiation de la zone tumorale, plus une marge de sécurité de un à quatre centimètres qui correspond aux voies d'extension éventuelles *(23, 32, 33)*. La dose totale d'irradiation atteint 50 à 60 Gray (Gy), administrée sur cinq à six semaines sous forme d'une fraction quotidienne de 2 Gy, cinq jours sur sept.

L'efficacité de la radiothérapie dans le traitement des gliomes malins est établie, mais la tolérance limitée des tissus sains empêche, chez l'adulte et surtout chez l'enfant,

l'utilisation des doses curatives élevées *(35)*. De ce fait, aux doses d'irradiation appliquées, la survie des patients atteints de gliomes malins de haut grade reste très sombre.

En vue d'améliorer la réponse à la radiothérapie, d'autres modes de fractionnement (hyperfractionnement, radiothérapie accélérée), d'autres modes d'irradiation (radiochirurgie et radiothérapie stéréotaxique fractionnée) font l'objet d'investigations cliniques *(35, 36)*.
Dans le cas de l'hyperfractionnement, le patient reçoit plusieurs séances d'irradiation par jour, ce qui permet de délivrer une dose totale supérieure dans un même temps (6 semaines). La dose par fraction peut être égale ou inférieure à 2 Gy. La radiothérapie accélérée à l'inverse, permet de délivrer la même dose totale qu'en radiothérapie conventionnelle mais dans un temps plus court. Malheureusement, ces deux approches n'ont pas permis une amélioration significative du taux de contrôle de la maladie *(35, 36)*.

Par ailleurs, un certain nombre de stratégies sont à l'étude pour tenter de potentialiser l'action des radiations ionisantes en interférant avec les facteurs connus pour être impliqués dans la radiorésistance (hypoxie tumorale, progression dans le cycle cellulaire, surexpression du R-EGF, *etc*...).

3- La chimiothérapie

L'action de la chimiothérapie est rendue difficile par le ralentissement du débit sanguin cérébral au voisinage de la tumeur du fait de l'effet compressif de celle-ci, et, par la BHE qui limite la pénétration des molécules anticancéreuses au voisinage de la tumeur *(31)*.

Malgré le nombre important d'études de phase II, la place de la chimiothérapie dans le traitement des gliomes malins de haut grade est moins bien définie que celle de la chirurgie ou de la radiothérapie. Dans de nombreuses études, la réponse à la chimiothérapie n'est pas suivie d'une amélioration de la survie *(37)*. Deux méta-analyses ont toutefois démontré un bénéfice pour les malades traités par chimiothérapie adjuvante *(34, 38)*. La plus récente rapporte une augmentation significative de la survie à 2 ans, celle-ci passant de 15 à 25% *(38)*.

L'intérêt des agents anticancéreux semble toutefois dépendre directement du type histologique (glioblastome, astrocytomes anaplasiques ou oligoastrocytomes anaplasiques) de la tumeur, qu'il faudra probablement mieux définir à l'avenir pour pouvoir mener des études mieux ciblées et obtenir des effets plus probants *(23)*.

Jusqu'à présent, le traitement de première intension a essentiellement reposé sur l'administration d'une nitroso-urée (carmustine = BCNU, lomustine = CCNU, fotemustine) en monothérapie *(39)*.

En deuxième intention, le neuro-oncologue peut faire appel à d'autres drogues dont la place n'est pas clairement établie.
Les polychimiothérapies associant procarbazine-CCNU-vincristine ou les dérivés du platine (Carboplatine, Oxaliplatine) délivrés seul ou en association sont parfois envisagés.

Parmi les nouvelles molécules anticancéreuses proposées pour traiter les gliomes malins, les résultats les plus encourageants viennent du témozolomide, un agent alkylant administré *per os (40, 41)*. Cette molécule a, de ce fait, été approuvée aux Etats-Unis dans le traitement des astrocytomes anaplasiques réfractaires après une thérapie standard, et par l'Union Européenne, pour les patients atteints de glioblastome *multiforme* montrant une progression ou une récurrence après une thérapie standard *(42, 43)*.

Des essais thérapeutiques sont en cours afin d'évaluer la toxicité et l'efficacité de nouveaux agents antinéoplasiques tels que les inhibiteurs de farnésyltransférase (R115777), les inhibiteurs d'angiogénèse (SU5416) ou les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase (Iressa® , Glivec®), dans le traitement des gliomes malin de haut grade.

LA RADIOTHERAPIE

LA RADIOTHERAPIE

I- ACTION DES RAYONNEMENTS IONISANTS AU NIVEAU CELLULAIRE

La radiothérapie constitue, avec la chirurgie et la chimiothérapie, une modalité thérapeutique classique et majeure dans la prise en charge des cancers. Le radiothérapeute tente d'éradiquer les tumeurs solides en délivrant aux patients des rayonnements dits "ionisants", c'est-à-dire des rayonnements électromagnétiques de haute énergie (photons X ou γ) ou des rayonnements de particules (électrons, neutrons, protons) qui possèdent une énergie suffisante pour arracher des électrons à la matière biologique.

A- Interactions rayonnements-matière

Quand ils arrivent au contact du milieu biologique, les photons X et γ peuvent interagir avec les noyaux mais surtout interagissent avec les électrons des atomes du milieu en leur cédant une partie de leur énergie. Selon l'énergie du photon incident et selon qu'il rencontre un électron des couches externes ou internes, il déclenche dans un temps très bref (10^{-15} seconde) des phénomènes :

- de transfert thermique
- d'excitation : l'électron rencontré passe du niveau énergétique fondamental à un niveau d'énergie supérieur. Son retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'un photon de fluorescence.
- d'ionisation : l'électron rencontré est arraché au cortège électronique de l'atome du milieu. Les quelques électrons mis en mouvement par le flux de photons incidents sont hautement énergétiques et constituent les particules *« directement ionisantes »*, à l'origine de l'action biologique. Ils engendrent à leur tour des excitations et des ionisations secondaires, en proportion beaucoup plus grande que celles générées par les photons incidents eux-mêmes.

B- Réactions radio-chimiques

Les photons X ou γ incidents et les électrons arrachés par ces derniers rencontrent, dans le milieu biologique, des atomes appartenant essentiellement aux molécules d'eau (10^{13} molécules d'eau par cellule) ou aux macromolécules (10^{8} macromolécules par cellule) membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires. De ce fait, les rayonnements ionisants vont engendrer deux types de réactions radio-chimiques distinctes, chacune aboutissant à la formation de radicaux libres.

1- L'effet direct des rayonnements ionisants

Lorsque le photon ou l'électron libéré secondairement, transfèrent tout ou partie de leur énergie à un atome appartenant à une macromolécule organique de la cellule (protéines, lipides, sucres, acides nucléiques...), celle-ci passe à un niveau énergétique instable, par phénomène d'excitation ou d'ionisation, et perd l'excédent d'énergie respectivement :

- par retour à l'état initial avec émission d'un photon de fluorescence,
- par rupture de liaisons chimiques à l'intérieur de la molécule. Il se forme alors une brèche dans la molécule et des radicaux libres. La réaction peut se traduire par l'équation :

$$R_1\text{--}R_2 \rightarrow R_1\text{--}R_2^* \rightarrow R_1^\bullet + R_2^\bullet \qquad (^*\text{=excitation})$$

$$R_3\text{--}R_4 \rightarrow R_3\text{--}R_4^* \rightarrow R_3^\bullet + R_4^\bullet \qquad (R_1^\bullet\text{=radical libre } R_1)$$

Les radicaux moléculaires peuvent se recombiner entre eux de façon anormale.

$$R_1^\bullet + R_3^\bullet \rightarrow R_1\text{--}R_3$$

2- L'effet indirect des rayonnements ionisants : la radiolyse de l'eau

Les organes vivants étant très riches en eau (80%), l'interaction entre les rayonnements et les molécules d'eau reste la plus probable. L'interaction rayonnement-matière induit alors rapidement (10^{-12} seconde) la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) formées à partir des molécules d'eau excitées ou ionisées. Ces réactions radio-chimiques correspondent à la radiolyse de l'eau.

La dissociation de la molécule d'eau, par phénomène d'ionisation, sous l'action du rayonnement photonique peut se traduire par l'équation suivante :

$$h\nu + H_2O \rightarrow e^- + H_2O^+$$

L'ion H_2O^+, très instable, a une durée de vie très courte et se dissocie rapidement selon la réaction :

$$H_2O^+ \rightarrow H^+ + OH^\bullet \qquad (OH^\bullet = \text{radical hydroxyle})$$

L'électron projeté, lui, peut réagir avec d'autres molécules d'eau :

$$e^- + H_2O \rightarrow H^\bullet + OH^- \qquad (H^\bullet = \text{radical hydrogène})$$

Le photon incident peut, cependant, n'induire qu'une excitation de la molécule d'eau qu'il rencontre. Ce phénomène se traduit par l'équation :

$$h\nu + H_2O \rightarrow H_2O^*$$

Pour revenir à un niveau d'énergie plus stable, la molécule d'eau excitée va se dissocier selon la réaction :

$$H_2O^* \rightarrow H^\bullet + OH^\bullet$$

Les radicaux libres ($H^\bullet$; $OH^\bullet$) ainsi produits s'apparient activement et par recombinaison peuvent former des espèces moléculaires :

$H^\bullet + H^\bullet \rightarrow H_2$ (H_2 = dihydrogène)

$H^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O$

et surtout $OH^\bullet + OH^\bullet \rightarrow H_2O_2$ (H_2O_2 = peroxyde d'hydrogène)

Toutefois, la présence d'oxygène moléculaire tend à amplifier la cascade des réactions chimiques car l'oxygène réagit très facilement avec le radical hydrogène ou avec les électrons libres selon les équations suivantes :

$O_2 + H^\bullet \rightarrow OOH^\bullet$ ($OOH^\bullet$ = radical hydroperoxyde)

$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ ($O_2^{\bullet -}$ = radical superoxyde)

L'eau intracellulaire est finalement décomposée sur le trajet du rayonnement en ions (H_2O^+, H^+, OH^-), en radicaux libres ($OH^\bullet$, $H^\bullet$, $OOH^\bullet$, $O_2^{\bullet -}$) et en espèces moléculaires (H_2O_2, H_2) hautement réactives, oxydantes ou réductrices.

Les produits de la radiolyse de l'eau vont secondairement attaquer les macromolécules organiques situées à proximité. Ces réactions peuvent se traduire par l'équation :

$$OH^\bullet + R_1\text{--}H \rightarrow R_1^\bullet + H_2O$$

$$H^\bullet + R_1\text{--}H \rightarrow R_1^\bullet + H_2$$

Cette attaque aboutit donc à la rupture de liaisons covalentes simples ou doubles, comme dans le cas des effets radio-chimiques directs.

C- Les dommages cellulaires radio-induits

Les rayonnements ionisants sont responsables, au cours des premières secondes après irradiation, de ruptures de liaisons covalentes ou de recombinaisons chimiques anormales touchant les macromolécules organiques de la cellule. L'importance des dommages cellulaires induits dépend directement de l'importance biologique de la molécule lésée, et les effets biologiques des radicaux libres diffèrent considérablement selon le compartiment de la cellule où ils sont formés *(44)*.

1- Au niveau cytoplasmique

Lorsqu'ils sont formés dans le cytoplasme, les radicaux libres sont susceptibles de toucher les structures protéiques (protéines de structure, protéines enzymatiques, récepteurs) et peuvent altérer leur fonction. Cependant, la conformation des protéines rend ces dernières difficilement accessibles, et ne favorise pas l'attaque radicalaire, si bien qu'aux doses utilisées en radiothérapie, l'atteinte des structures protéiques ne constitue pas l'évènement principal et n'a que peu de conséquences sur la survie cellulaire.

2- Au niveau membranaire

L'action directe ou indirecte des rayonnements ionisants sur les lipides insaturés aboutit à une peroxydation de la double couche lipidique membranaire. L'altération fonctionnelle des membranes qui en résulte conduit à la mort de la cellule *(44)*.

3- Au niveau de l'ADN

Les macromolécules d'ADN étant les plus grosses molécules de la cellule, elles constituent la cible privilégiée des rayonnements ionisants et des radicaux libres formés secondairement *(45, 46)*. Ceux-ci sont susceptibles de provoquer des altérations de bases (méthylation, oxydation ou réduction, etc...), la destruction des désoxyriboses, la formation de pontages inter- ou intra-brins entraînant alors une modification de la conformation de la molécule d'ADN, l'apparition de liaisons protéine-acide nucléique, et, des ruptures de liaisons sucre-phosphate donnant lieu à des cassures simple ou double-brin.

Classiquement, environ 1000 cassures simple-brin, 40 cassures double-brin *(46)*, 2000 dommages de bases (essentiellement des dommages oxydatifs), 70 dommages multiples localisés sur les deux brins, 160 pontages inter-brin et 30 pontages protéine-ADN sont radio-induits par Gy et par cellule diploïde *(47, 48)*.

Il semble que la distribution des dommages ne soit pas randomisée. En effet, les rayons X produiraient des électrons secondaires ionisants et des radicaux libres selon des trajectoires assez courtes et ces derniers diffuseraient peu. Ainsi, du fait de la structure compactée de l'ADN, la rencontre entre un "faisceau" d'électrons ionisants et de radicaux libres et la chromatine en paquet provoquerait la concentration des dommages au niveau de régions limitées de l'ADN *(47, 49)*.

Les coupures double-brin ainsi que les dommages multiples localisés (c'est-à-dire cassures, modifications de bases et de sucres et dommages oxydatifs, induits à proximité les

uns des autres dans l'ADN) constituent les lésions les plus délétères pour la cellule et sont à l'origine d'effets létaux ou au contraire d'effets mutagènes, à l'origine d'instabilités génétiques et de transformations néoplasiques *(46, 48, 50)*.

II- LA REPONSE CELLULAIRE A L'IRRADIATION

Afin de maintenir la stabilité et l'intégrité de leur génome, les cellules disposent naturellement de processus d'auto-surveillance très élaborés, qui prennent rapidement en charge les dommages radio-induits au niveau de leur ADN.

Les lésions radio-induites constituent un signal initiateur qui active un réseau complexe de voies de signalisation connectées entre elles, où interviennent en cascade des protéines détectrices de lésions, des protéines de transduction et des protéines effectrices *(figure 1) (51)*.

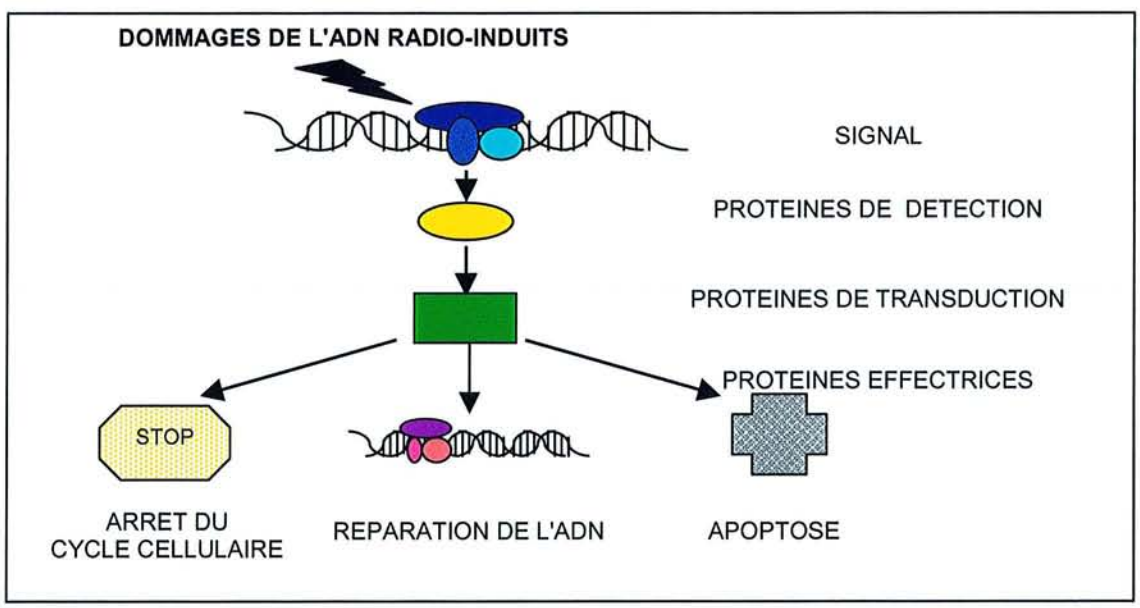


Figure 1 : Voies de transduction du signal activées en réponse aux dommages de l'ADN radio-induits *(46, 51)*.

La réponse cellulaire à l'égard des dommages de l'ADN radio-induits associe les mécanismes de régulation de la progression dans le cycle cellulaire, les mécanismes de réparation des lésions et les mécanismes aboutissant à la mort par apoptose *(figure 1)*. L'issue de la réponse cellulaire déclenchée par les radiations ionisantes dépend, non seulement du nombre et des types de dommages radio-induits, mais encore du type et des propriétés physiopathologiques des cellules irradiées *(52)*.

1- Détection des dommages de l'ADN radio-induits

D'après les connaissances actuelles, les protéines impliquées dans la détection des lésions sont assimilées à des "scanners" qui analyseraient en permanence la chromatine, et qui initieraient un signal dès la rencontre d'une anomalie *(52)*. Même si elles sont encore mal identifiées et mal connues, il semblerait que ces protéines de détection impliquées diffèrent en fonction du type de dommages induits.

2- Protéines clés impliquées dans la transduction du signal

Dans ce réseau de signalisation complexe, certaines protéines permettent l'exécution coordonnée des différents mécanismes (régulation du cycle cellulaire, réparation des lésions, mort cellulaire programmée) participant à la réponse cellulaire.

Il s'agit notamment de la poly(ADP-ribose)-polymérase (PARP) qui se fixe très rapidement au niveau des cassures simple brin radio-induites, et facilite la mise en place de la réparation par excision de bases *(53)*.

La protéine kinase ATM (*ataxia telengiectasia mutated*) est activée rapidement en réponse aux cassures double brin de l'ADN et un grand nombre d'événements (réponse au stress, progression dans le cycle cellulaire, réparation) dépendent de son activation *(51, 54)*.

La DNA-PK (*DNA-dependant protein kinase*) joue un rôle central dans la réparation des cassures double-brin radio-induites par religation non homologue, et active par phosphorylation un certain nombre de protéines cibles impliquées dans la réponse aux dommages radio-induits *(55-57)*.

La communauté scientifique s'accorde à considérer la protéine p53 comme la protéine responsable du devenir de la cellule endommagée après irradiation. La protéine p53 est le substrat de nombreuses protéines (entre autre, ATM et DNA-PK) et constitue un élément central dans la signalisation intracellulaire en réponse aux lésions de l'ADN. Elle est impliquée à la fois dans la régulation de la progression dans le cycle cellulaire, et dans le déclenchement de la mort par apoptose *(52, 58)*.

3- Irradiation et régulation du cycle cellulaire

Après avoir été irradiées, les cellules modifient leur progression dans le cycle cellulaire : les dommages de l'ADN radio-induits provoquent l'arrêt aux différents points de contrôle (G1/S, S, G2/M). Ces arrêts permettent aux mécanismes de réparation d'œuvrer pour prévenir les anomalies de réplication (blocage au niveau de la transition G1/S ou pendant la phase S) ou les aberrations chromosomiques pendant la mitose (blocage au niveau de la transition G2/M) *(45, 59, 60)*.

4- Réparation des dommages de l'ADN radio-induits

De manière générale, les dommages radio-induits de type altération de bases, altération de sucres ou dommages mono-brin, sont très efficacement et très rapidement réparés car la cellule est fréquemment confrontée à ce type de lésions. En particulier, les cassures simple brin peuvent correspondre à des états intermédiaires de l'ADN physiologiques et ne constituent donc pas un risque létal pour la cellule. A l'inverse, la probabilité pour la cellule de rencontrer des cassures double-brin ou des dommages multiples localisés est moins grande. La cellule est donc moins bien équipée pour les affronter et les conséquences létales de ce type de lésions sont potentiellement plus importantes *(61)*.

La plupart des lésions de l'ADN sont fidèlement réparées, mais les lésions non réparées ou réparées avec erreurs de séquence, sont responsables de la mort cellulaire ou donnent lieu à des mutations, des instabilités génomiques, et des transformations néoplasiques *(48)*.

En adéquation avec les différents types de lésions radio-induites, plusieurs systèmes de réparation différents et complémentaires peuvent être activés et s'enchaîner.
Les systèmes BER (*base excision repair*), NER (*nucleotides excision repair*), HR (*homologous recombination*) et NHEJ (*non-homologous end-joining*) sont les quatre principaux mécanismes impliqués dans la réparation des dommages radio-induits.

Lorsqu'une voie de réparation est momentanément surchargée, d'autres systèmes peuvent partiellement prendre le relais, mais cette déviation vers d'autres systèmes est souvent moins efficace car moins bien adaptée *(48)*.

5- La mort cellulaire radio-induite *(figure 2)*

5.1. La mort cellulaire reproductive

La radiothérapie oncologique a pour but de détruire les cellules tumorales. Aux doses tolérées en clinique, la mort des cellules irradiées peut être immédiate, mais se traduit préférentiellement par la perte de leur capacité prolifération. Il s'agit de la mort reproductive.

La réparation non accomplie ou défectueuse des dommages radio-induits provoque l'apparition dans les cellules irradiées d'anomalies majeures *(60)*, responsables de l'élimination des cellules au moment des mitoses ultérieures.

Dans le cas de la ***mort mitotique***, la cellule irradiée peut poursuivre son existence immédiate en assurant ses fonctions métaboliques *(62)*, mais les anomalies de l'ADN sont telles que la cellule n'a pas la capacité d'achever avec succès la mitose suivante. Ce processus

se caractérise alors par l'apparition de cellules géantes et de cellules binuclées, témoignant d'une cytodiérèse abortive, et par la formation de micronoyaux qui subissent progressivement une exocytose, aboutissant à la perte progressive du matériel génétique.

Dans le cas de la ***mort cellulaire différée***, les cellules initiales irradiées restent capables de se diviser mais au cours de la descendance, une proportion importante de cellules filles meurent, si bien que la cellule initiale est inapte à former une colonie d'au moins 50 cellules *(63)*.

Au cours des processus de mort cellulaire mitotique ou différée, l'élimination des cellules résulte soit d'une mort nécrotique soit du déclenchement de l'apoptose *(63)*.

5.2. La nécrose

La mort cellulaire par nécrose résulte en général d'un traumatisme cellulaire important et est associée à une cytolyse. Cette cytolyse s'accompagne *in vivo* d'une réaction inflammatoire importante en raison du relargage du contenu intracellulaire dans le milieu environnant. *In vivo,* ce processus concerne toute une zone tissulaire à l'intérieur de laquelle toutes les cellules ont été tuées selon ce processus *(62, 64)*.

5.3. L'apoptose

L'apoptose correspond à un processus physiologique génétiquement déterminé, transcriptionnellement actif, exigeant de l'ATP, qui survient naturellement au cours du développement des différents tissus. L'apoptose est un processus d'auto-destruction étroitement régulé, sous la dépendance de nombreuses voies de signalisation pro-apoptotiques et anti-apoptotiques en équilibre *(65)*, équilibre que les radiations ionisantes sont capables de déplacer.

Les cellules apoptotiques ne subissant aucun phénomène de lyse, l'apoptose *in vivo* ne s'accompagne d'aucune réaction inflammatoire *(62, 64)*. En réponse aux radiations ionisantes, le processus apoptotique peut être initié à la fois par les dommages créés au niveau de l'ADN et par les dommages créés au niveau de la membrane cytoplasmique.

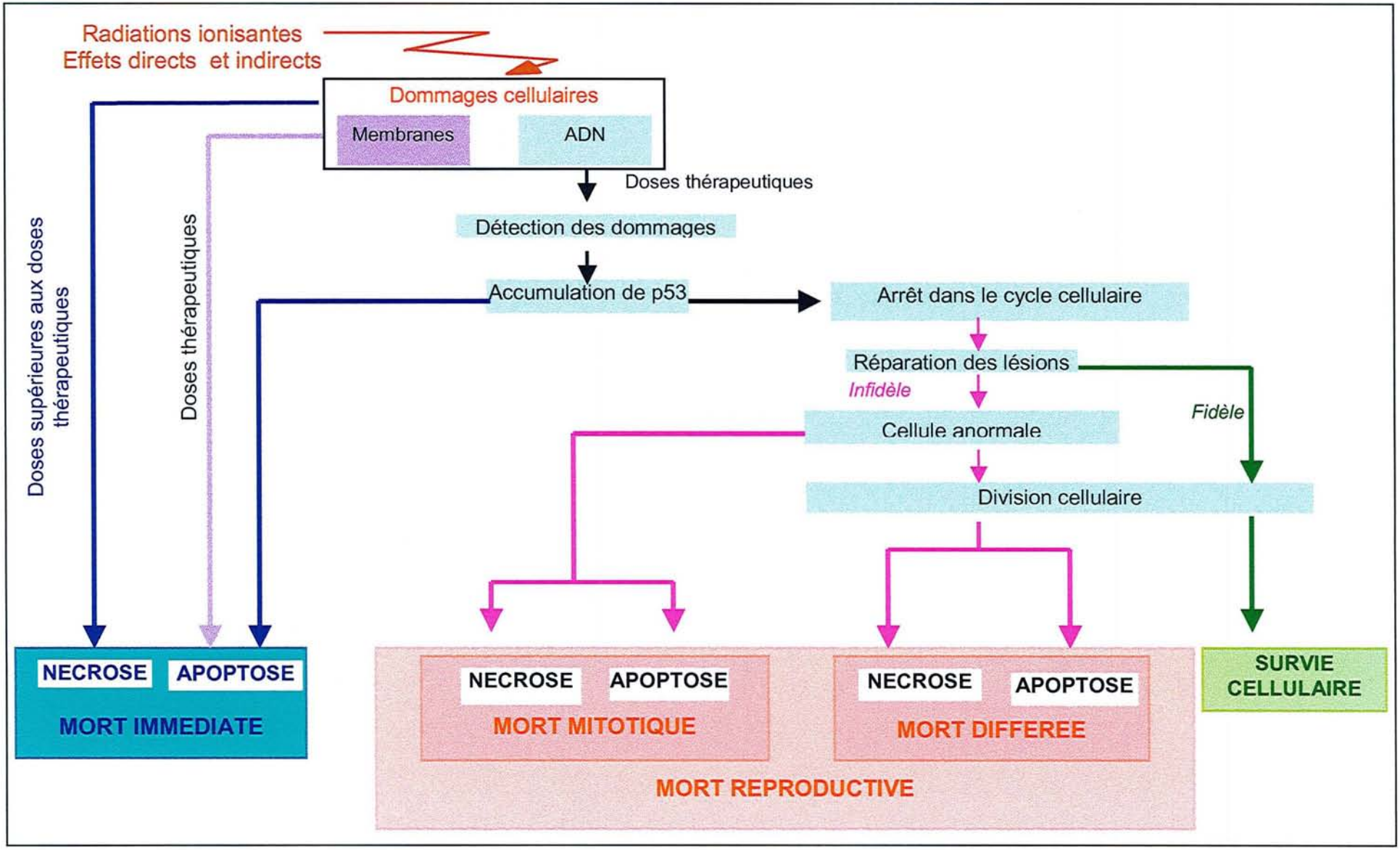


Figure 2 : Représentation schématique des différents types de mort cellulaire après irradiation.

6- Létalité des lésions radio-induites

En fonction des aptitudes de la cellule à réparer les lésions de l'ADN radio-induites, celles-ci sont traditionnellement classées en trois catégories *(66)*:

- les lésions létales : le dommage provoqué atteint une fonction vitale et la cellule n'a pas la capacité de réparer fidèlement la lésion. La cellule meurt immédiatement ou au cours d'une mitose ultérieure.

- les lésions sublétales, qui sont réparables, à moins qu'elles ne s'accumulent en nombre tel que les systèmes enzymatiques de réparation sont débordés.

- les lésions potentiellement létales : dans des conditions favorables de nutrition, de vascularisation et d'oxygénation, ces dommages sont réparés tant que les cellules ne sont pas obligées d'entrer en cycle, mais elles deviennent létales dès que les conditions sont défavorables ou que la division cellulaire survient rapidement après irradiation.

III- EFFICACITE DE LA RADIOTHERAPIE

Au final, l'effet antitumoral de la radiothérapie dépend de paramètres inhérents à la tumeur irradiée et de paramètres inhérents aux modalités de traitement.

A- Paramètres inhérents à la tumeur irradiée

Les tissus tumoraux sont caractérisés par leur "radiosensibilité intrinsèque", paramètre qui englobe l'ensemble des propriétés génotypiques, phénotypiques et micro-environnementales susceptibles de moduler la curabilité des tumeurs.

La radiosensibilité intrinsèque peut être appréciée *in vitro* par la SF_2 (*surviving fraction following a dose of 2 Gy*), et *in vivo* par la TCD_{50} (*tumor control dose 50*), c'est-à-dire la dose de radiations nécessaire pour contrôler 50% des tumeurs selon un schéma d'administration défini.

In vitro, la radiosensibilité intrinsèque des cellules tumorales est déterminée par l'activation d'oncogènes et par l'inactivation de gènes suppresseur de tumeur impliqués positivement ou négativement dans la réponse des cellules à l'égard des radiations ionisantes. En particulier, les cellules néoplasiques ayant acquis des propriétés génotypiques et phénotypiques favorisant leur survie (perte de la fonctionnalité de p53, augmentation de l'efficacité des enzymes de réparation) sont plus résistantes vis-à-vis de l'action des radiations ionisantes.

D'autre part, l'irradiation est plus efficace sur les cellules en cycle que sur les cellules quiescentes (phase G0/G1), et les cellules en phase G2 ou en phase M présentent la plus

grande radiosensibilité *(60)*. Ces variations de radiosensibilité semblent être associées à des variations de conformation de la chromatine, et à des variations de la qualité de la réparation des lésions de l'ADN *(46)*.

In vivo, la réponse du tissu tumoral irradié ne correspond pas simplement à la somme des effets obtenus sur chaque cellule tumorale prise individuellement. En effet, lorsqu'un tissu tumoral est soumis à une irradiation, il se comporte comme une unité cohérente, où des effets autres que ceux présentés précédemment (à savoir, les effets sur le cycle cellulaire, la réparation, ou la survie cellulaire) interviennent *(67)*.

En particulier, le tissu tumoral est adjacent au tissu sain et des interactions entre les deux sont susceptibles d'influer sur l'efficacité de la radiothérapie. D'autre part, dans le volume tumoral irradié, plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les cellules stromales ou les monocytes / macrophages, coexistent avec les cellules tumorales. L'ensemble de ces cellules peut contribuer positivement ou négativement à l'effet antitumoral de la radiothérapie, notamment en raison de leur capacité à relarguer des facteurs de croissance (VEGF, bFGF,...) et des cytokines (TNFα, interleukines, , TGFβ.....) *(67, 68)*. En effet, ces différents facteurs influent sur les propriétés de prolifération, d'extension ou d'invasion des tumeurs dont dépend directement la radiosensibilité intrinsèque des tumeurs.

La radiosensibilité des tumeurs est également conditionnée par la présence de zones hypoxiques *(69)*.

B- Paramètres inhérents aux modalités de traitement

La curabilité d'une tumeur dépend de la dose totale de rayonnements ionisants délivrée ainsi que de l'homogénéité de sa distribution.
En théorie, tous les cancers pourraient être contrôlés localement si la radiothérapie était délivrée à des doses suffisamment importantes et sur un volume suffisamment grand pour englober toutes les cellules tumorales. Cependant, il est impossible à l'heure actuelle de délivrer des doses élevées dans un large champ car le risque de voir apparaître des dommages sévères, aigus ou retardés, au niveau de tissus sains est trop important pour être acceptable *(70)*.

Les modalités d'irradiation standard ont été établies en prenant compte de l'indice thérapeutique parfois faible. Ainsi, pour limiter la toxicité sur les tissus sains, la dose d'irradiation totale est généralement délivrée en plusieurs fractions (jusqu'à 30 fractions) étalées dans le temps (jusqu'à 6 semaines). Néanmoins, le fractionnement et l'étalement des irradiations sont délétères en terme d'effet antitumoral. En effet, l'intervalle entre deux irradiations permet la réparation efficace des dommages sublétaux. D'autre part, les premières irradiations éliminent les cellules les plus sensibles impliquant un enrichissement de la tumeur

en clones plus résistants. Certains auteurs ont même décrit l'existence d'une repopulation accélérée de la tumeur par les cellules clonogènes radiorésistantes *(71, 72)*. L'effet anti-tumoral obtenu pour une dose totale définie délivrée en une seule fraction est supérieur à l'effet observé pour la même dose totale délivrée en plusieurs fractions successives.

L'HYPOXIE TUMORALE

L'HYPOXIE TUMORALE

I- PHYSIOLOGIE DE L'OXYGENATION TISSULAIRE

Les tissus humains présentent une totale dépendance vis-à-vis de l'oxygène moléculaire (O_2) car celui-ci est indispensable à la phosphorylation oxydative, seul mécanisme cellulaire assurant une production d'énergie, sous forme d'ATP (adénosine triphosphate), efficace, rentable et suffisante.

A- Paramètres influençant l'oxygénation tissulaire

De manière générale, l'oxygénation d'un tissu résulte de l'équilibre qui existe entre la disponibilité en oxygène pour le tissu, et la consommation en oxygène au cours de l'activité respiratoire des cellules *(73)*.

La disponibilité en oxygène pour le tissu est déterminée par la quantité d'oxygène transporté par le sang, par le flux sanguin qui irrigue le tissu, ainsi que par la capacité de diffusion de l'oxygène vers l'espace extra-vasculaire *(73)*.

Ainsi, des variations concernant la pression partielle en oxygène (pO_2) du sang artériel, la concentration sanguine en hémoglobine et sa saturation en O_2, la courbe de dissociation de l'oxygène, le gradient de pO_2 entre le sang et le tissu avoisinant, ou la mobilité des globules rouges peuvent être directement responsables d'une réduction de l'apport en oxygène au niveau du tissu. D'autre part, des perturbations du flux sanguin, rencontrées lors de la formation de thrombus, lors de compressions vasculaires ou lors de déformations vasculaires, peuvent contribuer à la réduction de l'oxygénation tissulaire.

B- Mécanismes physiologiques d'adaptation à l'hypoxie tissulaire

Dans un tissu sain, les apports en oxygène sont en adéquation avec les besoins cellulaires *(73)*. Lorsqu'un déséquilibre survient, induisant alors une hypoxie tissulaire, celui-ci est détecté et provoque le déclenchement d'une réponse physiologique permettant de rétablir l'homéostasie *(74)*.

1- Réponse adaptative à l'échelle de l'organisme

Lorsque le manque d'oxygène touche simultanément tous les tissus (ex: hypoxies par insuffisance respiratoire, hypoxies anémiques), une réponse adaptative globale est mise en place à l'échelle de l'organisme. Par exemple, une diminution de la pO_2 du sang artériel, transitoire et d'intensité modérée est détectée par des cellules spécialisées au niveau des corpuscules carotidiens, et cette diminution donne lieu à une réponse immédiate matérialisée par l'augmentation réflexe du rythme respiratoire permettant d'améliorer la saturation en oxygène, et par l'augmentation du rythme cardiaque permettant d'augmenter la pression sanguine artérielle. Cette réponse réflexe implique la libération rapide de neurotransmetteurs de type catécholamine *(74)*.

Dans le cas d'une hypoxie tissulaire maintenue pendant plusieurs jours (personnes anémiques ou personnes effectuant un séjour prolongé en altitude), la production de globules rouges est stimulée afin d'améliorer la capacité de transport de l'O_2 : cette augmentation survient secondairement à l'augmentation de la sécrétion d'érythropoïétine par les cellules rénales *(74)*.

2- Réponse adaptative à l'échelle cellulaire

Outre les cellules spécialisées (cellules rénales, corpuscules carotidiens) qui engendrent une réponse adaptative globale, toutes les cellules vivantes sont capables de détecter la survenue d'une hypoxie localisée (ex : hypoxies ischémiques). Elles répondent alors en ajustant leurs fonctions métaboliques afin d'assurer leur propre survie.

L'adaptation métabolique cellulaire se traduit principalement par une augmentation de la glycolyse anaérobie aux dépens de la phosphorylation oxydative. Sachant que le rendement en ATP de la glycolyse est plus faible que celui de la phosphorylation oxydative, les cellules tentent de compenser ce manque en augmentant l'expression et l'activité des enzymes glycolytiques (phosphoglycérate kinase 1, pyruvate kinase M). De même, le transport du glucose est accru du fait d'une augmentation de l'activité et de l'expression des transporteurs du glucose (GLUT) *(74, 75)*.

Parallèlement, les cellules en conditions hypoxiques s'adaptent en réduisant au maximum leur consommation d'énergie, d'une part en diminuant l'activité de leurs pompes ioniques (canaux Na^+/K^+) très coûteuses en ATP, et d'autre part, en réduisant massivement et rapidement leurs synthèses protéiques *(76)*. L'inhibition de la synthèse protéique est levée très rapidement après réoxygénation *(76, 77)*.

Dans le cas d'hypoxie très sévère ou très prolongée, les mécanismes d'adaptation protecteurs ne sont plus suffisants pour permettre la survie des cellules, et celles-ci entrent alors en apoptose *(75, 78)*.

3- Réponse adaptative à l'échelle moléculaire : implication de HIF-1 *(Hypoxia Inducible Factor-1)*

Le mécanisme moléculaire de régulation le mieux caractérisé et qui semble le plus largement utilisé par les cellules soumises à une hypoxie, implique le facteur de transcription activateur HIF-1, qui interagit avec des éléments de réponse spécifiques, les HRE (*hypoxia responsive element*), contenus au niveau des séquences promotrices et *enhancers* des gènes cibles soumis à une régulation par l'hypoxie *(79-81)*.
Les HRE ont été identifiés pour la première fois dans la région promotrice du gène codant pour l'érythropoïétine *(79)*, et ont permis ensuite d'isoler et d'identifier le facteur de transcription HIF-1 *(80)*.

3.1. Régulation de HIF-1 par l'hypoxie

Le facteur de transcription HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités protéiques : la sous-unité HIF-1α et la sous-unité HIF-1β (ou ARNT1 pour *aryl hydrocarbon nuclear translocator 1*) *(82, 83)*.

L'importance de HIF-1 dans l'homéostasie de l'oxygène a été établie par des études d'inactivation des gènes (souris *knock-out)* codant pour les protéines du complexe HIF-1. En effet, des souris *knock-out* pour la sous-unité HIF-1α ou la sous-unité HIF-1β présentent une déficience au niveau de la vascularisation et des malformations cardiaques et neuronales qui conduisent à la mort embryonnaire *(84)*.

La régulation par l'hypoxie de HIF-1 est le résultat de la régulation de l'expression et de l'activité de la sous-unité HIF-1α, basée sur la concentration intracellulaire en O_2 *(figure 3)*.

Dans les cellules de mammifère, ARNm et protéines correspondant aux deux sous-unités de HIF-1 sont exprimés de façon constitutive dans la plupart des cellules.

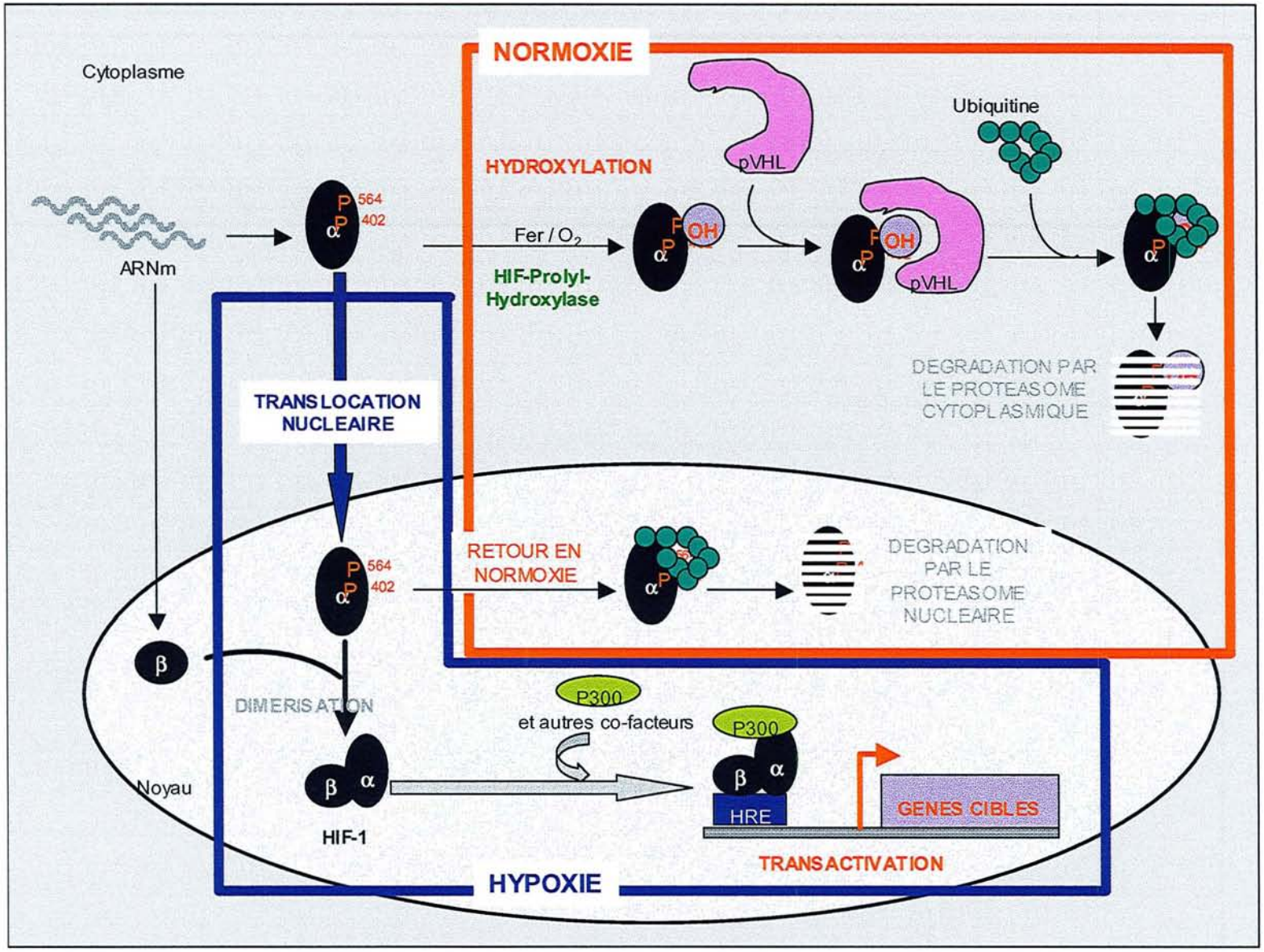


Figure 3 : Régulation de l'activité de HIF-1 par l'hypoxie. *Schéma adapté d'après Gothié et Pouysségur, Médecine/Sciences, 2002 (84).*

Dans les cellules soumises à des conditions normoxiques, la sous-unité HIF-1β est présente de façon constitutive dans le noyau. A l'inverse, la sous-unité HIF-1α est maintenue à un taux très faible car elle est rapidement dégradée (demi-vie < 5 minutes) par le protéasome dans le cytoplasme *(85-87)*. Pour cela, HIF-1α est hydroxylée au niveau de ces résidus proline 564 et 402 (Pro 564 et Pro 402) par des prolyl-hydroxylases, enzymes utilisant l'oxygène moléculaire et le fer comme co-facteur *(86)*. L'hydroxylation des résidus Pro 564 et Pro 402 est nécessaire pour que vienne ensuite se fixer à ce niveau, la protéine von Hippel-Lindau (pVHL). Cette dernière appartient à un complexe enzymatique qui possède une activité E3-ubiquitine ligase. Ainsi, en conditions normoxiques, la sous-unité HIF-1α est ubiquitinylée puis dégradée par le protéasome *(85-87)*.

En condition d'hypoxie, l'oxygène devient un facteur limitant à l'activité de la prolyl-hydroxylase ce qui diminue l'hydroxylation de HIF-1α. La protéine pVHL ne peut pas reconnaître la sous-unité HIF-1α non hydroxylée, qui ne peut donc pas être dégradée. Le signal hypoxique déclenche la stabilisation et la translocation de HIF-1α vers le noyau, où elle peut se fixer à HIF-1β, et former le dimère HIF-1α/HIF-1β. Dans le noyau, le facteur de transcription HIF-1 se fixe sur les éléments HRE et s'associe à d'autres co-facteurs, dont la protéine p300/CPB, pour activer la transcription des gènes dont l'expression est dépendante de l'oxygène *(84, 88, 89)*.
Toutefois, l'activité transcriptionnelle de HIF-1 n'est optimale que si HIF-1α subit des modifications supplémentaires de type phosphorylation *(90)*.

3.2. Régulation de HIF-1 indépendante de l'hypoxie

Même si l'hypoxie reste l'inducteur ubiquitaire de HIF-1, la stabilisation de la sous-unité HIF-1α est parfois provoquée par des voies indépendantes de l'hypoxie dans certains types cellulaires.
Par exemple, dans des cellules musculaires lisses vasculaires, il a été observé une forte augmentation de HIF-1α, suite à l'exposition des cellules à l'angiotensine II, la thrombine, et au PDGF (*platelet derived growth factor*) *(91)*.
De même, l'insuline, l'IGF-1 et l'IGF-2 (*insulin-like growth factor-1 et 2*), l'EGF et le FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) induisent l'expression de HIF-1 dans des cellules embryonnaires murines en situation de normoxie *(92)*.

Deux voies de transduction ont été principalement associées à la stabilisation de la sous-unité HIF-1α dans des conditions d'oxygénation normale. La première correspond à la voie de signalisation par la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et la protéine AKT, et la

seconde correspond à la voie des MAP kinases (*mitogen activated protein kinases*) *(figure 4) (88).*

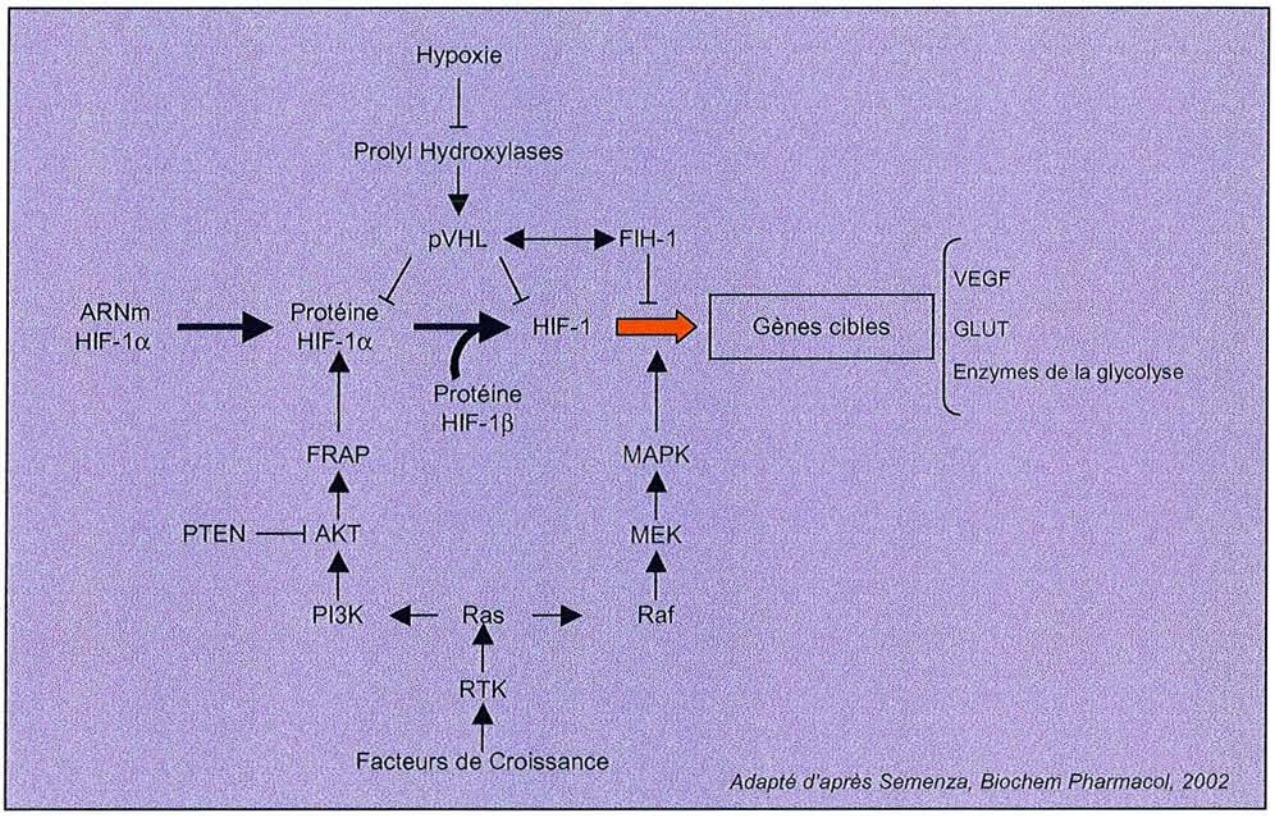


Figure 4 : Voies de transduction du signal impliquées dans l'expression et l'activation de HIF-1. Les abréviations sont répertoriées en annexe dans la "Liste des abréviations".

3.3. HIF-1 : régulateur central de l'expression de gènes en conditions hypoxiques

Jusqu'à présent, plus de 40 gènes ont été répertoriés comme gènes cibles de HIF-1. Tous codent pour des protéines intervenant dans des systèmes de contrôle de l'homéostasie de l'O_2. Les principaux gènes cibles de HIF-1 sont présentés dans le *tableau 2.*

Tableau 2 : Principaux gènes cibles du facteur de transcription HIF-1.

SYSTEME D'ADAPTATION	Gènes cibles	Fonctions
TRANSPORT DE L'OXYGENE	Erythropoïétine	Facteur de croissance de la lignée érythrocytaire
	Hème oxygénase 1	Synthèse de vasodidalateur (CO)
	Transferrine	} Transport du fer
	Récepteur de la transferrine	
	Céruloplasmine	Métabolisme du fer
ANGIOGENESE	VEGF	Facteur de croissance des cellules endothéliales
	VEGF-R1 (Flt-1)	Récepteur au VEGF
	NOS 2	Synthèse du NO, agent vasodilatateur
	Endothéline-1	Peptide vasoconstricteur
	PAI-1	Régulation de la migration des cellules endothéliale
	TGFβ	Facteur pro-angiogénique
	Adrénomédulline	Peptide vasodilatateur
ADAPTATION METABOLIQUE	Hexokinase 1 et 2	} Enzymes de la glycolyse
	Phosphofructokinases	
	Aldolase A et C	
	Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase	
	Phosphoglycérate kinase 1	
	Enolase-1	
	Pyruvate kinase M	
	Lactate déshydrogénase A	
	Transporteur du Glucose 1 et 3	Incorporation du glucose
REGULATION DU pH	Anhydrase carbonique 9	Catalyse la réaction $H^+ + HCO_3^- \leftrightarrows H_2CO_3$
APOPTOSE CYCLE CELLULAIRE	Nip3	Protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2
	Protéine p21	} Régulation du cycle cellulaire
	Cyclin G2	
NEUROTRANSMISSION	Tyrosine hydroxylase	Synthèse des neurotransmetteurs catécholaminergiques
FACTEURS DE CROISSANCE	IGF-2	
	IGF-BP 1	

Toutes les abréviations citées dans ce tableau sont répertoriées en annexe dans la "Liste des abréviations".

3.4. HIF-1 : protéine anti- et pro-apoptotique

La sous-unité HIF-1α peut exercer alternativement un effet anti- et pro-apoptotique, en fonction de la sévérité et de la durée de l'hypoxie, mais également en fonction du type cellulaire.

L'effet anti-apoptotique de HIF-1 a essentiellement été observé dans des cultures de neurone. En effet, alors que les chélateurs du fer, tels que la déféroxamine, sont connus pour protéger les neurones contre l'apoptose, il a été montré que l'effet anti-apoptotique de ces agents résultait d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 *(93)*. A l'inverse, Carmeliet *et coll.* ont établi l'implication de HIF-1 dans le déclenchement de l'apoptose en situation d'hypoxie sévère ou prolongée en montrant que des cellules souches embryonnaires déficientes pour HIF-1 étaient résistantes à l'apoptose induite par l'hypoxie *(94)*. Pour cela, HIF-1 augmente l'expression du gène *Nip3* codant pour une protéine pro-apoptotique du même nom appartenant à la famille de Bcl-2.

D'autre part, il a été démontré que l'hypoxie induisait une accumulation de la protéine p53, parallèlement et dépendamment de la stabilisation de HIF-1α, et une liaison entre HIF-1α et p53 a été mise en évidence *(94, 95)*.

Récemment, une étude a montré que les rôles antagonistes anti- et pro-apoptotique de HIF-1α, étaient associés à l'existence de deux états de phosphorylation distincts de la protéine *(90)*.

II- PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPOXIE TUMORALE

A- Mise en évidence et caractéristiques de l'hypoxie tumorale

L'existence de zones hypoxiques dans les tumeurs était présagée depuis de nombreuses années *(96)*, mais ce n'est qu'avec l'arrivée des micro-électrodes sensibles à l'oxygène que l'hypoxie tumorale a pu être identifiée et caractérisée définitivement, d'abord dans les modèles de greffes tumorales chez les animaux *(73)*, puis dans les tumeurs solides accessibles chez les patients *(11, 97-99)*.

Il apparaît que la distribution des valeurs de pO_2 enregistrées dans les tumeurs est très différente de celle obtenue dans les tissus sains *(97, 100)*. Des zones d'hypoxie modérée à sévère, voire d'anoxie ont été identifiées dans une large variété de tumeurs humaines (cancer du sein *(100)*, cancer du col de l'utérus *(97)*, cancers de la sphère ORL *(9)*, sarcomes des tissus mous *(98)*, tumeurs cérébrales malignes *(29, 30)*, prostate *(101) etc...*).

La présence de nombreuses zones hypoxiques est considérée aujourd'hui comme une propriété physiopathologique caractéristique des tumeurs solides *(4, 100)*.

La primeur, et par conséquent la plus grande expertise, concernant la détermination de l'oxygénation tumorale, revient à l'équipe de P. Vaupel et M. Hockel (*Université de Mainz, Allemagne*). Cette équipe a montré que les pO_2 médianes enregistrées dans les cancers du sein et dans les cancers cervicaux étaient inférieures aux valeurs enregistrées dans les tissus normaux (respectivement, 30 mmHg *vs* 65 mmHg pour le sein, et 13 mmHg *vs* 48 mmHg pour l'utérus) *(97, 100)*. Des écarts similaires ont été rapportés ultérieurement pour d'autres localisations tumorales *(102-104)*.

D'autre part, Vaupel *et coll.* ont rapporté qu'environ 60% des cancers cervicaux localement avancés présentaient des zones d'hypoxie sévère ($pO_2 \leq 2,5$ mmHg) et/ou d'anoxie ($pO_2 = 0$ mmHg) *(69)*. Les récidives locales de cancers du col se sont avérées être plus hypoxiques que les tumeurs primitives, puisque 78% des récidives présentaient des zones dont la pO_2 était inférieure ou égale à 2,5 mmHg *(69)*.

La présence de zones d'hypoxie sévères a été enregistrée dans les glioblastomes avec une pO_2 médiane de 7,4 mmHg *(29)*. Dans une autre étude menée sur des gliomes de haut grade, la pO_2 médiane était de 5,6 mmHg, et 48% des valeurs de pO_2 étaient inférieures à 2,5 mmHg *(30)*. Dans cette étude, malgré une différence non significative, la pO_2 tendait à augmenter quand il s'agissait de gliome de bas grade (pO_2 médiane = 10,3 mmHg) *(30)*.

Concernant le développement de l'hypoxie et sa proportion dans les tumeurs, plusieurs auteurs ont constaté une hétérogénéité importante, aussi bien à l'intérieur d'une même tumeur, qu'entre les tumeurs de même histologie *(102)*. Par ailleurs, aucune relation entre la taille des tumeurs et la sévérité de l'hypoxie tumorale n'a été mise en évidence *(97, 100, 105)*.

B- Origine de l'hypoxie tumorale

Dans les tumeurs solides, l'apport en O_2 est insuffisant par rapport à la consommation d'O_2 des cellules néoplasiques et des cellules stromales, générant ainsi des zones d'hypoxie dans le tissu tumoral.

1- L'hypoxie chronique

Thomlinson et Gray ont été les premiers à apporter des éléments d'explication quant aux mécanismes responsables de l'instauration d'une hypoxie dans les tissus tumoraux *(96)*. En observant des coupes histologiques de tumeurs humaines, ils ont constaté que la distance qui séparait dans le tissu tumoral, les capillaires sanguins de la zone de nécrose était constante : elle atteignait environ 150 µm. En prenant en compte la pO_2 dans les capillaires sanguins nourriciers et le niveau de consommation de l'O_2 par les cellules, les auteurs ont calculé que cette distance correspondait à la distance maximale de diffusion de l'oxygène *(96)*. Ils ont alors émis l'hypothèse qu'un gradient de diffusion de l'oxygène, des vaisseaux vers la zone de nécrose, devait être responsable de l'apparition, à proximité de la zone de nécrose, de cellules hypoxiques viables *(figure 5) (96)*.

Plusieurs auteurs ont observé dans le tissu tumoral, une augmentation des distances entre les vaisseaux perfusés, probablement liée à la prolifération anarchique du tissu malin, et ont confirmé l'hypothèse de Thomlinson et Gray *(106-108)*. Compte tenu de la limitation de diffusion de l'O_2, les cellules situées à plus de 90 -100 µm du vaisseau perfusé le plus proche, ne reçoivent plus autant d'O_2 qu'elles en nécessitent et deviennent hypoxiques *(106)*. Si aucun traitement extérieur n'est appliqué à la tumeur, l'hypoxie découlant de l'augmentation des

distances inter-capillaires et de la limite de diffusion de l'O_2 est irréversible. C'est pourquoi, elle est qualifiée d'***hypoxie chronique*** *(4)*.

Des études *in vivo* basées sur l'administration d'analogues de la thymidine (BrdUrd ou IdUrd) et leur détection par des méthodes immunohistochimiques, ont montré que la prolifération cellulaire concernait majoritairement les cellules tumorales situées au voisinage des vaisseaux sanguins *(figure 5)*. En revanche, les cellules situées à plus de 90 -100 µm d'un vaisseau, c'est-à-dire les cellules en zone d'hypoxie chronique, n'incorporaient pas l'analogue de la thymidine *(109)*.

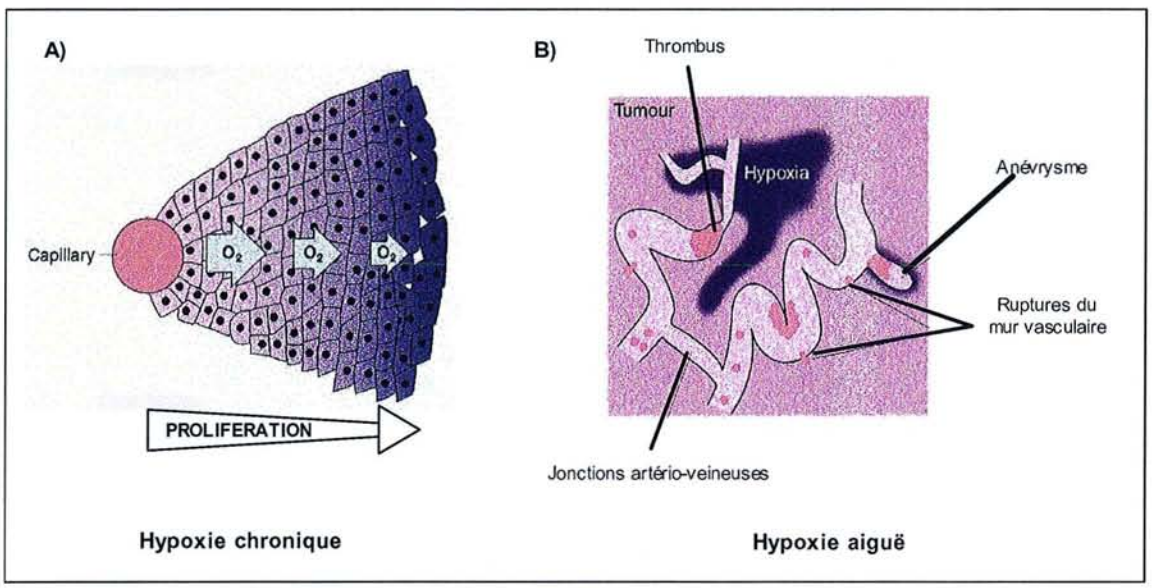


Figure 5 : Les deux formes d'hypoxie. **A)** Gradient de diffusion de l'oxygène à partir d'un capillaire sanguin perfusé. **B)** Anomalies structurales et fonctionnelles de la micro-circulation intra-tumorale responsables de l'hypoxie aiguë. *Schéma adapté de Brown, Molec Med Today, 2000 (110).*

2- L'hypoxie aiguë

Toutefois, le modèle de Thomlinson et Gray ne permet pas d'expliquer à lui seul la présence de toutes les zones d'hypoxie observées. En effet, dans un certain nombre de tumeurs, des zones hypoxiques étaient juxtaposées à des régions dont le degré d'oxygénation était quasi normal, par comparaison avec les tissus sains *(111)*. Par injections successives de deux agents fluorescents (l'un à tropisme tumoral et l'autre à tropisme vasculaire), Chaplin *et coll.* ont apporté la preuve définitive que l'hypoxie tumorale pouvait également résulter d'une altération temporaire de la perfusion sanguine responsable de la survenue d'une hypoxie de type ischémique, réversible et transitoire *(112)*. Il s'agit donc d'une ***hypoxie aiguë***, apparaissant aujourd'hui comme le phénomène majoritaire.

Les masses tumorales sont caractérisées par de nombreuses anomalies structurales et fonctionnelles de la micro-circulation intra-tumorale *(figure 5)*. La formation de micro-anévrysmes, les ruptures du mur vasculaire, l'établissement de jonctions artério-veineuses sont susceptibles de provoquer des perturbations voire des inversions du flux sanguin *(73, 113-115)*. Des compressions vasculaires (associées à la prolifération massive des cellules tumorales, à une réaction inflammatoire ou/et à une réaction œdémateuse) ou la formation de thrombus intra-vasculaires peuvent conduire à la l'occlusion temporaire de vaisseaux.

3- Autres facteurs favorisant l'hypoxie tumorale

Alors qu'elle est intrinsèquement causée par une vascularisation tumorale défectueuse, l'hypoxie tumorale est très souvent amplifiée et aggravée par des facteurs externes *(69)*. En particulier, l'anémie provoquée soit par le développement tumoral soit par les traitements anticancéreux, en diminuant la capacité du sang à transporter l'oxygène, aggrave le développement de l'hypoxie *(2, 3)*. De même, l'hypoxie tumorale est aggravée chez les fumeurs puisque le monoxyde de carbone produit par le tabac réduit la libération de l'O_2 au niveau des tissus.

Les traitements cytotoxiques provoquent des changements brutaux de gradients en oxygène et de perfusion sanguine. Ainsi, au cours des heures et des jours qui suivent l'administration de fortes doses d'irradiation ou l'administration d'agents anticancéreux, des variations importantes de la pO_2 ont été enregistrées dans les modèles tumoraux chez l'animal *(116-120)*ou dans les tumeurs de patients *(104, 121)*, probablement du fait de modifications du métabolisme *(116)* et de la consommation d'oxygène par les cellules, ainsi que du fait de modifications du flux sanguin *(122, 123)*.

C- Tolérance des cellules tumorales vis-à-vis de l'hypoxie

Sachant que l'organisme possède physiologiquement des mécanismes d'adaptation à l'hypoxie tissulaire, la tumeur tire profit de cette capacité d'adaptation, et l'utilise à l'extrême pour favoriser sa propre croissance. Par ailleurs, la tolérance des cellules tumorales étant beaucoup plus grande que celle des cellules normales, l'adaptation à l'hypoxie devient alors un processus pathologique.

Cette grande tolérance vis-à-vis de l'hypoxie est liée à deux processus coexistants. Tout d'abord, les altérations génétiques présentes dans les cellules tumorales (déséquilibre en faveur des voies anti-apoptotiques, dérégulation de la prolifération cellulaire...) peuvent leur permettre de survivre et de se développer plus aisément que les cellules normales dans des

conditions environnementales extrêmes *(75)*. Deuxièmement, les cellules tumorales, caractérisées par une instabilité génomique et phénotypique, sont capables de faire évoluer leurs propriétés en situation hypoxique, afin que les cellules émergentes puissent survivre dans un milieu extrêmement défavorable *(5)*.

Cette grande tolérance des tumeurs vis-à-vis de l'hypoxie est principalement permise par l'intervention accrue de HIF-1 qui favorise la progression tumorale, par l'activation des voies glycolytiques et le développement d'une néo-angiogenèse tumorale.

1- Implication de HIF-1dans la progression tumorale

1.1. Surexpression de HIF-1α dans les tumeurs

Plusieurs études ont montré que la protéine HIF-1α était exprimée de façon plus importante en terme de fréquence et d'intensité, dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux *(124, 125)*. Ainsi, dans l'étude de Zhong *et coll.*, alors que le marquage immunohistochimique était négatif dans 88% des tissus normaux, 53% des tumeurs primaires présentaient une surexpression de HIF-1α *(124)*. La surexpression de HIF-1α a été retrouvée dans des tumeurs d'origine mammaire, cérébrale, pulmonaire, colique, ovarienne ou prostatique. D'autre part, 2/3 des métastases présentaient une surexpression de HIF-1α *(124)*.

1.2. Induction de l'expression de HIF-1α dans les tumeurs

Comme dans les tissus sains, l'induction de l'expression de HIF-1α est principalement associée à l'hypoxie tumorale. Une relation directe entre la surexpression de HIF-1α et la pO_2 intratumorale a été mise en évidence dans les cancers cervicaux *(126)*.

Dans les glioblastomes *multiforme* qui ont été identifiés comme des tumeurs hypoxiques *(29, 30)*, la présence de la sous-unité HIF-1α a été mise en évidence par immunohistochimie dans les cellules qui entourent la zone de nécrose, ainsi que dans les cellules infiltrantes, aux marges de la tumeur *(127, 128)*. Cette distribution confirme le lien entre l'expression de HIF-1α et le niveau d'oxygénation du tissu tumoral.

Toutefois, dans les tumeurs, des altérations telles que l'activation d'oncogènes (Ras, récepteur à l'EGF, ...) ou l'inhibition de gènes suppresseurs de tumeur (pVHL, PTEN, ...), peuvent également être responsables de l'expression de HIF-1α, indépendamment de l'état d'oxygénation des cellules tumorales. Par exemple, l'amplification du récepteur à l'EGF (R-EGF) est l'altération la plus communément rencontrée dans les gliomes malins *(129)*. Or, le R-EGF est un récepteur membranaire capable d'activer la voie de signalisation PI3K-AKT-FRAP et la cascade de transduction des MAP kinases, responsables de l'augmentation de

l'expression de HIF-1α et de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 *(cf figure 4) (130).* De même, PTEN est un gène suppresseur de tumeur fréquemment inactivé dans les tumeurs cérébrales *(129).* Or, celui-ci code pour une phosphatase qui régule négativement la voie de signalisation PI3K-AKT-FRAP. Ainsi, l'inactivation de PTEN peut se traduire par l'augmentation de l'expression de HIF-1α et par l'augmentation de l'activité du facteur de transcription HIF-1, indépendamment de l'état d'oxygénation des cellules tumorales *(130)(cf figure 4).*

1.3. Importance de HIF-1 dans la progression tumorale

Des expérimentations ont consisté à implanter, en sous-cutané chez la souris, des cellules embryonnaires néoplasiques sauvages (HIF-1$\alpha^{+/+}$) ou mutées négativement pour HIF-1α (HIF-1$\alpha^{-/-}$). Les tumeurs formées à partir des cellules HIF-1$\alpha^{-/-}$ étaient beaucoup plus petites que les tumeurs formées à partir des cellules HIF-1$\alpha^{+/+}$, indiquant que la perte de HIF-1 aboutit à une réduction du développement tumoral *(131).*

D'autre part, il a été montré que le blocage de l'activité transcriptionnelle de HIF-1, en empêchant l'interaction spécifique entre HIF-1 et le co-activateur p300/CPB, permettait de réduire efficacement la croissance tumorale *in vivo (132).*

L'ensemble de ces travaux a conduit les auteurs à identifier HIF-1 comme un facteur favorisant la progression tumorale.

2- Déplacement du métabolisme vers la glycolyse

Warburg *et coll.* ont montré que l'incorporation du glucose et la glycolyse étaient très élevées dans les cellules tumorales animales et humaines, en situation d'hypoxie mais également en conditions normoxiques *(130).* Depuis, cette propriété a été largement confirmée, et est d'ailleurs utilisée aujourd'hui à visée diagnostique. En effet, la tomographie par émission de positons (TEP) s'appuie sur la plus grande incorporation d'un dérivé du glucose, le de 2-[^{18}F]-fluoro-2-déoxy-D-glucose ([^{18}F]-FDG), par les cellules cancéreuses que par les cellules normales, pour établir le diagnostic des cancers *(133).*

L'activation constitutive de la voie glycolytique permet probablement aux cellules tumorales de maintenir un certain équilibre énergétique malgré la très faible disponibilité en O_2, ce qui contribue à la grande tolérance des cellules tumorales vis-à-vis de l'hypoxie.

Il a été constaté que le déplacement métabolique en faveur de la glycolyse pouvait correspondre à une réponse physiologique normale mise en oeuvre par les cellules tumorales pour s'adapter à l'hypoxie tumorale, ou pouvait être la conséquence d'altérations oncogéniques

(133). L'augmentation de la glycolyse est généralement associée à la surexpression du facteur de transcription HIF-1 *(75, 133, 134)*.

L'augmentation de l'expression des transporteurs du glucose GLUT-1 et GLUT-3 *(135)* et l'augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes glycolytiques (Hexokinase II, Lactate déshydrogénase, *etc*...) sont à l'origine de l'augmentation de la captation du glucose et de la glycolyse par les cellules cancéreuses *(133, 134)*.

3- L'angiogenèse tumorale

La vascularisation tumorale résulte essentiellement d'un processus angiogénique, correspondant au développement de nouveaux capillaires sanguins par bourgeonnement à partir du réseau capillaire préexistant dans l'environnement tumoral.

L'angiogenèse est un processus physiologique survenant surtout au cours du développement embryonnaire, qui n'intervient durant la vie adulte qu'au moment de la cicatrisation tissulaire et du cycle menstruel chez la femme *(136)*. En revanche, le développement tumoral s'accompagne d'une angiogenèse excessive, et par conséquent pathologique, où les cellules endothéliales prolifèrent 200 à 2000 fois plus vite que les cellules endothéliales des tissus adultes normaux *(137)*. L'angiogenèse tumorale est un processus "multi-étapes", où le déroulement de chaque étape dépend de l'équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques dont les principaux sont énumérés dans le *tableau 3*.

Tableau 3 : Principaux facteurs endogènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse.

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs antiangiogéniques
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	*Thrombospondin*
Acidic and basic fibroblast growth factor (aFGF and bFGF)	*Angiostatin*
Platelet-derived endothelial cell growth factor (PDECGF)	*Endostatin*
Angiogenin	*Interferon α, β, γ*
Transforming growth factor α, β (TGF α and TGF β)	*Interleukin-12 (IL-12)*
Epidermal growth factor (EGF)	*Platelet factor 4 (PF4)*
Hepatocyte growth factor (HGF)	*Angiopoietin 1*
Platelet-activating factor (PAF)	*Tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP)*
Tumor necrosis factor- α (TNF α)	
Granulocyte colony-stimulating factor (GCS-F)	
Interleukin-8 (IL-8)	
Prostaglandin E1 and E2	
Vascular integrin $\alpha_V\beta_3$	
Matrix metalloproteinases (MMP)	

3.1. Nécessité de l'angiogenèse tumorale

Ce processus est fondamental pour la croissance tumorale car les vaisseaux sanguins assurent l'apport en oxygène et en nutriments, et permettent l'évacuation des déchets.

Le rôle de l'angiogenèse en biologie cancéreuse a été mis en avant par Folkman, qui a suggéré dès 1971, que les tumeurs solides, en l'absence de néovascularisation, resteraient "dormantes" dès que leur taille aurait atteint 2 à 3 mm de diamètre, du fait de la limite de diffusion de l'oxygène et des nutriments *(138)*. De nombreuses investigations ultérieures ont confirmé les suppositions de Folkman, et les arguments supportant l'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale était dépendante de l'angiogenèse ont été récapitulés en 1990. Voici trois de ces arguments *(139)*.

a- La taille des tumeurs implantées dans des organes perfusés isolés où les vaisseaux sanguins ne prolifèrent pas est limitée à 1 à 2 mm^3, mais ces-mêmes tumeurs greffées chez la souris croissent rapidement après la mise en place d'une néo-vascularisation.

b- L'index de marquage à la thymidine tritiée (*labeling index*) moyen pour une tumeur solide donnée est directement fonction du marquage des cellules endothéliales dans cette tumeur.

c- Des inhibiteurs de l'angiogenèse, qui ne possèdent pas d'activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales *in vitro,* sont capables d'inhiber la croissance des tumeurs *in vivo*.

D'après les connaissances actuelles, l'angiogenèse ne participe pas seulement à la croissance tumorale : elle est également impliquée dans la progression initiale (passage de la lésion précancéreuse à la lésion cancéreuse), dans la phase d'invasion (passage de cellules tumorales dans la circulation) et dans l'évolution des micro-métastases dormantes vers des métastases actives *(140)*.

3.2. Mécanismes de l'angiogenèse tumorale

3.2.1. Les micro-tumeurs dites avasculaires

Les cellules néoplasiques ayant acquis la capacité de proliférer spontanément et de manière incontrôlée, se multiplient pour former une micro-tumeur avasculaire dont la taille n'excède pas 1 à 2 mm^3, en raison de la diffusion limitée de l'oxygène, des nutriments et des déchets *(139)*. En général, tant que les micro-tumeurs restent avasculaires, les cellules néoplasiques prolifèrent en continu, mais la division cellulaire est compensée par un très fort taux de mort cellulaire *(141)*.

L'étape avasculaire du processus tumoral concerne non seulement les tumeurs *in situ* dans la phase précoce de leur développement, mais concerne également les micro-métastases en dormance *(142)*. Cette étape peut durer pendant plusieurs années après l'initiation cancéreuse, ce qui explique que des récidives de la maladie sont observées chez les patients après plusieurs années de rémission.

3.2.2. Le "switch" angiogénique

Dans le développement tumoral, le "switch angiogénique" correspond au moment où la micro-tumeur sort de sa période avasculaire pour initier la mise en place de sa vascularisation.

Le "switch" angiogénique qui survient spontanément dans les tumeurs humaines et expérimentales, peut se produire en réponse au micro-environnement hypoxique avec l'intervention de HIF-1 *(143)*, ou suite à l'activation d'oncogènes *(142)*. Chacun de ces évènements se traduit par l'induction de l'expression et de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF, par les cellules tumorales ou stromales.

Il suffit que quelques cellules néoplasiques (environ 1%) acquièrent le "phénotype angiogénique" pour que la micro-tumeur sorte de sa période avasculaire et que la tumeur se vascularise *(144)*.

3.2.3. Les étapes de la formation des néo-vaisseaux tumoraux (figure 6)

L'initiation

Les capillaires sanguins pré-existant dans l'environnement tumoral sont présents sous forme mature, et sont caractérisés par des cellules endothéliales quiescentes, interagissant avec la membrane basale, l'ensemble étant stabilisé par les péricytes qui inhibent, *via* le TGFβ, la prolifération des cellules endothéliales. L'intégrité de la structure vasculaire dépend de l'équilibre entre l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2), qui jouent respectivement le rôle de stabilisateur et de déstabilisateur de la structure vasculaire.

Les capillaires sanguins situés au voisinage de la tumeur sont en permanence déstabilisés sous l'action de l'Ang-2 qui induit la perte des contacts entre cellules endothéliales, membrane basale et péricytes. Les cellules endothéliales deviennent alors plus sensibles aux effets des agents mitogéniques. Néanmoins, l'initiation de l'angiogenèse ne peut avoir lieu que lorsque le VEGF agit de façon synergique avec l'Ang-2 *(145)*.

Le VEGF induit une vasodilatation des capillaires, *via* le NO, et une augmentation de la perméabilité vasculaire, d'où son autre nom : le VPF (*vascular permeability factor*). L'augmentation de la perméabilité vasculaire permet l'extravasation de protéines plasmatiques qui forment alors dans le tissu, une couche matricielle sur laquelle les cellules endothéliales activées pourront migrer ultérieurement *(146)*.

Migration et prolifération des cellules endothéliales

Le plasminogène est l'une des principales protéines plasmatiques extravasées : dans le milieu péri-vasculaire, sous l'action des activateurs du plasminogène de type tissulaire (*t-PA*) ou de type urokinase (*u-PA*), il est activé en plasmine qui en retour active certaines

métalloprotéinases. La plasmine ainsi que les métalloprotéinases dégradent les composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, les structures protéiques de protéoglycanes) et de la membrane basale. Cette étape est nécessaire à la pénétration, puis à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales sous l'effet de stimuli respectivement chimio-attractants et mitogènes.

Dans l'espace péri-vasculaire, les cellules endothéliales vont donc se multiplier et se positionner les unes à la suite des autres pour former au final une colonne de migration, structure tubulaire formée de cellules endothéliales.

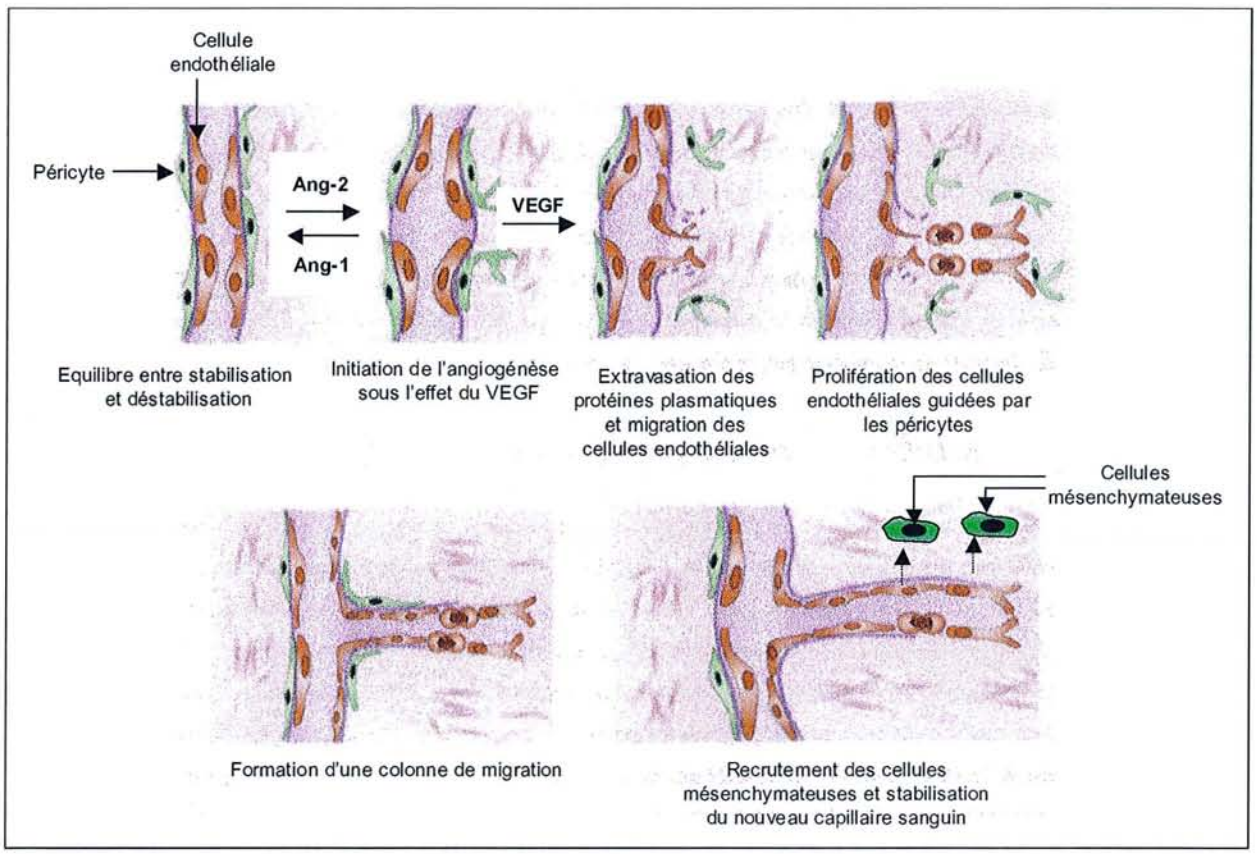


Figure 6 : Les étapes de la formation des néo-vaisseaux tumoraux. *Schéma adapté d'après Bergers, Nature Reviews Cancer, 2003 (147).*

L'étape ultime consiste à reformer une structure capillaire stable. Ceci implique la formation d'une membrane basale, le recrutement par les cellules endothéliales des cellules mésenchymateuses qui vont elles-mêmes se différencier en péricytes, et l'établissement de jonctions entre ces différents éléments *(147)*.

3.3. Caractéristiques de l'angiogénèse tumorale

Contrairement à l'angiogénèse des tissus sains, la régulation de l'angiogénèse tumorale n'est pas parfaite, et les dysfonctionnements provoquent des anomalies vasculaires telles que la vascularisation tumorale, du fait de ces caractéristiques uniques, peut être distinguée de la vascularisation normale *(147)*.

En premier lieu, les vaisseaux tumoraux sont incapables de devenir quiescents, ce qui se traduit par la croissance perpétuelle des néo-vaisseaux.

La croissance continue s'accompagne d'anomalies morphologiques. Les vaisseaux tumoraux sont déformés, dilatés, tortueux et peuvent même être nécrosés. Comparativement à une vascularisation normale, les péricytes recrutés sont souvent moins nombreux, et les interactions qui lient les cellules endothéliales, la membrane basale et les péricytes sont souvent moins fortes. De même, il peut arriver que les cellules endothéliales ne se positionnent pas les unes à la suite des autres pour s'organiser en monocouche, mais forment des amas cellulaires. Par ailleurs, Chang *et coll.* ont apporté la preuve que des cellules tumorales contribuaient à former la paroi des vaisseaux sanguins tumoraux *(148)*. L'ensemble de ces anomalies morphologiques génère une instabilité et une fragilité de la paroi des vaisseaux tumoraux. En relation avec cette fragilité accrue, le réseau vasculaire tumoral est souvent hémorragique. L'action permanente du VEGF rend les capillaires très perméables.

Le réseau vasculaire tumoral ne présente pas l'organisation hiérarchique habituellement rencontrée dans les tissus sains, à savoir, artères, artérioles, capillaires, veinules et veines, mais correspond plutôt à un réseau enchevêtré et complexe où le sens du flux sanguin n'est pas toujours très bien défini.

Au final, les anomalies touchant l'angiogenèse tumorale se traduisent par une perfusion sanguine imparfaite et irrégulière aussi bien dans l'espace que dans le temps.

3.4. Le VEGF : principal facteur pro-angiogénique

Les facteurs pro- et anti-angiogéniques dérivent à la fois des cellules tumorales et des cellules stromales (macrophages, fibroblastes) et existent sous forme soluble, liée à la membrane des cellules ou liée à la matrice extracellulaire *(149)*.

Plus d'une vingtaine de facteurs de croissance, de cytokines, et autres substances ont été identifiées comme possédant des propriétés pro-angiogéniques, tandis que parallèlement, de nombreux inhibiteurs de l'angiogenèse ont été mis en évidence *(cf tableau 3)*.

Le VEGF, décrit pour la première fois en 1983 *(150)*, est le facteur soluble pro-angiogénique le plus étudié. Il est considéré à l'heure actuelle comme le plus puissant, même si l'intervention des autres facteurs reste indispensable.

L'implication majeure du VEGF dans l'angiogenèse tumorale a été mise en évidence *in vivo* en démontrant que l'inhibition du VEGF par un anticorps anti-VEGF permettait de réduire significativement la croissance de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris *nude* (un rhabdomyosarcome, un glioblastome multiforme et un léiomyosarcome) *(151)*.

Le gène *VEGF* code pour 6 isoformes protéiques distinctes, qui sont le $VEGF_{121}$, le $VEGF_{145}$, le $VEGF_{165}$, le $VEGF_{183}$, le $VEGF_{189}$, le $VEGF_{206}$, respectivement composées de 121, 145, 165, 183, 189, et 206 résidus d'acide aminé, et qui sont issues de l'épissage alternatif de l'ARNm *(152, 153)*. Les différentes isoformes diffèrent par leur capacité à se lier à l'héparine et à l'héparane-sulfate : cette propriété conditionne leur capacité à exercer leur action stimulatrice sur les cellules endothéliales à distance.
Le $VEGF_{189}$, le $VEGF_{206}$ présentent une très grande affinité à l'égard de l'héparine et de l'héparane-sulfate et sont entièrement séquestrés, soit au niveau des membranes des cellules qui les produisent, soit au niveau de la matrice extracellulaire.
A l'inverse, le $VEGF_{121}$ est une protéine soluble et diffusible qui peut exercer son action biologique sur des cellules endothéliales situées à distance.
Le $VEGF_{145}$ et le $VEGF_{165}$ peuvent se lier à l'héparine et à l'héparane-sulfate mais ces isoformes présentent une affinité moindre pour ces derniers, si bien que ces deux isoformes existent à la fois sous forme soluble et sous forme séquestrée *(152)*.

Tandis que le $VEGF_{145}$ et le $VEGF_{206}$ sont rarement exprimés par les tissus, le $VEGF_{121}$, le $VEGF_{165}$ et le $VEGF_{189}$ sont habituellement les isoformes prédominantes. Les isoformes 121 et 165 jouent un rôle biologique direct et majoritaire dans l'angiogenèse tumorale *in vitro* et *in vivo*. L'isoforme 189 peut être clivée en un facteur tronqué de 110 acides aminés possédant un pouvoir mitogénique sur les cellules endothéliales équivalent à l'isoforme 165 *(152-154)*.

Les différentes isoformes se lient à deux récepteurs à activité tyrosine kinase : VEGFR-1 (flt-1) et VEGFR-2 (KDR/flk-1), qui sont exprimés essentiellement à la surface des cellules endothéliales, et de façon minoritaire à la surface de monocytes/macrophages et de certaines cellules tumorales *(155)*.

D- Méthodes de mesure de l'hypoxie tumorale

De nombreuses techniques ont été développées afin de détecter et de quantifier l'hypoxie tumorale. Ce paragraphe présente, de façon non exhaustive, les méthodes les plus fréquemment utilisées en pratique clinique ou évaluées à titre expérimental. Nous essaierons de résumer leur principe technique, ainsi que leurs principaux avantages et inconvénients.

1- Les sondes polarographiques sensibles à l'oxygène

Les techniques les plus fréquemment rencontrées consistent à introduire directement dans le tissu tumoral une sonde polarographique sensible à l'oxygène, qui permet de déterminer la pO_2 après réduction électro-chimique de l'oxygène dissous. Plusieurs systèmes incluant ces sondes polarographiques ont été développés successivement afin de les rendre aisément utilisables, notamment chez les patients. A l'heure actuelle, le système *pO_2 Histograph*, commercialisé par Eppendorf™, Allemagne fait référence.

1.1. Présentation et principe du système pO_2 Histograph, Eppendorf™

Le système comprend deux microélectrodes entre lesquelles une faible tension (- 700 mV) de polarisation (d'où le qualificatif "polarographique") est appliquée : il s'agit de l'anode en argent, polarisée positivement et servant d'électrode référence, et de la cathode en or (17 µm de diamètre), polarisée négativement et contenue dans une sonde en forme d'aiguille (diamètre total : 300 µm). Alors qu'au niveau de l'anode se produit la réaction d'oxydation suivante,

$$4\,Ag + 4\,Cl^- \rightarrow 4\,AgCl + 4\,e^-$$

l'oxygène est réduit électro-chimiquement au niveau de la cathode en or selon la réaction suivante :

$$O_2 + 2\,H_2O + 4\,e^- \rightarrow 4\,OH^-$$

Un faible courant est alors généré, directement proportionnel à la pression partielle en oxygène.

La sonde polarographique du *pO_2 Histograph* est guidée par un moteur qui lui permet de pénétrer pas à pas dans les tissus. La particularité du *pO_2 Histograph* provient du fait que l'ensemble de ce système "sonde + moteur" est relié à un système informatique, qui pilote le couple "moteur + sonde", et qui enregistre les mesures.

L'appareil enregistre la pO_2 locale à chaque pas. Du fait de la progression de la sonde dans la tumeur, plusieurs mesures sont enregistrées successivement le long d'un même axe de mesure. Afin d'obtenir une information globale concernant l'ensemble du tissu tumoral, les mesures sont effectuées selon plusieurs axes successifs.

La sonde polarographique nécessite d'être étalonnée dans une solution de sérum physiologique (NaCl 0,9%) : pour cela, la solution est saturée successivement en oxygène puis en azote permettant ainsi de définir respectivement le 100% puis le 0% d'oxygène.

Les mesures de courant électrique, et par conséquent les mesures de pO_2, enregistrées par le système informatique sont automatiquement corrigées par rapport à la température et à la pression atmosphérique ambiante, influant sur la dissolution et la diffusion de l'oxygène.

1.2. Avantages et inconvénients

Les microélectrodes polarographiques sensibles à l'oxygène, et plus particulièrement le *pO_2 Histograph*, Eppendorf™, ont l'avantage de permettre une mesure directe de l'oxygénation tumorale. Ce système utilisable chez les malades, a permis de mesurer l'hypoxie tumorale dans de nombreuses tumeurs humaines accessibles (tête et cou, col de l'utérus, sein, poumon, vessie, lymphomes, sarcome des tissus mous) *(8, 9, 11, 105)*, et dans les tissus sains correspondants *(100, 102)*.

L'un des inconvénients de ce système est que l'électrode consomme elle-même de l'oxygène au cours de la réduction électrochimique, provoquant alors une diminution continue du signal au cours du temps, lorsque l'électrode reste en un même point *(156)*. Ceci peut aboutir à une sous estimation de la pression partielle en oxygène et le mouvement de l'électrode est donc nécessaire. De même, le principe technique des microélectrodes rend la détection et la quantification précise plus difficile pour les très faibles concentrations en oxygène puisqu'elles correspondent à des courants électriques très faibles *(156)*. Or, en terme de risque radiobiologique, ce sont les zones présentant une très faible oxygénation qui présentent le plus d'intérêt.

Enfin, une étude a montré que la détermination de l'hypoxie tumorale par le système *pO_2 Histograph*, pouvait donner lieu à des variations de résultats importantes entre les laboratoires malgré un protocole identique. Cette étude suggère donc la prudence quand il s'agit de comparer les données, en valeurs absolues, obtenues entre différentes équipes ou quand il s'agit de prédire la réponse à la radiothérapie pour un sujet donné *(157)*.

2- Les fibres optiques sensibles à l'oxygène

2.1. Présentation et principe du système OxyLite

Afin de s'affranchir en partie des limitations liées aux électrodes polarographiques, un appareil de mesure de la pression partielle en oxygène a récemment été commercialisé par Oxford Optronics™, Royaume-Uni : le système *OxyLite*. Ce système utilise un fluorophore dérivé du ruthénium incorporé dans un polymère à l'extrémité distale d'une fibre optique. Une lumière bleue, émise par des diodes au niveau de l'extrémité proximale du système, se propage le long de la fibre optique jusqu'à son extrémité distale, où elle excite le ruthénium, donnant naissance à un signal de fluorescence. La durée de vie de la fluorescence est

inversement proportionnelle mais non linéaire, à la pression partielle en oxygène présente à l'extrémité de la fibre optique *(156, 158)*.

2.2. Avantages et inconvénients

La relation entre la pO_2 et le signal de fluorescence étant inversement proportionnelle, cette méthode est particulièrement sensible pour les faibles pO_2 (0-15 mmHg). Par contre, cette relation n'étant pas linéaire, les sondes sont pré-calibrées par le fournisseur.

Comme pour le *pO_2 Histograph*, Eppendorf™, la fibre optique est associée à un système informatique permettant l'enregistrement des données. Par contre, les premiers modèles de cet appareil ne comportent pas de moteur permettant le déplacement de la fibre au sein du tissu. Ainsi, sachant qu'aucune consommation d'oxygène ne se produit au cours de la réaction, ce système permet de réaliser des mesures en continu en un même point, mais l'appréciation de la pO_2 globale sur l'ensemble de la tumeur nécessite en contrepartie beaucoup plus d'intervention de la part du manipulateur.

2.3. Validation du système OxyLite

La comparaison des données obtenues par les deux systèmes a été réalisée chez l'animal sur un modèle de tumeurs murine *(159)*. Des résultats comparables ont été obtenus concernant le pourcentage de valeurs de $pO_2 < 5$ mmHg. En revanche, les résultats différaient significativement pour la fraction de valeurs de $pO_2 < 2,5$ mmHg, la discordance s'expliquant par les principes techniques des deux méthodes *(159)*.

Une étude évaluant l'effet du monoxyde de carbone sur l'oxygénation tumorale a montré que les deux méthodes de mesures de l'hypoxie permettaient d'aboutir à des conclusions comparables, même si les valeurs absolues d'oxygénation tumorale enregistrées avec les deux méthodes étaient parfois différentes *(160)*.

3- Limites d'utilisation des systèmes *pO_2 Histograph* et *OxyLite*

Ces deux systèmes (*pO_2 Histograph*, Eppendorf™ et *OxyLite,* Oxford Optronics™) ont pour principal avantage de permettre une mesure directe de l'oxygénation tumorale, qu'il est possible de réitérer sur une même tumeur à des moments différents. Ceci permet par conséquent d'évaluer les variations de l'oxygénation tumorale notamment en fonction d'éléments pouvant la modifier (radiothérapie, traitements visant à lutter contre l'hypoxie tumorale...).

Ces deux techniques peuvent être appliquées chez l'Homme pour des localisations tumorales accessibles telles que les tumeurs ORL, les cancers du col de l'utérus, de la vessie mais leur utilisation est difficilement envisageable pour des tumeurs profondes.

D'autre part, la sonde étant introduite en aveugle dans la tumeur à étudier, des mesures proches de zéro sont susceptibles d'être enregistrées dans les zones nécrotiques. Bien qu'elles ne correspondent pas à un risque radiobiologique réel, il n'est pas possible de distinguer et donc d'éliminer ces valeurs. Par conséquent, elles peuvent être responsables d'une sous-estimation de la pO_2 globale dans le tissu tumoral *(161, 162)*.

Ces techniques étant invasives, elles sont surtout critiquées car la pénétration des sondes dans le tissu tumoral provoquent des saignements, des oedèmes ou des phénomènes de vasoconstriction. Elles peuvent par conséquent induire des perturbations du micro-environnement tumoral probablement à l'origine d'erreurs de mesure.

4- Les marqueurs exogènes d'hypoxie: les dérivés nitro-imidazolés

4.1. Principe

Alors que les dérivés nitro-imidazolés étaient proposés comme agents permettant de potentialiser l'action des radiations ionisantes, plusieurs travaux ont montré que la liaison intracellulaire des dérivés nitro-imidazolés était dépendante de la faible concentration en oxygène *(163, 164)*. Dès lors, le misonidazole radiomarqué a été utilisé en tant que marqueur d'hypoxie pour développer des tests d'évaluation de l'hypoxie tumorale *(165)*.

Actuellement, les seuls marqueurs utilisés en clinique sont l'EF5 (*2-(2-nitro-1-H-imidazol-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl) acétamide*) et le pimonidazole (*1-[(2-hydroxy-3-piperidinyl)propyl]-2-nitroimidazole*) *(figure 7)*.

Dans les cellules présentant une pO_2 faible (inférieure à 10 mmHg), les composés nitro-imidazolés sont métabolisés en composés très réactifs qui forment des adduits sur les macromolécules intracellulaires *(figure 7B) (166)*. Une relation étroite ayant été mise en évidence *in vitro* et *in vivo,* entre le degré d'hypoxie et l'intensité de la liaison de ces métabolites nitro-imidazolés sur les macromolécules intracellulaires, cette approche a été proposée comme un nouveau moyen d'évaluer l'hypoxie tumorale *(165)*.

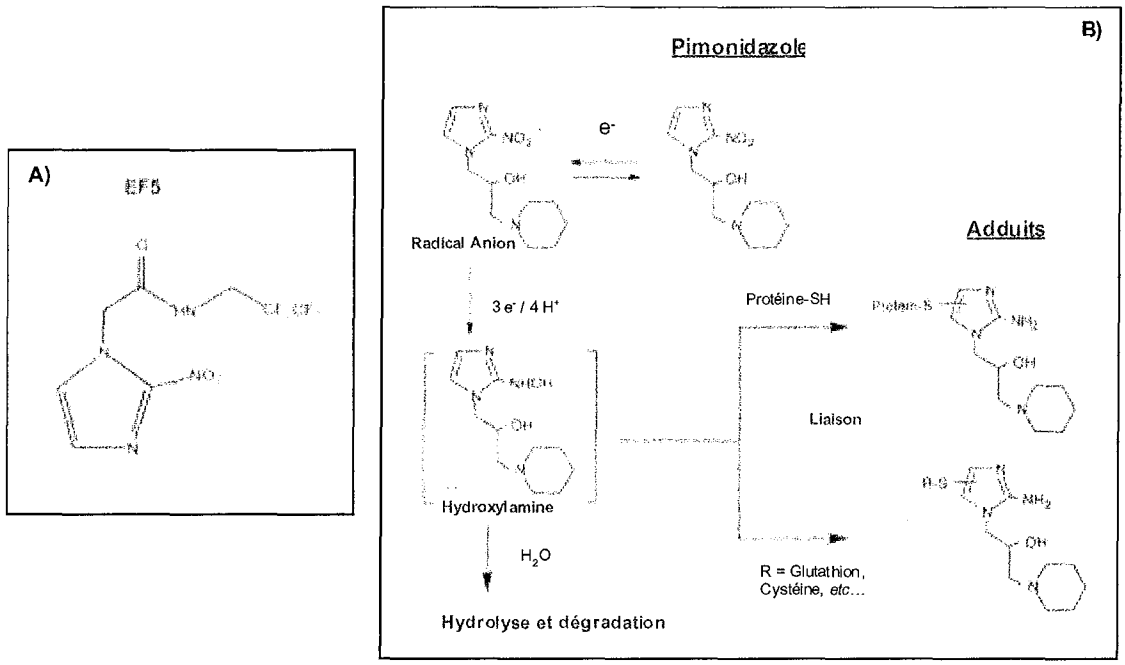


Figure 7 : **A)** Structure de l'EF5. **B)** Schéma de l'activation par réduction du pimonidazole. La réduction du pimonidazole en radical anion est complètement inhibée lorsque la concentration en oxygène ≥ 14 µM. 50% de l'inhibition survient pour une concentration en oxygène de 4 µM. *D'après Raleigh et coll, Radiat Res, 1999 (167).*

Plusieurs méthodes de révélations sont proposées pour la détection de ces adduits : l'autoradiographie, l'immunohistochimie, la cytométrie en flux, la spectroscopie ou l'imagerie à résonance magnétique, la tomographie à émission de positons *(168)*.

En particulier, le développement d'anticorps, couplés à des fluorochromes ou à des enzymes, qui reconnaissent spécifiquement les adduits formés par le pimonidazole ou par l'EF5, ont permis de développer des méthodes de détection utilisant la cytométrie en flux et l'immunohistochimie *(111, 168-170)*. La technique immunohistochimique a d'ailleurs été utilisée pour identifier les cellules hypoxiques sur des coupes histologiques de sphéroïdes multicellulaires, de tumeurs solides animales, et de tumeurs humaines marquées chez les patients.

Alors que la cytométrie en flux ne permet de mesurer que l'intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité d'adduits formés, les analyses immunohistochimiques fournissent en plus, des informations concernant la répartition spatiale des zones hypoxiques dans les tumeurs.

Des différences de métabolisation ont été constatées entre les différents types cellulaires *(168)*, ce qui rend difficile l'utilisation de l'intensité en tant que mesure absolue de l'hypoxie. Par conséquent, les analyses immunohistochimiques semblent désormais être préférées à la cytométrie en flux par la communauté scientifique *(171, 172)*.

4.2. Avantages et inconvénients

L'utilisation des dérivés nitro-imidazolés comme marqueurs d'hypoxie permet d'analyser l'hypoxie à l'échelle cellulaire, et ne prend en compte que l'hypoxie des cellules métaboliquement actives, donc potentiellement viables, qui sont les seules à présenter un danger en radiobiologie. D'autre part, contrairement aux techniques utilisant des sondes, ce procédé n'entraîne pas de perturbation du micro-environnement tumoral. Enfin, l'avantage majeur des marqueurs d'hypoxie est que la technique est applicable pour toutes les tumeurs, directement accessibles ou non.

En revanche, cette approche ne peut être envisagée que si les expérimentations ne nécessitent pas une détermination continue ou répétée de l'oxygénation tumorale. Pour un usage clinique, le fait de devoir administrer par injection ou ingestion un composé nitroimidazolé aux patients peut constituer un inconvénient. Sur la base des données pharmacocinétiques et toxicologiques, l'EF5 et le pimonidazole se sont avérés être les plus adaptés à l'usage clinique *(173)*.

4.3. Validation de la méthode

Ces techniques d'évaluation de l'hypoxie tumorale par l'EF5 ou le pimonidazole ont été comparées avec le *pO_2 Histograph* chez des patients atteints de tumeurs tête et cou ou de tumeurs cervicales. Les auteurs n'ont pas observé de corrélation entre les résultats obtenus par les deux techniques *(172, 174, 175)*. Cette absence de corrélation pourrait résulter du fait que le biais introduit par la nécrose influence de manière opposée les mesures enregistrées par les deux méthodes *(175, 176)*. En effet, les valeurs de pO_2 enregistrées dans les zones de nécrose par les microélectrodes sont représentatives d'un milieu anoxique, alors que l'absence de marquage, résultant d'une absence de métabolisation des dérivés nitroimidazole, dans ces mêmes zones nécrotiques est considérée comme une zone normoxique.

Dans des modèles animaux, il a été montré que le marquage des cellules hypoxiques par le pimonidazole permettait une estimation pertinente de l'hypoxie cellulaire à l'origine de la radiorésistance *(167, 177)*.

Par ailleurs, chez les patients porteurs de tumeurs ORL, une relation a été observée entre la fraction hypoxique déterminée par le marquage au pimonidazole et le contrôle locorégional des tumeurs par la radiothérapie. En effet, pour les malades dont les biopsies présentaient un faible marquage au pimonidazole, le taux de contrôle à deux ans était de 87% alors qu'il n'était que de 48% pour les malades dont les biopsies présentaient un marquage intense ($p = 0,01$) *(178)*.

5- Les marqueurs endogènes d'hypoxie

La compréhension des mécanismes moléculaires régulés par l'hypoxie a conduit à rechercher des protéines dont la présence et/ou la quantité seraient le reflet de l'état d'oxygénation des tumeurs, d'un point de vu qualitatif ou semi-quantitatif.

Les investigations ont initialement concerné la densité micro-vasculaire et le VEGF. Depuis peu, la sous-unité α du facteur de transcription HIF-1, le transporteur du glucose GLUT-1 et l'anhydrase carbonique 9 (CA9) font également l'objet d'études visant à démontrer leur intérêt en tant que marqueurs endogènes d'hypoxie *(179)*.

5.1. Densité vasculaire et VEGF

Il a été envisagé d'évaluer l'angiogenèse tumorale comme facteur pronostique chez les patients cancéreux. Ainsi, l'évaluation immuno-histochimique de la densité micro-vasculaire, grâce à des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales (CD31, CD34, facteur de Willebrand), constitue un facteur pronostique indépendant dans de nombreuses tumeurs solides *(180)*.

Une manière indirecte de mesurer l'activité angiogénique dans les cancers est d'évaluer l'expression des facteurs angiogéniques dans les tissus tumoraux ou la quantité des protéines angiogéniques sécrétées dans les fluides biologiques. Il est de plus en plus évident que le niveau de facteurs angiogéniques circulants peut avoir une valeur pronostique.

Avec très peu d'exceptions, les différentes études menées ont montré une forte association entre l'expression élevée du VEGF dans les tumeurs et le stade tumoral avancé, ainsi qu'un faible taux de survie des patients. Une telle association a largement été confirmée dans les carcinomes mammaires, colorectaux, gastriques, les cancers du poumon, les ostéosarcomes, les mélanomes et même les leucémies. Dans la plupart des cancers, l'expression du VEGF dans les tumeurs s'est avéré être un facteur pronostique significatif de la rechute ou de la survie indépendamment des autres facteurs pronostiques clinico-pathologiques conventionnels. Dans certaines études, il a même été identifié comme le facteur prédictif le plus puissant de la survie en analyse multivariée *(140)*.

5.2. HIF-1α, Glut-1 et CA9

De nombreuses études, basées sur l'analyse immunohistochimique de biopsies de patients, ont montré que l'expression des protéines HIF-1α, Glut-1 et CA9 *(181, 182)*, était beaucoup plus importante dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains correspondant. De même, pour de nombreux cancers, l'expression forte de ces protéines a été associée à une augmentation de l'agressivité tumorale et à une réponse plus faible des tumeurs aux

traitements anticancéreux *(135, 183-185)*. Enfin, des études de co-localisation entre l'expression de ces protéines et les adduits de pimonidazole ou d'EF5, ont permis de démontrer qu'elles pouvaient constituer de nouveaux marqueurs pertinents de l'hypoxie tumorale *(126, 179, 186, 187)*.

Cette approche récente reste à être validée notamment par des études prospectives inter-laboratoires afin de s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats obtenus.

6- Les techniques d'imagerie médicale

Les avancées technologiques en matière d'imagerie médicale, basée sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou l'émission de positons, laissent entrevoir à terme la possibilité de détecter l'hypoxie tumorale de manière non invasive, en continu et de façon dynamique, avec une résolution proche de l'échelle cellulaire, quelle que soit la localisation de la tumeur.

Par exemple, il a été montré que la tomographie par émission de positons (TEP) peut être utilisée pour détecter des marqueurs d'hypoxie (misonidazole, erythronitroimidazole) marqués par des radionucléides émetteurs de positons (Fluor-18). Cette technique de détection de l'hypoxie tumorale n'en est encore qu'à ses débuts, et de nombreux paramètres doivent dans l'avenir être optimisés (meilleurs marqueurs d'hypoxie et meilleurs traceurs émetteurs de positons, délai optimal entre l'injection et l'analyse, évaluation pharmacocinétique...) *(188, 189)*.

De même, la spectroscopie à résonance magnétique nucléaire semble prometteuse pour détecter des marqueurs d'hypoxie (misonidazole) marqués par des traceurs présentant des propriétés de résonance magnétique nucléaire (Fluor-19) *(190, 191)*.

Récemment, l'oxymétrie EPR (*electron paramagnetic resonance*) permettant une mesure directe de la pO_2 intratissulaire a été développée, et les résultats obtenus chez l'animal par cette méthode non invasive étaient parfaitement corrélés aux résultats obtenus avec un marquage des cellules hypoxiques par l'EF5 *(192, 193)*.

La validation des méthodes d'imagerie nécessitera la mise en place d'essais cliniques sur un grand nombre de patients. Mais, ces techniques sont difficilement accessibles à l'heure actuelle, car elles nécessitent des installations hautement spécialisées et sont très coûteuses.

E- Conséquences biologiques et thérapeutiques de l'hypoxie tumorale

De nombreuses publications documentent la corrélation étroite qui associe l'hypoxie des tumeurs solides à un pronostic défavorable. Ceci s'explique par le fait que l'hypoxie tumorale favorise la progression maligne et qu'elle provoque une plus grande résistance aux traitements anticancéreux

1- Conséquences biologiques de l'hypoxie tumorale

1.1. Mise en évidence de l'augmentation de l'agressivité des tumeurs hypoxiques

Plusieurs études cliniques ont identifié l'hypoxie tumorale comme un facteur pronostique très puissant et indépendant en terme de contrôle de la maladie, de survie des malades *(11, 194)*, ou d'invasion métastatique *(105, 195)*.

Des travaux expérimentaux ont démontré que l'hypoxie tumorale contribuait à augmenter le pouvoir métastatique de cellules tumorales murines *in vitro* ou de tumeurs implantées chez l'animal *(196-198)*. L'analyse histopathologique de 47 pièces chirurgicales de cancers cervicaux montraient que les extensions tumorales étaient significativement plus larges pour les tumeurs mal oxygénées (pO_2 < 10 mmHg) *(199)*. De même, la pO_2 médiane de tumeurs ayant donné lieu à une invasion métastatique était significativement plus faible que la pO_2 médiane mesurée dans les tumeurs non métastatiques *(105)*.

Les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'environnement hypoxique confèrerait aux tumeurs des propriétés biologiques leur permettant de développer une plus grande agressivité vis-à-vis de l'hôte, se traduisant par l'augmentation de leur capacité d'invasion et de leur pouvoir métastatique.

1.2. Contribution de l'hypoxie tumorale à la sélection de clones agressifs

L'environnement hypoxique, normalement défavorable à la prolifération et à la survie cellulaire, participe à la sélection de clones cellulaires ayant acquis, à la suite de nombreuses altérations génétiques et phénotypiques, la capacité d'outrepasser la privation en oxygène et en nutriments *(5, 12, 78)*.

1.2.1. Sélection de clones cellulaires possédant un potentiel apoptotique diminué

Les expérimentations de Graeber *et coll.* ont montré que le micro-environnement hypoxique, en induisant l'entrée en apoptose de la plupart des cellules tumorales sensibles à l'hypoxie, était capable de sélectionner des clones cellulaires possédant au préalable un

potentiel apoptotique diminué. Ainsi, en mélangeant des cellules $p53^{-/-}$ (phénotype muté) et des cellules $p53^{+/+}$ (phénotype sauvage) dans un rapport 1 pour 1000, et en les soumettant à plusieurs cycles alternant hypoxie et réoxygénation, ils ont montré que les cellules $p53^{-/-}$ devenaient majoritaires par rapport aux cellules $p53^{+/+}$ *(200)*.

La sélection des clones possédant un potentiel apoptotique diminué semble directement impliquée dans l'augmentation de l'agressivité tumorale. Une étude menée chez 29 patientes atteintes de cancers cervicaux a montré que la probabilité d'envahissement ganglionnaire et de récidive était supérieure lorsque les tumeurs étaient hypoxiques et présentaient un index apoptotique faible (groupe 1 = pO_2 médiane < 10 mmHg + IA ≤ 0,5%), comparativement aux autres tumeurs (groupe 2 = pO_2 médiane > 10 mmHg + IA ≤ 0,5% ou pO_2 médiane < 10 mmHg + IA ≥ 0,5%) *(201)*. La fréquence d'invasion ganglionnaire était de 70% *vs* 35% et la fréquence des récidives était de 70% *vs* 25%, respectivement. Dans cette étude, la survie sans récidive n'atteignait que 10% chez les patientes du premier groupe, alors qu'elle était de 70% pour les patientes du deuxième groupe *(201)*.

1.2.2. Généralisation du concept de " sélection clonale "

La sélection clonale, initialement mise en évidence pour les mutants p53 négatifs *(200)*, est très certainement un processus général qui se répète dès qu'une modification génétique en faveur d'une plus grande agressivité tumorale apparaît.

Ainsi, les clones capables d'émettre les signaux pro-angiogéniques les plus puissants et les plus efficaces favoriseront leur propre développement au détriment des autres clones. De même, le micro-environnement hypoxique sélectionne les clones ayant le potentiel métastatique le plus élevé, à savoir les clones caractérisés entre autre par une production de MMPs augmentée, une sécrétion d'inhibiteurs de MMPs diminuée, et une diminution des intégrines membranaires, permettant ainsi un détachement plus aisé des cellules tumorales *(75)*.

1.3. Contribution de l'hypoxie à l'instabilité génomique

L'hypoxie contribue directement à l'instabilité génomique et à la mutagénèse en générant des mutations ponctuelles, des amplifications de gènes ou des réarrangements chromosomiques à l'origine d'une augmentation du nombre de variants génétiques *(202)*.

Par exemple, des fibroblastes de rats exposés pendant 24 h à des conditions anoxiques présentaient 3 fois plus de cassures chromosomiques que les fibroblastes cultivés en conditions normales *(203)*.

Il a été également montré que la fréquence des mutations dans les cellules tumorales cultivées en hypoxie sévère était 5 fois plus élevées que dans les mêmes cellules cultivées en conditions normoxiques *(204)*.

Les nombreux variants génétiques ainsi générés subissent à leur tour une pression de sélection. L'hypoxie favorise au fur et à mesure l'apparition de clones de plus en plus agressifs et contribue à la progression maligne.

2- Conséquences thérapeutiques de l'hypoxie tumorale

Les conséquences néfastes de l'hypoxie tumorale sur les traitements anticancéreux ont initialement été étudiées à l'aide des micro-électrodes sensibles à l'oxygène dans les tumeurs accessibles (sphère ORL, utérus) nécessitant un traitement par radiothérapie. Désormais, grâce à de nouvelles méthodes d'évaluation de l'hypoxie, des conclusions similaires émergent pour toutes les modalités thérapeutiques (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, voire même thérapie photodynamique) et pour la plupart des cancers, notamment pour les tumeurs cérébrales *(1)*.

2.1. Impact de l'hypoxie tumorale sur l'efficacité de la radiothérapie

Dès le début des années 50, plusieurs travaux ont démontré sur une grande variété de cellules (cellules végétales, cellules d'insecte et cellules de mammifères) et de tissus, que l'hypoxie conférait aux cellules des propriétés de résistance vis-à-vis des radiations ionisantes *(6)*. Ainsi, la radiosensibilité de cellules de mammifères irradiées en milieu aérobie (21% O_2) était 2,5 à 3 fois supérieure à celle de cellules irradiées en milieu anoxique (100% N_2) *(6)*. Gray *et coll.* ont montré que c'était la présence d'oxygène au moment de l'irradiation qui importait *(6)*.

Etant donné que l'oxygène amplifie la cascade radicalaire initiée par la radiolyse de l'eau, et permet d'augmenter les lésions induites par les radiations ionisantes au niveau de l'ADN, il est logique qu'en conditions hypoxiques l'effet cytotoxique des radiations soit compromis *(4)*. Toutefois, il est aujourd'hui évident que l'implication de l'oxygène dans les réactions radio-chimiques n'est pas le seul élément expliquant l'importance de l'oxygénation tumorale dans la réponse à la radiothérapie.

L'évolution de la radiosensibilité relative des cellules en fonction de la pO_2, est représentée sur la *figure 8*.

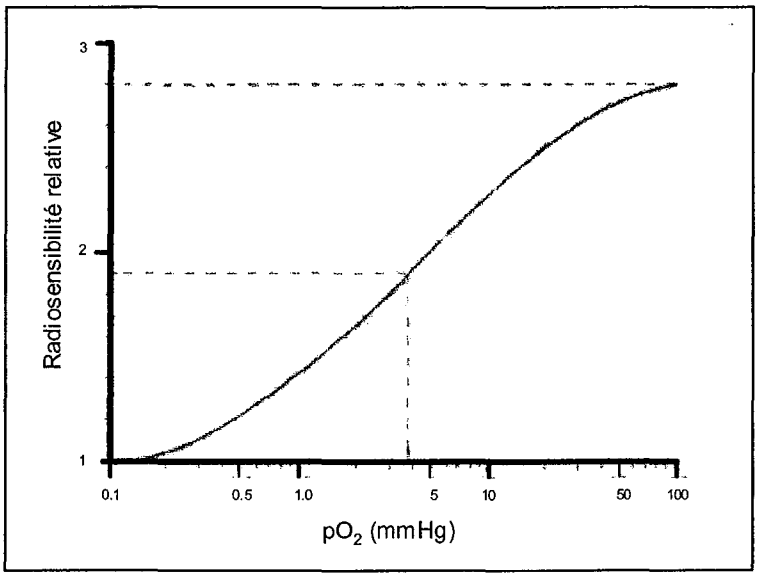


Figure 8 : Radiosensibilité relative en fonction de la pression partielle en oxygène dans l'environnement cellulaire. *D'après Vaupel et coll., Cancer Res, 1989 (73).*

La radiosensibilité est optimale et varie peu pour des valeurs de pO_2 tissulaire comprises entre 100 mmHg et 30 mmHg, mais diminue très rapidement lorsque la pO_2 varie entre 20 mmHg et 0 mmHg. En particulier, la radiosensibilité des cellules est divisée par 1,5 puis par 2 lorsque la pO_2 tombe respectivement à 5 mmHg puis à 2,5 mmHg *(73)*.

De nombreuses études cliniques ont confirmé l'effet délétère de l'hypoxie chez les patients traités par radiothérapie.

En 1988, Gatenby *et coll.* publiaient les premiers résultats d'un essai mené chez 31 patients atteints de cancers de la sphère ORL et traités par radiothérapie. Dans cette étude, 18 patients présentaient une réponse complète et la pO_2 moyenne dans ce groupe atteignait en moyenne 20,6 mmHg. Comparativement, un groupe composé de 11 patients n'ayant pas répondu au traitement présentait une pO_2 moyenne de 4,6 mmHg. D'autre part, sur les 13 patients présentant une pO_2 moyenne comprise entre 0 et 10 mmHg, 10 n'ont pas répondu au traitement, alors qu'une réponse complète a été obtenue pour tous les patients présentant une pO_2 moyenne comprise entre 21 et 30 mmHg *(8)*.

Hockel *et coll.* ont étudié l'oxygénation de tumeurs localement avancées du col de l'utérus chez des patientes traitées par radiothérapie. La survie sans récidive à 3 ans était de 75% quand la pO_2 médiane était $\geq$ 10 mmHg, et tombait à 40% quand la pO_2 médiane était $<$ 10 mmHg *(199)*.

Nordsmark *et coll.* ont évalué l'oxygénation au niveau de ganglions métastatiques chez 34 patients atteints de cancers de la tête et du cou et ont montré que le pourcentage de valeurs

de $pO_2 < 2,5$ mmHg était le facteur prédictif indépendant le plus puissant en terme de réponse à la radiothérapie *(9)*.

Pour le même type de patients, Brizel *et coll.* ont observé chez les patients présentant une pO_2 médiane ≥ 10 mmHg, une survie sans récidive à 12 mois de 78% tandis qu'elle n'atteignait que de 22% pour les patients présentant une pO_2 médiane < 10 mmHg *(10)*. Une étude ultérieure incluant un plus grand nombre de patients (63 *vs* 28 patients) a permis aux auteurs de confirmer ces premiers résultats *(205)*.

2.2. Hypoxie tumorale et efficacité de la chirurgie

Hockel *et coll.* ont étudié l'oxygénation de tumeurs localement avancées du col de l'utérus chez 47 patientes traitées par chirurgie. La survie globale à 3 ans était de 75% quand la pO_2 intratumorale était ≥ 10 mmHg, et tombait à moins de 30% quand la pO_2 intratumorale était < 10 mmHg *(199)*.

Récemment, une étude rétrospective menée dans les oligodendrogliomes, a montré que les patients traités par chirurgie totale ou subtotale qui présentaient une expression de HIF-1α modérée à forte (plus de 50% des cellules marquées) avaient une survie globale statistiquement plus faible (25% *vs* 75% à 12 mois) que les patients qui ne présentaient pas d'expression de HIF-1α (moins de 10% de cellules marquées) *(185)*.

2.3. Hypoxie tumorale et efficacité de la chimiothérapie

Même si les cellules hypoxiques *in vitro* ne présentent pas de résistance systématique aux agents de chimiothérapie (autres que la bléomycine ou les "bioréductive drugs"), cette résistance peut exister *in vivo (206)*.

Les molécules de chimiothérapie, au même titre que l'oxygène et les nutriments, ont un périmètre de diffusion limité, et seules les cellules les plus proches du vaisseau perfusé subiront l'action cytotoxique du médicament. D'autre part, dans les zones où l'hypoxie résulte d'une altération du flux sanguin, de la même façon que les cellules ne sont pas approvisionnées en oxygène, elles ne peuvent pas être atteintes par les médicaments antinéoplasiques.

Enfin, il est probable que la pression de sélection imposée par l'hypoxie tumorale aux cellules favorise l'émergence de clones cellulaires dont les capacités de résistance aux agents anticancéreux soient exacerbées. En effet, une étude a démontré que l'amplification du gène codant pour la dihydrofolate réductase, cible du méthotrexate, était plus fréquemment augmentée dans des cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) exposées à une hypoxie transitoire *(207)*.

De même, il a été décrit une induction de la glycoprotéine P responsable entre autre de la résistance à la doxorubicine *(202)*.

III- LUTTER CONTRE LA RESISTANCE INHERENTE A L'HYPOXIE TUMORALE

De nombreuses études pré-cliniques et cliniques ont été réalisées pour évaluer les multiples stratégies thérapeutiques visant à réduire l'hypoxie tumorale. Ces stratégies peuvent être divisées en deux grandes catégories. Tout d'abord, ont été envisagées des stratégies globales qui visaient à augmenter la disponibilité en oxygène pour le tissu tumoral. Plus récemment, sont apparues des stratégies basées sur l'exploitation de l'hypoxie tumorale, qui constitue un système environnemental spécifique aux tumeurs solides. Ces approches utilisent des molécules qui ciblent les cellules hypoxiques pour les sensibiliser à l'action des radiations ionisantes ou pour les détruire directement.

Des essais cliniques ont été menés chez des patients atteints de tumeurs pour lesquelles des arguments laissaient envisager l'existence de cellules hypoxiques, et pour lesquelles la radiothérapie constitue un standard thérapeutique (tumeurs ORL, tumeurs du col de l'utérus, tumeurs cérébrales, tumeurs de la vessie, cancer de l'œsophage ou cancer du poumon non à petites cellules) *(208)*.

A- Stratégies visant à augmenter la disponibilité en oxygène au niveau tumoral

1- Oxygène hyperbare

Dès 1953, Gray *et coll.* ont proposé les caissons hyperbares comme un moyen d'augmenter l'oxygénation tumorale *(6)*. Le caisson hyperbare est un moyen d'exposer les animaux ou les patients à une atmosphère contenant 100% d'oxygène sous pression (2 ou 3 atmosphère). Ce procédé permet de saturer le sang et les liquides cellulaires en oxygène dissout et d'améliorer ainsi la disponibilité de l'O_2 pour les tissus, dont le tissu tumoral.

L'influence de l'oxygène hyperbare sur la réponse à la radiothérapie a été évaluée *in vivo* chez l'animal *(6, 209-211)*. L'ensemble des expérimentations démontrait un bénéfice pour les animaux recevant une oxygénothérapie hyperbare *(6, 210-212)*, et les résultats obtenus étaient particulièrement encourageants pour les animaux initialement anémiques *(209, 210)*.

Néanmoins, les essais thérapeutiques randomisés ont abouti à des conclusions mitigées et n'ont pas vraiment permis de confirmer le caractère prometteur des résultats pré-cliniques. Par exemple, un large essai multicentrique conduit par le *Medical Research Council* (Grande-Bretagne), a rapporté un bénéfice significatif pour des patients atteints de cancers de la sphère

ORL exposés à l'oxygène hyperbare pendant la radiothérapie *(213)*. Le taux de stérilisation locale à 5 ans passait de 30 à 51% *(213)*.
Inversement, un essai mené chez des patientes atteintes de cancers cervicaux n'a montré aucun bénéfice lié à l'oxygénothérapie hyperbare *(214)*.

Compte tenu de l'importante toxicité observée (convulsions dues à l'inhalation d'oxygène, complications thoraciques, surpression au niveau de l'oreille interne) et des problèmes de compliance qui en résultaient, ainsi que de la difficulté à mettre en oeuvre cette technique dans le même temps que l'irradiation, cette approche thérapeutique a été abandonnée au cours de ces dernières années. Toutefois, de récentes expérimentations chez l'animal ont montré que l'influence positive de l'oxygène hyperbare sur l'oxygénation tumorale et sur la réponse à la radiothérapie, perdurait jusqu'à 30 minutes après l'arrêt de l'exposition à l'oxygène, ce qui pourrait conduire à reconsidérer cette stratégie *(211)*.

2- Inhalation de carbogène et injection de nicotinamide

Alternative plus aisément réalisable, l'association d'une inhalation de carbogène, mélange gazeux constitué de 95% d'O_2 et 5% de CO_2, et d'une injection de nicotinamide, permet de lutter simultanément contre l'hypoxie tumorale chronique et l'hypoxie tumorale aiguë.

En effet, même si les conclusions des études pré-cliniques sont mitigées *(215, 216)*, un certain nombre de travaux expérimentaux chez l'animal ont démontré que le nicotinamide réduisait les fluctuations de la perfusion micro-régionale responsables de l'hypoxie aiguë *(217, 218)*, et que le carbogène augmentait la disponibilité en O_2 *(219, 220)*, ces deux effets se traduisant par une augmentation de l'oxygénation tumorale *(217, 220, 221)*. Dans les modèles tumoraux expérimentaux chez l'animal, le carbogène et le nicotinamide, délivrés seuls ou en association, ont conduit à une amélioration de la radiosensibilité *(217, 222, 223)*. L'effet bénéfique du carbogène et du nicotinamide sur la réponse à la radiothérapie a notamment été rapporté pour des xénogreffes de gliome U87 *(224)*.

De nombreux protocoles cliniques ont suivi les expérimentations pré-cliniques, évaluant l'efficacité de l'association carbogène-nicotinamide combinée à la radiothérapie, elle-même administrée le plus souvent de façon accélérée. Malgré l'amélioration spectaculaire de l'oxygénation tumorale (*Témoin : 8 mmHg vs Carbogène : 96 mmHg (225)* ; *Témoin : 3,8 vs Carbogène : 62,2 mmHg (226)*) observée chez les patients inhalant du carbogène, l'administration de l'association carbogène-nicotinamide chez les patients irradiés a conduit à des conclusions mitigées en terme d'efficacité *(221, 227, 228)*.
En effet, des résultats encourageants ont été obtenus lors de deux essais de phase II incluant respectivement 124 et 215 patients atteints de cancer de la tête et du cou et traités par un

protocole ARCON (*accelerated radiotherapy combined with carbogen and nicotinamide*) *(221, 228)*: ces deux essais rapportaient des taux élevés concernant le contrôle loco-régional de la maladie.
A l'inverse, l'essai conduit par le groupe de l'EORTC (*European Organization for Research and Treatment Cancer*) sur des patients présentant le même type de pathologie, n'a pas mis en évidence d'amélioration du contrôle local lorsque les patients recevaient le traitement ARCON *(227)*.

Les premières études cliniques évaluant la faisabilité du protocole chez des patients présentant un glioblastome ne semblent pas mettre en évidence d'amélioration quant à l'évolution de la maladie *(229-231)*. De plus, le traitement ne semble pas être toujours très bien toléré par les malades puisque près de la moitié des patients présentent des effets secondaires modérés à sévères (nausées et vomissements, intolérance au carbogène, crises d'épilepsie, léthargie,...) *(230-232)*.

3- Modulation du transport et de la libération de l'oxygène au niveau des tissus hypoxiques

L'hémoglobine constitue le transporteur physiologique de l'oxygène et de plus, une relation étroite a clairement été établie entre la concentration sanguine en hémoglobine et le contrôle tumoral local ***(cf p.80)***. Aussi, pour améliorer l'oxygénation tumorale, il a logiquement été envisagé de moduler la capacité du sang à transporter l'oxygène.

Ces investigations consistent soit à augmenter le transport de l'oxygène en effectuant des transfusions sanguines, en administrant de l'hémoglobine modifiée par hémi-synthèse ou en administrant de l'érythropoïétine recombinante humaine, soit à manipuler la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine (modulateur allostérique RSR13) *(208, 233)*. L'intérêt d'administrer de l'érythropoïétine recombinante humaine pour tenter d'améliorer l'oxygénation tumorale et la réponse à la radiothérapie sera discuté dans un chapitre ultérieur ***(cf p.86)***.

3.1. Les transfusions sanguines

Etant donné le grand nombre de travaux relatant l'effet délétère de l'anémie sur la réponse à la radiothérapie, les transfusions sanguines ont été utilisées dans la pratique clinique oncologique courante dans le but d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie. Néanmoins, les études pré-cliniques et cliniques évaluant l'impact des transfusions sanguines sur l'efficacité du traitement n'ont pas permis de conclure à un bénéfice thérapeutique. Certaines études suggèrent même au contraire une diminution de la survie des patients ayant reçus des transfusions *(234)*. Les conclusions divergentes, mais surtout les nombreux risques

(infectieux, allo-immunisation, réaction allergique, immunosuppression) associés à l'utilisation des transfusions sanguines ont conduit à l'abandon de cette stratégie comme moyen de lutte contre l'hypoxie tumorale *(234)*.

3.2. L'hémoglobine modifiée

Quelques expérimentations pré-cliniques chez l'animal ont évalué l'intérêt d'administrer de l'hémoglobine modifiée *(235)*. Ces études préliminaires utilisaient de l'hémoglobine bovine purifiée couplée à du polyéthylèneglycol (PEG-Hb) et montraient une augmentation à la fois de l'oxygénation et de la réponse à la radiothérapie des tumeurs murines étudiées *(235)*.

3.3. Les modulateurs allostériques de l'hémoglobine

Certains auteurs ont cherché à développer des modulateurs allostériques de l'hémoglobine dont le chef de file est le RSR13. Ces modulateurs sont des molécules capables de modifier l'affinité des chaînes de globine pour l'oxygène, et augmenter par conséquent la libération de l'oxygène au niveau des tissus hypoxiques. Elles miment ainsi l'action d'un modulateur allostérique endogène physiologique : le 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG) *(233, 236)*.

Une réduction de l'hypoxie tumorale après administration de RSR13 a été mise en évidence pour des tumeurs greffées chez l'animal *(237, 238)*. De même, sur des modèles animaux, il a été démontré que le RSR13 pouvait améliorer la réponse de tumeurs murines ou humaines à la radiothérapie *(237, 239)*.

Deux études de phase II réalisées respectivement chez des patients atteints de glioblastome *(240)*et chez des patients présentant des métastases cérébrales *(241)* ont rapporté des résultats encourageants par rapport aux données historiques.

Une autre approche consiste à remplacer dans les globules rouges le 2,3-DPG par de l'inositol hexaphosphate, hydrate de carbone polyphosphorylé « naturel », capable de diminuer significativement l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène et d'augmenter la libération de l'oxygène dans les tissus jusqu'à 3 fois. Alors que physiologiquement (en présence de 2,3-DPG) seulement 25% de l'oxygène véhiculé est libéré au niveau des tissus, 75% de l'oxygène véhiculé est libéré en présence d'inositol hexaphosphate *(242, 243)*.

B- Stratégies ciblant les cellules hypoxiques

Depuis le début des années 70, une voie de recherche thérapeutique consiste à vouloir tirer profit du fait que l'hypoxie est l'apanage du tissu tumoral. Pour cela, des molécules agissant sélectivement sur les cellules hypoxiques sont développées. Ces recherches ont donné lieu à l'apparition successive de deux catégories de molécules : les radiosensibilisants des cellules hypoxiques et les cytotoxiques des cellules hypoxiques.

1- Radiosensibilisants des cellules hypoxiques : dérivés nitro-imidazolés

Initialement, les dérivés nitro-imidazolés de première génération (métronidazole, misonidazole) ont été développés en tant que radiosensibilisants des cellules hypoxiques tumorales. Il a été émis l'hypothèse que des molécules très électrophiles, devaient mimer l'action de l'oxygène radicalaire au moment de l'irradiation, et interagir avec les éléments issus de la radiolyse de l'eau. Alors que l'oxygène est absent en conditions hypoxiques, ces molécules devaient donc permettre d'amplifier la cascade radicalaire, et par conséquent, aboutir à la radiosensibilisation des cellules hypoxiques *(163, 166, 244, 245)*.

En réalité, l'affinité électronique des dérivés nitro-imidazole ne suffit pas à expliquer la cytotoxicité *in vitro* de ces composés, qui se sont avérés plus toxiques vis-à-vis des cellules hypoxiques qu'ils ne devaient l'être. Leur toxicité résulte également de leur réduction métabolique en substances toxiques dans les cellules hypoxiques : les dérivés nitro-imidazolés sont transformés par des nitro-réductases, en un intermédiaire réactif capable de former des adduits avec les composés intracellulaires dans les cellules hypoxiques *(163, 166, 245)*. Ce mécanisme fait que ces agents sont désormais considérés comme appartenant à la classe des "cytotoxiques des cellules hypoxiques".

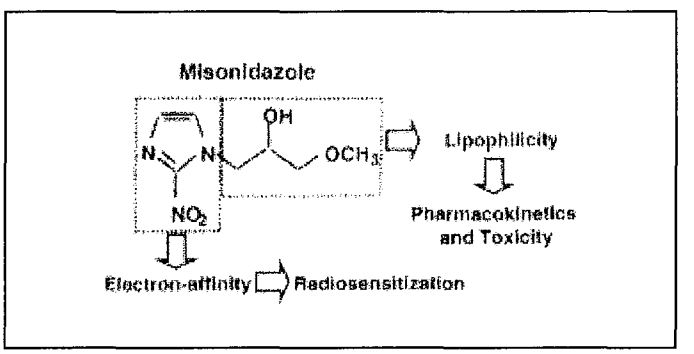


Figure 9 : Le misonidazole en tant que radiosensibilisant des cellules hypoxiques. *D'après Brown, Cancer Res, 1999 (4).*

Le métronidazole (Flagyl®) et le misonidazole *(figure 9)*, molécules très prometteuses chez l'animal, ont été évaluées en clinique. En particulier, un essai thérapeutique randomisé a rapporté une augmentation de la survie des patients souffrant de gliomes malins et recevant du métronidazole parallèlement à l'irradiation *(246)*.

L'utilisation de ces deux molécules a néanmoins été limitée du fait de leur importante neurotoxicité *(4)*. Des composés de deuxième génération, moins lipophiles, ont été synthétisés afin de limiter la survenue de neuropathies centrales et périphériques : l'étanidazole, le pimonidazole, et le nimorazole sont les molécules les plus étudiées.

Au total, les dérivés nitro-imidazolés ont été évalués dans 52 essais thérapeutiques randomisés incluant plus de 7000 patients. La plupart de ces essais, considérés individuellement, ont conduit à des résultats décevants puisqu'aucun bénéfice n'a pu être mis en évidence *(208, 247)*. Seuls l'essai DAHANCA 2 (*Danish Head and Neck Cancer 2*), associant misonidazole et radiothérapie conventionnelle, et l'essai DAHANCA 5, associant nimorazole et radiothérapie conventionnelle, ont montré un bénéfice significatif pour des patients atteints de tumeurs non métastatiques du pharynx et du larynx sus-glottique *(248)*. Les bons résultats de l'essai DAHANCA 5 ont été confirmés par une étude de phase II associant le protocole CHART (*Continuous Hyperfractinated Accelerated Radiation Therapy*) et le nimorazole chez des patients souffrant de cancers avancés de la sphère ORL *(249)*.

2- Cytotoxiques des cellules hypoxiques

La mitomycine C a été la première molécule utilisée afin de détruire sélectivement les cellules hypoxiques. Elle a donné naissance à une nouvelle classe de composés appelés *bioreductive drugs,* dont le chef de file est la tirapazamine (TPZ). Ces molécules administrées sous forme de pro-drogues ne sont métabolisées en composés cytotoxiques qu'en cas de pO_2 basse, donc préférentiellement dans les tissus tumoraux. Le mécanisme de la cytotoxicité sélective sur les cellules hypoxiques est résumé dans la *figure 10*.

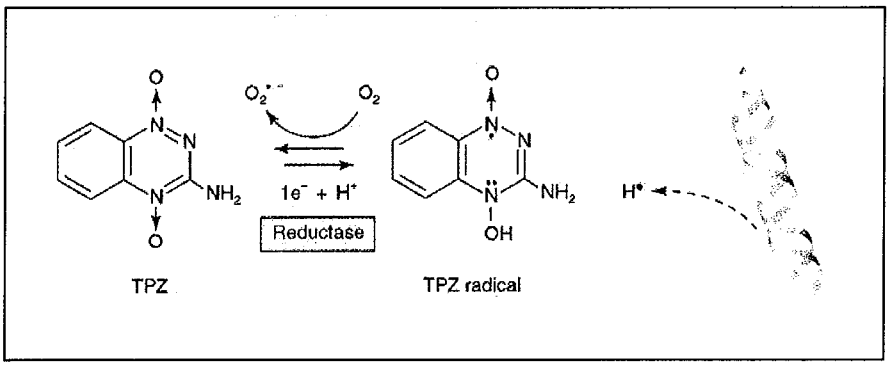


Figure 10 : Mécanisme de la cytotoxicité de la tirapazamine à l'égard des cellules hypoxiques. *D'après Brown, Cancer Res, 1999 (4).*

La tirapazamine est un excellent substrat pour une certaine variété de réductases intracellulaires. La réductase réduit la TPZ en lui ajoutant un électron, aboutissant ainsi à la formation d'un intermédiaire très instable et très réactif : le radical TPZ.

En conditions normoxiques, l'oxygène moléculaire et le radical TPZ interagissent : le radical TPZ est oxydé et revient à la molécule TPZ initiale, et l'oxygène moléculaire est réduit donnant naissance au radical superoxyde.

En conditions hypoxiques, cette interaction ne se produit pas. Le radical TPZ se stabilise alors en arrachant un proton aux macromolécules environnantes, et cause ainsi des dommages structuraux.

Notamment, les réductases qui métabolisent la TPZ sont rencontrées en forte concentration dans le noyau : les macromolécules les plus proches des radicaux TPZ sont par conséquent les molécules d'ADN *(250)*. Cette disposition favorise la formation, dans un espace confiné, de nombreux radicaux TPZ, à l'origine de nombreuses cassures simple et double-brin très rapprochées entre elles, et explique probablement l'importante cytotoxicité de la TPZ *(4)*.

Non seulement de très faibles concentrations de TPZ suffisent pour tuer les cellules hypoxiques, mais de plus, l'effet cytotoxique différentiel entre cellules hypoxiques et cellules normoxiques est très élevé. En effet, la concentration nécessaire pour produire *in vitro* un effet cytotoxique donné est 50 à 300 fois plus faible dans les cellules hypoxiques que dans les cellules normoxiques *(4)*. Cet effet différentiel s'explique par le fait que les radicaux TPZ formés en conditions hypoxiques sont beaucoup plus cytotoxiques que les radicaux superoxyde formés en conditions normoxiques.

Les premiers essais pré-cliniques d'association TPZ-radiothérapie chez les rongeurs ont abouti à des conclusions très positives *(4)*, suivis très rapidement par des évaluations cliniques de cette stratégie *(251)*. Les résultats rapportant 60% de contrôle local à 18 mois chez des patients atteints de tumeurs ORL sont très encourageants *(251)*. A l'inverse, un essai

de phase II mené dans les gliomes malins de haut grade n'a pas montré de bénéfice thérapeutique pour les patients irradiés recevant de la tirapazamine *(252)*.

3- Nouvelles approches

3.1. Thérapie génique

Des approches de thérapie génique sont également au stade d'études préliminaires. Afin d'accéder à une spécificité vis-à-vis des cellules hypoxiques, le gène d'intérêt est placé sous la dépendance d'un promoteur spécifiquement reconnu par le facteur de transcription HIF-1, présent essentiellement dans les cellules hypoxiques. Le gène d'intérêt peut, par exemple, coder pour une enzyme de métabolisation capable de transformer une prodrogue inactive en agent cytotoxique *(253)*.

3.2. Inhibiteurs de HIF-1

Le facteur de transcription HIF-1 étant largement responsable des effets délétères de l'hypoxie tumorale, un criblage des molécules susceptibles d'inhiber directement ou indirectement son expression ou/et son activité est en cours *(254)*.

4- Conclusion

Malgré le grand nombre d'approches développées pour combattre la radiorésistance due à l'hypoxie tumorale, les résultats obtenus jusqu'à présent sont loin d'être satisfaisants *(4, 208)*. En effet, la majorité des essais randomisés aboutissent à des conclusions négatives quant à la possibilité d'améliorer l'efficacité des radiations ionisantes par la diminution de l'hypoxie tumorale.

Toutefois, Overgaard *et coll.* dénoncent l'absence de méthodologie rigoureuse lors de ces essais thérapeutiques, car elle serait selon eux, à l'origine de ces échecs *(208)*. Les auteurs démontrent dans une méta-analyse que la compilation des résultats de 83 essais thérapeutiques randomisés, incluant 10779 patients, toutes pathologies cancéreuses confondues et tous types de traitements "anti-hypoxie" considérés, met en évidence un bénéfice statistiquement significatif, en terme de contrôle local et de survie globale, pour les cancers ORL traités par radiothérapie associée à un modulateur de l'hypoxie tumorale (en particulier, l'oxygène hyperbare et les dérivés nitro-imidazolés). D'un point de vue méthodologique, les auteurs remettent en cause la taille des échantillons : en effet, pour montrer une amélioration d'environ 5 à 10% apportée par les modulateurs d'hypoxie, les auteurs ont calculé que les études auraient dû comprendre environ 1000 patients, alors que chaque essai n'incluait en médiane, que 84 patients *(208)*.

D'après les conclusions d'Overgaard *et coll.*, et étant donnée l'implication majeure de l'hypoxie dans la progression tumorale et dans la résistance aux traitements, la compréhension et la modulation de l'hypoxie tumorale restent des voies de recherche très importantes. De nombreux efforts doivent donc encore être réalisés en ce sens, afin de pouvoir inclure le traitement des cellules hypoxiques comme complément aux autres approches thérapeutiques.

L'ERYTHROPOIETINE

L'ERYTHROPOIETINE

I- L'ERYTHROPOIETINE ENDOGENE (EPO)

A- Erythropoïétine endogène et hématopoïèse

1- Découverte de l'érythropoïétine endogène

Au cours des excursions dans les Andes menées pendant la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle, une relation entre la production d'érythrocytes et l'hypoxie a été établie *(255, 256)*. En 1906, Carnot et Deflandre ont été les premiers à évoquer l'existence d'un facteur humoral contrôlant l'érythropoïèse : ils nommèrent ce facteur *hémopoïétine (255, 257)*. Toutefois, la preuve de l'existence de l'érythropoïétine n'a été apportée définitivement qu'en 1953 par les travaux d'Erslev *(258)*. Au cours de ces expérimentations, l'auteur injectait de façon répétée à des lapins normaux, du plasma issu de lapins présentant une anémie sévère. Il observait alors chez les lapins receveurs, une nette réticulocytose, et à plus long terme, une augmentation de l'hématocrite *(258)*.

Pour la première fois en 1977, une équipe est parvenue à purifier quelques milligrammes d'érythropoïétine à partir d'urine de patients anémiques *(259)*. Ce travail a constitué une étape décisive dans la connaissance de cette hormone, puisqu'il a permis le développement des premiers dosages radio-immunologiques de l'EPO, ainsi que l'identification de la séquence en acides aminés de la protéine *(260)*. Entre temps, l'obtention d'une partie de la séquence en acides aminés a rendu alors possible le clonage du gène de l'érythropoïétine, et l'expression de celui-ci dans des cellules de mammifère, aboutissant à la production d'érythropoïétine recombinante humaine (rHuEPO) *(261, 262)*.

2- Sites de production de l'érythropoïétine

2.1. Production rénale

Jacobson *et coll.* ont montré chez des rats qu'une néphrectomie bilatérale empêchait l'augmentation du taux d'EPO circulante, habituellement observée après l'induction d'une hémorragie *(263)*. Cette étude a permis aux auteurs de conclure que le rein était l'organe principalement impliqué dans la production de l'EPO circulante.

Les études visant à identifier les types cellulaires impliqués dans la synthèse de l'EPO n'ont pas encore permis d'aboutir à des conclusions définitives. A l'heure actuelle, l'hypothèse

selon laquelle la synthèse de l'EPO serait assurée par les cellules péritubulaires du rein, semble la plus probable *(257)*.

2.2. Production hépatique

Chez l'adulte, environ 10 à 15% de l'EPO circulante est produite par le foie *(264)*. Deux types de cellules hépatiques sont impliqués dans cette production : les hépatocytes et certaines cellules non parenchymateuses (cellules Ito) *(257)*.

Le foie est le site principal de la production d'EPO pendant le développement fœtal et durant la période néonatale *(264)*. Le passage entre la production hépatique et la production rénale débuterait aux alentours de la 30ème semaine de gestation et serait complet environ 6 semaines après la naissance *(264)*.

3- Structure de l'érythropoïétine humaine

Chez l'homme, le gène de l'érythropoïétine humaine est localisé au niveau du bras long du chromosome 7 (région q11 – q22) *(265)*. Il est composé de 5 exons et 4 introns et est présent, dans les cellules, sous forme d'une seule copie *(266)*. Le gène code pour une protéine précurseur composée de 193 acides aminés, qui inclut une séquence signal de sécrétion (*hydrophobic secretory leader sequence*) correspondant aux 27 premiers résidus d'acide aminé au niveau de l'extrémité N-terminale *(261, 262)*. Cette protéine précurseur subit des modifications post-traductionnelles qui aboutissent au clivage de la séquence signal sus-citée *(262)* et à la perte du résidu Arginine de l'extrémité C-terminale (Arg 166) *(267)*. Au final, l'érythropoïétine mature circulante est une protéine composée de 165 résidus d'acides aminés *(figure 11)*.

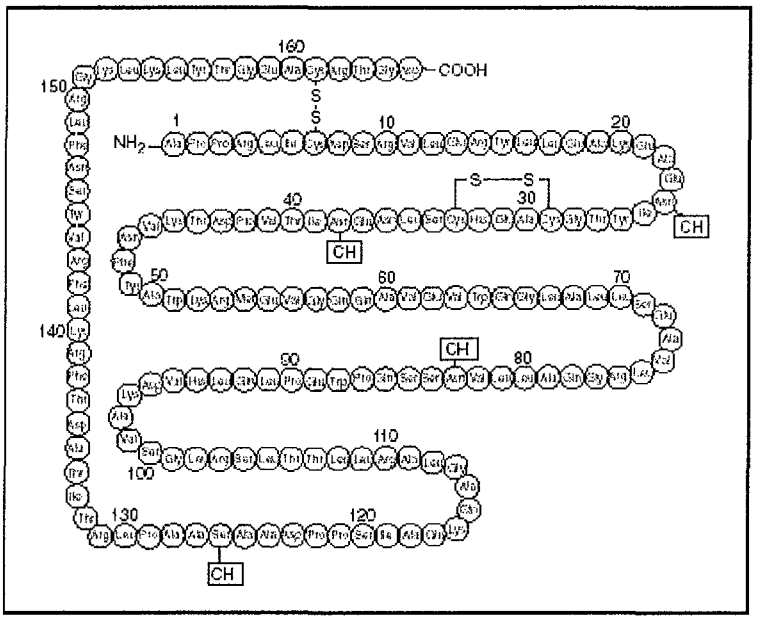


Figure 11 : Structure primaire de l'érythropoïétine mature circulante formée de 165 résidus d'acide aminés. Sont indiqués les positions des ponts disulfure (S-S), et des goupements glycosylés (CH). *D'après Lappin, The Oncologist, 2003 (268).*

Elle renferme deux ponts disulfure, situés respectivement entre les résidus cystéine 7 et 161 et entre les résidus cystéine 29 et 33, qui sont nécessaires à l'activité biologique de l'EPO *(260)*. D'autre part, l'érythropoïétine mature circulante porte trois chaînons glycosylés, eux-mêmes syalylés et liés par un atome d'azote sur les résidus Asparagine 24, 38 et 83, ainsi qu'un chaînon glycosylé lié par un atome d'oxygène sur le résidu Serine 126 *(260, 269)*. Au total, le poids moléculaire de l'EPO atteint 30,4 kDa, dont 39% correspond aux groupements glycosylés. La glycosylation n'est pas indispensable pour l'activité biologique *in vitro*, mais permet de maintenir les taux circulants dans le sang. En effet, l'EPO déglycosylée est parfaitement active mais elle est rapidement éliminée par le foie *(255)*.

4- Contrôle de la production de l'érythropoïétine

4.1. Contrôle par l'hypoxie tissulaire

Contrairement à ce qui pouvait être attendu, la concentration sanguine en globules rouges n'est pas le paramètre initiateur de la synthèse d'EPO et de la boucle de régulation de l'érythropoïèse. En réalité, la caractéristique physiologique détectée par le rein est la disponibilité en oxygène pour les tissus. Ainsi, l'hypoxie tissulaire représente le premier stimulus de la synthèse d'EPO.

Tout phénomène qui induit une diminution de la quantité d'oxygène délivrée aux tissus, et en particulier au tissu rénal, stimule (régulation positive) la production de l'hormone par les cellules rénales et provoque une augmentation de la concentration plasmatique en EPO. En particulier, les personnes vivant en altitude présentent des taux d'EPO et de globules rouges circulants très élevés. De même, il a été démontré chez des patients souffrant d'anémie chronique, que la concentration en EPO plasmatique augmentait de manière exponentielle lorsque le taux d'hémoglobine ou l'hématocrite diminuait. Par ailleurs, les patients dont l'hémoglobine présente une affinité anormalement élevée pour l'oxygène, souffrent systématiquement d'érythrocytose, survenant secondairement à la stimulation de la synthèse d'EPO. Enfin, le monoxyde de carbone (CO) qui est responsable de la formation de carboxyhémoglobine, beaucoup plus affine pour l'oxygène que l'oxyhémoglobine, constitue le stimulus le plus puissant de la production d'EPO *(255)*.
En réponse à une hypoxie tissulaire sévère, la concentration plasmatique en EPO peut augmenter jusqu'à 1000 fois et atteindre jusqu'à 10000 UI/L notamment chez les patients souffrant d'anémie sévère, alors que le taux normal est compris entre 5-25 UI/L *(270, 271)*.

A l'inverse, lors d'une augmentation de l'oxygène délivré au niveau du rein, le taux d'EPO circulante est diminué (régulation négative) *(271)*. Ainsi, l'administration d'une seule unité de sang suffit à provoquer une diminution de la production d'EPO. De même, le taux d'EPO plasmatique chute chez des personnes ou des animaux respirant de l'oxygène quasi pur *(255)*.

4.2. Régulation génique

Les études de Bondurant *et coll.* et de Beru *et coll.* ont mis en évidence chez des rongeurs préalablement anémiés, une accumulation de l'ARNm de l'EPO dans le tissu rénal et dans le tissu hépatique. Ces travaux ont ainsi permis de démontrer que la régulation de la production de l'hormone résultait directement d'une régulation génique au niveau des organes sécréteurs *(266, 272)*.

La régulation du gène de l'EPO par l'hypoxie implique le facteur de transcription HIF-1 qui se fixe, lors de conditions hypoxiques, sur la séquence HRE contenue dans une séquence *enhancer* du gène de l'EPO *(79, 80, 273)*.
Déterminer les bases moléculaires de la régulation, par l'oxygène, de l'expression de HIF1α, qui à son tour contrôle entre autres, la transcription du gène de l'EPO, a été l'une des plus importantes découvertes concernant la régulation de l'expression du gène de l'EPO.

Tandis que la séquence *enhancer* comporte trois sites (BS1, BS2 et BS3) indispensables à l'inductibilité du gène de l'EPO par l'hypoxie *(80)*, HIF-1 ne se lie qu'au site BS1. Ceci suggère l'implication parallèle d'autres facteurs de transcription qui collaboreraient avec HIF-1. Il semble que des facteurs de régulation positive et négative puissent intervenir, mais l'identité et l'implication de ces facteurs restent encore mal connue *(257)*.

5- Fonctions biologiques de l'érythropoïétine dans le système hématopoïétique

5.1. Les cellules hématopoïétiques cibles

L'EPO circulante stimule la production de globules rouges, du fait de son action sur les cellules précurseurs de la lignée érythrocytaire *(figure 12)*.

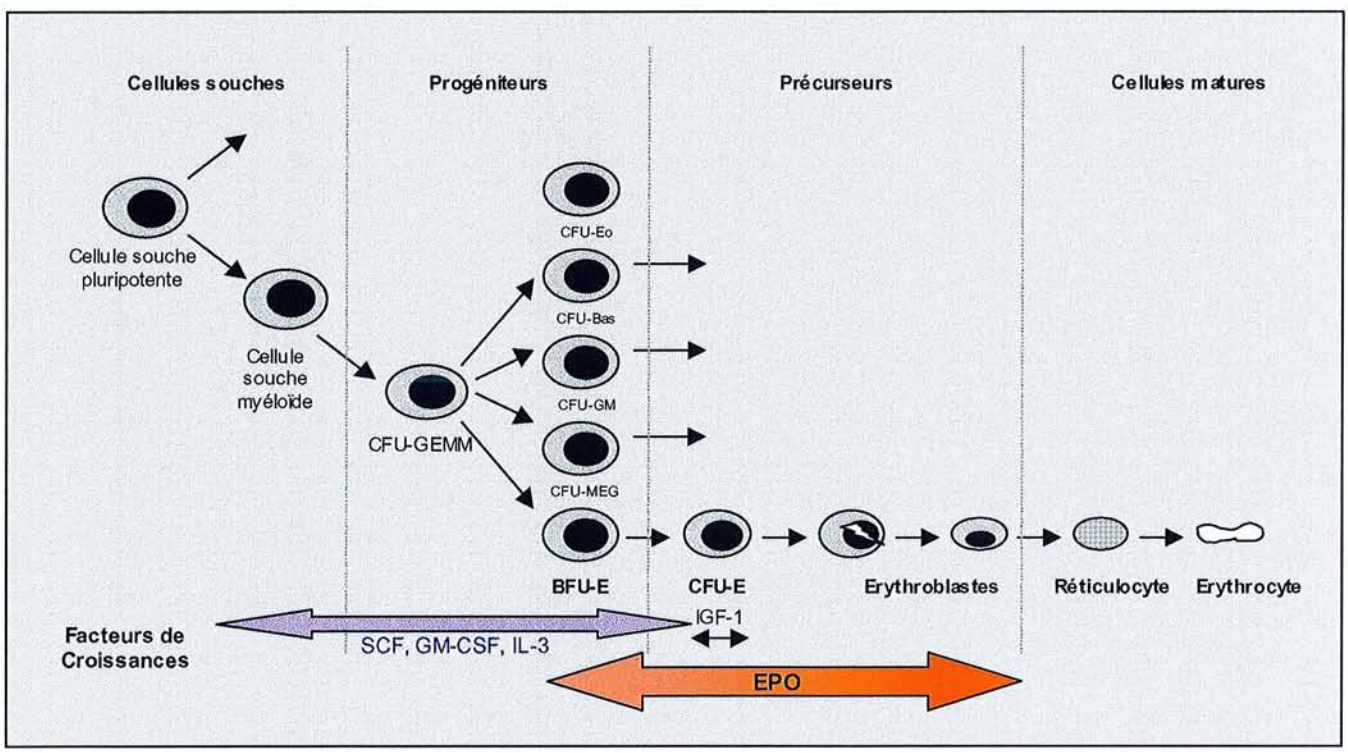


Figure 12 : Cellules hématopoïétiques cibles de l'EPO. *Adapté d'après Klingmüller, Eur J Biochem, 1997 et Fisher, Exp Biol Med, 2003 (257, 274).*

L'EPO ne semble pas impliquée dans l'engagement des cellules pluripotentes vers la lignée érythrocytaire. Les BFU-E *(burst forming units-erythroid)* et les CFU-E *(colony forming units-erythroid)* correspondent aux premiers stades du développement érythropoïétique identifiées en culture cellulaire comme étant sensibles à l'EPO *(274)*. L'EPO agit sur ces cellules en synergie avec le SCF *(stem cell factor)*, le GM-CSF

(granulocyte/macrophage colony-stimulating factor), l'IL-3 *(interleukine-3)*, l'IL-4, IL-9 et l'IGF-1 pour permettre leur prolifération et leur maturation.

Les BFU-E sont les cellules les plus précoces du développement érythrocytaire que l'EPO soit capable de stimuler. Cependant, ces progéniteurs sont peu répondeurs à l'EPO du fait de leur taux faible en récepteur membranaire, et leur prolifération ne peut être stimulée *in vitro* que par de très fortes concentrations en EPO *(257, 274)*.

Les principales cellules cibles de l'EPO sont les CFU-E ou proérythroblastes, capables de répondre à de très faibles concentrations en EPO. Il a été montré que la stimulation par l'EPO des CFU-E est indispensable pour leur survie, pour leur prolifération, et leur différenciation terminale *(275, 276)*. L'EPO participe aux étapes ultérieures de la différenciation des érythroblastes, et stimule la sortie des réticulocytes de la mœlle.

5.2. Boucle de régulation de l'érythropoïèse

Le niveau de production des globules rouges est étroitement lié à la demande en oxygène par les tissus. La production normale de globules rouges dépend d'un taux basal d'EPO circulante. L'hormone produite au niveau du rein est sécrétée et circule dans le sang jusqu'à la moelle osseuse, où elle se lie aux récepteurs spécifiques exprimés à la surface des précurseurs de la lignée érythrocytaire *(figure 13)*.

Koury et Bondurant ont proposé un modèle pour expliquer l'importance de la régulation de la survie des CFU-E par l'EPO. D'après ces auteurs, en condition normale, l'EPO circulante serait en quantité très faible, de sorte que seulement une minorité de progéniteurs survivrait, et subirait une maturation complète pour donner des érythrocytes fonctionnels *(275)*.

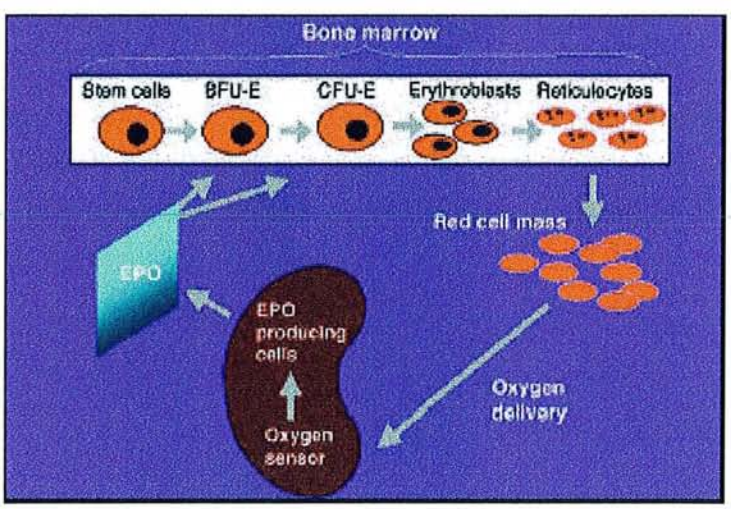


Figure 13 : Boucle de régulation de l'érythropoïèse. *D'après Lappin, The Oncologist, 2003 (268).*

Lorsque la quantité d'oxygène délivrée aux tissus diminue, la synthèse de l'EPO par les cellules rénales est accrue. L'hormone favorise alors la viabilité d'une majorité de progéniteurs, ainsi que leur prolifération et leur différenciation terminale, aboutissant alors à une augmentation de la masse de globules rouges circulants *(275)*. La concentration sanguine en hémoglobine et par conséquent, la capacité du sang à transporter l'oxygène, sont ainsi augmentées, ce qui permet de répondre à la diminution de la disponibilité en oxygène pour les tissus *(256)*.

6- Le récepteur à l'érythropoïétine (R-EPO)

L'érythropoïétine exerce son action au niveau de ces cellules cibles, en se liant à ses récepteurs membranaires spécifiques. Le récepteur à l'EPO appartient à la superfamille des récepteurs hématopoïétiques, qui comprend entre autre le récepteur à l'hormone de croissance, le récepteur à la prolactine, le récepteur au G-CSF, le récepteur au GM-CSF, le récepteur à la thrombopoïétine, et les récepteurs de nombreuses interleukines. L'ensemble de ces récepteurs partage un certain nombre de caractéristiques structurales et fonctionnelles.

6.1. Structure du récepteur

Le récepteur à l'EPO, glycoprotéine membranaire constituée de 66 kDa *(277, 278)* est divisé en 3 domaines *(figure14)* :
- un domaine extra-cellulaire, qui porte le domaine de liaison de l'EPO,
- un domaine transmembranaire assurant l'ancrage du récepteur dans la membrane cellulaire,
- et un domaine intracellulaire, responsable de l'activation de la cascade de signalisation intracellulaire, qui contient le domaine box1 et porte huit résidus tyrosine (Tyr) susceptibles d'être phosphorylés après activation du récepteur par l'hormone.

Chaque domaine box1 permet l'ancrage spécifique et constitutif d'une protéine kinase : JAK2 *(Janus kinase 2)*. Les résidus Tyrosine, lorsqu'ils sont phosphorylés, servent d'ancrage à des protéines adaptatrices ou effectrices renfermant un domaine SH2 (*pour Src homology 2 domain*) *(279)*.

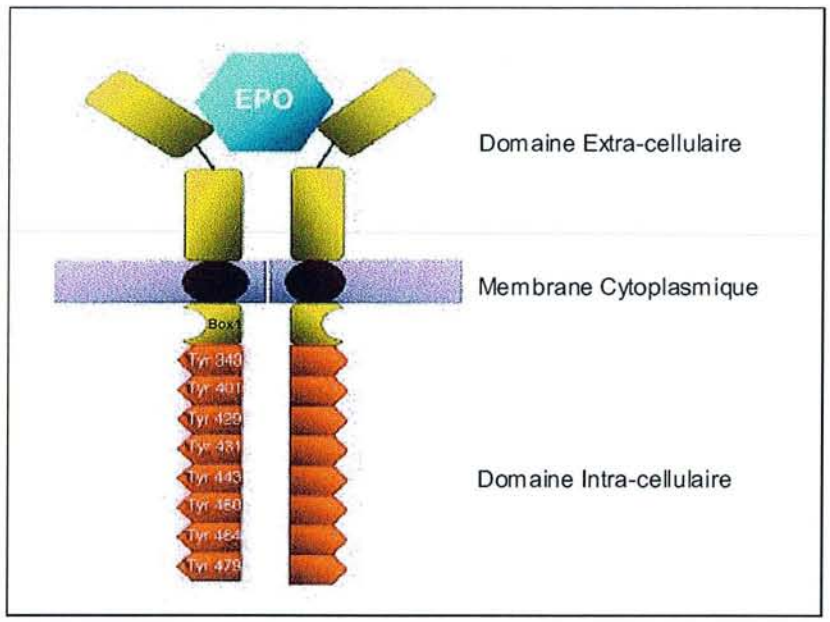


Figure 14 : Structure du récepteur à l'érythropoïétine (R-EPO). Les R-EPO existent initialement sous forme de monomères. Lors de l'interaction de l'hormone avec ses récepteurs, une seule molécule d'EPO se lie à deux récepteurs adjacents. *D'après Lappin, The Oncologist, 2003 (268).*

6.2. Activation et désactivation du récepteur

6.2.1. Activation du R-EPO (257, 274, 279).

D'après les analyses cristallographiques, les récepteurs à l'EPO existent initialement sous forme de monomères, et lors de l'interaction de l'hormone avec ses récepteurs, une seule molécule d'EPO se lie à deux récepteurs adjacents, formant ainsi un pont entre deux monomères. La fixation de l'EPO provoque une dimérisation des récepteurs, qui déclenche la cascade de signalisation intracellulaire *(figure15)*.

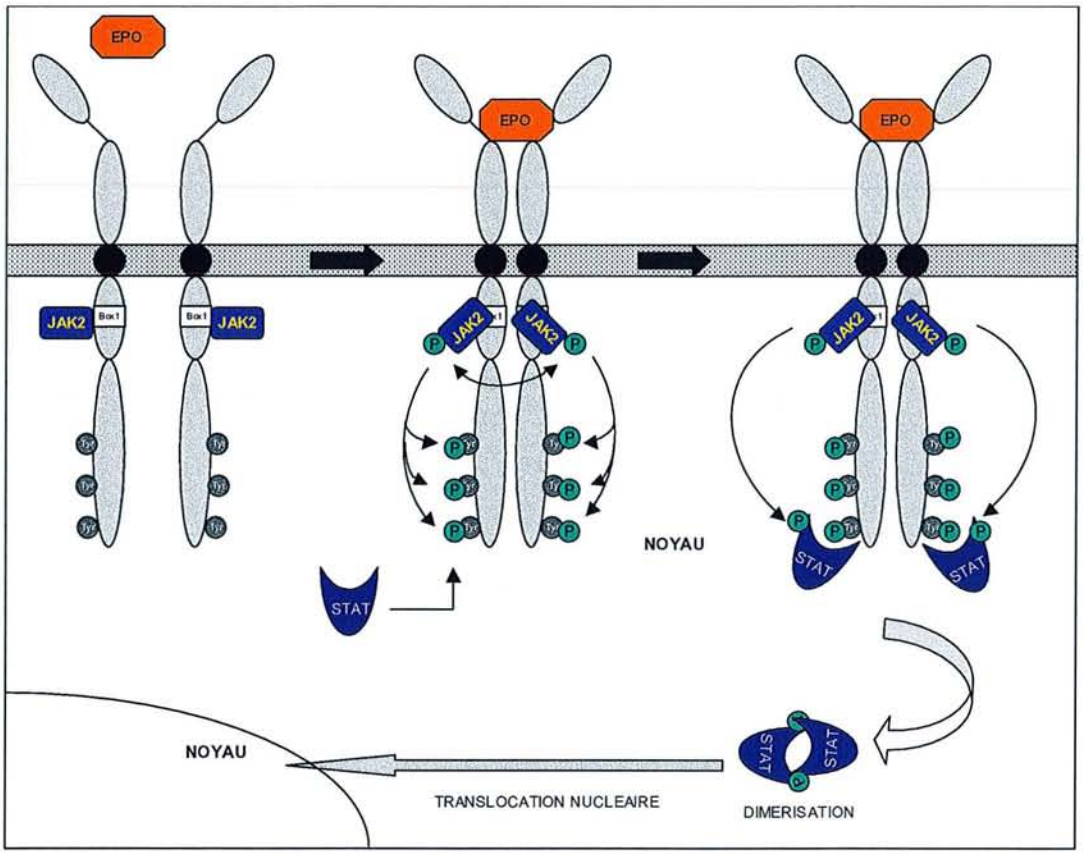


Figure 15 : Activation de la voie de signalisation impliquant les protéines JAK2 et STAT5. *Schéma adapté d'après Klingmüller, Eur J Biochem, 1997 (274).*

La cascade de signalisation ainsi induite correspond à une cascade de phosphorylations / déphosphosphrylations. Les premières phosphorylations sont réalisées par les protéines JAK2.

La dimérisation des récepteurs adjacents, résultant de la fixation de l'hormone, est associée à un changement conformationnel des récepteurs, provoquant alors le rapprochement de deux protéines JAK2 (chaque monomère portait initialement une protéine JAK2). Le rapprochement des protéines JAK2 rend possible une phosphorylation mutuelle : chaque protéine JAK2 phosphoryle son homologue au niveau de ses résidus Tyr. Les protéines JAK2 phosphorylées sont ainsi activées.

Elles phosphorylent en retour plusieurs protéines intracellulaires au niveau de leurs résidus Tyr.

En particulier, JAK2 phosphoryle les résidus Tyr contenus dans le domaine intracellulaire du récepteur lui-même. Les résidus Tyr phosphorylés du récepteur servent de point d'ancrage pour de nombreuses protéines qui renferment des domaines SH2. Lorsque ces protéines s'ancrent au niveau des résidus phosphotyrosine (phosphoTyr), elles sont

phosphorylées à leur tour par les protéines JAK2, ce qui provoque alors leur activation aboutissant à la transduction du signal en aval.

Les principales protéines effectrices du complexe R-EPO/JAK2 sont les protéines STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*). Parmi les autres protéines effectrices, on trouve la PLCγ *(phospholipase Cγ)*, la PI3-K *(phosphatidylinositol 3-kinase)*, des protéines tyrosine phosphatases (SHP1 ou SHP2). De plus, un certain nombre de protéines adaptatrices, dont Shc ou Grb2 (*growth factor receptor binding protein 2)*, ont également été identifiées comme capables d'interagir avec le complexe EPO-R/JAK2.

Les protéines STAT5 sont des facteurs de transcription qui existent à l'état latent dans le cytoplasme des cellules et qui s'ancrent par leur domaine SH2 au niveau des Tyr 343 et 401 du récepteur. Les protéines STAT5, après avoir été phosphorylées par les protéines JAK2, se détachent du récepteur pour former des dimères *(figure 15)*. Ces dimères forment un facteur de transcription actif, qui pénètre dans le noyau de la cellule, où il se lie sur des séquences d'ADN spécifiques, et active la transcription de gènes cibles.

La stimulation par l'EPO induit une phosphorylation rapide de la PLCγ, qui lorsqu'elle est activée, induit la formation de deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-triphosphate et le diacylglycérol, qui activent à leur tour la protéine kinase C (PKC).

L'ancrage direct ou indirect des protéines adaptatrices Shc et Grb2 au niveau des résidus phosphoTyr du R-EPO aboutissent à l'activation de la protéine Ras, qui active à son tour la protéine Raf, déclenchant ensuite l'activation de la cascade des MAP Kinases *(figure 16)*.

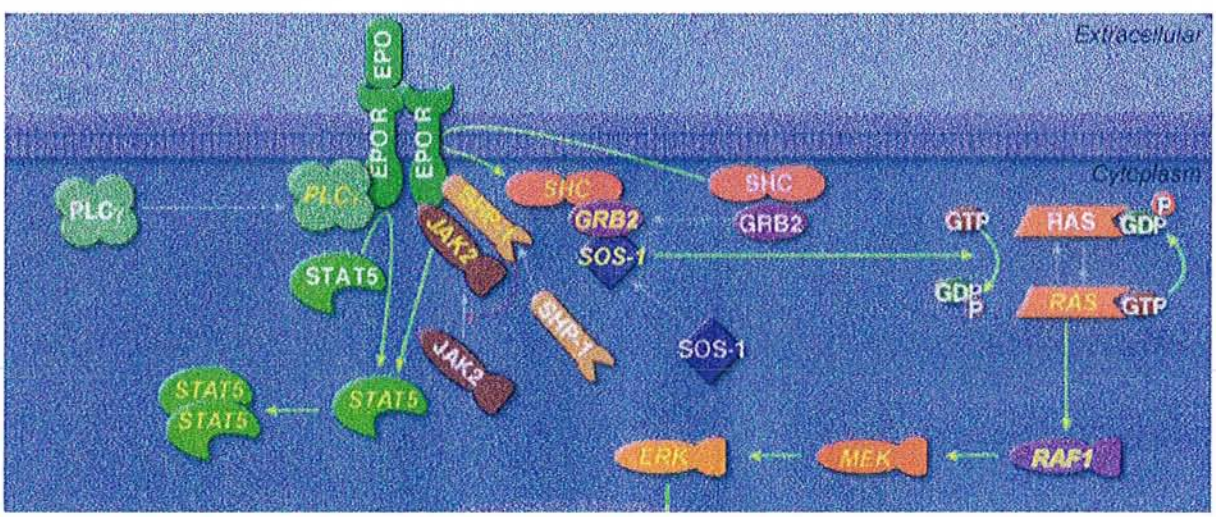


Figure 16 : Principales cascades de signalisation intracellulaire activées par la fixation de l'EPO sur son récepteur porté par les précurseurs de la lignée érythrocytaire. *Source : Biocarta.com.*

La liaison de l'EPO sur ses récepteurs doit induire un signal intracellulaire aboutissant à la survie des précurseurs érythrocytaires, à leur prolifération et à leur différenciation. Les données actuelles suggèrent l'existence de plusieurs voies redondantes pour un même effet.

Ainsi, il semble que la voie de signalisation JAK2/STAT5 participe principalement à la survie *(280-282)* mais ne semble pas impliquée dans la prolifération des précurseurs érythrocytaires *(282)*. L'EPO, *via* JAK2 et STAT5, empêche l'entrée en apoptose des cellules en augmentant l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-x_L *(280)*.

La principale voie régissant la prolifération des précurseurs érythrocytaires semble être la voie des MAPK *(283)*. Cette voie est complétée semble-t-il, par l'activation de la PLCγ et de la PKC, habituellement impliquée dans le déclenchement d'un signal mitogénique *(274)*.

La différenciation des précurseurs érythrocytaires pourraient être également le résultats de l'activation de plusieurs voies redondantes, dont la voie des MAPK *(283)*.

6.2.2. Auto-régulation du R-EPO

Parallèlement à l'activation des voies responsables des effets cellulaires, des voies régulant l'activité du R-EPO sont activées. Ainsi, l'ancrage de protéines SHP1 sur les Tyr du R-EPO permet l'activation de ces protéines, et par conséquent, l'activation de leur activité phosphatase. Ceci conduit à la déphosphorylation et donc à l'inactivation des protéines JAK2. Ainsi, la cascade de signalisation est régulée négativement et par conséquent contrôlée *(274)*. De plus, il existe probablement une régulation négative du R-EPO, accomplie par des protéines dont la synthèse a été induite par la fixation de STAT5 sur le gène correspondant.

B- Implication de l'érythropoïétine en dehors du système hématopoïétique

1- Mise en évidence

1.1. Production d'EPO extra-rénale et extra-hépatique

Au début des années 90, grâce au développement et à l'expansion des techniques de biologie moléculaire, la présence de l'ARNm de l'EPO a été mise en évidence chez les rongeurs au niveau des poumons, de la rate, des testicules, des ovaires et des oviductes, et surtout au niveau du cerveau *(284-287)*. La proportion d'ARNm de l'EPO rencontrée dans les testicules, dans la rate et dans le cerveau correspond respectivement à 30%, 20% et 10% de la proportion d'ARNm rencontrée dans le rein *(288)*.

Chez l'homme, en plus du rein et du foie, l'ARNm de l'EPO et la protéine elle-même ont été identifiés dans le cerveau *(289, 290)* dans le placenta *(291)*, dans les organes

reproducteurs féminins (col, endomètre, ovaires) *(292)*et dans de nombreuses tumeurs malignes *(288, 293-295)*.

1.2. Localisation tissulaire du récepteur

Après avoir longtemps cru que l'EPO était exclusivement une hormone agissant sur les précurseurs érythrocytaires, l'utilisation d'érythropoïétine radiomarquée à l'^{125}Iode a permis de détecter la présence du R-EPO à la surface de cellules non érythrocytaires (cellules de phéochromocytome PC12 et SN6). La séquence du gène codant pour le R-EPO était identique à celle connue pour les précurseurs érythrocytaires *(296)*.

Depuis, le R-EPO a été mis en évidence dans le cerveau de souris exposées au monoxide de carbone *(286)*, et dans le cerveau humain *(290, 297)*, dans le rein *(298)*, dans les organes reproducteurs femelles (endomètre, ovaires) *(292)* et dans plusieurs tumeurs malignes solides (carcinome rénal, cancer du sein, cancer gastrique, tumeurs malignes des organes reproducteurs féminins, tumeurs solides pédiatriques,...) *(277, 278, 293-295, 299-301)*.

Le R-EPO est également présent à la surface des cellules endothéliales au niveau des vaisseaux sanguins dans de nombreux tissus normaux (cerveau, utérus) *(287, 302, 303)* ou cancéreux (cancer du sein, cancer gastrique, tumeurs malignes des organes reproducteurs féminins, tumeurs solides pédiatriques,...) *(277, 278, 293-295, 300, 301)*.

2- L'érythropoïétine au niveau du système nerveux central (SNC)

2.1. Système autocrine / paracrine impliquant l'EPO dans le système nerveux central

Il a été démontré que les astrocytes produisaient, de manière dépendante de l'oxygène, de l'EPO ayant un poids moléculaire plus faible que l'EPO circulante, du fait d'une diminution de la sialylation *(285)*. Par ailleurs, le R-EPO a été mis en évidence dans le cerveau de rats et de souris *(286, 304)*, ainsi que dans le système nerveux central humain *(289, 290)*. Leur présence a été identifiée à la surface des neurones, des astrocytes et de la microglie, ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux *(297)*. Ces données suggèrent par conséquent que le SNC possède un système EPO/R-EPO autocrine et paracrine indépendant du système endocrine impliqué dans l'érythropoïèse où l'érythropoïétine produite par les astrocytes se lie sur les récepteurs localisés à la surface des astrocytes eux-mêmes (système autocrine), des neurones, de la microglie, ainsi qu'au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (système paracrine) *(256)*.

2.2. Effet neuroprotecteur de l'EPO

Les expérimentations de Sakanaka *et coll.* ont montré que l'instillation intracérébrale continue d'rHuEPO chez des gerbilles soumises à une ischémie modérée, permettait de retarder et de diminuer significativement la mort des neurones induite par l'ischémie *(305)*. A l'inverse, le R-EPO soluble instillé chez ces mêmes animaux modérément ischémiques, accélérait et amplifiait la mort neuronale, en bloquant l'activité de l'EPO endogène *(305)*. Ces observations ont été confirmées chez le rat et la souris en utilisant d'autres modèles d'induction de l'ischémie cérébrale *(306, 307)*.

Il a été montré que l'rHuEPO pouvait franchir la barrière hémato-encéphalique *(308, 309)*, et pouvait réduire les dommages cérébraux provoqués par un accident ischémique focal, par un traumatisme crânien d'origine mécanique ou par une encéphalomyélite autoimmune expérimentale *(310)*. De même, elle pouvait retarder et diminuer la sévérité des crises d'épilepsie, expérimentalement induite par l'administration d'analogue du glutamate *(310)*.

Ces expérimentations ont donc mis en évidence le rôle neuroprotecteur joué *in vivo* par l'EPO produite dans le cerveau. L'effet neuroprotecteur de l'EPO semble passer par une diminution de la toxicité du NO, par une diminution de la toxicité du glutamate, par un effet anti-oxydant direct et par un effet anti-inflammatoire *(305, 311, 312)*.

Même si les mécanismes moléculaires expliquant l'effet neuroprotecteur de l'EPO ne sont pas élucidés, la voie de signalisation aboutissant à l'activation de NF-κB semble participer à ce processus *(311, 312)*.

3- Rôle de l'érythropoïétine au niveau vasculaire

La présence de R-EPO a été mise en évidence sur des cellules HUVEC *(human umbilical cord endothelial cell (302))*. *In vitro*, l'rHuEPO augmente la prolifération des cellules endothéliales *(302, 313)*, les protégent contre l'apoptose induite par le LPS (lipopolysaccharide) *(314)*et augmente leur migration *(302)*.

Il a été montré que des cellules endothéliales humaines exprimaient le R-EPO et répondaient à l'rHuEPO en proliférant et en se différenciant pour donner une structure vasculaire quand elles étaient ensemencées dans du Matrigel™ *(315)*. Ce processus était associé à une stimulation de la phosphorylation de JAK2, et à la production de MMP-2 *(315)*.

De plus, l'rHuEPO induisait une réponse angiogénique au niveau de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet, suggérant fortement que l'EPO agit comme un facteur pro-angiogénique *(315)*.

Sachant qu'à l'âge adulte, l'angiogenèse n'existe qu'au niveau de l'endomètre utérin, Yasuda *et coll* ont étudié l'éventuelle implication de l'EPO dans l'angiogenèse utérine *(287)*. Ces auteurs ont montré que l'injection de R-EPO soluble dans l'utérus de la souris inhibait la

croissance de l'endomètre, en inhibant l'activité de l'EPO endogène. D'autre part, ils ont montré que l'rHuEPO injectée dans la cavité utérine de souris ovariectomisées stimulait l'angiogenèse utérine et la croissance de l'endomètre, au même titre que le 17β-Estradiol *(287)*. L'ensemble de ces résultats, associés au fait que les cellules endothéliales de l'endomètre utérin expriment le R-EPO, suggère que l'EPO constitue l'un des facteurs pro-angiogéniques impliqués dans la croissance endométriale.

4- L'érythropoïétine au niveau d'autres fonctions organiques

Une étude a rapporté que les cellules rénales exprimaient le R-EPO et que l'rHuEPO stimulait leur prolifération, suggérant que l'EPO endogène joue un rôle paracrine au niveau du rein *(298)*.

Il a également été montré que l'rHuEPO influençait la stéroïdogénèse testiculaire chez les hommes en stimulant directement la production de la testostérone *(316)*.

Par ailleurs, la présence d'EPO a été identifiée dans le lait maternel et les R-EPO ont été détectés au niveau des entérocytes chez les nouveau-nés. Ces résultats suggèrent donc que l'EPO puisse jouer un rôle dans le développement des fonctions intestinales chez les nouveau-nés *(317)*.

5- Rôle de l'érythropoïétine endogène dans le développement tumoral

5.1. Cancer rénal

Après avoir montré la présence de R-EPO à la surface des cellules rénales saines, et après avoir suggéré que l'EPO agissait comme un facteur de croissance sur les cellules rénales *(298)*, Westenfelder *et coll.* ont émis l'hypothèse que l'EPO peut jouer un rôle stimulateur dans la croissance des carcinomes rénaux. Au cours des expériences menées pour vérifier cette hypothèse, ils ont montré que des biopsies de patients, ainsi que des lignées de cellules tumorales d'origine rénale (Caki-2 et 786-0) exprimaient des R-EPO (au niveau de l'ARNm et de la protéine). Ils ont également montré que l'rHuEPO pouvait stimuler *in vitro* la prolifération de ces mêmes lignées cellulaires. De plus, une sécrétion d'EPO endogène a été détectée au niveau des tumeurs et du tissu rénal sain *(299)*.

5.2. Cancer du sein

Récemment, Acs *et coll.* ont rapporté l'existence d'une expression basale, stimulée par l'hypoxie, de l'EPO et de ses récepteurs R-EPO au niveau de lignées cellulaires de cancer du sein. Ils ont montré *in vitro* que l'rHuEPO pouvait stimuler la synthèse d'ADN et la prolifération de ces mêmes lignées. Ils ont confirmé sur des biopsies de tumeurs mammaires l'expression protéique d'EPO et de R-EPO. Le marquage immunohistochimique était particulièrement positif dans les cellules tumorales jouxtant la zone nécrotique, suggérant une régulation de l'expression par l'hypoxie, et au niveau de la vascularisation tumorale, tant au niveau de l'endothélium (pour l'EPO et les R-EPO) que de la couche musculaire lisse (uniquement pour les R-EPO) *(277)*. Dans une étude ultérieure portant sur 184 carcinomes mammaires invasifs et 158 carcinomes mammaires *in situ*, ces mêmes auteurs ont montré que le marquage immunohistochimique des R-EPO était significativement plus intense dans les tumeurs de haut grade histologique, présentant une nécrose, une invasion lymphovasculaire, un envahissement ganglionnaire, et la perte de l'expression des récepteurs hormonaux (œstrogène et progestérone). Au vu de ces résultats, les auteurs ont proposé la possibilité que l'hypoxie favorise le développement tumoral en induisant une nouvelle voie de signalisation autocrine et paracrine impliquant l'EPO et ses récepteurs *(300)*.

Arcasoy *et coll.* ont tenté de confirmer le lien éventuel entre l'hypoxie tumorale et l'expression de l'EPO, par l'analyse immunohistochimique des cellules hypoxiques viables après injection aux patientes porteuses de tumeurs mammaires, du pimonidazole. Bien qu'une colocalisation de l'expression des R-EPO et de l'EPO ait été confirmée dans cette étude, les auteurs n'ont pas démontré de colocalisation entre l'hypoxie cellulaire et l'expression d'EPO *(278)*. En revanche, ces expérimentations ont permis de démontrer indirectement l'implication de l'EPO endogène et de ses récepteurs dans la progression tumorale : en effet, ils ont montré que l'administration du R-EPO soluble, d'un anticorps anti-EPO ou d'un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de JAK2 permettait de réduire la croissance de tumeurs mammaires murines implantées chez le rat *(278)*.

5.3. Cancers pelviens

Yasuda *et coll.* après avoir suggéré l'existence au niveau de l'utérus d'un système paracrine impliquant l'EPO et ses récepteurs *(287)*, s'est naturellement intéressée à l'implication de ce système dans les tumeurs malignes des organes reproducteurs féminins *(294, 318)*. D'une part, les auteurs ont montré que des tumeurs de patientes, souffrant de pathologies cancéreuses d'origine ovarienne, cervicale ou endométriale, exprimaient tant au niveau génique que protéique, l'EPO et les R-EPO. Ces derniers ont été identifiés à la fois au niveau des cellules malignes et au niveau des cellules endothéliales vasculaires *(294)*. Dans

une étude ultérieure, la même équipe a montré que 24 lignées cellulaires d'origine tissulaire très diverses (glioblastome, mélanome, cancers digestifs, cancer du poumon, etc...) exprimaient l'ARNm de l'EPO et du R-EPO et que la sécrétion d'EPO était stimulée par l'hypoxie. De même, la plupart des xénogreffes étudiées, établies à partir des lignées cellulaires précédemment citées, présentaient un immunomarquage positif pour les R-EPO *(295)*. Cette dernière étude a permis aux auteurs de généraliser à l'ensemble des tumeurs malignes, l'implication, de façon autocrine et paracrine, de l'EPO et de ses récepteurs dans le développement tumoral : le système EPO/R-EPO semble contribuer à la fois à la croissance, à la viabilité et à l'angiogenèse tumorale *(295)*.

D'autre part, ils ont étudié, sur des fragments tumoraux cultivés *in vitro,* et sur des tumeurs humaines implantées chez la souris *nude*, les conséquences de l'inhibition de l'EPO endogène en injectant dans le tissu tumoral soit un anticorps anti-EPO, soit le R-EPO soluble *(294, 318)*. Les auteurs ont démontré dans ces deux études, d'une part, que les deux traitements provoquaient la destruction des néo-vaisseaux, et d'autre part, que les deux traitements inhibaient la prolifération et induisaient la mort par apoptose des cellules tumorales.

Néanmoins, ces résultats restaient à confirmer car la méthodologie utilisée était inhabituelle et critiquable, notamment concernant l'administration du traitement (ex : 3 injections intra-tumorales de 0,2 mL d'anticorps en 3 heures) ou le délai retenu entre l'administration du traitement et l'analyse de l'effet (12 à 24 heures dans la plupart des cas) *(294, 318)*.

Pour cela, ils ont également étudié l'effet de l'EMP9, un peptide mimant l'action de l'EPO mais inhibant la cascade de signalisation JAK2/STAT5, sur la croissance de xénogreffes humaines. L'EMP9 injecté en intra-péritonéal, entraînait la destruction massive de tissu tumoral, caractérisé alors par la présence de nombreuses cellules mortes et peu de vaisseaux *(295)*.

5.4. Tumeurs pédiatriques

L'étude publiée par Batra *et coll.* confirme pour un certain nombre de tumeurs pédiatriques que le système EPO/R-EPO contribue à la fois à la croissance, à la viabilité et à l'angiogenèse tumorale *(293)*.

II- L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE

A- Anémies et cancers

1- Définition de l'anémie

L'anémie est définie par une diminution de la masse d'hémoglobine totale circulante. Sous réserve que le volume sanguin total ne soit pas augmenté, le taux d'hémoglobine (Hb) exprimé par unité de volume de sang (g/dL) permet d'identifier une anémie. On parle d'anémie lorsque le taux d'hémoglobine est inférieur à 13 g/dL chez l'homme et à 12 g/dL chez la femme. Le *National Cancer Institute,* en accord avec d'autres instituts, ont subdivisé les anémies en quatre groupes : anémie légère (Hb >10 g/dL), anémie modérée (Hb : 8 à 10 g/dL), anémie sévère (Hb : 6,5 à 7,9 g/dL) et anémie pouvant être mortelle (Hb < 6,5 g/dL) *(319).*

L'hématocrite qui est la proportion du volume sanguin occupée par le volume érythrocytaire s'abaisse parallèlement. L'anémie peut donc être également définie par une baisse de l'hématocrite au-dessous de 40% chez l'homme et de 35% chez la femme.

2- Incidence de l'anémie chez les patients cancéreux

La moitié des patients atteints de pathologies malignes, hématologiques ou non, présentent une anémie *(320).* Ce chiffre peut augmenter considérablement chez les patients cancéreux en stade avancé ou chez les patients traités par chimiothérapie ou/et radiothérapie (jusqu'à 80% pour les cancers du poumon traités par radio-chimiothérapie) *(321).*

L'anémie prend en général la forme des anémies associées aux maladies chroniques, résultant de l'activation des systèmes immunitaire et inflammatoire *(320).* Les cytokines de l'inflammation, notamment l'IL-1, le TNFα et le TGFβ, exercent un effet inhibiteur direct sur la production d'érythropoïétine *(322).* Ainsi, les patients atteints de tumeurs solides présentent généralement des taux d'EPO circulante faible par rapport à leur taux d'hémoglobine *(323).*
D'autre part, des évènements tels que les pertes sanguines (cancers génitaux ou cancers digestifs), l'hémolyse, l'infiltration de la moelle osseuse (métastases), souvent associés au développement tumoral, peuvent contribuer à l'apparition d'anémies chez les patients cancéreux *(320, 324).*
L'anémie peut aussi être exacerbée chez certains patients du fait de carences nutritionnelles (fer, vitamine B12, folates) associées à la maladie *(320).*
De même, l'effet myélosuppresseur direct et indirect des thérapies, notamment la chimiothérapie incluant des sels de platine (agent néphrotoxique), peut contribuer à l'instauration ou à l'aggravation de l'anémie chez les malades *(320).*

3- Conséquences de l'anémie associée aux cancers

L'impact de l'anémie sur les capacités physiques et intellectuelles des patients varie considérablement d'un sujet à l'autre. La sévérité des symptômes liés à l'anémie dépend de son degré, de sa rapidité d'installation ainsi que de l'âge et de l'état général du patient.

La fatigue, pouvant aller jusqu'à l'épuisement, est la conséquence première de l'anémie chez les patients cancéreux. Les autres symptômes associés à l'anémie sont les dyspnées, les complications cardiovasculaires, les céphalées, les vertiges, une altération des fonctions cognitives, l'aménorrhée, la dépression *(319, 325)*.

Globalement, l'anémie est à l'origine d'une diminution de la qualité de vie des malades et plusieurs études ont montré que l'augmentation du taux d'hémoglobine s'accompagnait d'une amélioration de la qualité de vie *(324, 326, 327)*.

4- Anémie et résistance aux traitements anticancéreux

Au-delà de l'impact délétère de l'anémie sur la qualité de vie des malades, un certain nombre d'études cliniques ont démontré que l'anémie, même légère, pouvait avoir une influence négative sur l'efficacité des traitements, et constituait même dans certains cas un facteur pronostique concernant la survie des patients.

4.1. Impact de l'anémie sur l'efficacité de la radiothérapie

En clinique, l'influence néfaste de l'anémie, mesurée avant traitement, sur le pronostic des patients recevant une radiothérapie à visée curative a été mise en évidence dès les années 50 chez des patientes atteintes de cancers cervicaux *(328)*.

Depuis, l'impact de l'anémie sur la réponse loco-régionale et sur la survie des patients a été documenté par de nombreuses études et pour des tumeurs solides d'origine très diverse : les essais concernaient principalement les tumeurs "tête et cou" et les cancers du col de l'utérus, mais également, les cancers de la vessie, du poumon, des bronches, de la prostate ou de l'anus. Ces études ont fait l'objet de nombreuses revues *(329-332)*.

En particulier, une étude rétrospective sur 605 patientes traitées par radiothérapie pour cancer cervical, montrait une différence significative en terme de survie globale, de rémission complète et de contrôle loco-régional entre les patientes anémiques (Hb < 12 g/dL) et les patientes non anémiques avant l'initiation du traitement. L'augmentation de la survie globale chez les patientes non anémiques était de 12% *(333)*.

De même, une étude rétrospective sur 899 patients atteints de tumeurs "tête et cou" a rapporté une corrélation significative entre le taux d'hémoglobine avant traitement par radiothérapie et la survie des patients à 5 ans ou le contrôle tumoral local *(334)*. Le contrôle tumoral local et le taux de survie à 5 ans des patients anémiques n'étaient que de 20,9% et de 28,4% respectivement, alors qu'ils atteignaient 76% et 58,2% chez les patients non anémiques.

Dans le cancer du poumon non à petites cellules, le taux de survie à 2 ans pour les patients présentant un taux d'hémoglobine < 12,5 g/dL était de 6% alors qu'il atteignait 20% pour les patients présentant un taux d'hémoglobine > 14,5 g/dL *(335)*.

Même si toutes ces études n'ont pas utilisé les mêmes taux d'hémoglobine pour définir l'anémie, l'ensemble des résultats démontre clairement qu'un taux d'hémoglobine faible **avant** la radiothérapie diminue les chances de contrôle loco-régional de la maladie et la survie des patients.

Bien que les études aient été moins nombreuses, il apparaît aujourd'hui que la diminution du taux d'hémoglobine **en cours de traitement** par radiothérapie affecte l'efficacité du traitement. En effet, il a été démontré pour des tumeurs "tête et cou" et pour des tumeurs du col utérin, que l'installation d'une anémie en cours de radiothérapie diminue les chances de contrôle loco-régional de la maladie et diminuerait les chances de survie des patients *(336-339)*.

D'après une étude prospective publiée en 2003, chez 87 patientes souffrant d'un cancer cervical, le taux d'hémoglobine en cours d'irradiation pourrait même constituer le facteur pronostique le plus puissant en terme de contrôle local et de survie *(340)*.

4.2. Impact de l'anémie sur l'efficacité de la chimiothérapie et la chirurgie

La significativité pronostique de l'anémie ne semble pas être limitée à l'efficacité de la radiothérapie. En effet, le taux d'hémoglobine faible (Hb < 13 g/dL pour les hommes et < 12 g/dL pour les femmes) a été associé à un plus grand risque d'échec thérapeutique chez des patients traités chirurgicalement pour un cancer de la glotte. Le contrôle loco-régional à 5 ans était significativement plus faible chez les patients anémiques (60% *vs* 85%) *(341)*. De même, chez des patients traités chirugicalement pour un cancer du poumon non à petites cellules, la survie globale médiane était de 25 mois chez les malades dont le taux d'hémoglobine était ≤ 10g/dL, et de 52 mois chez les malades dont le taux d'hémoglobine était > 10g/dL *(342)*.

Une étude rétrospective menée chez 250 patientes traitées par chimiothérapie pour un cancer ovarien, a récemment identifié le taux d'hémoglobine avant et pendant le traitement

comme un facteur pronostique puissant de la survie globale *(343)*. Un constat similaire a été rapporté pour des patients atteints de cancers pulmonaires *(344)*.

5- Anémie et hypoxie tumorale

Au moins deux raisons peuvent être avancées pour expliquer l'altération de l'efficacité thérapeutique liée à l'anémie.

Tout d'abord, l'altération de la qualité de vie, qui reflète globalement une altération de l'état général, peut dans certains cas, obliger à différer ou à diminuer les doses de traitement délivrées *(345)*.

D'autre part, la possibilité que la survenue d'une anémie s'accompagne d'une diminution de l'oxygénation tumorale a été évoquée. Cette hypothèse est à l'heure actuelle la plus fréquemment avancée, même si elle n'est pas vérifiée dans toutes les études cliniques.

Une étude chez le rat a montré que les animaux anémiques présentaient une pression partielle en oxygène médiane significativement plus faible que les animaux non anémiques *(14)*.

Les travaux de Stadler *et coll.* d'une part, et de Becker *et coll.* d'autre part, évaluant la pO_2 médiane dans des tumeurs "tête et cou", tendaient à confirmer ces résultats pré-cliniques. En effet, dans la première étude, la pO_2 était égale à 6 mmHg chez les 10 patients présentant un taux d'hémoglobine < 12 g/dL alors qu'elle atteignait 24 mmHg chez les 13 patients dont le taux d'hémoglobine était > 12 g/dL *(346)*. Dans la seconde étude, les auteurs mettaient en évidence une diminution significative de la pO_2 médiane (5 mmHg) chez les patients présentant une anémie sévère, par rapport aux patients ayant une anémie légère (13 mmHg), et par rapport aux patients non anémiques (15 mmHg) *(2)*.

A l'inverse, les études de Knocke *et coll.* et de Dunst *et coll.* n'ont pas montré de lien entre le taux d'hémoglobine et l'oxygénation tumorale chez des patientes souffrant de cancers cervicaux avant l'initiation d'un traitement par radiothérapie *(340, 347)*.

Une étude très récente menée dans le cancer du sein où les patientes étaient divisées en 5 groupes en fonction de leur taux d'hémoglobine (8-10 g/dL ; 10-12 g/dL ; 12-13 g/dL ; 13-14 g/dL ; >14 g/dL) a démontré une augmentation exponentielle de la pO_2 médiane parallèle à l'augmentation de la concentration sanguine en hémoglobine *(3)*.

B- Erythropoïétine recombinante humaine (rHuEPO)

1- Découverte, production et structure

La production d'érythropoïétine recombinante humaine a débuté avec la recherche du gène codant pour l'érythropoïétine endogène à partir d'une banque d'ADN génomique humain. Au cours de cette recherche, un certain nombre de clones ont été identifiés comme renfermant potentiellement le gène de l'EPO *(262)*. Pour vérifier que les clones isolés renfermaient effectivement la séquence génique codante complète aboutissant à l'hormone fonctionnelle, les séquences d'ADN ont été exprimées dans des cellules CHO. L'érythropoïétine ainsi synthétisée et biologiquement active tant *in vitro* qu'*in vivo*, constituait l'érythropoïétine recombinante humaine *(262, 348)*.

L'rHuEPO a ensuite été isolée, purifiée, caractérisée et comparée à l'érythropoïétine urinaire avec différentes techniques. Les analyses indiquaient que l'hormone de synthèse ne pouvait pas être distinguée de l'hormone urinaire tant au niveau de ses propriétés biochimiques qu'au niveau de ses propriétés immunologiques *(348)*. L'rHuEPO est une protéine composée de 165 résidus d'acides aminés dont la séquence primaire est parfaitement identique à la séquence primaire de l'EPO urinaire. De même, la position des ponts disulfures, les sites de glycosylation, et la structure secondaire de la protéine sont conservées dans l'rHuEPO. Quelques différences apparaissent au niveau des chaînes glycosylées, qui peuvent présenter des groupements différents de ceux observés pour l'hormone urinaire *(255, 349)*.

2- Usages thérapeutiques de l'érythropoïétine recombinante humaine

Le développement de techniques de culture et de production en masse ont permis de disposer de quantités importantes d'rHuEPO, et d'envisager son usage clinique dans le traitement des anémies débilitantes qui touchent inéluctablement les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique *(350)*. Dès 1987, Eschbach *et coll.* rapportaient les résultats d'un essai clinique de phase I et II réalisé chez 25 patients au stade terminal d'une pathologie rénale et montraient que l'rHuEPO permettait de supprimer les transfusions sanguines jusque-là nécessaires, et permettait de restaurer un hématocrite normal chez ces patients *(351)*. Ces mêmes auteurs ont ensuite démontré l'efficacité de l'rHuEPO pour corriger l'anémie associée aux insuffisances rénales en progression *(352)*.
L'utilisation de l'rHuEPO chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique a été approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) en juin 1989 *(257)*.

Chez ces patients, l'augmentation de la concentration sanguine en hémoglobine et de l'hématocrite était dépendante de la dose d'rHuEPO et était accompagnée d'une amélioration de l'état général et de la tolérance à l'effort *(255)*. La correction de l'anémie par l'rHuEPO

permettait également d'augmenter l'apport en oxygène au niveau des tissus périphériques, ce qui se traduisait par une augmentation significative de la pression partielle en oxygène transcutanée ou musculaire *(353, 354)*.

Les premiers effets secondaires recensés étaient principalement d'ordre cardio-vasculaire, avec notamment la survenue d'hypertension artérielle et de thrombose *(355)*. Plus récemment, des cas d'érythroblastopénie, liée à la production d'anticorps anti-EPO neutralisant l'action de l'EPO, ont été rapportés chez des insuffisants rénaux traités pendant plusieurs mois ou plusieurs années. Cet effet secondaire reste cependant très rare *(356)*.

3- Erythropoïétine recombinante humaine et cancers

3.1. L'érythropoïétine recombinante humaine dans le traitement des anémies associées à la pathologie cancéreuse

Chez les patients cancéreux très souvent anémiques, l'érythropoïétine recombinante humaine est apparue comme une alternative à la transfusion sanguine *(357)*. Cette possibilité thérapeutique apparaissait d'autant plus intéressante qu'une production d'érythropoïétine souvent trop faible avait été démontrée chez les patients cancéreux, alors que les précurseurs érythrocytaires apparaissaient capables de répondre normalement à une stimulation par l'érythropoïétine *(323)*.

Au cours du premier essai de phase I-II, il a été démontré chez les patients atteints de tumeurs solides, que l'rHuEPO était bien tolérée et permettait de corriger significativement l'anémie associée au cisplatine après 4 semaines de traitement (injection i.v. 5 fois/semaine à la dose de 100 ou 200 UI/kg) *(358)*. Dans un essai de phase III, il a été démontré que l'rHuEPO (s.c. 100 UI/kg 3 fois/semaine) permettait de diminuer le nombre de transfusions sanguines nécessaires dans cette même population *(359)*. De nombreuses études ont confirmé par la suite l'intérêt de l'rHuEPO pour traiter les anémies associées aux cancers *(326, 327, 345)*.

En 2001, un essai prospectif mené chez plus de 3000 patients cancéreux traités par polychimiothérapie, a montré que l'rHuEPO permettait d'augmenter significativement le taux d'hémoglobine, de diminuer le nombre de transfusions sanguines requises *(360)*. Il faut noter toutefois qu'environ 30% des patients sont réfractaires au traitement.

Cet essai a également montré que l'rHuEPO améliorait le statut fonctionnel tout en diminuant la fatigue des patients *(360)*. L'effet bénéfique de l'rHuEPO sur la qualité de vie des patients cancéreux a été confirmé par deux études multicentriques, randomisées en double-aveugle *(326, 327)*.

3.2. L'érythropoïétine recombinante humaine et le risque de prolifération tumorale

Malgré une quantité croissante de données démontrant l'implication, de façon autocrine et paracrine, de l'EPO et de ses récepteurs dans le développement tumoral, les risques de stimuler la croissance tumorale par l'administration d'rHuEPO chez les patients cancéreux restent mal définis.

3.2.1. Etudes in vitro

Lors de l'introduction de l'rHuEPO comme traitement des anémies associées aux cancers, plusieurs équipes se sont intéressées à l'influence de l'rHuEPO sur la croissance de cellules tumorales *in vitro*. Les trois premières études réalisées utilisaient soit des lignées cellulaires tumorales référencées à l'*American Type Culture Collection* (ATCC) *(361, 362)*, soit des cellules tumorales obtenues par dissociation de tumeurs fraîches de patients *(363)*, avec des origines histologiques très diverses (cancer du poumon, du sein, du pancréas, de la prostate, glioblastomes, neuroblastome, ostéosarcome, *etc*...). Les concentrations en rHuEPO testées variaient de 0,01 UI/mL à 400 UI/mL englobant ainsi largement les concentrations rencontrées dans l'organisme après administration d'rHuEPO. La croissance cellulaire a été analysée par essai clonogénique en double agar *(361-363)*, mais également par détermination du pourcentage de cellules en phase S en cytométrie en flux *(362)*.
Aucune de ces trois études n'a démontré d'effet stimulateur de l'rHuEPO sur la croissance des cellules tumorales. A l'inverse, Wollman *et coll.* ont rapporté une diminution de la croissance cellulaire pour une lignée de neuroblastome humain *(364)*.

Plus récemment, des expérimentations menées *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales caractérisées par la présence de R-EPO fonctionnels, ont abouti à des conclusions contradictoires. La première étude évaluait par le test colorimétrique au "MTT", l'effet de l'rHuEPO (pour des concentrations comprises entre 0,5 et 100 UI/mL) sur la croissance de cellules Caki-2 et 786-0, dérivant de carcinomes rénaux humains, et montrait que l'rHuEPO stimulait la prolifération cellulaire *(299)*. L'étude d'incorporation de la thymidine tritiée, ainsi que l'analyse de la prolifération par test MTT, ont conduit Acs *et coll.* à des conclusions similaires sur deux lignées de cellules tumorales d'origine mammaire (MCF-7 et BT549) exposées à 10 UI/mL *(277)*. En revanche, Westphal *et coll.*, utilisant les deux même techniques et des concentrations d'rHuEPO comprises entre 10 et 1000 UI/mL, n'ont pas mis en évidence de stimulation de la prolifération celullaire par l'rHuEPO sur 5 lignées cellulaires dont une dérivait d'un carcinome rénal humain *(365)*.

3.2.2. Etudes in vivo chez l'animal

In vivo, Joiner *et coll.* rapportaient que l'administration d'rHuEPO (20 UI/jour, 5 fois / semaine) à des souris non anémiques provoquaient un ralentissement de la croissance

tumorale faible mais significatif de tumeurs d'origine murine *(366)*. Cet effet n'a pas été retrouvé dans les études menées par l'équipe de Vaupel *(14)*.

Par ailleurs, il a été montré sur deux modèles murins référencés de myélome multiple, que l'rHuEPO pouvait provoquer la régression complète et permanente des tumeurs, se traduisant par un allongement de la survie et une réduction de la mortalité des animaux *(367)*.

3.3. L'érythropoïétine recombinante humaine, oxygénation tumorale et réponse thérapeutique

3.3.1. Les études in vivo chez l'animal

La relation entre l'anémie et l'hypoxie tumorale, et son implication dans l'altération de la réponse à la radiothérapie, ont naturellement conduit les auteurs à envisager l'utilisation de l'rHuEPO pour améliorer l'oxygénation et l'efficacité de la radiothérapie.

Les premières expérimentations *in vivo* chez les rongeurs porteurs de tumeurs murines ont abouti à des résultats contrastés *(14, 366, 368)*. Dans une première étude, l'rHuEPO permettait d'augmenter l'hématocrite chez des souris non anémiques, et empêchait qu'une anémie s'installe du fait de la croissance tumorale. En revanche, aucune amélioration de la radiosensibilité des tumeurs n'a été observée *(366)*.

Dans les études de Vaupel *et coll.*, l'administration d'rHuEPO a empêché l'installation d'une anémie, qui était provoquée chez des rats par induction d'une ascite hémorragique *(14)*, par administration de carboplatine *(368)* ou par irradiation totale *(369, 370)*. La compensation de l'anémie par l'rHuEPO permettait par ailleurs de réduire la sévérité de l'hypoxie tumorale *(14)*, et d'améliorer la réponse des tumeurs à la radiothérapie ou à la chimiothérapie (cyclophosphamide), comparativement à celle observée chez les animaux anémiques *(368-371)*.

3.3.2. Les essais thérapeutiques

Des essais thérapeutiques ont débuté pour évaluer l'intérêt d'administrer l'rHuEPO aux patients cancéreux devant recevoir un traitement anticancéreux conventionnel.

Dans une étude rétrospective sur 191 patients, traités pour une tumeur ORL par radio-chimiothérapie néo-adjuvante et chirurgie, le taux de contrôle tumoral et la survie chez les patients qui avaient avant radiothérapie un taux d'hémoglobine < 14,5 g/dL et qui recevaient alors de l'rHuEPO, étaient équivalents à ceux observés chez les patients qui avaient un taux d'hémoglobine > 14,5 g/dL. De plus, le contrôle tumoral et la survie étaient supérieurs à la réponse observée chez les patients qui avaient un taux d'hémoglobine < 14,5 g/dL non traités par l'rHuEPO *(372)*.

L'essai de phase III mené par Antonadou *et coll.* a montré une amélioration de la survie sans progression à 4 ans chez des patientes atteintes de cancers pelviens (col utérin, endomètre, prostate, colorectal, vessie) qui recevaient de l'rHuEPO durant la radiothérapie conventionnelle *(373)*. Cet essai n'ayant pas encore fait l'objet d'un article détaillé (publication sous forme de résumé à l'issue de l'*European Conference of Clinical Oncology, Lisbonne 2001*), peu d'information sont disponibles concernant les caractéristiques des patients inclus dans l'étude.

Des résultats négatifs ont été rapportés au cours d'un essai mené chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique et recevant une première ligne de chimiothérapie *(374)*. Malgré une convergence des courbes de survie à 19 mois, l'analyse intermédiaire à 12 mois faisait état d'une augmentation de la mortalité dans le groupe traité par rHuEPO (*vs* placebo). L'étude a donc été arrêtée à ce stade. Toutefois, les auteurs précisent que d'après une analyse *a posteriori*, la randomisation n'aurait pas conduit à la formation de groupes équivalents en terme d'âge, d'avancement de la maladie ou de facteurs de risques associés, si bien que les auteurs considèrent les résultats de cette étude non concluants *(374)*.

Des résultats négatifs ont également été rapportés à l'issue du premier essai randomisé, en double-aveugle contre placebo, réalisé chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou. En effet, cette étude n'a pas révélé de bénéfice pour les patients traités par l'rHuEPO, ni en terme de contrôle locorégional, ni en terme de survie sans progression, ni en terme de survie globale. Au contraire, l'administration d'rHuEPO s'est révélée délétère pour les patients *(375)*. Cependant, alors que le monoxyde de carbone libéré par la cigarette est connu pour altérer le transport de l'oxygène, les auteurs ne discutent pas le fait que le groupe traité par rHuEPO comportait 66% de fumeurs contre seulement 53% dans le groupe placebo.

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJECTIFS DE L'ETUDE

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les gliomes malins de haut grade, comme de nombreuses autres tumeurs malignes, sont caractérisés par la présence de zones d'hypoxie contribuant à augmenter la résistance de ces tumeurs vis-à-vis des traitements anticancéreux, dont la radiothérapie *(1)*. Plusieurs stratégies sont donc envisagées pour tenter de réduire l'hypoxie tumorale, en vue d'améliorer la sensibilité des gliomes malins à l'égard des traitements *(12, 13)*.

Notre travail avait pour objectif de déterminer si l'rHuEPO, administrée en l'absence d'anémie, pouvait permettre de réduire l'hypoxie tumorale, *via* l'augmentation du transport de l'oxygène, et d'améliorer secondairement la réponse à la radiothérapie fractionnée sur deux modèles de gliomes malins humains (GBM Nan1 et U87) greffés chez la souris *nude*.

Des données bibliographiques ayant suggéré l'implication éventuelle de l'EPO endogène dans le développement tumoral *(294, 295)*, la première étape de notre travail a consisté à étudier *in vitro* et *in vivo* l'influence de l'rHuEPO sur la prolifération tumorale.

La deuxième étape de notre travail devait déterminer si l'administration d'rHuEPO à des animaux non anémiques, pouvait aboutir à une réduction de l'hypoxie tumorale dans nos modèles de gliomes malins xénogreffés.
Dans un premier temps, il était nécessaire de vérifier que l'rHuEPO exerçait effectivement son activité pharmacologique chez des souris *nude* non anémiques. Puis, nous avons étudié l'influence de l'rHuEPO sur la pression partielle en oxygène, ainsi que sur la proportion de cellules tumorales hypoxiques viables.

L'hypoxie tumorale est un inducteur prépondérant de l'expression du VEGF, facteur pro-angiogénique associé à l'agressivité et à la croissance des gliomes malins *(376-379)*. Nous avons donc évalué l'impact de l'rHuEPO sur l'expression de ce facteur.

L'effet cytotoxique de la radiothérapie étant dépendant de la présence d'oxygène, l'objectif final a été de déterminer si l'administration d'rHuEPO pouvait permettre d'améliorer la réponse à la radiothérapie fractionnée des deux modèles de xénogreffes, en utilisant des conditions de traitement proches de celles réalisées en pratique clinique humaine.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

I- MODELES D'ETUDE

A- Les lignées tumorales

Au cours de nos expérimentations, nous avons évalué les effets de l'rHuEPO *in vitro* sur des cultures cellulaires monocouche de la lignée U87, et *in vivo* sur deux modèles de gliome malin d'origine humaine.

1- La lignée U87

La lignée U87 (glioblastome *multiforme* humain, ATCC HTB-14) est une lignée cellulaire adhérente, établie en culture monocouche par Ponten *et coll.* entre 1968 et 1971 à partir d'un gliome malin diagnostiqué chez une femme de 44 ans. Cette lignée nous a été fournie par l'équipe du Professeur H. Suit (*EL Steele Laboratory of Radiation Biology, Departement of Radiation Oncology, Massachusetts General Hospital, Boston, Etats-Unis*).
La réponse à la radiothérapie a été largement étudiée pour cette lignée tumorale qui est considérée comme un modèle de gliome radiorésistant *(7, 380, 381)*.

2- La lignée GBM Nan1

La lignée GBM Nan1 provient d'une patiente de 64 ans opérée d'un glioblastome temporal en 1997 dans le service de Neurochirurgie du CHU de Nancy. Des fragments de la pièce d'exérèse ont été transplantés le jour même chez des souris *nude*.
La lignée GBM Nan1 a été entretenue depuis son premier passage chez l'animal par repiquages successifs. Les caractéristiques pathologiques et immunohistochimiques ont été vérifiées au fur et à mesure des passages successifs.

B- Entretien de la lignée U87 en culture cellulaire

La lignée cellulaire U87 est conservée au congélateur à –80°C. Après décongélation, elle est cultivée en monocouche dans des flacons de culture de 75 cm^2 (Falcon, Dutcher, Brumath, France), contenant 15 mL de milieu de culture. La composition du milieu de culture est résumée dans le *tableau 4*. Les flacons sont placés dans un incubateur maintenu à 37°C et sous une atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'humidité.

Tableau 4 : Milieu de culture des cellules U87

Composants	Concentration	Fournisseurs
Sérum de Veau Fœtal inactivé (SVF)	9%	Dutcher
Pyruvate de sodium	1,25 mM	Invitrogen
Acides aminés essentiels	0,5 X	Invitrogen
Acides aminés non-essentiels	0,5 X	Invitrogen
Vitamines	0,4 X	Invitrogen
L-glutamine	2 mM	Invitrogen
L-serine	10,8 µg/mL	Invitrogen
L-asparagine	20 µg/mL	Invitrogen
Pénicilline	100 UI/mL	Invitrogen
Streptomycine	100 µg/mL	Invitrogen
DMEM *	qsp	Invitrogen

* Abréviation : DMEM = Milieu de Eagle modifié par Dulbecco.

Pour l'entretien de la culture cellulaire, les cellules sont ensemencées de façon hebdomadaire, à J_8. Après rinçage du tapis de cellules adhérentes au PBS (*phosphate-buffered saline*) (Invitrogen Corporation, Cergy Pontoise, France), elles sont décollées de leur support par digestion à la trypsine, à l'aide de 1 mL de solution de trypsine-EDTA (Invitrogen). Après 5 minutes d'exposition à 37°C, l'activité de l'enzyme est arrêtée par addition de milieu de culture (3 à 5 mL). La suspension cellulaire ainsi obtenue est centrifugée (1000 rpm, 10 minutes), et le culot cellulaire est ensuite remis en suspension dans du milieu (5 à 10 mL). Sur une fraction de la suspension cellulaire (450 µL) à laquelle on ajoute 50 µL d'un colorant d'exclusion, le bleu trypan (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), la concentration cellulaire est déterminée par numération des cellules vivantes à l'aide d'un hémocytomètre (Polylabo, VWR, Fontenay sous Bois, France). Les cellules sont ensuite ré-ensemencées à la concentration de 2.10^4 cellules/mL dans des flacons de culture de 75 cm^2. L'ensemencement définit le J_1 de la nouvelle culture.

C- La xénogreffe chez la souris *nude*

Les souris sont hébergées dans l'animalerie du Laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire (Faculté de Médecine de Nancy) dirigé par le Pr. F. Plénat, et la greffe est réalisée dans la salle de microchirurgie expérimentale de ce même laboratoire.

1- Les souris nude

Les souris *nude* ont été découvertes en 1962 dans un élevage de souris albinos non consanguines. Ces souris, sans poils, à la peau ridée, sont caractérisées par l'absence de thymus, et présentent une immunodéficience en lymphocytes T. Cette immunodéficience les rend particulièrement tolérantes pour la plupart des allo- et des xénogreffes.

Nous avons utilisé pour nos expérimentations des souris femelles athymiques *Ncr/Sed nude* (*nu/nu*) âgées de 6 à 8 semaines, provenant du centre d'élevage Charles River (Charles River Laboratories, Saint-Germain sur l'Arbresle, France).

A leur arrivée au laboratoire à l'âge de 6 semaines, les animaux sont placés dans des cages individuelles contenant de la litière (Société Safe, Villemoisson-sur-Orge, France) et reçoivent de l'eau et une alimentation (Société Safe, Villemoisson-sur-Orge, France) non stériles *ad libitum*. Les premières manipulations sur les animaux ne débutent que 7 à 10 jours après leur arrivée au laboratoire.

Les expérimentations animales sont réalisées en conformité avec la législation en vigueur.

2- Les greffons

2.1. Lignée U87

Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour la xénogreffe, la culture cellulaire est préalablement amplifiée. Pour ce faire, les cellules sont ensemencées à J_1 à la concentration de 4.10^4 cellules/mL, dans des flacons de culture de 225 cm^2 (Falcon, Dutcher, Brumath, France) contenant 45 mL de milieu de culture. A J_5, selon la technique décrite au paragraphe I.B, une suspension cellulaire à 10^7 cellules/mL est préparée dans du glucose 5% (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France).

La xénogreffe est réalisée, sans anesthésie, par injection sous-cutanée de 10^6 cellules (100 µL) au niveau de la face externe des pattes postérieures droite et gauche.

2.2. Lignée GBM Nan1

2.2.1. Origine des greffons

Une souris "porte-greffe" est sacrifiée lorsque la tumeur qu'elle porte atteint un volume d'environ 1000 mm^3. Le tissu tumoral est prélevé, puis plongé dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%). Il est alors coupé finement, à l'aide d'une lame de rasoir, afin

d'obtenir des fragments de 1 à 2 mm de diamètre et de 0,5 à 1 mm d'épaisseur. Ceux-ci constituent les greffons qui sont aussitôt implantés chez les souris receveuses.

2.2.2. Préparation et anesthésie de l'animal

Les souris receveuses sont anesthésiées par injection intrapéritonéale d'une solution constituée d'un mélange de kétamine (Kétamine, Panpharma, Fougère, France) et de xylazine (Rompun 2%, Bayer Pharma, Puteaux, France), respectivement à une concentration de 6 mg/mL et de 0,8 µg/mL. La dose injectée est de 0,01 mL/g de poids corporel. L'anesthésie survient dans les 5 minutes après l'injection pour une durée d'environ 30 minutes. L'animal endormi est ensuite fixé sur une planchette en plastique par ses quatre membres, en décubitus dorsal, au moyen de ruban adhésif de type Micropore, 3M.

2.2.3. L'intervention

Les greffons GBM Nan1 sont implantés en sous-cutané au niveau des plis inguinaux. A ce niveau, la peau et le tissu conjonctif sont incisés, dégageant ainsi les pédicules fémoraux. Les fragments tumoraux sont déposés en regard de ces pédicules. Les points de suture cutanée sont réalisés avec du fil de suture Prolène 5/0 stérile (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France).

A l'issue de l'intervention, les animaux sont replacés individuellement dans leur cage et surveillés jusqu'à ce qu'ils reprennent une activité physiologique.

II- ETUDES *IN VITRO* SUR LES CELLULES U87

A - Courbes de croissance et temps de doublement

Afin d'estimer la croissance et de déterminer le temps de doublement des cellules U87 traitées ou non par rHuEPO, nous avons réalisé, à l'aide d'un hémocytomètre, un comptage des cellules vivantes, en utilisant un colorant vital d'exclusion, le bleu trypan, témoin de l'intégrité membranaire.

A J_1, les cellules sont ensemencées à 2.10^4 cellules/mL dans des plaques 6 puits (Falcon, Dutcher) contenant 3 mL de milieu de culture. On laisse les cellules adhérer au support pendant 24 h (incubation à 37°C, 5% CO_2 et 95% d'humidité).
A J_2, dans chaque plaque, 3 puits reçoivent de l'rHuEPO à la concentration de 4 UI/mL, et 3 puits reçoivent un volume équivalent d'eau pour préparation injectable (eppi). L'eppi est l'excipient servant à diluer l'rHuEPO.

A J_3, J_4, J_5, J_6, J_8, J_9, J_{10}, les cellules sont décollées par trypsination, et une suspension cellulaire est obtenue pour chaque puits. Deux numérations sont effectuées pour chaque suspension.

La phase exponentielle de croissance des cellules peut être décrite par une équation (calculée automatiquement par Excel) de type : $\mathbf{y = a.e^{px}}$
A partir de cette équation, on peut déterminer le temps de doublement (TD) en appliquant la formule suivante : $\mathbf{TD = ln2 / p.}$

B - Analyse par le test MTT

Le test MTT est une méthode colorimétrique, utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT (Sigma), qui permet de mesurer la prolifération cellulaire et d'évaluer la cytotoxicité de xénobiotiques. Le MTT est un composé jaune pâle métabolisé par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. La métabolisation entraîne la formation de cristaux de formazan, de coloration brune.

Cet essai est réalisé en plaques 96 puits (Falcon, Dutcher). A J_1, 180 µL de suspension cellulaire à 2.10^4 cellules/mL sont déposés dans chaque puits. Les plaques sont placées à l'incubateur (37°C, 5% CO_2 et 95% d'humidité).
A J_2, 20 µL d'eppi (point 0 de la gamme de concentration) ou 20 µL d'rHuEPO (concentrations variant de 0,1 à 400 UI/mL) sont ajoutés dans chaque puits (6 puits par concentration). Les plaques sont placées à l'incubateur.
Le test MTT est réalisé après 24 h (J_3), 72 h (J_5), ou 120 h (J_7) d'exposition à l'rHuEPO. Au moment de la réalisation du test, 50 µL d'une solution de MTT (2,5 mg/mL dans du PBS) est ajoutée dans chaque puits. Après 3 heures d'incubation à 37°C, nécessaires à la métabolisation du colorant, l'intégrité des membranes cellulaires est détruite par addition de 50 µL de SDS (dodécylsulfate de sodium) à 25% ($^m/_v$) (Sigma). Après homogénéisation du milieu dans chaque puits, l'absorbance à 540 nm est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaques Titertek Multiscan® MCC/340 (Labsystem, Cergy-Pontoise, France).
Le zéro de densité optique est déterminé à partir de puits contenant du milieu de culture sans cellule, d'eppi, de la solution de MTT et du SDS.

C- Influence de l'rHuEPO sur la sensibilité des cellules U87 aux radiations ionisantes (^{60}Co)

L'influence de l'rHuEPO sur la radiosensibilité des cellules U87 *in vitro* a été réalisée en appliquant la méthode de "clonage en dilution limite", préalablement publiée par Bernhard *et coll. (382)* et reprise par Delmas *et coll. (383)*. Cette méthode est principalement utilisée quand le clonage en double couche d'agar ou en fond de boîte est rendu difficile en raison d'une altération de l'adhésion des cellules.

A J_1, les cellules sont ensemencées dans des plaques 96 puits, à raison de 1, 2, 4, 6 ou 10 cellules par puits (4 plaques pour chaque concentration cellulaire), contenues dans 20 µL de milieu de culture. Les plaques sont placées dans l'incubateur.
A J_2, 5 µL d'eppi ou d'rHuEPO sont ajoutés dans les puits de toutes les plaques, de sorte que la concentration finale par puits soit égale à 0 UI/mL, 0,4 UI/mL, 4 UI/mL ou 40 UI/mL (12 puits par concentration). Les plaques sont replacées dans l'incubateur pendant 48 h.
A J_4, la moitié des plaques sont irradiées à la dose de 2 Gy par une unité Theratron 780c ^{60}Co (Theratronics, Ottawa, Canada). La seconde moitié des plaques subit les mêmes contraintes de transport. Après l'irradiation, 200 µL de milieu de culture sont ajoutés dans tous les puits. 25 µL d'eppi ou d'rHuEPO sont ajoutés dans les puits de sorte que la concentration finale par puits reste égale à 0 UI/mL, 0,4 UI/mL, 4 UI/mL ou 40 UI/mL. Les plaques sont mises à l'incubateur pendant 10 jours.
A J_{14}, après une étape de fixation à l'éthanol 96%, les colonies formées dans les différents puits sont colorées avec du crystal violet 10% ($^{m}/_{v}$) (Quélab Laboratories, Montréal, Québec).

Lors de l'observation macroscopique des plaques, les puits dans lesquels aucune colonie ne s'est formée sont comptés comme "puits négatifs". On calcule la "fraction de puits négatifs". Pour l'analyse, on représente pour les 8 groupes de traitement (rHuEPO 0 ; 0,4 ; 4 ; 40 UI/mL associé ou non à la RT 2 Gy) :

ln (fraction de puits négatifs) = f (nombre de cellules ensemencées par puits)

Pour chaque groupe de traitement, on obtient une droite de régression. La fraction survivante (SF) correspond au *ratio* entre la pente de droite du groupe traité (rHuEPO ± RT) et la pente de droite du groupe témoin (aucun traitement). La fraction survivante à 2 Gy (SF_2) est égale au *ratio* entre la pente de droite du groupe irradié (± rHuEPO) et la pente de droite du groupe non irradié correspondant (± rHuEPO).

III- ETUDES *IN VIVO*

A- Les traitements

1- Définition des bras thérapeutiques

Le jour de la greffe (J_G), les souris sont réparties de manière aléatoire en deux groupes:
- le groupe **Témoin** : les souris n'ont reçu aucun traitement ;
- le groupe **RHuEPO** : les souris ont reçu une injection quotidienne d'rHuEPO.

Pour les études impliquant des groupes de tumeurs irradiées, ces deux premiers groupes sont ensuite subdivisés pour former au total quatre groupes :
- le groupe **Témoin**
- le groupe **RHuEPO**
- le groupe **RT** : les souris ont été traitées par radiothérapie
-le groupe **RT + RHuEPO** : les souris ont été traitées par radiothérapie et par injections d'rHuEPO.

2- Définition des repères temporels

Pour la totalité des études *in vivo*, des points de repère dans le temps ont été définis et sont présentés sur la *figure 17* :

J_G : jour de la xénogreffe ;

J_{MT} : jour où une micro-tumeur d'environ 2 à 3 mm de diamètre est clairement identifiable ;

J_1 : jour où le volume tumoral atteint 250 ± 50 mm^3 ;

J_6 : 20 à 24 heures après la dernière fraction d'une série de 5 irradiations ;

J_{28} : fin du traitement par radiothérapie fractionnée.

Le volume tumoral est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse, selon deux axes correspondant respectivement au plus grand diamètre (D en mm) et au plus petit diamètre (d en mm) de la tumeur. Le volume tumoral (V) en mm^3 est calculé selon la formule suivante :

$$V = (D \times d^2) / 2$$

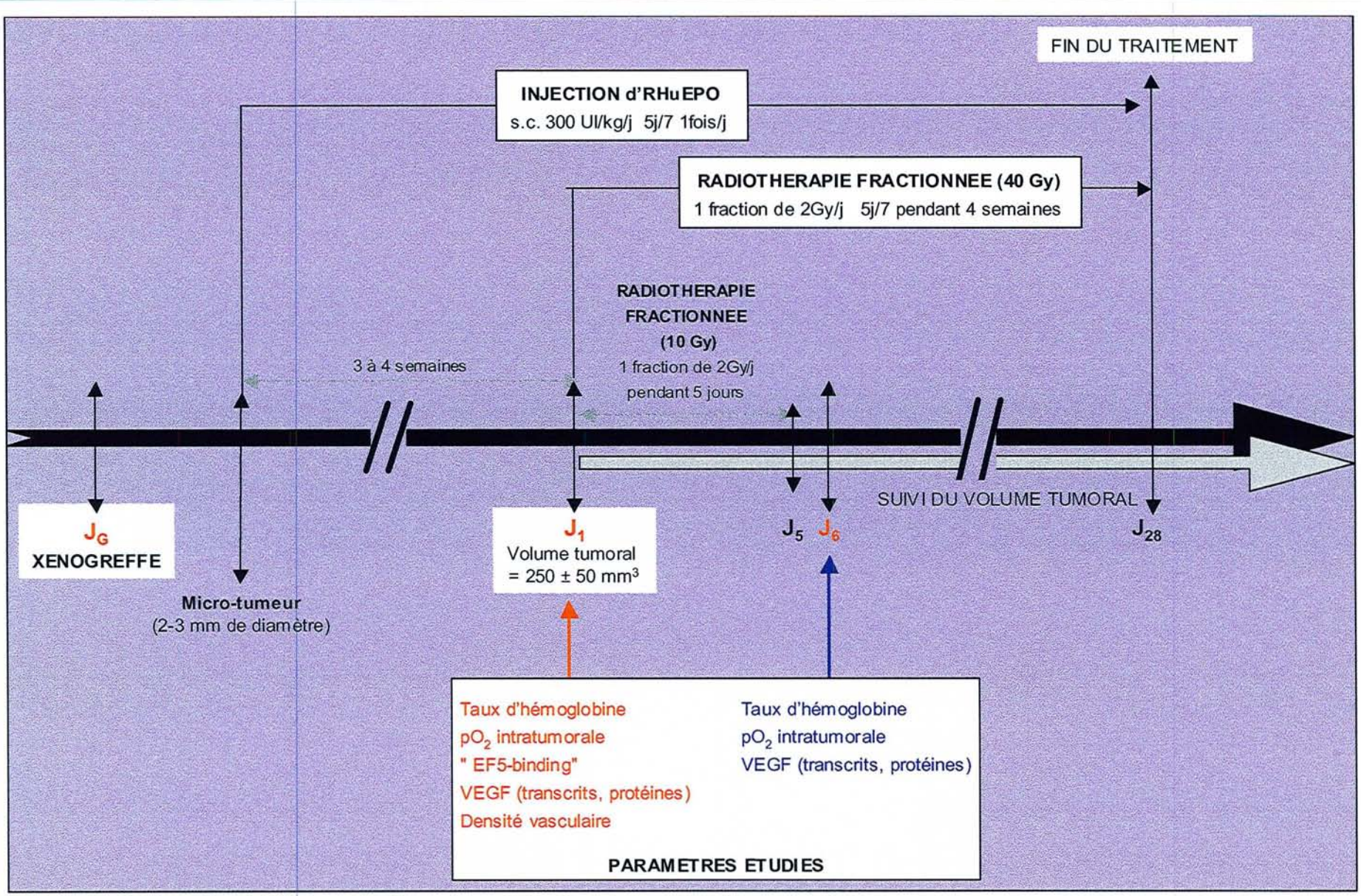


Figure 17 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental *in vivo* mis en œuvre dans notre étude.

3- Administration des traitements

3.1. L' érythropoïétine recombinante humaine

L'érythropoïétine recombinante humaine (Epoetin alpha, EPREX®) nous a été fournie par le laboratoire Ortho-Biotech (Issy-les-Moulineaux, France) sous forme de minidoses de 1 mL à une concentration de 40 000 UI/mL.
A partir de cette solution mère, une solution à 30 UI/mL est préparée par dilution avec de l'eau pour préparation injectable.

L'érythropoïétine recombinante humaine est administrée aux animaux des groupes RHuEPO et RT + RHuEPO à raison de 300 UI/kg/jour, 1 fois/j, 5 j/7. Les injections sont réalisées en sous-cutané sans anesthésie à l'aide d'une seringue à insuline de 1 mL, dès l'apparition de micro-tumeurs (J_{MT}) et sont poursuivies jusqu'au dernier jour de l'expérimentation.

3.2. La radiothérapie

La radiothérapie a été réalisée dans le Département de Radiothérapie du Centre Alexis Vautrin (Nancy, France), dirigé par le Dr C. Marchal, avec un appareil de radiothérapie de contact de type Muller RT 100®, délivrant des rayons X, équipé d'un collimateur de 1,5 cm de diamètre. Le débit de dose, en utilisant une énergie de 85 kV (sous 8 mA, 220V), est de 985 cGy/minute. La dose est calculée à la peau (100%). A 5 mm et à 10 mm de profondeur, la dose reçue est respectivement égale à 75% et 60%.

Après anesthésie et fixation de l'animal, le collimateur est placé au contact de la tumeur *(figure 18)*.

Deux protocoles d'irradiation ont été appliqués au cours de nos expérimentations.
Protocole 1 (analyse de la pO_2 intra-tumorale ou du VEGF) : les tumeurs irradiées reçoivent 10 Gy, à raison de 5 fractions de 2 Gy, de J_1 à J_5.
Protocole 2 (étude d'efficacité des traitements) : les tumeurs irradiées reçoivent 40 Gy, à raison de 20 fractions de 2 Gy, 1 fraction/j, 5j/7 pendant 4 semaines (J_1 à J_{28}).

Dans tous les cas, les irradiations n'ont pas été réalisées le week-end, de façon comparable à l'irradiation chez l'homme.

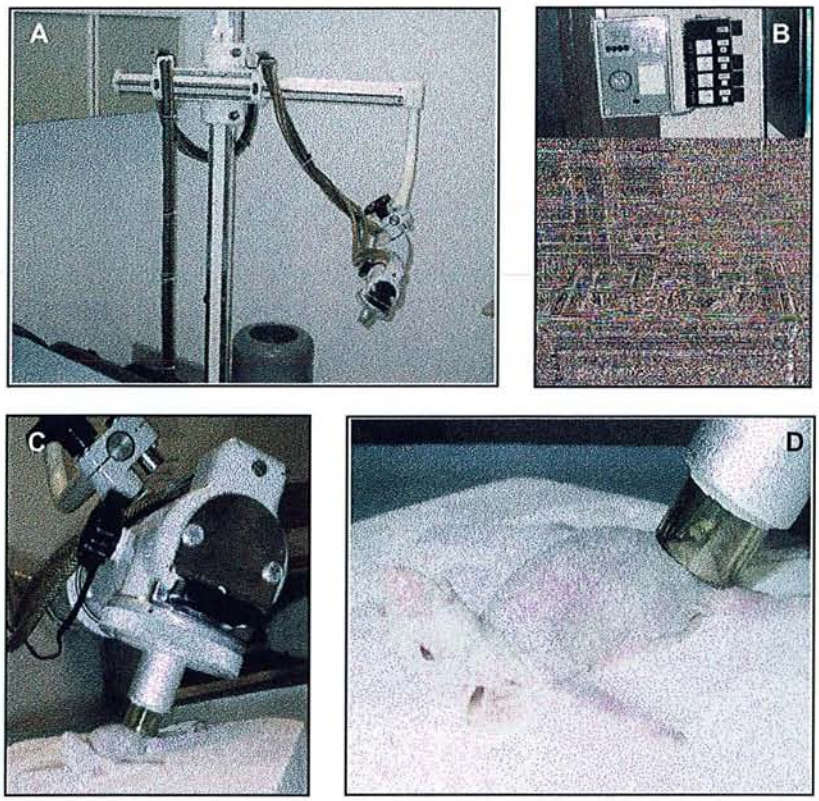


Figure 18 : Appareil de radiothérapie de type Muller RT 100® utilisé pour l'irradiation des souris *nude*. **A)** Bras articulé portant la tête d'irradiation à son extrémité. **B)** Console de pilotage de l'appareil. **C)** Tête d'irradiation positionnée sur la tumeur développée par une souris *nude*. **D)** Collimateur permettant de cibler le faisceau de photons X sur la tumeur.

4- Evaluation de l'effet des traitements

4.1. Activité pharmacologique de l'rHuEPO

Pour vérifier l'activité pharmacologique de l'rHuEPO, nous avons mesuré la concentration sanguine en hémoglobine des souris *nude*, porteuses de xénogreffes.

Pour ce faire, l'extrémité distale de la queue de l'animal est coupée à l'aide de ciseaux. Un échantillon de sang (environ 80 µL) est recueilli à l'aide un tube capillaire (Clinitube™, Radiometer, Neuilly Plaisance, France). Le contenu du tube est ensuite versé dans un tube Eppendorf de 0,2 mL (Dutcher, Brumath, France), préalablement hépariné (5 UI) (Héparine Choay, Sanofi-Synthelabo France, Paris, France).

La concentration sanguine en hémoglobine est déterminée par la méthode de Drabkin (kit Sigma Diagnostics® total hemoglobin, Sigma, St Quentin-Fallavier, France), qui est une méthode spectrophotométrique, non automatisée. Le sang est mis en contact avec du réactif de Drabkin, composé de ferricyanure de potassium, de cyanure de potassium et de bicarbonate de

sodium durant environ 5 à 10 minutes. Lors de la réaction biochimique, l'hémoglobine est tout d'abord transformée en methémoglobine sous l'action du ferricyanure, puis en cyanmethémoglobine par réaction avec le cyanure. L'absorbance de la cyanmethémoglobine est alors déterminée à 540 nm par un spectrophotomètre de type UV-Visible Lambda-Bio (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

A partir d'une solution mère de cyanmethémoglobine fournie avec le kit, une gamme d'étalonnage est préparée. Le tracé de la droite de calibration, mesurant l'absorbance en fonction de la concentration en hémoglobine, nous permet d'obtenir une droite de régression (R^2 compris entre 0,998 et 1,00), à partir de laquelle la concentration en hémoglobine des échantillons dosés est déterminée.

4.2. Activité anti-tumorale de la radiothérapie seule ou associée à l'rHuEPO

Pour comparer l'efficacité des traitements, nous avons utilisé l'analyse des courbes de survie de Kaplan-Meier, en utilisant le "temps de triplement" des tumeurs comme paramètre de fin d'étude. Pour cela, nous avons suivi la croissance tumorale, en mesurant le volume des tumeurs trois fois par semaine. Pour chaque tumeur, nous avons alors déterminé le "temps de triplement", c'est-à-dire le délai nécessaire pour que le volume tumoral soit égal à trois fois le volume initial.

B- Analyse de l'hypoxie tumorale

1- Mesure de la pression partielle en oxygène intratumorale

La mesure de la pression partielle en oxygène dans les tumeurs a été réalisée au moyen du *pO_2-Histograph* (Eppendorf™, Hambourg, Allemagne). Il combine une électrode polarographique sensible à l'oxygène, couplée à un système de traitement informatique. Les mesures sont réalisées sur les deux lignées de gliomes xénogreffées, à J_1 (volume tumoral compris entre 200 et 300 mm^3) et à J_6 *(figure 19)*. Les animaux servant pour l'étude à J_6 ne sont pas les mêmes que ceux ayant servi pour l'étude à J_1.

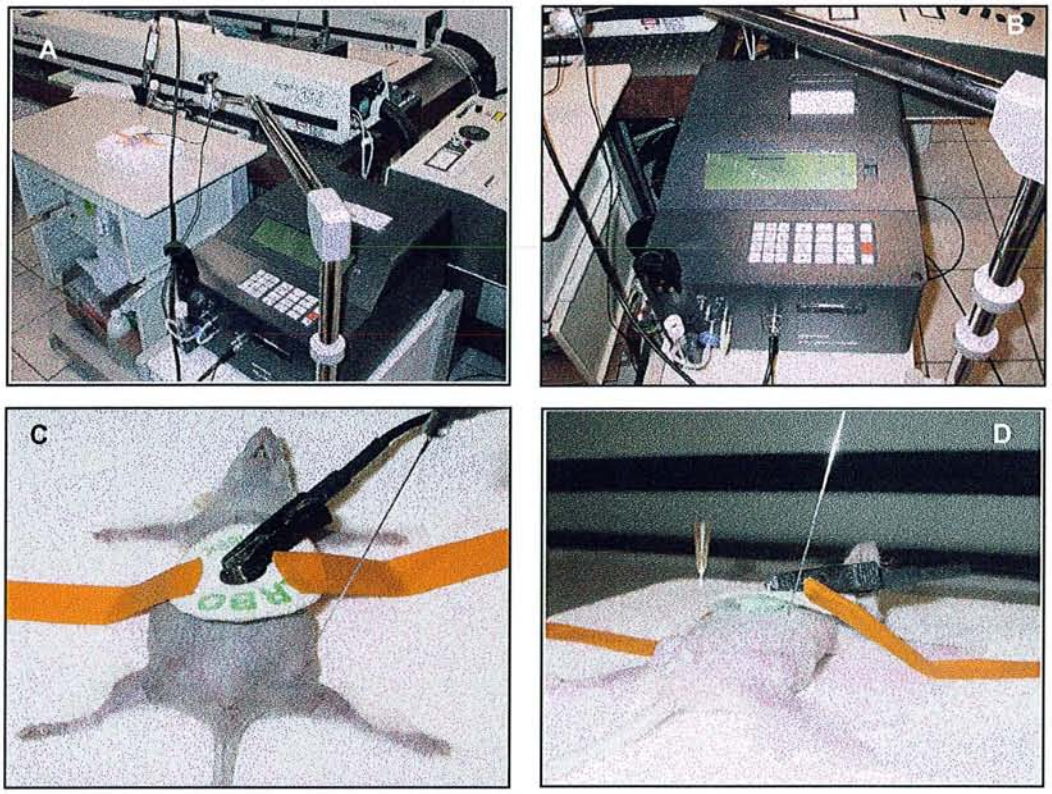


Figure 19 : *pO_2-Histograph, Eppendorf™* utilisé pour mesurer la pression partielle en oxygène intratumorale. **A)** Vue d'ensemble de l'appareil. **B)** Système informatique de pilotage et d'enregistrement des données. **C)** Electrode de référence placée sur le thorax de la souris nude. **D)** Electrode de mesure pénétrant dans la tumeur.

A chaque nouvelle utilisation, la pression atmosphérique du jour (donnée par Météo France) est programmée dans l'appareil, et une calibration initiale de l'électrode est effectuée. La calibration s'effectue dans une chambre de calibration, contenant 5 mL de NaCl 0,9%, dans lequel baigne l'électrode. Elle débute par un bullage d'oxygène, permettant de définir le 100% d'O_2 (durée : 2 minutes) et se poursuit par un bullage d'azote qui permet de définir le 0% d'O_2 (durée : 3 minutes). Trois cycles successifs "oxygène + azote" sont effectués pour la calibration initiale de l'appareil.

Pour la mesure de la pO_2 intratumorale, la souris est anesthésiée et fixée sur une plaque de polystyrène, en décubitus dorsal pour les animaux porteurs de xénogreffes GBM Nan1 ou en procubitus pour les animaux porteurs de xénogreffes U87. Une électrode de référence est placée sur le thorax ou le dos de la souris. Des précautions particulières sont prises pour que, malgré la fixation, aucune compression tissulaire ne soit provoquée.

Pour faciliter la pénétration de l'électrode dans la tumeur, la peau ainsi que la surface de la tumeur sont préalablement perforées à l'aide d'une aiguille 25 G (Neolus 25G, Terumo Europe, Louvain, Belgique). La progression de l'électrode dans la tumeur est programmée de

sorte que l'électrode avance de 0,4 mm et se rétracte de 0,2 mm (la rétraction permet la décompression des tissus). La mesure est réalisée à la fin du mouvement de rétraction.
Le nombre d'axes de mesure par tumeur, et le nombre de mesure par axe, varient en fonction du volume tumoral. Pour chaque tumeur, au minimum 4 séries de mesures sont réalisées selon 4 axes différents, choisis de façon à obtenir des valeurs de pO_2 les plus représentatives de l'ensemble de la tumeur. Au minimum 12 mesures par axe sont enregistrées.
Après chaque tumeur, un cycle de calibration "oxygène + azote" est réalisé.

L'analyse des données était ensuite effectuée à l'aide du logiciel *pO_2-Pool* (version 1.2) fourni par Eppendorf™, fonctionnant sous Windows 3.11. Toutes les mesures de pO_2 obtenues pour chaque tumeur sont compilées. Les valeurs de pO_2 négatives sont systématiquement éliminées. Le logiciel *pO_2-Pool* permet de déduire la pO_2 moyenne, la pO_2 médiane, le pourcentage de valeurs de pO_2 inférieures à 2,5 mmHg (définissant la fraction hypoxique < 2,5 mmHg) et le pourcentage de valeurs de pO_2 inférieures à 5 mmHg (définissant la fraction hypoxique < 5 mmHg) pour chaque tumeur.

2- Analyse des cellules tumorales hypoxiques viables : technique de l'"EF5-binding"

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec l'équipe des Docteurs E. Moyal et C. Toulas, (Unité INSERM U563, Institut Claudius Régaud, Toulouse). L'EF5 et l'anticorps ELK3.51 conjugué au Cy3 nous ont été gracieusement fournis par le Dr C. Koch (*Department of Radiation Oncology, University of Pennsylvania, Philadelphie, PA 19104, USA*).

2.1. Principe de la méthode

L'EF5 (*2-(2-nitro-1-H-imidazol-1-yl)-N-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)acétamide*) est un dérivé pentafluoré de l'étanidazole qui est métabolisé de façon sélective dans les cellules hypoxiques viables, et ses métabolites forment des adduits avec les macromolécules intracellulaires.
La détection immunohistochimique des sites de métabolisation de l'EF5 à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique (ELK3.51) couplé à un fluorochrome (*Cyanine dye 3* ou *Cy3*) a permis l'analyse des régions tumorales hypoxiques sur des coupes histologiques de tissu tumoral congelé.

L'évaluation de l'hypoxie tumorale par cette méthode a été réalisée pour les tumeurs GBM Nan1 et pour les tumeurs U87 à J_1 en appliquant le protocole décrit par Cohen-Jonathan Moyal *et coll. (384)*.

2.2. Métabolisation de l'EF5 par les cellules hypoxiques

Une solution d'EF5 à 10 mM est obtenue par dissolution de 10 mg de poudre dans 3,3 mL de NaCl 0,9%.

La souris vivante et non anesthésiée est maintenue immobile à l'aide d'un système de contention artisanal, qui permet de dégager la queue de l'animal.
L'EF5 est injecté à raison de 10 µL/g de poids, dans la veine caudale, après dilatation de celle-ci par chauffage. L'injection intraveineuse est suivie 30 minutes plus tard, d'une injection intrapéritonéale d'un volume équivalent.

Trois heures après la première injection d'EF5, la souris est sacrifiée par dislocation cervicale. La tumeur est immédiatement excisée et congelée.

2.3. Détection immunohistochimique des adduits d'EF5

A partir de chaque tumeur congelée, des "cryo-coupes" de 5 µm d'épaisseur sont effectuées à l'aide d'un cryotome de type Leica CM 3050S (Leica Microsystèmes SAS, Rueil-Malmaison, France) et déposées sur des lames "Superfrost" (CML France, Nemours, France). Les coupes histologiques sont fixées pendant 1 heure à 4°C dans une solution de formaldéhyde 3,7% ($^{m}/_{v}$) pH 7,4 (paraformaldéhyde dilué dans du PBS stérile) puis les lames sont rincées 2 fois pendant 10 minutes dans du PBS à température ambiante.

Après séchage, les coupes sont encerclées à l'aide d'un stylo Dako Pen (DakoCytomation, Trappes, France). Le cercle, tracé en relief, délimite la zone dans laquelle sont réalisées les réactions ultérieures.

Dans le but de saturer les sites antigéniques aspécifiques, 150 µL d'une solution de blocage *(tableau 5)* sont déposées sur les coupes histologiques placées à plat dans une chambre humide et noire, puis les lames sont mises à incuber pendant 1h30 à température ambiante.

Tableau 5 : Solution de blocage des sites antigéniques aspécifiques

Composants	Volumes (mL)	Fournisseurs
Solution diluante de l'anticorps	*3,0*	*Voir tableau 6*
Lait en poudre	*0,8*	Régilait®
Sérum normal de souris	*0,2*	Sigma

Tableau 6 : Solution diluante de l'anticorps

Composants	Quantités	Fournisseurs
Albumine murine sans acides gras	1,5 g	Sigma
Tween 20	0,3 mL	Prolabo
PBS	100 mL	Invitrogen

Les lames sont rincées 3 fois 1 minute dans du PBS à température ambiante, puis séchées délicatement.

Les coupes sont ensuite mises en contact avec 75 µL de solution de marquage, composée de la solution diluante *(tableau 6)* contenant l'anticorps primaire ELK3-51 couplé au Cy3 à la concentration de 75 µg/mL. Le contact avec l'anticorps primaire, à l'abri de la lumière et à température ambiante dure 1h30.

Les lames subissent à l'abri de la lumière, à température ambiante et sous agitation, 2 lavages de 40 minutes dans du PBS-Tween (Tween 20 0,3% $^{v}/_{v}$ dans du PBS), suivi d'un lavage de 40 minutes au PBS.

Les lames sont ensuite séchées délicatement et montées. Avant de poser la lamelle (CML France, Nemours, France) sur la coupe, on dépose sur la coupe une goutte de liquide de montage Vectashield® (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) contenant un stabilisateur de fluorescence et du DAPI (*4'6-diamidino-2-phenylindole*), utilisé pour marquer l'ADN et localiser le noyau des cellules.

2.4. L'analyse microscopique

2.4.1. Caractéristiques du matériel de microscopie

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un microscope droit de type Provis AX70 (Olympus, Rungis, France) équipé pour l'observation en lumière blanche et en épifluorescence. Les caractéristiques du microscope ont été précédemment décrites dans la thèse de Doctorat de C. Dill-Bour *(385)*. Nous ne ferons qu'une description succincte du poste de microscopie.

Les sources lumineuses sont une lampe à xénon permettant les observations en lumière blanche, et une lampe à vapeur de mercure HBO 100 W (Osram, Eurosep, Molsheim, France) permettant l'excitation des échantillons pour les observations d'image en fluorescence.

Trois objectifs plans et apochromatiques sont disponibles : 10 X, 40 X et 100 X, les deux derniers étant à immersion à huile.

Pour étudier un maximum de fluorochromes, nous disposons des filtres (Olympus, Rungis, France) suivants :

- passe-bande : 380-385 nm, 400-440 nm, 420-460 nm, 460-490 nm, et 510-550 nm
- passe-haut : 590 nm
- miroir dichroïque : 400 nm, 505 nm, 570 nm.

Les filtres sont combinés pour former des blocs filtres adaptés, composés d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque, et d'un filtre d'émission.

L'acquisition des images est réalisée avec une caméra CCD (*charged coupled device*) de type DP-50 (Olympus, Rungis, France) refroidie par un module Peltier. La résolution du capteur est réglée à 1392 x 1040. L'acquisition des images est effectuée à l'aide du logiciel *Viewfinder Lite* (Olympus) permettant le réglage de tous les paramètres d'acquisition. Une fois acquises, les images sont transférées automatiquement sur le logiciel *Studio Lite* (Olympus) servant à la sauvegarde des images.

2.4.2. Caractéristiques des fluorochromes étudiés

Les caractéristiques spectrales du Cy3 et du DAPI sont résumées dans le *tableau 7*.

Tableau 7 : Caractéristiques des fluorochromes étudiés

Caractéristiques	Cy3	DAPI
Couleur de fluorescence	Orange	Bleu
Longueur d'onde d'absorption maximale	550 nm (510 - 560 nm)	370 nm (330 - 390 nm)
Longueur d'onde d'émission maximale	570 nm (570 - 610 nm)	450 nm (410 - 550 nm)
Coefficient d'extinction molaire (x 10^3)	150 M^{-1} cm^{-1}	27 M^{-1} cm^{-1}

Nous utilisons deux blocs filtres adaptés à l'observation de ces deux fluorochromes *(tableau 8)* :

Tableau 8 : Composition des blocs filtres utilisés

	Cy3	DAPI
Filtre d'excitation	510-550 nm	330-385 nm
Miroir dichroïque	570 nm	400 nm
Filtre d'émission	590 nm	420-460 nm

2.4.3. Analyse semi-quantitative

Les observations sont effectuées à l'aide de l'objectif 10X et les conditions d'acquisition sont adaptées pour chaque lignée. Toutes les tumeurs d'une même lignée sont analysées dans des conditions (séquence d'observation, puissance de la lumière d'excitation, temps d'acquisition des images) strictement identiques.

Les images sont analysées à l'aide du logiciel *AnalySIS 3.1* (Soft Imaging System, Münster, Allemagne). Pour cela, nous avons préalablement établi une routine d'analyse incluant les étapes suivantes :

1- Division de l'image acquise en 1392 x 1040 pixels

2- Transformation des images en 256 niveaux de gris (niveaux 0 à 255).

3- Quantification du nombre de pixels pour chaque niveau de gris

4- Affichage de l'histogramme de distribution, représentant le nombre de pixels en fonction des niveaux de gris, et de l'intensité de fluorescence moyenne de l'image.

Pour chaque tumeur, l'analyse d'une coupe histologique prise au hasard est effectuée. Pour chaque coupe histologique, l'analyse est réalisée sur 10 champs (0,65 mm X 0,48 mm), donnant 10 histogrammes. Un histogramme global correspondant à la somme des 10 histogrammes initialement obtenus, est tracé pour chaque tumeur. De même, l'intensité de fluorescence moyenne est calculée pour chaque tumeur.
L'histogramme moyen de chaque groupe thérapeutique étudié est ensuite tracé.

C- Etude de la densité vasculaire par immunohistochimie

Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr. F. Plénat (Laboratoire d'Anatomie et de Cytotologie Pathologiques, CHU Brabois, Nancy).

La densité vasculaire est étudiée par marquage immunohistochimique des vaisseaux à l'aide d'un anticorps spécifiquement dirigé contre le collagène IV murin, élément constitutif de la membrane basale des vaisseaux. L'étude est réalisée sur des tumeurs GBM Nan1 et U87,

prélevées à J_1 ou à J_6. Pour chaque tumeur, une coupe histologique prise au hasard sert à la détermination de la densité vasculaire.

1- Préparation des échantillons

Après sacrifice de l'animal, la tumeur est excisée, coupée en fragments de 2 à 4 mm d'épaisseur, et immédiatement fixée dans du formaldéhyde 3,7% ($^{m}/_{v}$) pH 7,4 (paraformaldéhyde dilué dans du PBS stérile) (Carlo Erba, Val de Reuil, France) pendant environ 16 à 20 heures.

Les fragments tumoraux fixés sont déshydratés dans un automate de type Tissue Tek® VIP (Bayer Diagnostics, Puteaux, France) par passage dans différents bains *(tableau 9)*, puis inclus dans de la paraffine (paraffine tissue TEK).

A l'aide d'un microtome de type Leica RM 2135 (Leica Microsystèmes SAS, Rueil-Malmaison, France), des coupes tissulaires d'une épaisseur de 5 µm sont obtenues et étalées dans une goutte d'eau distillée sur des lames adhésives X-tra (Surgipath, Courtaboeuf, France). Après séchage sur une platine chauffante à 50°C, des lames sont conservées à l'abri de la chaleur et de la poussière jusqu'à utilisation.

Tableau 9 : Etapes de déshydratation et d'imprégnation des fragments tumoraux

Phases	Bacs	Bains	Durée	Température	Fournisseurs
Déshydratation	1	Formol 10%	1 h	TA*	Carlo Erba
	2	Alcool 95 °	30 min	TA	Elvetec Services, Genas, France
	3	Alcool 95 °	30 min	TA	
	4	Alcool 95 °	1 h	TA	
	5	Alcool 100 °	30 min	TA	Elvetec Services,
	6	Alcool 100 °	1 h	TA	
	7	Alcool 100 °	1 h	TA	
	8	Toluène	30 min	TA	Carlo Erba
	9	Toluène	30 min	TA	
	10	Toluène	1 h	TA	
Imprégnation	11	Paraffine	30 min	58°C	"Paraffine tissue TEK" Bayer Puteaux, France
	12	Paraffine	30 min	58°C	
	13	Paraffine	1 h	58°C	
	14	Paraffine	2 h	58°C	

* TA : Température ambiante

2- Technique immunohistochimique

Les lames sont déparaffinées par immersion dans des bains successifs décrits dans le *tableau 10*.

Tableau 10 : Etapes de déparaffinage des lames

Bacs	Bains	Durée	Température
1	Toluène	10 min	TA*
2	Alcool 100°	10 min	
3	Alcool 95°	10 min	
4	PBS-Tween*	10 min	

* PBS-Tween : Tween 20 à 0,1% ($^{v}/_{v}$) dans du PBS. TA : Température ambiante

Le démasquage des sites antigéniques nécessite une hydrolyse catalysée par la chaleur des liaisons établies entre le formaldéhyde et les macromolécules tissulaires, puis une étape de digestion enzymatique par la trypsine. La première étape est réalisée à l'aide d'une cocotte minute (Clipso®, Seb, Selongey, France) et consiste à immerger les lames dans du tampon citrate 10 mM à ébullition, et laisser agir la vapeur sous pression pendant 5 minutes. Au bout des 5 minutes, les lames sont immédiatement ramenées à température ambiante par immersion dans de l'eau distillée. Puis, les lames sont plongées dans une solution de $CaCl_2$ (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) à 0,4% ($^{m}/_{v}$ d'eau distillée) préchauffée à 37° dans laquelle sont ajoutés 0,1% ($^{m}/_{v}$) de trypsine (Merck-Eurolab, VWR, Fontenay sous Bois, France). Les lames sont incubées à 37°C pendant 10 minutes.

Après un lavage à l'eau distillée et un séchage, les coupes histologiques délimitées par un cercle au Dako Pen (DakoCytomation) sont mises en contact avec l'anticorps primaire dans une chambre humide. Nous avons utilisé un anticorps polyclonal de lapin anti-collagène IV de souris (Novotec, Saint Martin la Garenne, France), dilué au 1/4000 ^{e} dans une solution diluante adaptée *(tableau 11)*. L'incubation des coupes avec l'anticorps primaire dure une nuit à 4°C.

Tableau 11 : Composition de la solution diluante

Réactifs	Concentrations	Fournisseurs
Azide de sodium	0,1% ($^{m}/_{v}$)	Sigma
N-éthyl-maléimide	0,06% ($^{m}/_{v}$)	Sigma
Albumine sérique bovine (BSA)	1% ($^{m}/_{v}$)	Sigma
Glycérol	30% ($^{v}/_{v}$)	Sigma
PBS		

Après trois rinçages des lames au PBS-Tween, les coupes sont mises en contact avec l'anticorps secondaire pendant 1h à température ambiante. Nous avons utilisé un anticorps secondaire de chèvre biotinylé dirigé contre les IgG de lapin (DakoCytomation, Trappes, France), dilué au 1/200^{e} dans du PBS-Tween.

Après deux rinçages au PBS-Tween, l'addition pendant 30 minutes, de peroxyde d'hydrogène à 6% (H_2O_2 30%, Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) permet de d'inhiber l'activité des peroxydases endogènes, susceptibles d'interférer lors des étapes ultérieures de révélation.

Pour révéler la réaction, la biotine fixée sur l'anticorps secondaire est mise en présence de streptavidine, elle-même couplée à une peroxydase. Après deux rinçages au PBS-Tween, la solution de streptavidine-peroxydase (DakoCytomation, Trappes, France), diluée au 1/200^{e} (PBS-Tween), est déposée sur chaque coupe. Le contact dure 1h à l'obscurité, à température ambiante, puis les lames sont lavées deux fois au PBS-Tween.

L'activité enzymatique de la peroxydase est mise en évidence à l'aide du kit VECTOR *NovaRED*™ (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA), utilisé selon les recommandations du fournisseur. La solution de révélation est déposée pendant 5 minutes sur les coupes.

Afin de faire apparaître les noyaux des cellules dans le tissu, une contre-coloration à l'hématoxyline (SPECI, Bayer) est effectuée, suivi d'une déshydratation. Pour cela, les lames sont immergées dans une successions de bains *(tableau 12)*, avant d'être montées avec du liquide de montage Eukitt (Euromedex, France).

Tableau 12 : Bains de contre coloration et de déshydratation.

Etapes	Bacs	Bains	Durée
Contre-coloration des noyaux	1	Hématoxyline	45 sec.
	2	Eau distillée	passage
	3	Eau ammoniaquée	passage
	4	Eau distillée	passage
Déshydratation	5	Alcool 100°	passage
	6	Alcool 100°	passage
	7	Toluène	infini

3- Détermination de la densité vasculaire

A l'aide du même équipement que celui décrit précédemment (microscope Provis AX70 + caméra DP-50), les coupes histologiques sont observées en lumière blanche par transmission avec l'objectif 10X.

Pour chaque coupe, 6 images (soit 6 champs de 0,65 mm X 0,48 mm) sont acquises dans des zones représentatives de la vascularisation tumorale. De façon aléatoire, trois images sont sélectionnées pour le comptage des vaisseaux immunomarqués. Les résultats de densité vasculaire pour chaque tumeur correspondent à la somme de vaisseaux dénombrés dans les trois champs.

D- Analyse de l'expression des transcrits du VEGF

L'expression des transcrits du VEGF est étudiée par RT-PCR (*reverse transcription and polymerase chain reaction*), sur les deux lignées de gliomes malins à partir de tumeurs prélevées à J_1 et à J_6.

Après sacrifice de l'animal, la tumeur est excisée, coupée en petits fragments, qui sont immédiatement congelés dans de l'azote liquide. Environ 25 mg de tissu tumoral congelé sont nécessaires pour réaliser cette analyse.

1- Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits selon la méthode de Chomczynski *et coll. (386)*, à l'aide du réactif TRIzol® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) qui est une solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine. Le TRIzol® maintient l'intégrité des ARN lors de la dissociation des différents composants cellulaires.

Dans un microtube (microtube *RNase free*, Dutcher), un fragment tumoral congelé est mis en contact avec 1 mL de réactif TRIzol® et écrasé à l'aide d'un mini-pilon en plastique, en maintenant constamment le tube à 4°C. L'action du TRIzol® est encore poursuivie pendant 15 minutes à température ambiante.

Une centrifugation à 12000 g, pendant 10 minutes à 4°C (Centrifugeuse Jouan MR18-22, Saint-Herbelin, France) permet de séparer les débris cellulaires du surnageant dans lequel sont dissous les protéines, les ADN et les ARN.

Après récupération et transfert du surnageant dans un tube Eppendorf 1,8 mL (Dutcher), 0,2 mL de chloroforme (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés. Le mélange surnageant/chloroforme est agité vigoureusement (environ 15 sec.), puis centrifugé (12000 g pendant 15 minutes à 4°C). Deux phases, une aqueuse et une organique, se séparent: les ARN extraits se retrouvent exclusivement dans la phase aqueuse.

La phase aqueuse obtenue est transférée dans un tube Eppendorf 1,8 mL. 0,5 mL d'isopropanol (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés, afin de précipiter les ARN.

Les tubes sont laissés 10 minutes à température ambiante, puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les ARN totaux précipités forment un culot.

Le culot est lavé par addition de 1 mL d'éthanol à 75% (Prolabo), puis centrifugé à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C. L'éthanol est ensuite éliminé par aspiration puis par évaporation en plaçant les tubes ouverts à 37°C quelques minutes (bain sec, Fisher Bioblock Scientific, Illkiich, France). Le culot est ensuite resuspendu dans 50 µL d'eppi.

Pour chaque échantillon, un aliquot dilué au 1/200ème (eppi) est préparé et placé dans une cuve en quartz (Merck-Eurolab, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) pour réaliser la mesure de l'absorbance à 260 nm, permettant de déterminer la concentration en ARN totaux. Cette même dilution permet d'évaluer la qualité de la préparation d'ARN par la mesure de la densité optique (DO) à 280 nm (absorbance des protéines) et le calcul du rapport R= DO_{260nm}/DO_{280nm}. La préparation est considérée de bonne qualité si R > 1,8.

2- Transcription inverse (RT)

La réaction de transcription inverse (RT) permet de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARNm.

Un volume contenant 1 µg d'ARN totaux est déposé dans un tube à PCR à paroi fine (650 µL, Sorenson, BioSciences Inc., Dutcher, Brumath), et complété avec de l'eppi jusqu'à un volume final de 11 µL. Un microlitre d'amorces aléatoires (100 ng/µL, Random Primers, Invitrogen) est ajouté à cette solution. Une incubation de 10 minutes à 70°C dans le thermocycleur (Matercycler® gradient, Eppendorf, Polylabo, Strasbourg, France) permet d'abolir les structures secondaires ou tertiaires des ARN. Les tubes sont transférés ensuite sur un lit de glace pendant quelques minutes pour favoriser l'appariement des amorces aléatoires.

Le mélange réactionnel *(tableau 13)* nécessaire à la transcription inverse, est alors ajouté dans chaque tube.

Tableau 13 : Composition du mélange pour la réaction de transcription inverse

Composés	**Volume** (µL)	Fournisseurs
Tampon de synthèse 5X	4	Invitrogen
Désoxynucléotides triphosphates 10 mM	1	Invitrogen
Dithiotréitol 0,1 M	2	Invitrogen
Transcriptase inverse Superscript II (200 U/µL)	1	Invitrogen

Après 10 minutes à température ambiante, les tubes sont incubés 50 minutes à 42°C dans le thermocycleur, correspondant à la phase de synthèse des ADNc, puis 15 minutes à 70°C, correspondant à la phase de dénaturation de l'enzyme Superscript II. Afin d'éliminer les ARN restants, 1 µL de RNase H (2,5 U/µL) (Invitrogen) est ajouté à chaque échantillon, puis les tubes sont incubés durant 20 minutes à 37°C. Les ADNc sont conservés à –20°C jusqu'à utilisation.

3- Amplification en chaîne de l'ADN (PCR)

A partir des ADNc totaux, la PCR permet d'amplifier sélectivement des gènes cibles, grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques de ces gènes d'intérêt *(tableau 14)*.

L'expression de chaque gène d'intérêt est évaluée de manière semi-quantitative par rapport à l'expression d'un gène de référence.

Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène codant pour le VEGF et nous avons utilisé le gène codant pour la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) comme gène de référence, comme précédemment décrit dans la littérature *(387-389)*.

Tableau 14 : Description des amorces spécifiques utilisées pour la PCR

Gènes cibles		Amorces (5' – 3')	Réf.	Fournisseurs
VEGF	*sens*	AGC TAC TGC CAT CCA ATC GC	*(390)*	Invitrogen
	antisens	GGG CGA ATC CAA TTC CAA GAG		
GAPDH	*sens*	TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA		
	antisens	GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA		

La PCR est effectuée dans des tubes à PCR à paroi fine. Pour chaque tube, l'ensemble des réactifs nécessaires à l'amplification du gène codant pour le VEGF figure dans le *tableau 15*.

Tableau 15 : Composition du mélange pour l'amplification du gène codant pour le VEGF.

Réactifs de PCR	Volume (µL)	Fournisseurs
ADNc	1	
Tampon de PCR 10X	2	
$MgCl_2$ 50 mM	0,8	
dNTP 2,5 mM	1,6	
Amorce VEGF sens 5 µM	2	Invitrogen
Amorce VEGF antisens 5 µM	2	
Amorce GAPDH sens 5 µM	2	
Amorce GAPDH antisens 5 µM	2	
Taq DNA polymerase (5U/µL)	0,4	
H_2O (eppi)	qsp 20	

Après avoir été vortexés et centrifugés, les tubes sont placés dans le thermocycleur permettant d'alterner les phases de dénaturation, d'appariement et de synthèse *(tableau 16)*.

Tableau 16 : Cycles d'amplification du gène codant pour le VEGF

Etapes		Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale		94°C	3 min	1
Amplification	Dénaturation	94°C	1 min	33
	Appariement	57°C	1 min	
	Synthèse	72°C	1 min	
Dégradation de la Taq polymerase		72°C	10 min	1
Terminaison		4°C	infini	

4- Analyse des produits d'amplification

Les échantillons après PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose.

Un gel d'agarose à 1% ($^m/_v$) est préparé par dissolution d'agarose (Invitrogen) dans du tampon Tris-Borate-EDTA 0,5 X (TBE, Invitrogen), contenant du bromure d'éthidium (BET) (Sigma) à la concentration de 10 µg/mL. Le gel est mis à polymériser dans un support adapté, d'abord à température ambiante (15 minutes), puis à 4°C.

Deux microlitres de solution BlueJuice™ (Invitrogen) sont ajoutés aux produits de PCR, puis 10 µL sont déposés dans les puits.

La migration électrophorétique des produits de PCR se fait dans un tampon TBE 0,5X, sous 100V pendant 2h30.

Après migration, les bandes d'ADN sont visualisées par transillumination UV grâce à la fluorescence du BET intercalé dans l'ADN. Le système d'analyse d'image utilisé est de type Gel Doc 1000 (logiciel Molecular Analyst® version 1.2, BioRad, Ivry-sur-Seine, France). Pour chaque échantillon, le *ratio* d'expression relative (RER) est calculé. Il représente l'intensité de fluorescence de la bande du gène cible sur l'intensité de fluorescence de la bande du gène de référence, en l'occurrence la GAPDH.

Pour chaque tumeur étudiée, un fragment tissulaire a été choisi au hasard à partir duquel une solution d'ADNc a été préparée. A partir de chaque solution d'ADNc, trois réactions de PCR indépendantes ont été réalisées nous permettant de déterminer un RER moyen pour chaque tumeur.

E- Analyse de l'expression du VEGF par Western-Blot

L'expression de la protéine VEGF a été étudiée dans les xénogreffes GBM Nan1 en utilisant la technique de *Western-Blot*.

1- Extraction des protéines totales

1.1. Extraction des protéines totales

Pour éviter la dégradation des protéines par les protéases, les tubes sont maintenus continuellement dans un bac de glace à 4°C.

Dans un tube en polypropylène, les fragments de tumeurs congelés (environ 40 mg) sont immergés dans 1 mL de tampon de lyse dont la composition est décrite dans le *tableau 17 (391)*.

Tableau 17 : Composition du tampon de lyse de type RIPA

Réactifs	Concentrations	Fournisseurs
Déoxycholate de sodium	0,5% (m / v)	Sigma
SDS *	0,2% (m / v)	Sigma
Triton 100X	1% (v / v)	Sigma
Noninet P-40	1% (v / v)	Sigma
EDTA *	5 mM	Sigma
PMSF *	100 µg/mL	Sigma
Leupeptine	2 µg/mL	Sigma
Pepstatine	1 µg/mL	Sigma
PBS	qsp	Invitrogen

* Voir liste des abréviations

Une étape de broyage (3 fois 5 secondes) à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax (Imlab, Lille, France), puis une étape de sonication (10 secondes à 25 kHz) à l'aide d'un sonicateur (Soniceprep 150 MSE, Londres) permettent de broyer et de lyser les fragments tumoraux. Les lysats obtenus sont ensuite soumis à l'action du tampon de lyse pendant 1 heure à 4°C, tout en étant vortexés périodiquement.

A la fin de l'incubation, les échantillons lysés sont centrifugés (12000g, 15 minutes, 4°C) afin d'éliminer les débris et d'obtenir un homogénat protéique.

1.2. Dosage des protéines totales

Pour chaque échantillon, le dosage des protéines totales est effectué avec le kit *BioRad Dc Protein Assay* (BioRad, Ivry-sur-Seine, France), basé sur la méthode colorimétrique de Lowry *et coll. (392)*.

Les échantillons à doser sont préalablement dilués au $1/10^{e}$ et $1/20^{e}$ dans l'eppi. Une gamme de BSA (0 à 1,4 mg/mL) diluée dans le même solvant que les échantillons, est préparée à partir d'une solution de BSA à 2 mg/mL (Sigma) et déposée sur une plaque 96 puits (2 puits /point de gamme). Les échantillons sont déposés de la même manière. La solution A' est préparée en mélangeant 20 µL de solution S pour 1 mL de solution A (tartrate de cuivre) selon les recommandations du fournisseur. Vingt-cinq microlitres de solution A' puis 200 µL de solution B (réactif de Folin dilué) sont déposés dans chaque puits. La plaque est alors agitée et mise à incuber pendant 15 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. La densité optique à 690 nm est ensuite déterminée avec un lecteur de microplaque Titertek Multiscan® MCC/340 (Labsystem, Cergy-Pontoise, France).

Les extraits protéiques sont congelés et conservés à –80°C jusqu'à utilisation.

2- Séparation des protéines sur gels de polyacrylamide

Les gels sont préparés à l'aide du système Mini-Protéan III (BioRad). La proportion d'acrylamide est de 10% dans le gel de séparation et de 5% dans le gel de concentration *(tableau 18)*.

Tableau 18 : Composition des gels d'acrylamide

Réactifs	Solutions mères	Fournisseurs	**Gel de Séparation à 10%**	**Gel de Concentration à 5%**
Acrylamide-Bis	19 : 1	BioRad	10%	5%
Tris-HCl	1,5 M pH 8,8	Sigma	370 mM	-
Tris-HCl	0,75 M pH 6,8	Sigma	-	170 mM
Glycérol	50 % (^{v} / $_{v}$)	Sigma	5%	5%
SDS *	25 % (^{m} / $_{v}$)	Sigma	0,2%	0,2%
Ammonium persulfate	10 % (^{m} / $_{v}$)	Sigma	0,08%	0,11%
TEMED		BioRad	0,04%	0,11%
H_2O			qsp	qsp

* Voir liste des abréviations

Le gel de séparation est coulé en premier puis recouvert d'eau saturée en isobutanol (butanol-2, Prolabo). Après 30 minutes de polymérisation à température ambiante, la surface du gel est rincée à l'eau puis séchée. Le gel de concentration est alors coulé, puis le peigne mis en place afin de former les puits de dépôts. Après polymérisation, le peigne est retiré puis le bloc contenant le gel est immergé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration Tris-Glycine-SDS (tampon TGS, BioRad).

Les échantillons protéiques sont dilués dans du tampon RIPA *(tableau 17)* contenant du dithiotréitol à 4 mM, de façon à obtenir 50 µg de protéines contenus dans 15 µL. Quinze microlitres de tampon de Laemmli (BioRad) sont ajoutés dans chaque échantillon. Les protéines ainsi préparées sont chauffées à 95°C pendant 5 minutes afin de les dénaturer. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain de glace afin d'éviter toute renaturation même partielle des protéines.

Dans chaque puits du gel d'électrophorèse, 30 µL d'échantillon sont déposés. Dans au moins un puits, 8 µL d'un marqueur de taille adapté (Kaleidoscope, Prestained Standards, BioRad) est déposé. La migration électrophorétique des protéines s'effectue à 100 V pendant 2h15 à l'aide d'un générateur Power Pac 300 (BioRad).

3- Transfert sur membranes

En fin de migration, le gel est démoulé et le gel de concentration retiré. Le gel de séparation est récupéré puis incubé dans le tampon de tranfert *(tableau 19)* pendant au mois 15 minutes.

Tableau 19 : Composition du tampon de transfert

Réactifs	Proportions	Fournisseurs
Tris	48 mM	Sigma
Glycine	39 mM	Sigma
SDS	0,037% (m / v)	Sigma
Méthanol	20% (v / v)	Prolabo
H_2O	qsp	

Les membranes utilisées étaient en PVDF (fluorure de polyvinylidène) de type Immobilon-P de porosité 0,45 µm et présaturée (Millipore, Saint-Quentin en Yveline, France). Avant le transfert, les membranes sont activées selon le protocole résumé dans le *tableau 20.*

Tableau 20 : Protocole d'activation des membranes

Solutions	Durée d'incubation
Méthanol	30 sec.
H_2O	2 min.
Tampon de transfert	10 min.

Le transfert est réalisé à l'aide d'un système semi-sec de type Trans-Blot SD Cell (BioRad). Les couches successives pour le transfert sont placées selon la *figure 20.*

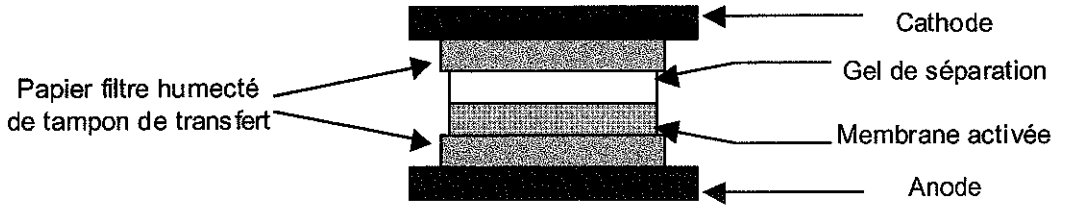


Figure 20 : Schéma du système de transfert semi-sec des protéines du gel sur la membrane.

Le transfert s'effectue à 0,08 A par membrane durant 25 minutes (générateur Power Pac 300, BioRad).

4- Immunomarquage

Après le transfert, les membranes sont séchées pendant 20 minutes sur un papier absorbant à température ambiante avant l'étape d'hybridation avec l'anticorps primaire.

Pour l'immunomarquage, nous avons utilisé un anticorps polyclonal de lapin anti-VEGF humain (Tebu, Santa-Cruz Biotechnology, Le Perray en Yvelines, France), dilué au 1/500^{e} dans une solution de saturation adaptée *(tableau 21)*.

Les membranes sont incubées une nuit à 4°C, sous agitation lente, dans une boîte de type PerfectWestern™ Containers (GenHunter Corporation, Nashville, TN, USA).

Tableau 21 : Solution de saturation des membranes

Réactifs		Proportions	Fournisseurs
Tampon TBST *	NaCl	500 mM	Sigma
	Tris-HCl pH 7,5	20 mM	Sigma
	Tween 20	0,05% (v/v)	Sigma
	H_2O	qsp	
Lait écrémé en poudre		2% (m/v)	Régilait®
BSA *		0,5% (m/v)	Sigma

* Voir liste des abréviations

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 15 minutes, sous agitation rapide, dans 15 mL de tampon TBST, puis sont mises en contact avec l'anticorps secondaire, qui est un anticorps de porc anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase (DakoCytomation), dilué au 1/1500^{e} dans 5 mL de solution de saturation. Les membranes sont incubées pendant 1h à température ambiante, avant d'être lavées de la même manière que précédemment puis révélées.

5- Révélation

La révélation a été réalisée avec le kit ECL™ Western Blotting (Amersham-Pharmacia Biotech, Saclay, France) dont le principe repose sur une réaction de chimioluminescence. La peroxydase couplée à l'anticorps secondaire est capable d'oxyder le luminol (réactif du kit ECL™) et aboutit à l'émission de lumière, imprimant un film d'autoradiographie adapté (Hyperfilm™ ECL, Amersham-Pharmacia Biotech).

Les membranes sont délicatement séchées puis mises en contact pendant 1 minute avec 6 mL de solution de révélation (provenant d'un mélange équivolume des deux réactifs

fournis dans le kit ECL™). Les membranes sont ensuite délicatement séchées avec du papier absorbant, enveloppées de papier film puis mises en contact avec le film photographique dans une cassette de type Hypercassette™ (Amersham-Pharmacia Biotech). Le temps d'exposition est d'environ 2 minutes, puis les films sont développés de façon automatique (développeur 3M, modèle XP2000) dans le Service de Radiologie du Centre Alexis Vautrin.

III- ANALYSES STATISTIQUES

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel StatView version 5.0.

Les tests statistiques utilisés sont des tests non paramétriques. Pour les comparaisons entre groupes, nous avons utilisé le *test U de Mann & Whitney*. Pour les corrélations, nous avons utilisé le *test des rangs de Spearman*.

Les différences entre deux groupes ou les corrélations entre deux paramètres sont considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

I- INFLUENCE DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR LA CROISSANCE TUMORALE

Le récepteur de l'érythropoïétine (R-EPO) a été identifié à la surface de nombreuses lignées cellulaires néoplasiques et dans plusieurs tumeurs malignes solides *(277, 278, 293-295, 299-301)*. En particulier, Acs *et coll.* et Yasuda *et coll.* ont rapporté l'expression de l'ARNm du R-EPO dans des cellules de gliomes malins de haut grade (U87, T98G, A172) *(277, 295)*.

Une étude récemment publiée suggère que l'EPO endogène peut contribuer à la fois à l'angiogenèse et à la croissance tumorale, et semble indispensable à la viabilité des tumeurs malignes *(295)*.

L'érythropoïétine recombinante humaine étant administrée pour mimer l'action de l'EPO endogène au niveau de l'hématopoïèse, nous ne pouvions pas exclure *a priori* l'éventualité que l'rHuEPO stimule la progression tumorale. C'est pourquoi, nos premières expérimentations ont consisté à évaluer *in vitro* et *in vivo* l'effet de l'rHuEPO sur la croissance tumorale.

A- Etude de la croissance cellulaire *in vitro*

1- Courbe de croissance des cellules U87

Nous avons évalué la croissance et la viabilité cellulaire par comptage, à l'aide d'un hémocytomètre, des cellules vivantes et en utilisant le bleu trypan, un colorant vital d'exclusion témoignant de l'intégrité membranaire. Nous avons établi la courbe de croissance des cellules U87 puis déterminé le temps de doublement de la lignée cellulaire, en fonction de l'absence ou de la présence d'rHuEPO.

L'effet de l'rHuEPO sur la croissance des cellules U87 a été étudié pour une concentration de 4 UI/mL, en considérant que cette concentration *in vitro* était dans le même ordre de grandeur que la concentration sanguine pouvant être atteinte *in vivo* dans nos conditions expérimentales : souris *nude* de 25 à 30 g, dont la masse sanguine est d'environ 2 à 3 mL, et injection quotidienne d'rHuEPO en sous-cutané à la dose de 0,3 UI/g.

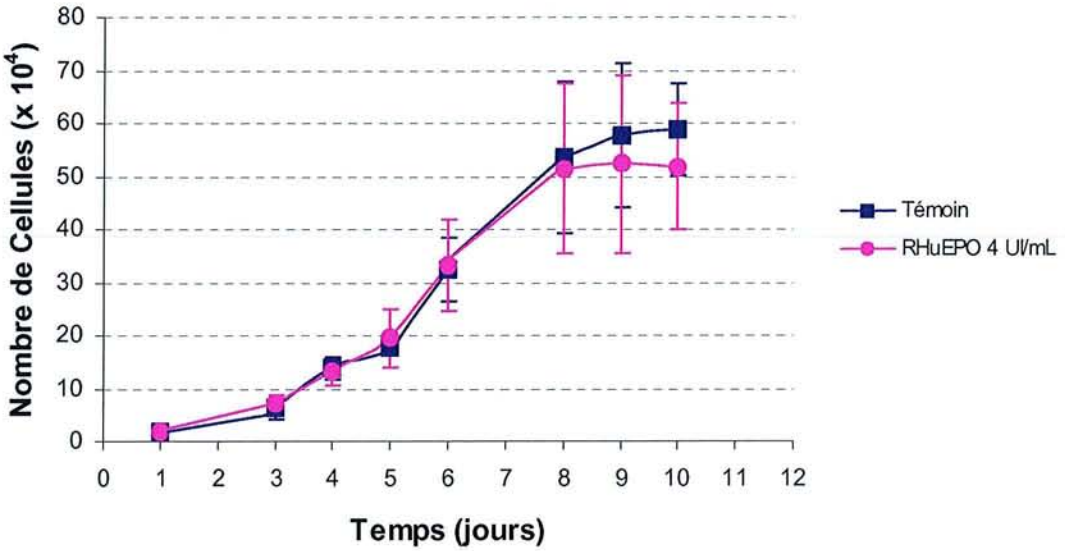


Figure 21 : Courbe de croissance des cellules U87 exposées ou non à l'rHuEPO (4 UI/mL). L'rHuEPO a été ajoutée au milieu de culture 24 h après l'ensemencement des cellules, et le contact a été poursuivi jusqu'au jour du comptage des cellules.
Les résultats représentent la moyenne et les écarts-type obtenus à partir de 4 expérimentations indépendantes.

Les courbes de croissance des cellules témoin et des cellules traitées par rHuEPO sont superposables *(figure 21)*. Après un ensemencement à 2.10^4 cellules/mL, la phase exponentielle de croissance des cellules U87 débute au 3ème jour de culture, et la confluence est atteinte au 7ème jour. Ces courbes de croissance nous ont permis de déterminer le temps de doublement des cellules U87 dans les deux conditions expérimentales *(tableau 22)*.

Tableau 22 : Temps de doublement des cellules U87 exposées ou non à l'rHuEPO (4 UI/mL).

	Temps de Doublement (heures)	
	Moyenne ± Ecart-type*	*p*
Témoin	35,2 ± 3,2	*> 0,05*
RHuEPO 4 UI/mL	36,2 ± 4,0	

* Les résultats ont été obtenus à partir de 4 expérimentations indépendantes.
p : Comparaison entre groupe témoin et groupe traité par rHuEPO en utilisant le test *U de Mann & Whitney*.

Aucune différence n'a été observée entre les temps de doublement mesurés pour les cellules U87 témoin et pour les cellules U87 traitées par rHuEPO, indiquant que l'rHuEPO n'exerce pas d'effet stimulateur sur la croissance des cellules U87.

2- Analyse de la prolifération et de la viabilité des cellules U87 par MTT

Afin de valider l'absence d'effet prolifératif de l'rHuEPO pour une large gamme de concentrations, nous avons complété nos investigations en analysant par une méthode colorimétrique utilisant le MTT, la prolifération et la viabilité des cellules U87 mises en contact pendant 24, 72 et 120 heures à des doses croissantes (comprises entre 0 et 400 UI/mL) d'rHuEPO. La densité optique lue à 540 nm est proportionnelle à la densité de cellules vivantes capables de métaboliser le MTT *(figure 22)*.

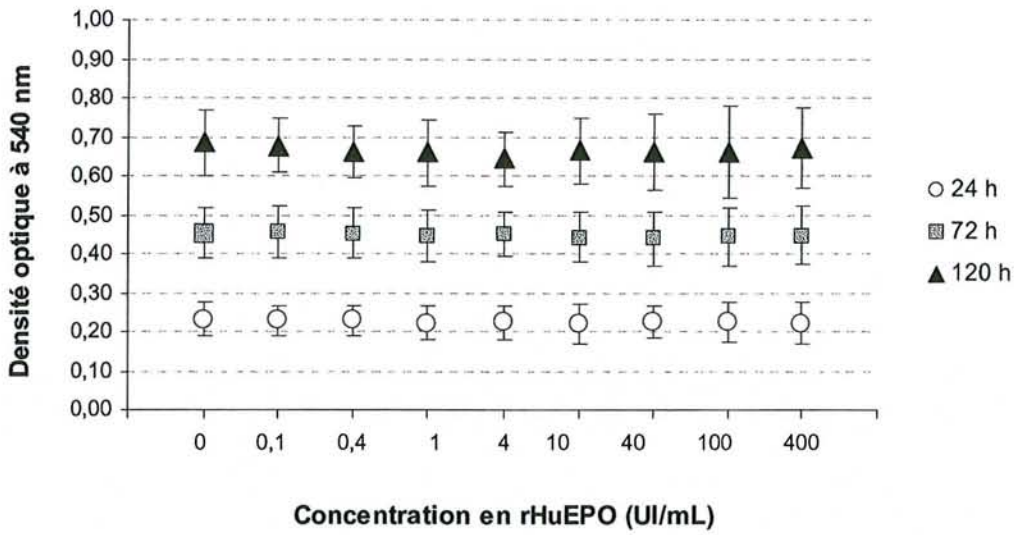


Figure 22 : Effet de concentrations croissantes d'rHuEPO et de différents temps de contact sur la prolifération et la viabilité des cellules U87 évaluée par le test MTT. L'rHuEPO a été ajoutée au milieu de culture 24 h après l'ensemencement des cellules, et le contact a été poursuivi jusqu'au jour de la réalisation du test de viabilité au MTT. Les résultats représentent la moyenne et les écarts-type obtenus à partir de 3 expérimentations indépendantes.

Reflétant la prolifération cellulaire au cours du temps, la *figure 22* montre une augmentation de la densité optique parallèlement à l'allongement de la durée de la culture. Néanmoins, quel que soit le moment de la révélation (24, 72, et 120 h), la densité cellulaire n'est pas modifiée par l'exposition des cellules à l'rHuEPO.

Comparativement au nombre important de lignées cellulaires non hématopoïétiques étudiées dans la littérature, l'effet stimulateur de l'rHuEPO sur la prolifération des cellules *in vitro* n'a été décrite que pour un petit nombre de lignées cellulaires (2 lignées de carcinome rénal *(299)*, et 2 lignées de carcinome mammaire *(277)*). Deux études qui utilisaient des méthodes d'évaluations différentes (essais clonogéniques, pourcentage de cellules en phase S) ont évalué l'effet de l'rHuEPO sur la croissance d'autres lignées cellulaires issues de

glioblastome *multiforme.* Comme dans notre étude, ces travaux n'ont montré ni stimulation ni ralentissement de la prolifération cellulaire par l'rHuEPO *(361, 362).*

Pour réaliser nos expérimentations, les cellules U87 ont été cultivées en utilisant un milieu de culture contenant, en particulier, du sérum de veau fœtal (SVF) 9% indispensable à la prolifération cellulaire. Or, la présence de SVF, contenant de nombreux facteurs de croissance (probablement même de l'EPO endogène), aurait pu masquer l'effet mitogène de l'rHuEPO exogène additionnée au milieu. Cependant, dans les lignées pour lesquelles un effet stimulateur de l'rHuEPO a été rapporté (lignée de carcinome rénal humain), une stimulation de la prolifération cellulaire a été observée dès la concentration de 0,5 UI/mL, malgré la présence de SVF 10% *(299)*, rendant donc l'hypothèse ci-dessus peu probable.

La stimulation de la prolifération cellulaire observée pour certaines lignées cellulaires *(277, 299)* est probablement associée à la présence de R-EPO fonctionnels, ainsi qu'à l'activation des voies de transduction en aval de ce récepteur. Dans le cadre d'un projet de recherche parallèle, il est donc envisagé d'étudier pour plusieurs lignées tumorales, dont la lignée U87, la présence et la fonctionnalité des R-EPO.

B- Etude *in vivo*

1- Effet sur la croissance tumorale

Pour évaluer l'influence de l'rHuEPO sur la croissance tumorale *in vivo*, nous avons travaillé sur deux lignées de gliomes malins humains xénogreffées, la lignée GBM Nan1 et la lignée U87, pour lesquelles le comportement prolifératif et la radiosensibilité diffèrent *(393).*

Le lendemain de la greffe, les souris sont réparties de façon aléatoire en deux groupes: le groupe témoin et le groupe traité par rHuEPO. Les injections quotidiennes d'rHuEPO débutent dès qu'une micro-tumeur sous-cutanée est identifiable, c'est-à-dire environ 3 jours après l'implantation de la tumeur pour la lignée GBM Nan1, et environ 3 semaines après l'injection de la suspension cellulaire pour la lignée U87. Le protocole expérimental que nous avons mis en œuvre sera présenté et discuté plus longuement ***p 128***.

En raison des approximations de mesure, rendues inévitables par l'utilisation d'un pied à coulisse manuel pour déterminer le diamètre de tumeurs de très petite taille, nous n'avons pas pu réaliser un suivi du volume tumoral dans la phase précoce du développement néoplasique. Nous avons alors déterminé le délai séparant le jour de greffe (J_G), du jour où le volume des tumeurs atteignait 250 ± 50 mm^3 (J_1).

Tableau 23 : Délai (en jours) séparant le jour de la greffe (J_G) et le jour où le volume tumoral atteint 250 ± 50 mm^3 (J_1).

	GBM Nan1		U87	
	Moyenne ± Ecart-type	*p*	Moyenne ± Ecart-type	*p*
Témoin	22,7 ± 7,6	*> 0,05*	43,6 ± 3,1	*> 0,05*
RHuEPO	19,1 ± 3,0		44,3 ± 6,9	

p : Comparaison entre groupe témoin et groupe traité par rHuEPO en utilisant le test non paramétrique non apparié *U de Mann & Whitney*.

Le délai moyen séparant (J_G) de (J_1) pour la lignée U87 est environ deux fois plus long que le délai enregistré pour la lignée GBM Nan1 *(tableau 23)*. Cette différence peut s'expliquer par les méthodes distinctes mises en œuvre pour xénogreffer les deux types de gliomes malins humains. En effet, pour la lignée GBM Nan1, nous avons procédé par implantation de fragments tumoraux, issus d'une xénogreffe source et donc déjà adaptés à l'environnement murin. Pour la lignée U87, la xénogreffe a consisté en l'injection sous-cutanée d'une suspension cellulaire. L'implantation de fragments tumoraux GBM Nan1 donne lieu à une prise de greffe et un développement tumoral plus précoce et plus efficace que l'injection sous-cutanée de cellules tumorales U87.

Toutefois, pour les xénogreffes U87, il faut noter qu'entre le moment où une micro-tumeur (2 à 3 mm de diamètre) est palpable et le moment où le volume tumoral atteint 250 ± 50 mm^3 (J_1), il s'écoule environ 3 à 4 semaines.

Malgré l'initiation précoce du traitement après la greffe, l'rHuEPO ne modifie pas le délai moyen séparant (J_G) de (J_1). Ainsi, d'un point de vue macroscopique, le développement tumoral dans sa phase précoce n'est pas influencé par la présence du facteur de croissance hématopoïétique.

A partir de J_1, nous avons réalisé un suivi régulier du volume tumoral dont les courbes sont représentées sur les *figures 23 et 24*.

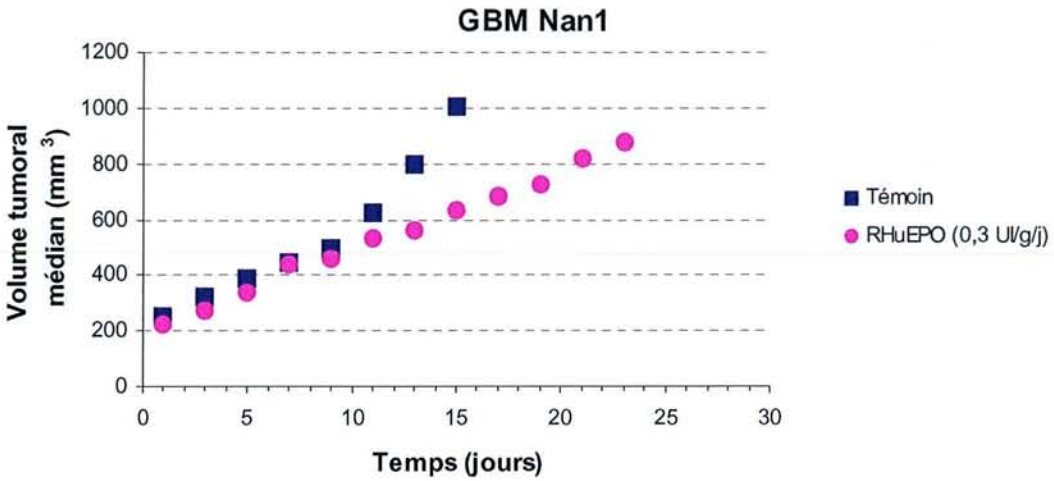


Figure 23 : Courbe de croissance des tumeurs GBM Nan1 traitées ou non par rHuEPO. L'rHuEPO a été injectée quotidiennement à la dose de 0,3 UI/g/j.
Témoin : *n = 9* ; RHuEPO: *n = 6* où *n* représente le nombre de tumeurs par groupe.

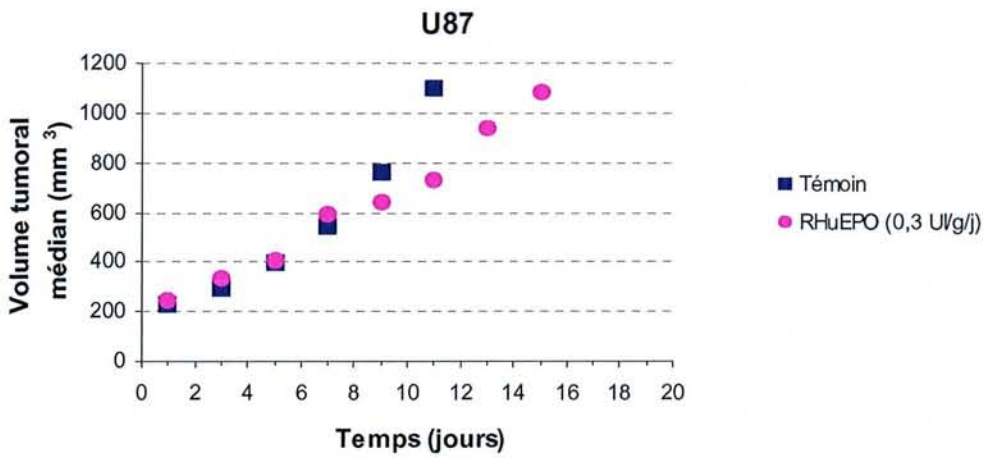


Figure 24 : Courbe de croissance des tumeurs U87 traitées ou non par rHuEPO. L'rHuEPO a été injectée quotidiennement à la dose de 0,3 UI/g/j. Témoin : *n = 8* ; RHuEPO : *n = 10* où *n* représente le nombre de tumeurs par groupe.

Dans les deux modèles expérimentaux étudiés, J_1 correspond au début de la phase de croissance rapide, tant pour les tumeurs témoin que pour les tumeurs traitées par rHuEPO.
A partir de J1 et jusqu'à environ 500 mm^3, les courbes de croissance obtenues pour les deux groupes de tumeurs sont superposables. Au-délà de 500 mm^3, les deux courbes se séparent indiquant un léger ralentissement de la croissance pour les tumeurs traitées par rHuEPO. La différence de volume devient significative pour la lignée GBM Nan1 à partir du J_{13}.

Le ralentissement de la croissance a déjà été rapporté par une étude montrant que l'administration d'rHuEPO à des souris non anémiques provoquait une diminution du diamètre moyen de tumeurs d'origine murine (lignée de carcinome mammaire NT). La faible différence par rapport au diamètre des tumeurs témoin, devenait significative pour une dose d'rHuEPO de 20 UI/jour *(366)*. Dans cette étude, le ralentissement de la croissance tumorale n'a pas été associé à un effet inhibiteur direct de l'rHuEPO sur la prolifération des cellules NT *in vitro*.

Des travaux ultérieurs n'ont pas montré de différence de croissance entre les tumeurs traitées et les tumeurs témoins *(14)*. Néanmoins, le développement exceptionnellement rapide de leur modèle d'étude (7 jours pour passer du fragment implanté à une tumeur de 1200 mm^3), ainsi que la durée très courte des expérimentations (au total 14 jours, dont 7 qui précédaient l'implantation tumorale), ne pouvaient permettre de mettre en évidence une différence, qui d'après nos observations et celles de Joiner et *coll.*, n'apparaît que tardivement et progressivement.

2- Effet sur la vascularisation tumorale

Des études *in vitro (302, 394)* et *in vivo (287, 315)* ont démontré que l'rHuEPO stimulait la prolifération et la migration des cellules endothéliales, deux processus majeurs de l'angiogenèse tumorale *(147)*. En particulier, l'injection d'rHuEPO dans la cavité utérine de souris ovariectomisées induit la formation de vaisseaux sanguins au niveau de l'endomètre *(287)*. En plus de l'effet mitogène et chimiotactique positif direct sur les cellules endothéliales, il semble que l'rHuEPO puisse exercer *in vivo* une action pro-angiogénique indirecte par stimulation de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou le PlGF (*Placenta growth factor*) *(293)*.

D'autre part, les R-EPO ont été mis en évidence à la surface des cellules endothéliales au niveau des vaisseaux sanguins de divers tissus cancéreux *(277, 278, 295, 300)*.

Il était donc important de connaître l'impact de l'rHuEPO sur l'angiogénèse dans les deux modèles que nous avons étudiés. En effet, la stimulation de l'angiogenèse dans nos modèles de gliomes xénogreffés pourrait influer sur la croissance tumorale *in vivo* ainsi que sur le micro-environnement tumoral (oxygénation, nutriments, pH...). Nous avons donc étudié la densité vasculaire intra-tumorale dans des xénogreffes GBM Nan1 et U87 traitées ou non par rHuEPO. Pour cela, nous avons utilisé une méthode immunohistochimique basée sur la reconnaissance par un anticorps spécifique du collagène IV, élément de structure de la membrane basale des vaisseaux sanguins *(395, 396)*.

Cette partie du travail a pu être effectuée grâce à la collaboration du Professeur F. Plénat (Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU Brabois, Nancy). La *figure 25* et le *tableau 24* illustrent les résultats obtenus pour des tumeurs prélevées à J_1 (volume tumoral compris entre 200 et 300 mm^3).

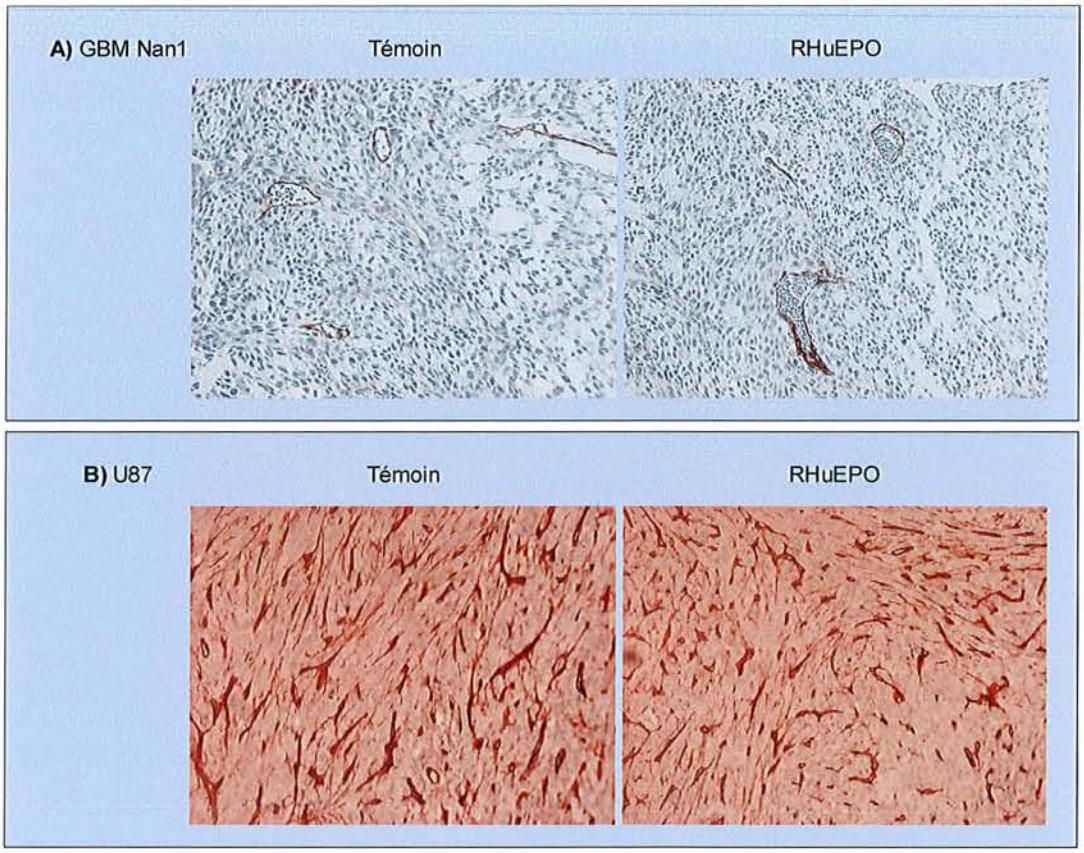


Figure 25 : Images représentatives de la vascularisation tumorale dans les xénogreffes **(A)** GBM Nan1 et **(B)** U87, témoin ou traitées par rHuEPO. Les vaisseaux sanguins tumoraux qui apparaissent en rouge, ont été identifiés par une technique immunohistochimique basée sur le marquage par l'anticorps anti-collagène IV. (Objectif 10 X).

Tableau 24 : Densité vasculaire déterminée à partir du comptage des vaisseaux sanguins intra-tumoraux marqués par l'anticorps anti-collagène IV.

	GBM Nan1			U87		
	n	Moyenne ± Ecart-type	*p*	*n*	Moyenne ± Ecart-type	*p*
Témoin	*4*	14 ± 6	*> 0,05*	*3*	326 ± 79	*> 0,05*
RHuEPO	*3*	16 ± 3		3	386 ± 110	

n : nombre de tumeurs par groupe.

p : Comparaison entre groupe témoin et groupe traité par rHuEPO en utilisant le test non paramétrique non apparié *U de Mann & Whitney*.

Malgré un volume tumoral moyen équivalent, les tumeurs U87 présentent environ 25 fois plus de vaisseaux que les tumeurs GBM Nan1. Cette différence importante peut certainement s'expliquer par la différence concernant les modalités de greffe utilisées pour les deux modèles. Dans les tumeurs GBM Nan1, la lumière des vaisseaux apparaît cependant plus dilatée que dans les xénogreffes U87, et nous pouvons y observer un grand nombre de globules rouges.

Dans les deux modèles tumoraux, la densité vasculaire dans les tumeurs traitées par rHuEPO est comparable à celle observée dans les tumeurs témoin. De plus, dans les limites de la technique utilisée, aucune modification morphologique de la vascularisation tumorale n'a été observée.

En résumé

L'érythropoïétine recombinante humaine, quelles que soient la concentration et la durée d'exposition, n'a pas exercé d'action stimulatrice directe sur la prolifération des cellules U87 in vitro.

Malgré l'initiation précoce du traitement par rapport au jour de la xénogreffe, l'rHuEPO n'a pas favorisé la croissance des tumeurs GBM Nan1 ou U87 in vivo. Au contraire, un léger ralentissement du développement tumoral a été observé pour les tumeurs dont le volume dépassait 500 mm^3. Cet effet ne peut être imputé à une action directe de l'rHuEPO sur les cellules tumorales puisqu'il n'a pas été observé in vitro.

Contrairement aux données de la littérature qui rapportent un effet pro-angiogénique de l'rHuEPO, nous n'avons pas observé de modification de la densité vasculaire tumorale après l'injection répétée d'rHuEPO chez des souris nude porteuses de gliomes malins humains GBM Nan1 ou U87.

II- INFLUENCE DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR L'HYPOXIE TUMORALE

L'hypoxie tumorale est un facteur limitant majeur à l'efficacité de la radiothérapie. La première explication apportée à ce phénomène est d'ordre radiobiologique.
L'oxygène moléculaire, qui permet d'amplifier les cascades de réactions radicalaires déclenchées par les radiations ionisantes, constitue un élément déterminant de l'efficacité du processus radiochimique. En effet, dans les cellules, le dioxygène est la molécule qui présente la plus grande affinité à l'égard des électrons libres, et réagit très rapidement avec les radicaux libres formés au moment de l'irradiation : il participe alors à la stabilisation et à l'augmentation de la sévérité des dommages radio-induits, notamment au niveau de l'ADN *(4)*. De ce fait, *in vitro* sur des cellules de mammifères, pour obtenir un effet cytotoxique donné, la dose de radiations ionisantes nécessaire en conditions hypoxiques est 2,5 à 3 fois plus importante que celle nécessaire en conditions normoxiques *(6)*.

Parmi les approches proposées pour lutter contre l'hypoxie tumorale et améliorer l'efficacité de la radiothérapie, les premières stratégies (oxygène hyperbare, carbogène, associé ou non au nicotinamide) visent à augmenter la quantité d'oxygène présente au moment de l'irradiation dans le tissu tumoral. Pour atteindre ce même objectif, nous avons choisi d'administrer de l'rHuEPO, dans l'attente d'augmenter la capacité du sang à transporter l'oxygène. Le but étant d'augmenter la quantité d'oxygène disponible pour les réactions radiochimiques, les effets attendus de l'rHuEPO sur le taux d'hémoglobine et sur l'hypoxie tumorale, devaient être atteints au moment de l'initiation de la radiothérapie et devaient être, si possible, maintenus en cours de radiothérapie.

La seconde partie de notre étude a consisté à vérifier que l'rHuEPO, ainsi que le schéma d'administration retenu, permettaient d'atteindre ces pré-requis.

A- Présentation et discussion du protocole expérimental

Le protocole expérimental que nous avons adopté pour l'ensemble de notre travail *in vivo* est récapitulé sur la *figure 26*.

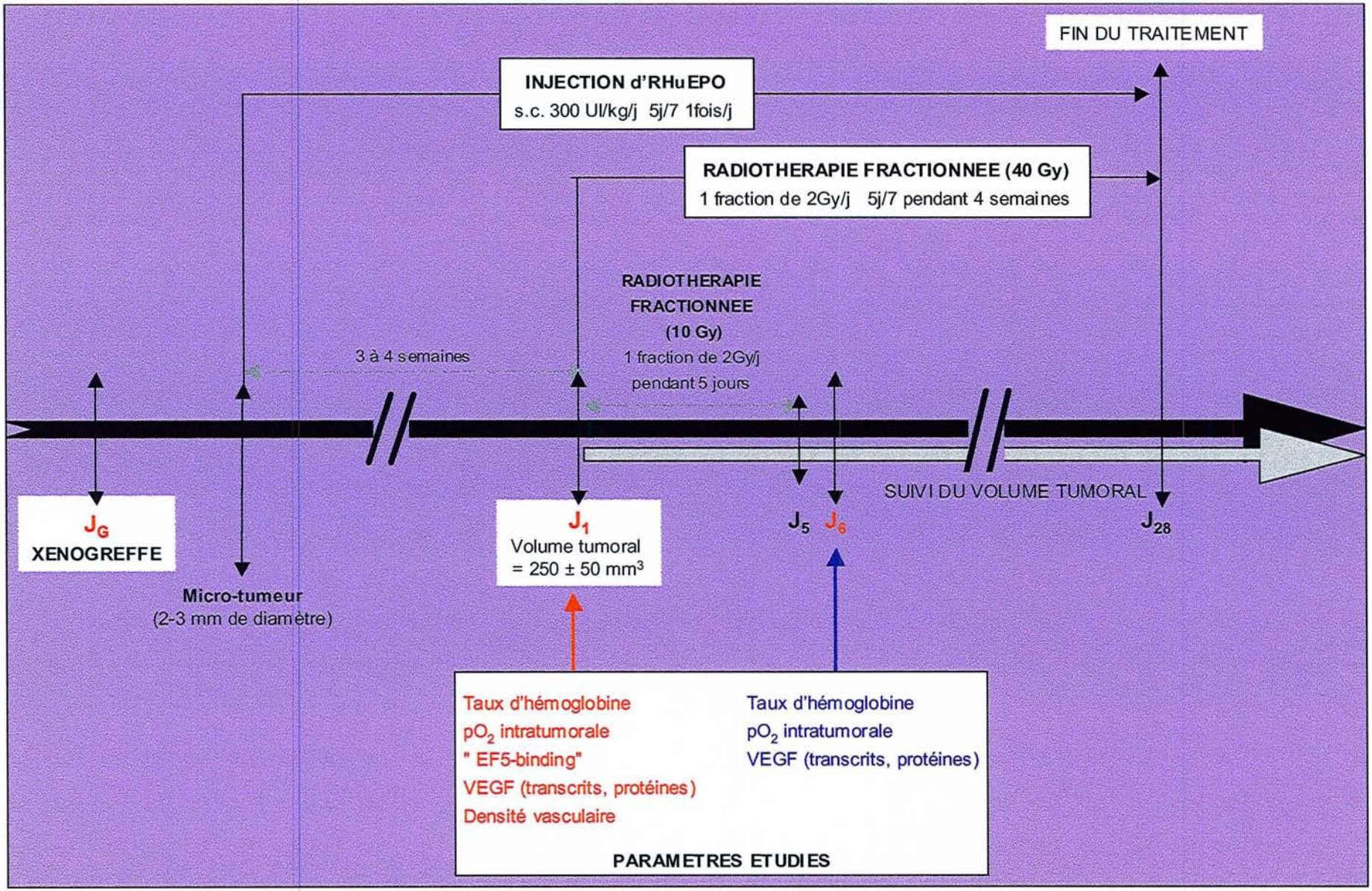


Figure 26 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental *in vivo* mis en œuvre dans notre étude.

Tout en s'adaptant aux contraintes du modèle animal, l'ensemble de notre travail a été réalisé avec la volonté de se rapprocher au mieux de la pratique clinique, afin que l'interprétation des résultats obtenus puisse éventuellement conduire à des essais thérapeutiques chez l'Homme. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser une dose et un schéma d'irradiation fractionnée approchant les modalités classiquement appliquées chez les patients.

Au préalable, nous avons défini le paramètre qui marque le début des irradiations (ou J_1) : le J_1 correspond au jour où le volume des tumeurs atteint 250 ± 50 mm^3. Ce volume de départ nous a semblé être un bon compromis entre la nécessité d'irradier des tumeurs de taille suffisante, et la nécessité de respecter les contraintes éthiques lors du suivi tumoral post-thérapeutique. Approximativement, 3 à 4 semaines étaient nécessaires pour qu'une micro-tumeur identifiable (2-3 mm de diamètre) se développe, et atteigne un volume de 250 ± 50 mm^3.

Les modalités d'administration de l'rHuEPO ont été définies par rapport aux objectifs ultimes de l'étude, à savoir, obtenir un effet sur le taux d'hémoglobine et sur l'hypoxie tumorale au moment de l'initiation de la radiothérapie (J_1) et le maintenir tout au long du traitement (J_{28}).

L'érythropoïétine recombinante humaine mime l'action de l'érythropoïétine endogène. Elle favorise la survie des précurseurs érythrocytaires (CFU-E) et stimule la prolifération, la différenciation et la maturation des proérythroblastes et des érythroblastes, aboutissant à terme, à l'augmentation du nombre de globules rouges circulant dans le sang *(255, 349)*. Le mode d'action de l'hormone implique qu'il existe un délai (> 2 semaines) entre l'initiation du traitement et le moment où les répercussions sur les concentrations sanguines en hémoglobine sont appréciables. Compte tenu du délai d'action de l'hormone, ainsi que de la vitesse de croissance des xénogreffes, l'rHuEPO a été administrée de manière quotidienne, et les injections ont débuté alors que les greffons étaient encore à l'état de micro-tumeurs. Ainsi, à J_1, les souris traitées par l'rHuEPO ont reçu le traitement pendant environ 3 à 4 semaines. Cette méthodologie avait préalablement été appliquée lors des premiers travaux qui utilisaient l'rHuEPO pour moduler la radiosensibilité de greffes tumorales chez la souris *(366)*.

Les modalités d'administration que nous avons retenues ne sont pas en adéquation parfaite avec la pratique clinique. En effet, l'rHuEPO est généralement administrée chez les patients à un stade avancé de la maladie, déjà anémiques, et qui sont sur le point de débuter la radiothérapie. En revanche, les posologies utilisées dans ce travail ont été adaptées à partir des posologies administrées en clinique humaine *(372, 375)*.

Le schéma d'administration de l'rHuEPO retenu pour notre étude correspond à 300 UI/kg/jour, 5j/semaine, pendant 3 à 4 semaines jusqu'au J_1 (soit 6000 UI/kg) ou pendant 7 à 8

semaines jusqu'au J_{28} (soit 12000 UI/kg). Il est comparable à ceux utilisés dans les études précliniques préalables. En effet, Joiner *et coll.* ont testé des doses comprises entre 150 et 600 UI/kg/jour, administrées 5 jours par semaines pendant 4 semaines *(366)*. Dans les travaux de Vaupel *et coll.*, des protocoles d'administration plus intenses (6 injections de 1000 UI/kg, réparties sur 14 jours *(14, 368)* ou 12 injections de 1000 UI/kg, réparties sur 4 semaines *(369, 370)*) ont été appliquées, mais les doses totales étaient équivalentes à celles que nous avons utilisées. Plus récemment, de fortes posologies ont également été utilisées dans une étude américaine : les auteurs délivraient à des rats 6 injections de 2000 UI/kg, réparties sur 18 jours *(397)*.

B- Influence de l'rHuEPO sur le taux d'hémoglobine

1- Avant radiothérapie

Afin de vérifier que l'rHuEPO exerce une activité pharmacologique chez les souris *nude* non anémiques, les concentrations en hémoglobine ont été mesurées à J_1. Les résultats sont présentés dans le *tableau 25*.

Tableau 25 : Effet de l'rHuEPO sur la concentration sanguine en hémoglobine avant irradiation (J_1).

	TAUX d'HEMOGLOBINE (g/dL)					
	GBM Nan1			U87		
	n	Moyenne ± Ecart-type	*p*	*n*	Moyenne ± Ecart-type	*p*
Témoin	*6*	15,6 ± 1,3	*0,024*	*12*	15,5 ± 1,4	*0,002*
RHuEPO	*8*	19,4 ± 2,8		*11*	17,7 ± 1,9	

n : nombre de tumeurs par groupe.

p : Comparaison entre groupe témoin et groupe traité par rHuEPO en utilisant le test non paramétrique non apparié *U de Mann & Whitney*.

Après 3 à 4 semaines de traitement, le taux d'hémoglobine à J_1 est significativement plus élevé chez les souris traitées par l'hormone de synthèse que chez les souris témoin, traduisant donc une stimulation de l'érythropoïèse chez les animaux non anémiques. En effet, les injections quotidiennes d'rHuEPO ont conduit à une augmentation du taux d'hémoglobine d'environ 25% et 15%, chez les animaux porteurs respectivement, de xénogreffes GBM Nan1 ou de xénogreffes U87.

Dans notre étude, les souris traitées par rHuEPO ont reçu à J_1 approximativement la même dose totale (6000 UI/kg) que les rats étudiés par Kelleher *et coll.*, mais selon un schéma d'administration moins intensif (injections réparties sur 4 semaines au lieu de 2 semaines)

(14). Au final, l'augmentation du taux d'hémoglobine que nous avons observée est légèrement plus faible que celle (29%) rapportée par l'équipe allemande pour leur modèle de sarcome murin *(14)*.

L'administration quotidienne et précoce après la greffe tumorale est une option méthodologique qui a permis d'augmenter la capacité du sang à transporter l'oxygène chez des animaux non anémiques, au moment de l'initiation de la radiothérapie.

2- En fonction du volume tumoral

L'augmentation du taux d'hémoglobine que nous avons observé à J_1, correspond toutefois à des conditions expérimentales restrictives. En effet, le volume tumoral est compris entre 200 et 300 mm^3. Afin de savoir si le bénéfice dû à l'rHuEPO peut apparaître dans d'autres circonstances, nous avons complété ces données par des mesures de concentrations en hémoglobine pour des tumeurs de volume plus important, pouvant matérialiser ainsi une situation de progression tumorale.

Les résultats de cette étude, réalisée uniquement sur le modèle GBM Nan1, sont résumés dans le *tableau 26*.

Tableau 26 : Evolution du taux d'hémoglobine en fonction du volume des tumeurs GBM Nan1.

Volume Tumoral (mm^3)		**Taux d'hémoglobine (g/dL)**	
Moyenne ± Erreur Standard		Moyenne ± Erreur Standard	
Témoin	**RHuEPO**	**Témoin**	**RHuEPO**
245 ± 14	225 ± 4	15,6 ± 0,6	19,4 ± 1,1 *
578 ± 87	586 ± 68	16,0 ± 0,1	18,0 ± 0,6 *
1194 ± 192	1118 ± 251	14,4 ± 0,4	15,9 ± 0,4 *

Chaque groupe comprenait de 6 à 11 animaux. * $p < 0,05$ concernant la comparaison entre groupe témoin et groupe traité par rHuEPO (test *U de Mann & Whitney*).

Nous avons constaté une chute du taux d'hémoglobine lorsque le volume tumoral augmentait. Pour les animaux recevant de l'rHuEPO, le déclin survient malgré la poursuite des injections tout au long du développement tumoral.

La chute du taux d'hémoglobine observée chez les animaux témoin ainsi que chez les animaux traités par rHuEPO a également été décrite par Joiner et *coll. (366)*. Le développement tumoral avancé s'accompagne d'une réaction inflammatoire exacerbée, et la survenue de micro-hémorragies est probablement plus fréquente dans les tumeurs de plus gros volume. Ces deux processus, impliqués dans la survenue des anémies associées aux

cancers chez les patients *(320)*, pourraient expliquer, au moins en partie le déclin, observé dans les modèles animaux.

Le déclin accéléré observé dans le groupe rHuEPO suggère l'existence de mécanismes physiologiques et biologiques supplémentaires capables de contrer l'action de l'rHuEPO chez les souris porteuses de grosses tumeurs (> 1000 mm^3). Il pourrait éventuellement s'agir d'une perte d'activité de l'hormone. Des investigations supplémentaires devront donc être menées afin d'élucider les causes de la chute du taux d'hémoglobine malgré la poursuite du traitement par rHuEPO.

Les taux d'hémoglobine mesurés chez les souris traitées par rHuEPO ont toujours été statistiquement supérieurs aux valeurs obtenues pour les groupes témoin. De plus, chez les souris traitées par rHuEPO présentant un développement tumoral avancé, les concentrations sanguines en hémoglobine restaient égales aux valeurs initialement mesurées dans le groupe témoin (où le volume tumoral était de 246 mm^3). Cette observation signifie que dans nos conditions expérimentales, l'rHuEPO constitue un moyen d'empêcher l'installation d'une anémie liée à la progression tumorale (matérialisée par l'augmentation du volume tumoral). Préalablement, l'équipe de Vaupel *et coll.* avait démontré que l'administration anticipée d'rHuEPO pouvait permettre d'empêcher l'installation d'une anémie chimio- ou radio-induite *(368, 370)*.

3- En cours d'irradiation

En pratique clinique, les traitements anticancéreux sont susceptibles de favoriser l'installation d'une anémie ou d'aggraver une anémie déjà installée *(321)*. Il était donc intéressant d'évaluer l'effet de l'rHuEPO sur des tumeurs irradiées, afin de savoir si le bénéfice initialement obtenu (J_1) pouvait être maintenu en cours d'irradiation.

Dans les deux modèles de gliomes xénogreffés, les concentrations sanguines en hémoglobine ont donc été mesurées après 5 fractions d'irradiation (J_6) *(tableau 27)*.

Tableau 27 : Effet de l'rHuEPO sur la concentration sanguine en hémoglobine après 5 fractions d'irradiation (J_6).

	TAUX d'HEMOGLOBINE (g/dL)					
	GBM Nan1			U87		
	n	Moyenne ± Ecart-type	*p*	*n*	Moyenne ± Ecart-type	*p*
Témoin	*9*	16,0 ± 0,4		*7*	14,0 ± 1,2	
RT	*11*	14,7 ± 1,6	*0,013* *	*6*	14,3 ± 0,9	*0,044* *
RT + RHuEPO	*11*	16,8 ± 2,6		*6*	16,0 ± 1,5	

n : nombre de tumeurs par groupe.

* Comparaison entre groupe RT et groupe RT + rHuEPO en utilisant le test non paramétrique non apparié *U de Mann & Whitney*.

Les animaux des groupes RT + rHuEPO présentent un taux d'hémoglobine moyen significativement plus élevé que les animaux des groupes RT. Dans le modèle GBM Nan1 et dans le modèle U87, nos résultats montrent respectivement une augmentation d'environ 15% et 10%. Ainsi, le fait de poursuivre les injections de l'hormone recombinante durant l'irradiation permet de maintenir des taux d'hémoglobine élevés pendant la radiothérapie.

Un certain nombre d'études cliniques ont démontré que le maintien de la concentration sanguine en hémoglobine au cours de la radiothérapie est un paramètre déterminant de l'efficacité du traitement *(333, 337, 340)*. En particulier, Dunst *et coll.* ont mené une étude prospective concernant 87 patientes atteintes de cancers cervicaux, chez qui ils ont mesuré le taux d'hémoglobine, avant le début de la radiothérapie, puis à mi-irradiation. Malgré le faible nombre de patientes par groupe, les auteurs ont montré que les patientes passant d'un taux normal avant RT à un taux faible à mi-RT avaient un pronostic équivalent à celui observé chez les patientes présentant un taux d'hémoglobine constamment faible (avant et à mi-RT). A l'inverse, les patientes passant d'un taux faible avant RT à un taux normal mi-RT avait un meilleur pronostic que les deux premiers groupes (70% *vs* 50% de contrôle local à 3 ans) *(340)*. Si ces données venaient à être confirmées sur une population de malades plus importante, l'utilisation de l'rHuEPO pourrait être envisagée pour assurer le maintien du taux d'hémoglobine pendant la radiothérapie.

C- Influence de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale avant irradiation

1-Mesure de la pression partielle en oxygène à l'aide du *pO₂-Histograph*

1.1. Variabilité intra- et inter-tumorale

1.1.1. Variabilité intra-tumorale

Alors qu'elle progresse dans le tissu tumoral selon un axe rectiligne, l'électrode sensible à l'oxygène du *pO₂-Histograph, Eppendorf™* enregistre régulièrement et en différents points la pression partielle en oxygène (pO_2).

La *figure 27* représente pour quatre tumeurs distinctes (2 tumeurs de la lignée GBM Nan1 et 2 tumeurs de la lignée U87), les valeurs de pO_2 enregistrées le long de chaque axe, pour quatre axes distincts par tumeur.

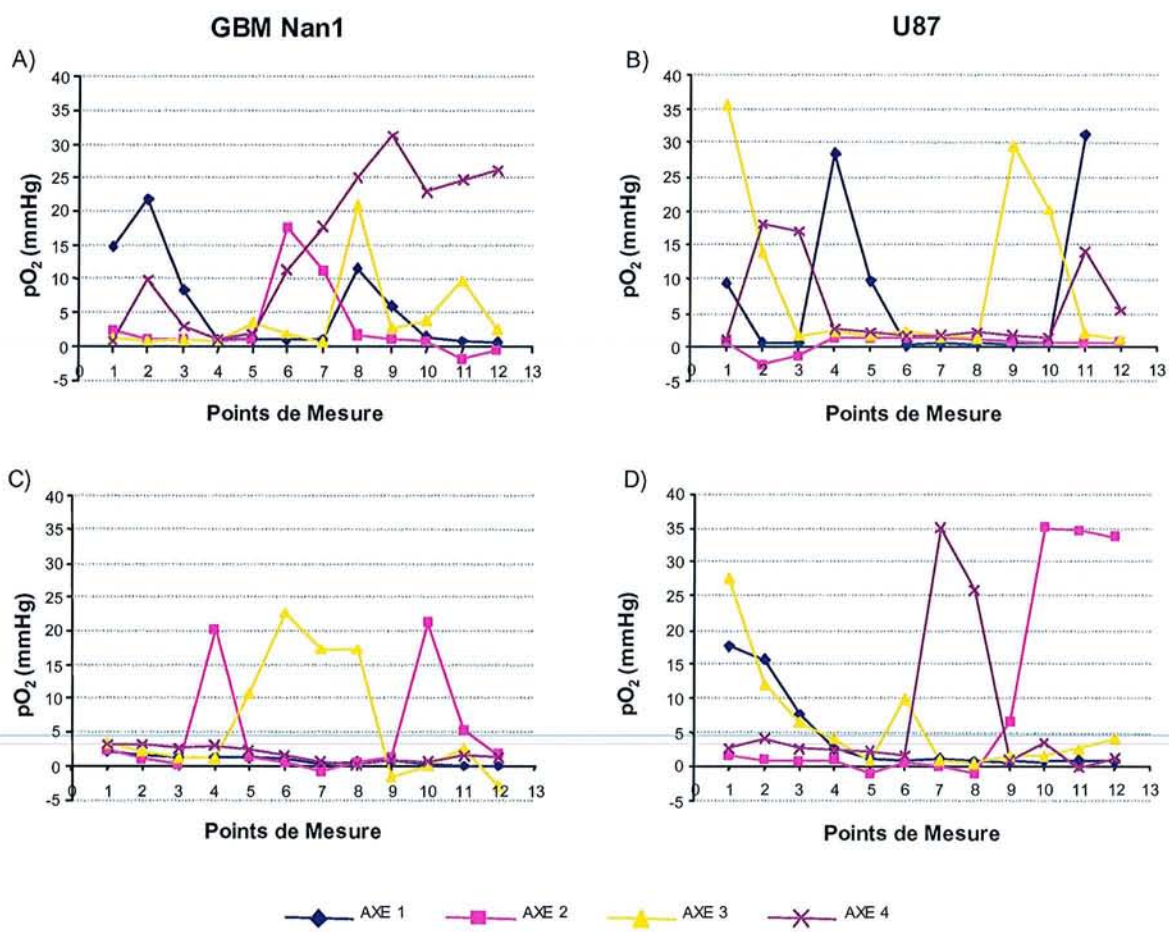


Figure 27: Exemples représentatifs de profils de mesures de pO_2 obtenus à l'aide du *pO₂-Histograph, Eppendorf™*. Chaque graphique correspond à une tumeur distincte, et pour chaque tumeur, les mesures de pO_2 sont enregistrées le long de quatre axes distincts. **A** et **C)** Xénogreffes GBM Nan1. **B** et **D)** Xénogreffes U87.

Le long d'un même axe, la pO_2 peut atteindre des valeurs hautes (jusqu'à 35 mmHg), du même ordre de grandeur que les valeurs enregistrées normalement dans les tissus sains *(398)*, et des valeurs très basses, voire négatives.
Lorsque les mesures sont effectuées selon quatre axes différents dans une même tumeur, les quatre profils de mesures obtenus sont très différents les uns des autres.

De la même façon que dans des études cliniques antérieures *(97, 98, 100)*, nous n'avons observé aucun lien entre les mesures de pO_2 enregistrées et la position de l'électrode dans la tumeur. En particulier, nous n'avons pas noté d'évolution systématique de la pO_2 quand l'électrode avançait de la périphérie vers le centre de la tumeur.

La variabilité intra-tumorale a été décrite dès les premières expérimentations utilisant le *pO_2-Histograph, Eppendorf™* chez les patients *(97, 100)*. En raison de cette grande variabilité, un minimum de 10 à 12 mesures de pO_2 par axe, le long d'au moins quatre axes, nous ont semblé indispensables pour obtenir une information suffisante sur l'état d'oxygénation des gliomes malins xénogreffés étudiés. Ainsi, pour les tumeurs les plus petites, nous avons enregistré au moins 48 valeurs de pO_2 et ce nombre était augmenté dès que les tumeurs étaient plus grosses (jusqu'à un maximum de 150 valeurs pour des tumeurs de 1000 mm^3).

La technique étant invasive, la pénétration de l'électrode provoque des lésions dans le tissu tumoral, qui peuvent engendrer à leur tour des perturbations du micro-environnement. Toutefois, nous n'avons pas observé d'altérations systématiques des valeurs de pO_2 mesurées, au fur et à mesure de l'enregistrement des mesures successives.

1.1.2. Variabilité inter-tumorale

Le système informatique du *pO_2-Histograph, Eppendorf™* compile l'ensemble des valeurs de pO_2 enregistrées, et fournit pour chaque tumeur un histogramme de distribution tel que ceux représentés dans la *figure 28*.

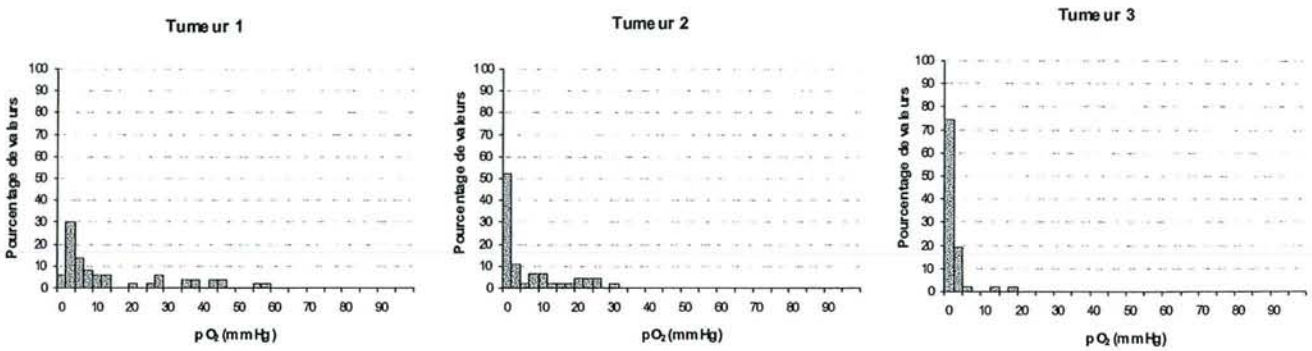


Figure 28 : Histogrammes de distribution des valeurs de pO_2, enregistrées pour trois xénogreffes GBM Nan1 distinctes appartenant à un même bras thérapeutique, illustrant la variabilité inter-tumorale.

En plus de la variabilité intra-tumorale, nous avons constaté une importante variabilité entre les tumeurs appartenant à un même bras thérapeutique. Les trois histogrammes représentés ci-dessus correspondant à trois tumeurs distinctes d'un même groupe illustrent cette variabilité inter-tumorale.

Tandis que pour la tumeur 1, les valeurs de pO_2 s'étalent de 0 à 60 mmHg, toutes les mesures enregistrées dans les tumeurs 2 et 3 sont inférieures respectivement à 35 mmHg et à 20 mmHg. Parallèlement, dans la tumeur 1, moins de 10% des valeurs de pO_2 sont comprises entre 0 et 2,5 mmHg, tandis que dans les tumeurs 2 et 3, 50 à 75% des valeurs enregistrées sont inférieures à 2,5 mmHg.

Malgré cette variabilité, nous avons toujours constaté une distribution assymétrique des valeurs de pO_2, caractérisée par une accumulation des mesures vers les faibles valeurs, notamment entre 0 et 5 mmHg. Une telle distribution est caractéristique des tissus cancéreux, alors que dans les tissus sains la distribution est le plus souvent gaussienne, centrée autour de 30 à 60 mmHg en fonction des tissus *(97, 100, 102, 398)*. Comparativement aux données cliniques *(97, 98, 100, 102)*, les greffes de tumeurs murines ou de tumeurs humaines chez les rongeurs présentent en général une fraction plus importante de mesures inférieures à 2,5 mmHg *(398)*.

De ce fait, les paramètres les plus représentatifs pour évaluer l'état d'oxygénation des xénogreffes tumorales sont la pO_2 médiane, le pourcentage de valeurs de pO_2 inférieures à 2,5 mmHg (ou fraction hypoxique < 2,5 mmHg) et le pourcentage de valeurs de pO_2 inférieures à 5 mmHg (ou fraction hypoxique < 5 mmHg). Néanmoins, la pO_2 moyenne reste un paramètre intéressant car elle apporte des informations complémentaires.

1.2. Effet de l'rHuEPO sur la pO_2 intra-tumorale

A partir des mesures de pO_2 enregistrées, quatre paramètres d'analyses fournis par le *pO_2-Histograph, Eppendorf™* ont été retenus pour la représentation graphique ci-desous. Il s'agit de la pO_2 moyenne *(figure 29A)*, la pO_2 médiane *(figure 29B)*, la fraction hypoxique < 2,5 mmHg *(figure 30A)* et la fraction hypoxique < 5 mmHg *(figure 30B)*. Ces paramètres sont présentés pour les tumeurs GBM Nan1 et U87, traitées ou non par rHuEPO.

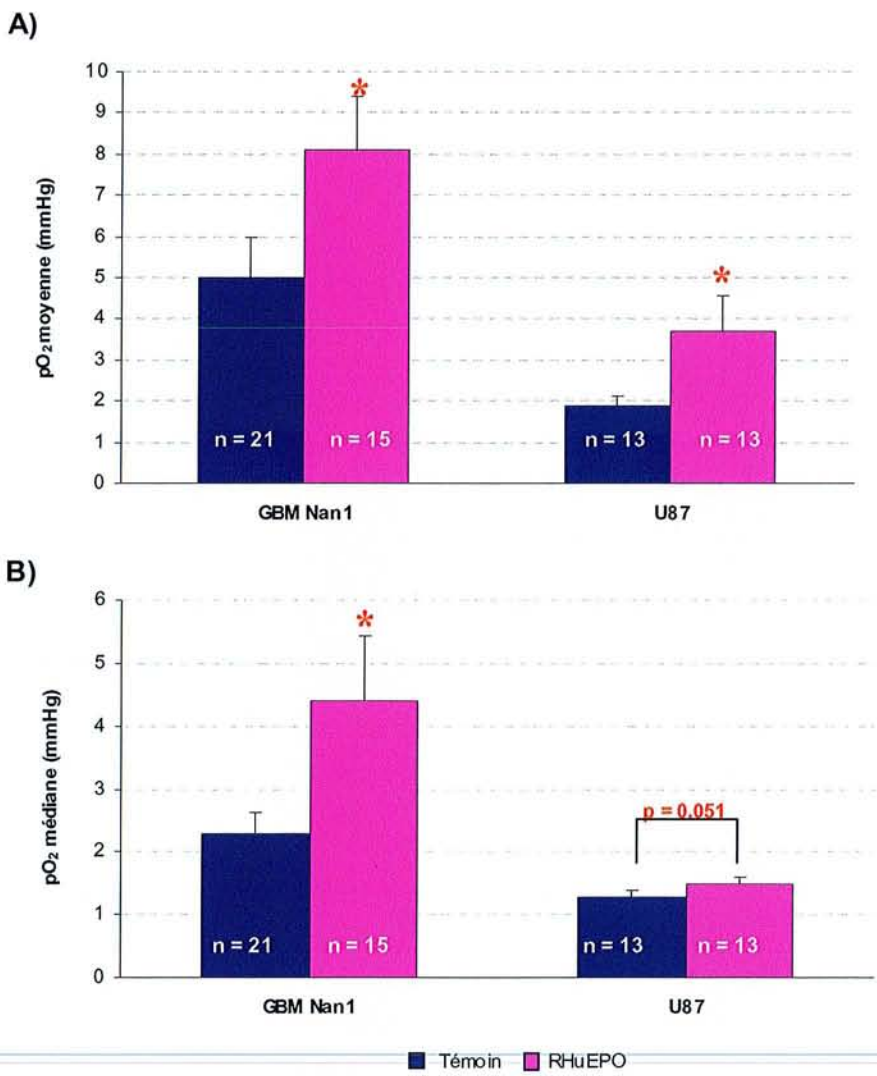


Figure 29 **: A)** PO_2 moyenne et **B)** pO_2 médiane mesurées avant irradiation **(J_1)** dans les tumeurs GBM Nan1 et dans les tumeurs U87 xénogreffées chez la souris *nude*. Les résultats représentent la Moyenne ± Erreur Standard. Pour l'analyse statistique, le test *U de Mann & Withney* a été appliqué. *n* : nombre de tumeurs par groupe. * $p < 0,05$.

Pour les deux modèles de gliomes malins xénogreffés, les tumeurs témoin présentent en moyenne une pO_2 médiane inférieure à 2,5 mmHg (2,3 ± 1,5 mmHg pour les tumeurs

GBM Nan1 et 1,3 ± 0,3 mmHg pour les tumeurs GBM Nan1), indiquant que les deux modèles étudiés sont particulièrement hypoxiques. Un tel degré d'hypoxie n'est toutefois pas incohérent, car une pO_2 médiane de 1,3 ± 1,0 mmHg a été préalablement rapportée pour un autre modèle de glioblastome humain (HTZ17) greffé chez la souris *nude (215)*.

Nous noterons en revanche, que ces valeurs sont plus faibles que celles enregistrées par Rampling *et coll. (29)* ou par Collingridge *et coll. (30)* chez des patients atteints de gliomes malins de haut grade. En effet, la pO_2 médiane était égale à 7,4 mmHg dans la première étude *(29)* et était égale à 5,6 ± 2,0 mmHg dans la seconde *(30)*.

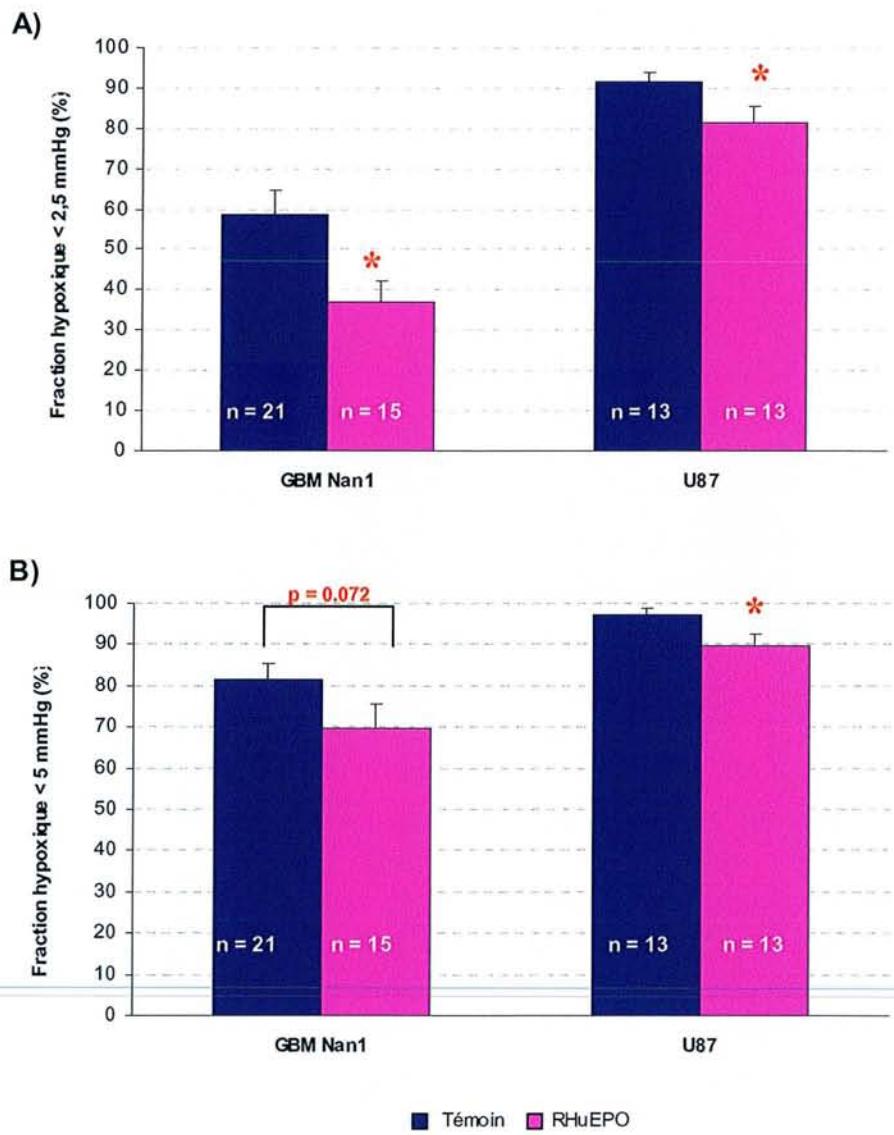


Figure 30 : **A)** Fraction hypoxique < 2,5 mmHg et **B)** fraction hypoxique < 5 mmHg mesurées avant irradiation **(J_1)** dans les tumeurs GBM Nan1 et dans les tumeurs U87 xénogreffées chez la souris *nude*. Les résultats représentent la Moyenne ± Erreur Standard. Pour l'analyse statistique, le test *U de Mann & Withney* a été appliqué. *n* : nombre de tumeurs par groupe. * $p < 0,05$.

Nous noterons également que les tumeurs U87 sont plus hypoxiques que les tumeurs GBM Nan1. Cette différence est particulièrement marquée quand on considère la fraction hypoxique inférieure à 2,5 mmHg : tandis qu'elle avoisine 60% pour la lignée GBM Nan1, elle atteint 90% pour la lignée U87.

Cette différence concernant l'hypoxie tumorale est en adéquation avec les images très différentes, que nous avons obtenues pour la vascularisation tumorale. En effet, dans les tumeurs GBM Nan1, les vaisseaux tumoraux sont peu nombreux mais la lumière des vaisseaux apparaît plus dilatée avec un grand nombre de globules rouges visibles, suggérant une vascularisation plus fonctionnelle que dans les tumeurs U87, où les vaisseaux sont très denses mais présentent une lumière plus fermée *(cf figure 25)*. D'autre part, en accord avec la différence d'hypoxie, nous avions constaté au cours d'expérimentations préalables, que les xénogreffes GBM Nan1 étaient plus radiosensibles que les xénogreffes U87 *(393)*.

Même si la différence n'atteint pas toujours le seuil de significativité statistique, l'ensemble des paramètres étudiés évoluent dans le sens d'une réduction de l'hypoxie tumorale lorsque les animaux reçoivent un traitement par rHuEPO. En particulier, les pO_2 moyennes sont multipliées par un facteur 1,5 (5,0 ± 4,4 mmHg *vs* 8,1 ± 4,9 mmHg ; $p = 0,027$) pour la lignée GBM Nan1, et 2 (1,9 ± 0,8 mmHg *vs* 3,7 ± 3,0 mmHg ; $p = 0,040$) pour la lignée U87. La pO_2 médiane double pour la lignée GBM Nan1, passant de 2,3 ± 1,5 mmHg à 4,4 ± 3,9 mmHg.

Le traitement par rHuEPO conduit principalement à une réduction statistiquement significative de la fraction hypoxique < 2,5 mmHg. Ainsi, dans les tumeurs traitées, la fraction hypoxique diminue de 20% (58,5 ± 4,4% *vs* 8,1 ± 4,9% ; $p = 0,027$) pour la lignée GBM Nan1 et de 10% (91,5 ± 8,3% *vs* 81,6 ± 13,4% ; $p = 0,035$) pour la lignée U87. La fraction hypoxique < 5 mmHg est également réduite mais de façon moins marquée.

La réduction de la fraction hypoxique < 2,5 mmHg par l'administration d'rHuEPO offre des perspectives intéressantes en terme de radiosensibilité. En effet, pour les pO_2 tissulaires comprises entre 1 et 5 mmHg, une variation même légère de la pO_2 se traduit par une augmentation notoire de la radiosensibilité *(cf figure 8)*. Par exemple, lorsque la pO_2 tissulaire chute en deçà de 2,5 mmHg, la radiosensibilité n'atteint que le tiers de son maximum, tandis que pour une pO_2 égale à 5 mmHg, la radiosensibilité atteint déjà 55% de son maximum *(73)*.

En 1996, Kelleher et *coll.* avaient démontré que l'rHuEPO pouvait améliorer l'état d'oxygénation de tumeurs murines greffées chez le rat, mais les auteurs n'avaient obtenu un effet positif sur l'oxygénation tumorale que chez des animaux anémiés *(14)*. Ils montraient

alors que l'rHuEPO permettait d'empêcher, en partie seulement, la survenue d'une hypoxie tumorale résultant de l'apparition d'une anémie : ainsi, la pO_2 médiane avoisinait environ 10 mmHg pour les rats témoin, 0,7 mmHg pour les rats anémiques, et 2,8 mmHg pour les rats dont l'anémie avait été prévenue par l'administration d'rHuEPO.

A l'inverse, les auteurs ne montraient pas de bénéfice sur l'oxygénation tumorale chez les animaux recevant de l'rHuEPO n'ayant pas été anémiés (pO_2 médiane : environ 10 mmHg) *(14)*.

Ainsi, ces données antérieures sont discordantes avec les résultats que nous avons obtenus. La discordance entre les deux études peut résulter de la différence de schéma d'administration de l'rHuEPO, et de ses répercussions sur la viscosité sanguine et le flux sanguin tumoral.

Lorsque l'on augmente la masse de globules rouges circulant dans le sang, l'avantage obtenu en terme de transport de l'oxygène peut être contrebalancé par l'augmentation de la viscosité sanguine, provoquant alors une diminution du flux sanguin tumoral *(399)*. Avec le protocole d'administration (6 injections de 1000 UI/kg, réparties sur 14 jours) utilisé par Kelleher et *coll.*, l'augmentation rapide (en 14 jours) et très importante (30%) du taux d'hémoglobine s'accompagnait chez les animaux non anémiés, d'une diminution significative du flux sanguin tumoral. La disponibilité en oxygène pour les tumeurs n'était alors pas augmentée sous traitement par rHuEPO *(14)*.

A l'inverse, les résultats obtenus par Joiner et *coll.* qui utilisaient un protocole d'administration (150 à 600 UI/kg/jours 5 jours/7 pendant 28 jours) comparable au nôtre *(366)*, ne montraient pas de modification du flux sanguin tumoral. Ces résultats nous permettent de penser que, selon notre schéma d'administration, l'rHuEPO n'a pas induit d'altération du flux sanguin tumoral, et ce, probablement parce que l'augmentation des taux d'hémoglobine est plus progressive.

Toutefois, l'augmentation ou non de la viscosité sanguine en fonction du schéma d'administration retenu n'est probablement pas la seule explication car Blackwell *et coll.*, malgré une administration intensive de l'rHuEPO (6 injections de 2000 UI/kg, réparties sur 18 jours) ont observé une amélioration de l'oxygénation tumorale chez des rats non anémiques recevant de l'rHuEPO *(397)*.

1.3. Validation de l'effet avec un autre protocole

L'effet de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale est indubitablement un effet au long cours, nécessitant plusieurs semaines de traitement pour qu'il devienne probant.

Toutefois, selon notre approche, l'administration d'rHuEPO a débuté quand les tumeurs étaient encore de taille réduite, et les injections ont été poursuivies tout au long de la croissance précoce des tumeurs. Cette méthodologie peut conditionner le développement d'un

micro-environnement tumoral particulier, lors de la phase initiale de croissance des xénogreffes.

Il était donc intéressant de déterminer si l'effet de l'rHuEPO sur l'oxygénation tumorale était dépendant du stade de développement tumoral au moment de l'initiation du traitement. Pour cela, nous avons évalué l'effet de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale en utilisant un protocole d'administration différent.
Pour cette partie du travail, les injections d'rHuEPO n'ont débuté qu'à J_1 (volume tumoral 250 ± 50 mm^3) et ont été réitérées pendant 4 semaines, à l'issue desquelles les mesures de pO_2 ont ainsi été réalisées sur des tumeurs de volume plus important (volume > 1000 mm^3) *(tableau 28).*

Tableau 28 : Effet de l'rHuEPO sur la pression partielle en oxygène de xénogreffes GBM Nan1 après administration tardive de l'rHuEPO.

	n	**Taux d'Hémoglobine (g/dL)**		**pO_2 médiane (mmHg)**		**Fraction hypoxique < 2,5 mmHg (%)**	
		Moy. ± Ec.-type	*p*	Moy. ± Ec.-type	*p*	Moy. ± Ec.-type	*p*
Témoin	*5*	14,3 ± 0,3	*0,043*	1,4 ± 0,5	*0,018*	82,3 ± 7,8	*0,029*
RHuEPO	*6*	16,0 ± 1,3		3,7 ± 1,7		36,9 ± 33,6	

n : nombre de tumeurs par groupe.
p : Comparaison entre groupe témoin et groupe traité par rHuEPO en utilisant le test non paramétrique non apparié *U de Mann & Whitney.*

Comme avec le premier protocole, le taux d'hémoglobine est augmenté de façon significative chez les souris traitées par rHuEPO. Parallèlement, la pO_2 médiane est significativement augmentée, et la fraction hypoxique < 2,5 mmHg significativement réduite. Ces résultats montrent que le bénéfice apporté par l'rHuEPO existe même pour des tumeurs déjà avancées, indiquant que l'effet préalablement observé n'était pas uniquement associé à l'initiation précoce du traitement.

2- Relation entre taux d'hémoglobine et pression partielle en oxygène

Nous avons cherché à savoir si une relation directe existait entre le taux d'hémoglobine et la pression partielle en oxygène en considérant chaque tumeur individuellement. Afin d'obtenir une gamme de concentrations en hémoglobine et une gamme de pressions partielles en oxygène les plus larges possibles, l'analyse a été réalisée sur la lignée GBM Nan1, et nous avons compilé des données obtenues pour des tumeurs témoin avec des données obtenues pour des tumeurs traitées par rHuEPO *(figure 31).*

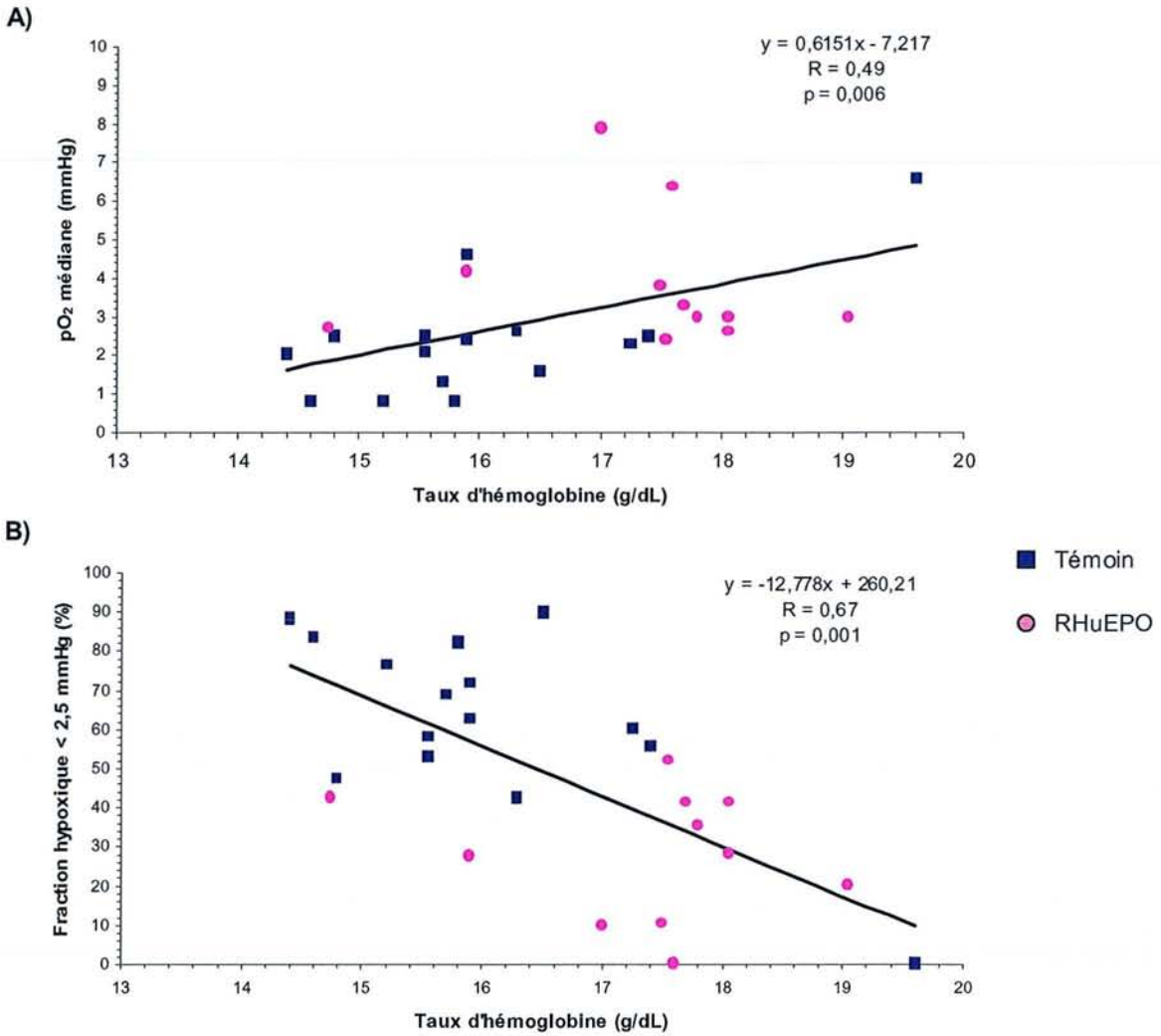


Figure 31: **A)** Corrélation entre le taux d'hémoglobine et la pO_2 médiane ou **B)** Corrélation entre le taux d'hémoglobine et la fraction hypoxique inférieure à 2,5 mmHg. Chaque point correspond à une tumeur individuelle pour laquelle a été mesurée la pO_2 puis le taux d'hémoglobine. Les tumeurs témoin et les tumeurs traitées par rHuEPO ont été distinguées. Pour l'analyse statistique, nous avons utilisé le *test de corrélation des rangs de Spearman*.

Selon une analyse globale, les deux graphiques montrent que les souris recevant l'rHuEPO présentent les taux d'hémoglobine les plus élevés et portent les tumeurs les moins hypoxiques. De plus, nous avons observé une corrélation significative entre le taux d'hémoglobine et la pO_2 médiane, ainsi qu'entre le taux d'hémoglobine et la fraction hypoxique < 2,5 mmHg.

Nous avions préalablement montré que l'administration d'rHuEPO n'influençait pas la densité vasculaire et que la vascularisation tumorale était comparable entre les tumeurs des

deux groupes, suggérant qu'une meilleure angiogenèse tumorale ne peut pas être la cause principale de l'effet observé. Ainsi, contrairement aux conclusions d'une étude récente qui suggérait que l'effet de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale était indépendant de son effet sur l'hématocrite*(397)*, cette corrélation est en faveur d'une relation de cause à effet entre l'amélioration du transport de l'oxygène et la réduction significative de l'hypoxie tumorale, observée quand les tumeurs sont exposées à l'rHuEPO.

3- Evaluation des cellules hypoxiques viables à l'aide de marqueurs exogènes dérivés des nitro-imidazolés

La localisation de l'électrode sensible à l'oxygène à l'intérieur de la tumeur n'étant pas contrôlée au cours des mesures de pO_2, cette technique fournit une appréciation globale de l'oxygénation des tumeurs, mais ne permet pas de distinguer les mesures réalisées dans le tissu tumoral vivant de celles réalisées dans les zones de nécrose ou dans les zones hémorragiques qui ne présentent pas de pertinence radiobiologique.

Il était donc intéressant de compléter nos investigations par une évaluation de l'hypoxie tumorale au niveau cellulaire.

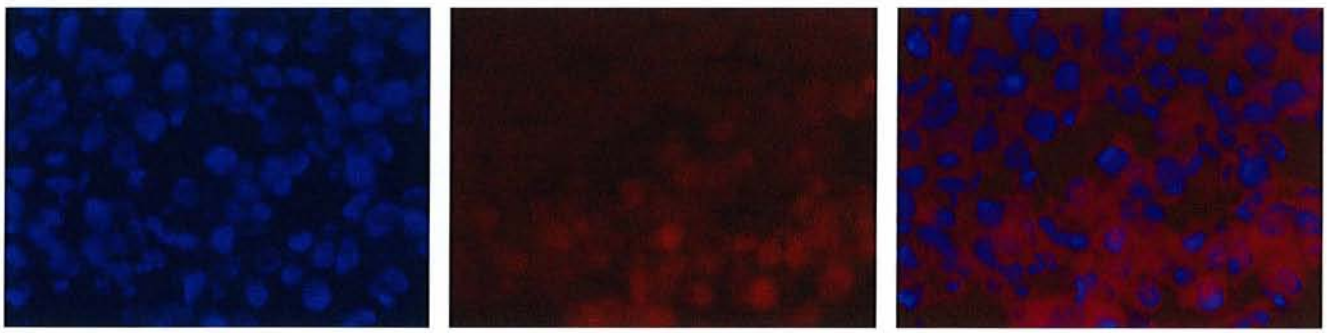
Les dérivés 2-nitro-imidazolés, tels que l'EF5 ou le pimonidazole, forment des adduits avec les macromolécules, essentiellement les protéines, dans les cellules hypoxiques, et ce, de façon proportionnelle au degré d'hypoxie *(167, 168)*. Durand *et coll.* ont démontré que les adduits d'EF5 étaient formés dans des cellules métaboliquement actives donc viables, mais non proliférantes, directement impliquées dans la radiorésistance tumorale *(400)*.

Nous avons donc évalué à J_1 la liaison de l'EF5 dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 recevant ou non de l'rHuEPO. La détection immunohistochimique des adduits d'EF5 a été effectuée avec l'anticorps ELK3.51 conjugué au fluorochome Cy3.

Cette partie du travail a été effectuée en collaboration avec les Docteurs E. Moyal et C. Toulas, (Unité INSERM U563, Institut Claudius Régaud, Toulouse). L'EF5 et l'anticorps ELK3.51 conjugué au Cy3 nous ont gracieusement été fournis par le Dr C. Koch (*Department of Radiation Oncology, University of Pennsylvania, Philadelphie, PA 19104, USA*).

3.1. Images de la liaison de l'EF5

Avant d'analyser le marquage de l'hypoxie tumorale par l'anticorps ELK3.51-Cy3, il est indispensable de s'assurer que la zone examinée correspond effectivement à une zone cellulaire. Pour cela, les noyaux des cellules ont été préalablement marqués au DAPI, colorant de fluorescence bleue, spécifique de l'ADN double brin *(figure 32)*.



DAPI **Cy3** **Superposition DAPI-Cy3**

Figure 32 : Validation des champs d'observation par recouvrement de la fluorescence rouge du Cy3, et de la fluorescence bleue du DAPI, caractéristique des noyaux des cellules. (Objectif 40X).

D'après la superposition des images de fluorescence bleue (DAPI) et rouge (Cy3), le signal de fluorescence rouge est visiblement plus diffus que le signal bleu, d'origine nucléaire. Le signal rouge semble d'origine cytoplasmique. Ces constatations confirment que la fluorescence du Cy3 observée correspond à la détection des adduits formés par les métabolites d'EF5 avec les protéines cytoplasmiques des cellules hypoxiques viables, conformément aux données de la littérature *(111, 167, 168, 174, 384)*.

La *figure 33* présente des images représentatives des observations faites pour les xénogreffes GBM Nan1 (A) ou U87 (B), témoin (1 et 3) ou traitées par RHuEPO (2 et 4). Les images 1 et 2 constituent une image moyenne de l'ensemble des images que nous avons enregistrées. Les images 3 et 4 sont caractéristiques du maximum de liaison de l'EF5 observé dans les deux groupes thérapeutiques.

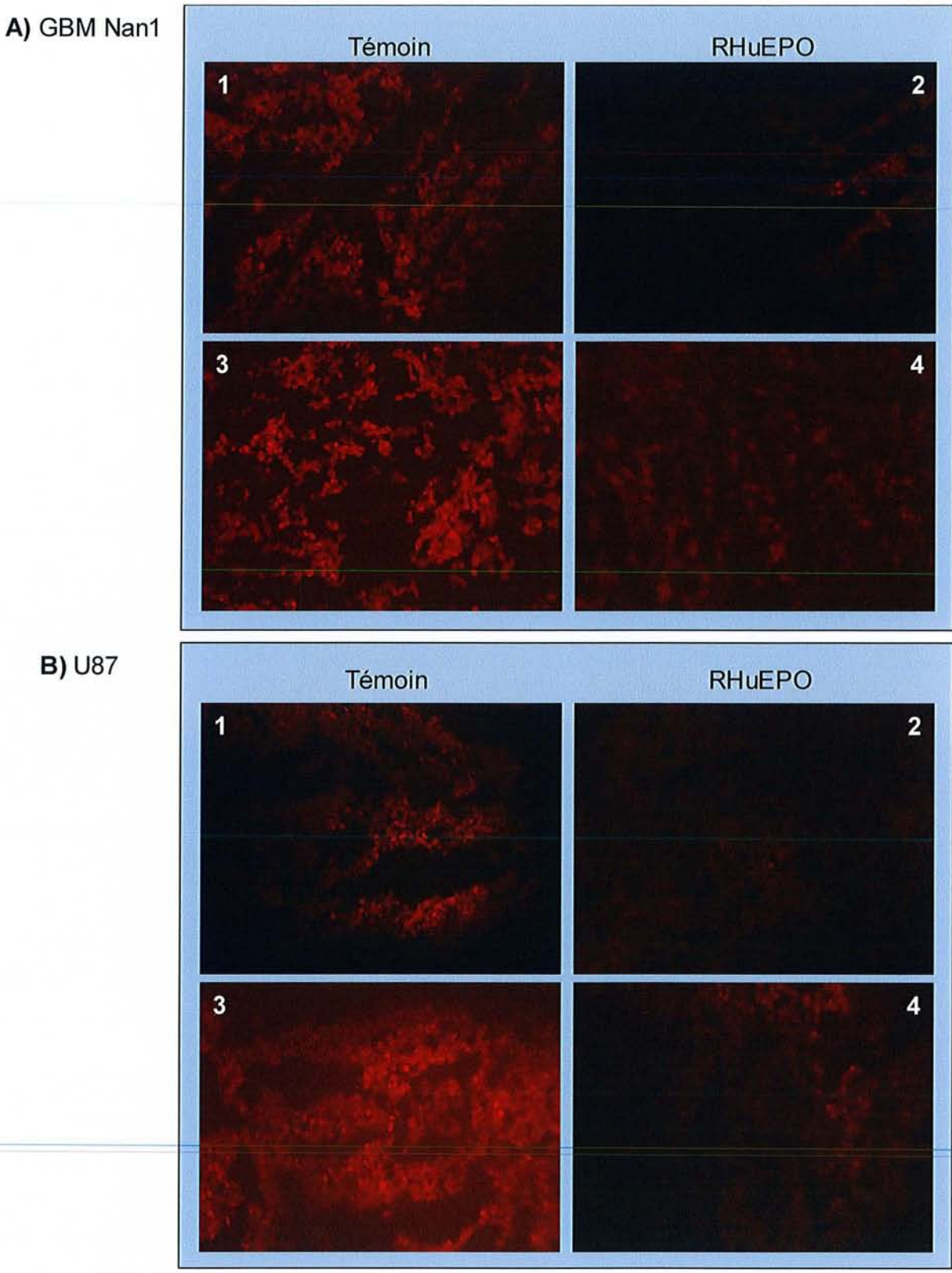


Figure 33 : Images représentatives de la liaison de l'EF5 dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 traitées ou non par rHuEPO, et prélevées à J_1. La détection immunohistochimique des adduits d'EF5 a été réalisée à l'aide de l'anticorps ELK3.51 conjugué au Cy3. Les images 1 et 2 constituent une image moyenne de l'ensemble des images que nous avons enregistrées. Les images 3 et 4 sont caractéristiques du maximum de liaison de l'EF5 observé dans les tumeurs témoin et les tumeurs traitées par rHuEPO. (Objectif 10 X).

D'une tumeur à l'autre au sein d'un même groupe thérapeutique, et au sein d'une même tumeur, la distribution et l'intensité de la liaison de l'EF5 varient de manière importante. Dans toutes les coupes histologiques, nous avons noté des zones où l'EF5 ne s'est pas lié, traduisant l'absence d'hypoxie. Conformément à ce que nous avons noté avec le *pO_2-Histograph*, aucune distribution systématique des plages d'hypoxie n'a été observée.

In vitro (168, 401, 402) et *in vivo (167)*, une relation directe entre l'intensité de fluorescence et le degré d'hypoxie a été mise en évidence. Dans les tumeurs témoin des deux lignées de gliomes, des zones avec une intensité de fluorescence élevée ont été identifiées, notifiant la présence de cellules très hypoxiques dans nos modèles de xénogreffe. Aucune comparaison n'a pu être faite entre les deux lignées car les expérimentations sur les deux lignées n'ont pas été menées simultanément.

Comparativement aux tumeurs témoin, les régions de liaison de l'EF5 sont moins étendues pour les tumeurs traitées par rHuEPO. La réduction de l'étendue des plages de liaison montre que l'administration d'rHuEPO permet de réduire, dans les tumeurs GBM Nan1 et U87, la proportion de cellules tumorales hypoxiques viables.

Comme l'illustre la *figure 34*, l'intensité de fluorescence moyenne et maximale des images enregistrées est également réduite dans les tumeurs traitées par rHuEPO.

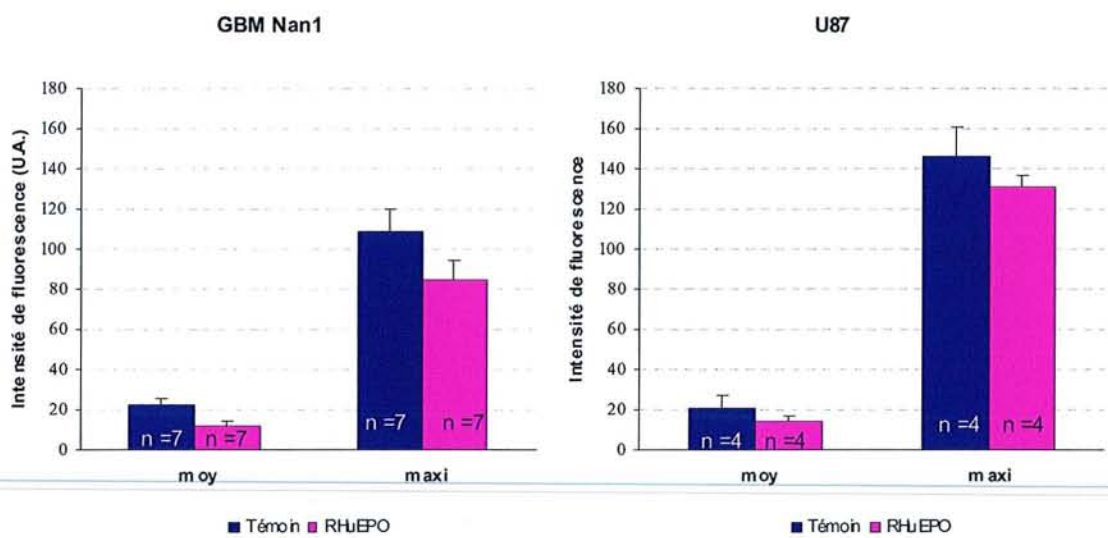


Figure 34 : Evaluation de la liaison de l'EF5 par l'intensité de fluorescence dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 recevant ou non un traitement par rHuEPO. A partir des 10 images acquises, les intensités de fluorescence moyenne et maximale ont été déterminées pour chaque tumeur. Les résultats représentent Moyenne ± Erreur Standard. *n*, nombre de tumeurs par groupe.

Dans les tumeurs traitées, la diminution du maximum d'intensité de fluorescence indique une augmentation faible mais globale de la concentration en oxygène dans les tumeurs.

3.2. Histogramme de distribution

Les images de fluorescence acquises ont été transformées en images à 256 niveaux de gris (0 à 255). Les niveaux de gris les plus élevés correspondent aux intensités de fluorescence les plus importantes. Ces images ont ensuite été divisées en un nombre constant de pixels (1392 x 1040), permettant d'obtenir une distribution du nombre de pixels en fonction des niveaux de gris. La *figure 35* représente, pour les deux lignées, la superposition des histogrammes moyens obtenus pour les groupes témoin et traités par rHuEPO.

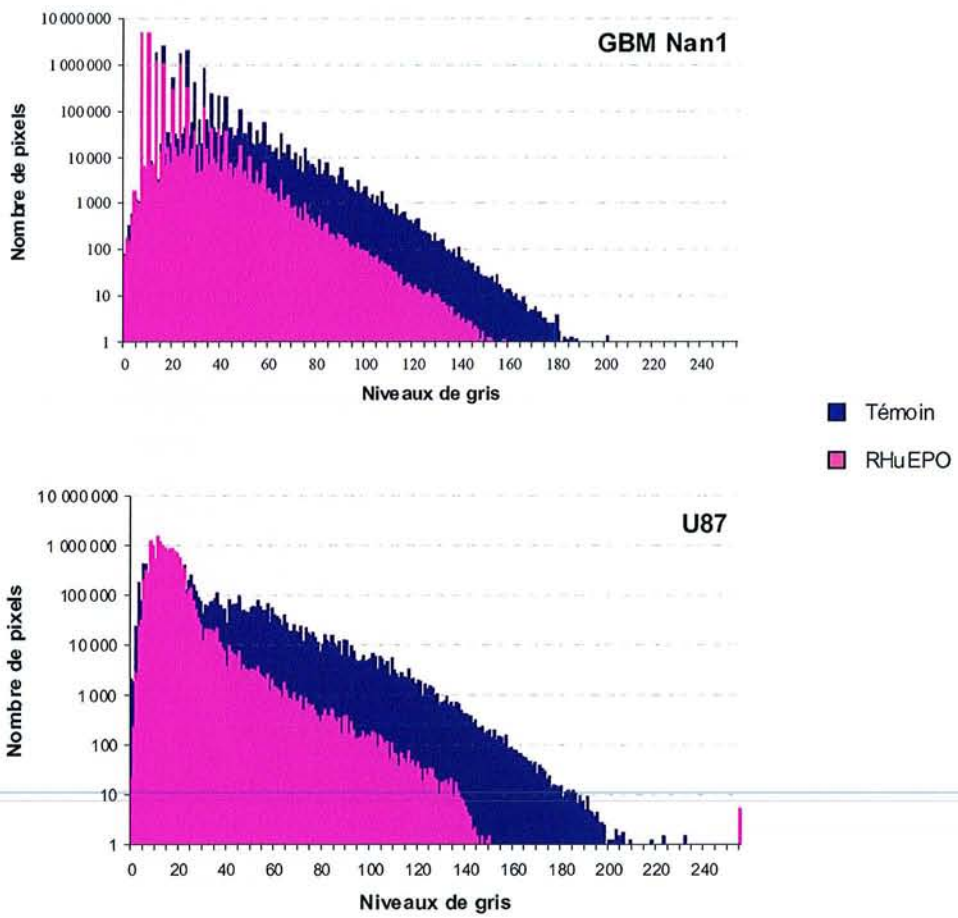


Figure 35 : Evaluation relative de la liaison de l'EF5 dans les tumeurs GBM Nan1 et U87. Les images de fluorescence ont été transformées en images à 256 niveaux de gris, les niveaux de gris élevés correspondant aux intensités de fluorescence les plus élevées.

L'analyse relative des images montre, pour les tumeurs traitées par rHuEPO, un déplacement vers la gauche de l'histogramme de distribution, comparativement aux tumeurs témoin. Ce décalage confirme la réduction de la liaison de l'EF5, tant en terme d'intensité qu'en terme d'étendue.

Nos résultats montrent que l'administration d'rHuEPO permet de réduire dans les tumeurs GBM Nan1 et U87, la proportion de cellules tumorales hypoxiques métaboliquement actives, donc viables, connues pour être directement impliquées dans la radiorésistance tumorale *(400)*. Il est intéressant de pouvoir agir sur ces cellules car elles ont également été décrites comme étant impliquées dans l'augmentation de l'agressivité des tumeurs. En raison de leur importante capacité à s'adapter aux conditions environnementales extrêmes (concentration en oxygène très faible, pH bas,...), leur phénotype se modifie et elles initient la formation de clones plus agressifs (acquisition de mutations supplémentaires favorisant la résistance aux traitements, clones plus aptes à envahir localement ou à distance) *(75, 196, 198)*.

4- Action de l'rHuEPO sur l'hypoxie chronique

Au moins deux formes d'hypoxie ont été identifiées dans les tumeurs :

- l'hypoxie aiguë qui résulte de l'altération temporaire de la perfusion sanguine tumorale et qui est considérée comme le phénomène majoritaire dans les tumeurs,
- et l'hypoxie chronique, qui résulte de la diffusion limitée de l'oxygène et de l'augmentation des distances entre deux vaisseaux perfusés *(4)*.

Les distances minimales séparant les vaisseaux sanguins perfusés (marqués au Hoechst 33342) et les cellules hypoxiques les plus proches (marquées à l'aide du pimonidazole) ont été analysées sur des coupes histologiques de xénogreffes de gliome malin humain *(106)*. Dans ce modèle, les distances minimales variaient de 90 à 140 µm. Les zones d'hypoxie étaient majoritairement situées entre 100 et 200 µm du vaisseau sanguin perfusé le plus proche. Au-delà de 200 µm, sont rencontrées des zones de nécrose *(106)*. Cette répartition, schématisée sur la *figure 36A*, peut varier légèrement d'un modèle tumoral à l'autre en fonction de l'activité métabolique des cellules tumorales *(107)*.

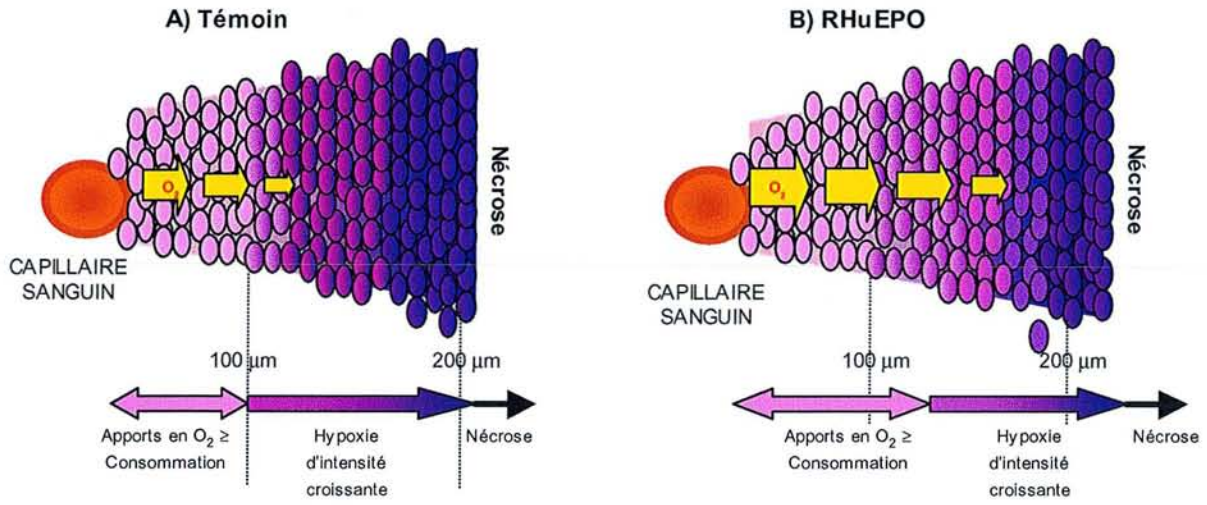


Figure 36 : Représentation schématique de la modification du gradient de diffusion de l'oxygène par l'rHuEPO.

Pour les deux modèles de gliomes malins xénogreffés, l'effet bénéfique de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale, évalué à l'aide du *pO_2-Histograph* ou par la technique de l'EF5 binding, reste modéré. En effet, même après le traitement par rHuEPO, la fraction hypoxique < 2,5 mmHg atteint encore 37% dans les xénogreffes GBM Nan1 et 80% dans les tumeurs U87.

L'rHuEPO, qui induit une amélioration des capacités de transport de l'O_2, augmente la quantité d'O_2 délivrée au niveau du tissu tumoral. Par conséquent, son mode d'action se limite probablement à une augmentation du gradient de diffusion de l'O_2 *(figure 36.B)*, pouvant expliquer que l'effet bénéfique de l'rHuEPO sur l'hypoxie reste modéré.

Dans les tumeurs U87, où l'hypoxie résulte d'une vascularisation très importante mais apparemment peu fonctionnelle, l'effet de l'rHuEPO a d'ailleurs été plus restreint que dans les tumeurs GBM Nan1 présentant une vascularisation visiblement plus fonctionnelle.

D- Influence de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale en cours d'irradiation

L'amélioration de l'oxygénation tumorale observée à J_1 laisse penser que lors de l'initiation de la radiothérapie, la tumeur pourra bénéficier d'une plus grande quantité d'oxygène, et l'efficacité radiochimique, voire radiobiologique, pourra être augmentée.

Néanmoins, l'irradiation n'étant jamais délivrée en dose unique, il n'est pas exclu que les dommages radio-induits, touchant notamment les cellules tumorales, les cellules endothéliales et les cellules impliquées dans le processus inflammatoire, perturbent le micro-

environnement tumoral, inhibant l'action bénéfique de l'rHuEPO sur l'hypoxie. Nous avons donc étudié le devenir de l'hypoxie tumorale après 5 fractions d'irradiation.

Les résultats sont représentés sur les *figures 37* (pO_2 moyenne et la pO_2 médiane) et *38* (fraction hypoxique < 2,5 mmHg et fraction hypoxique < 5 mmHg) pour les tumeurs GBM Nan1 et U87.

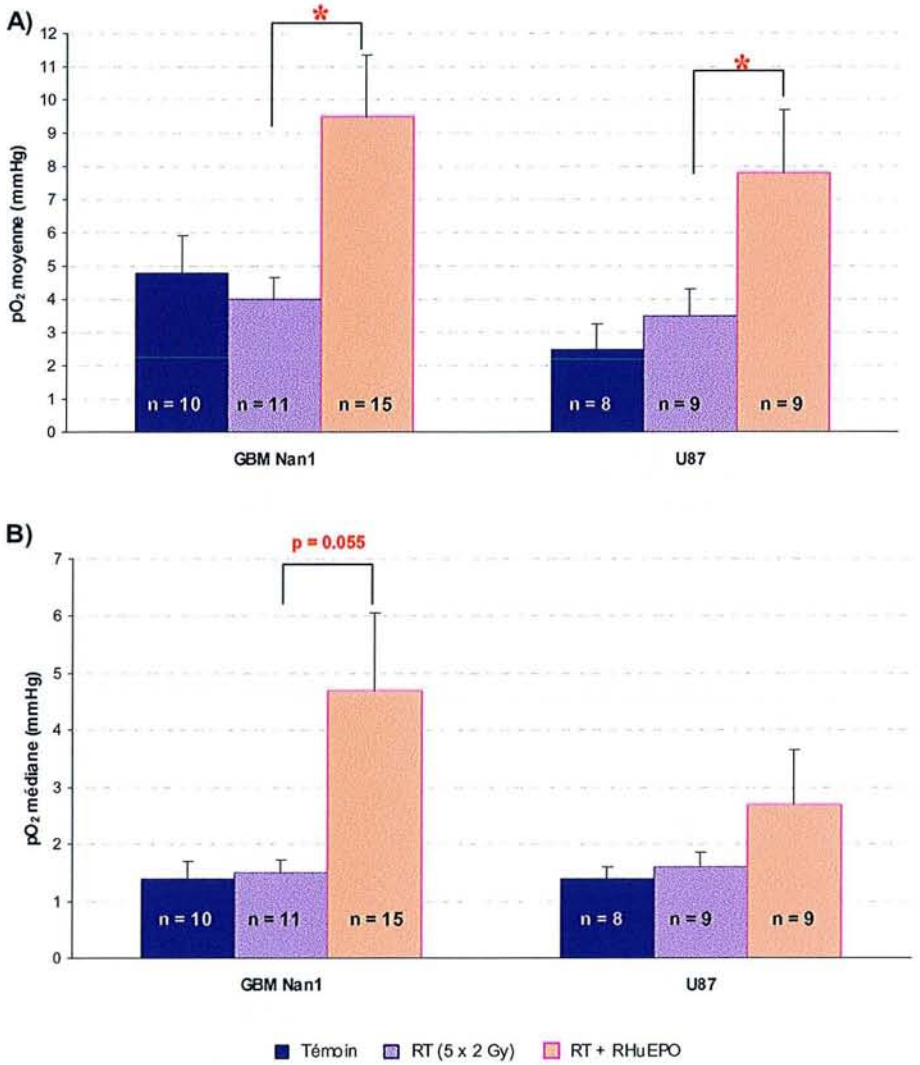


Figure 37 : **A)** PO_2 moyenne et **B)** pO_2 médiane mesurées après 5 fractions de 2 Gy (J_6) dans les tumeurs GBM Nan1 et dans les tumeurs U87 xénogreffées chez la souris *nude*. Les résultats représentent la Moyenne ± Erreur Standard. Pour l'analyse statistique, le test *U de Mann & Withney* a été appliqué. *n* : nombre de tumeurs par groupe. * $p < 0.05$.

Pour les deux modèles de gliomes malins étudiés, quel que soit le paramètre considéré, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le groupe RT et le groupe témoin. Les études pré-cliniques rapportées dans la littérature *(120, 121)* qui

utilisaient une irradiation fractionnée, ne montraient pas de variation des mesures de pO_2 lorsque les mesures étaient réalisées dans les 15 jours après l'initiation de la radiothérapie.

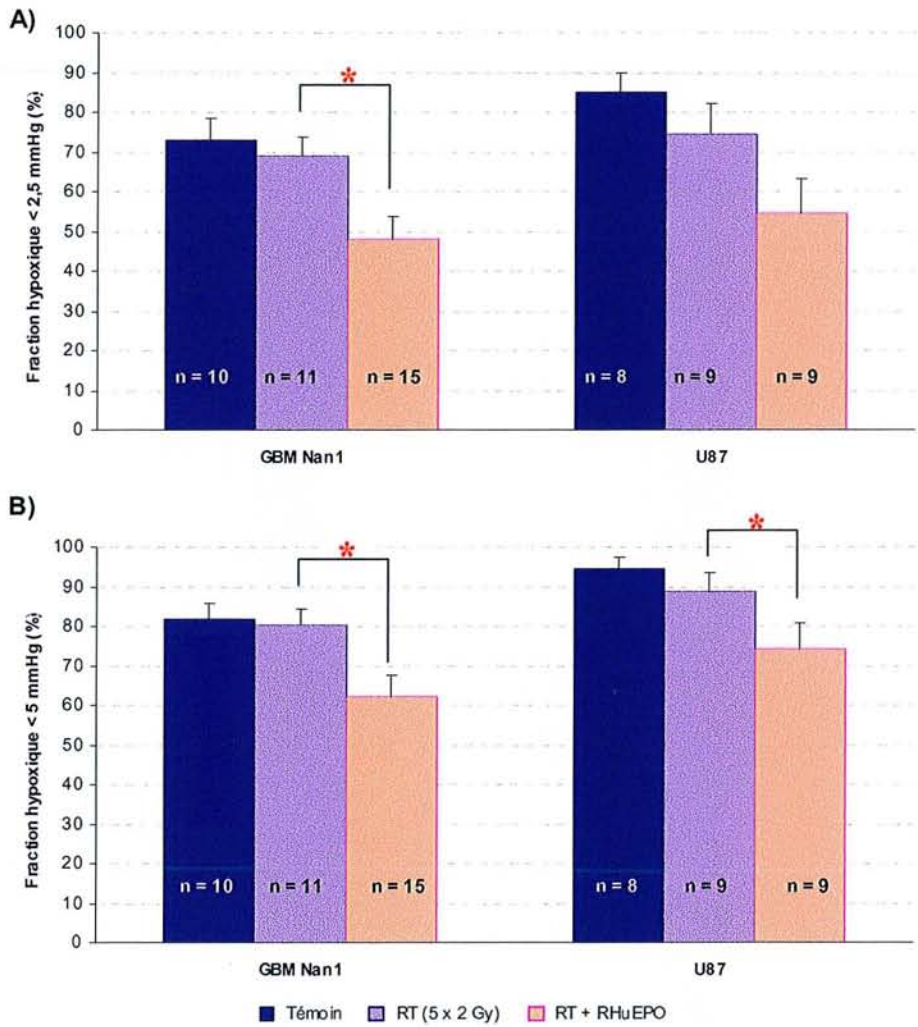


Figure 38 : **A)** Fraction hypoxique inférieure à 2,5 mmHg et **B)** fraction hypoxique inférieure à 5 mmHg mesurées après 5 fractions de 2 Gy (J_6) dans les tumeurs GBM Nan1 et dans les tumeurs U87 xénogreffées chez la souris *nude*. Les résultats représentent la Moyenne ± Erreur Standard. Pour l'analyse statistique, le test *U de Mann & Withney* a été appliqué. n : nombre de tumeurs par groupe. * $p < 0,05$.

L'absence de variation de la pression partielle en oxygène ne signifie pas pour autant que le traitement par radiothérapie n'a induit aucun effet sur l'hypoxie tumorale. Au contraire, l'irradiation modifie probablement l'oxygénation intra-tumorale mais les modifications, induites simultanément ou successivement, se produisent dans des sens opposés. Par exemple, la destruction de cellules par les radiations ionisantes s'accompagne probablement d'une réoxygénation locale, du fait d'une diminution de la consommation d'oxygène *(122)*, et éventuellement d'une diminution de la pression interstitielle et d'une réouverture des

vaisseaux *(123, 403)*. Mais parallèlement, les radiations ionisantes agissant sur les cellules endothéliales, les structures micro-vasculaires peuvent transitoirement ou définitivement être altérées, ce qui peut conduire à une aggravation de l'hypoxie locale *(123, 404)*.

Les données de la littérature qui relatent les changements de l'oxygénation tumorale après irradiation sont d'ailleurs très contradictoires quant à leurs conclusions, reflétant la complexité des effets des radiations sur le micro-environnement tumoral. Ainsi, un certain nombre d'études rapportent une réoxygénation des tumeurs *(116, 405, 406)*, tandis que d'autres démontrent une diminution de l'oxygénation, suivie d'un retour à la normale pendant les 24 à 72 h suivant l'irradiation *(117, 119)*. Sachant que ces études ont été réalisées après une irradiation unique en utilisant parfois une forte dose (10 à 65 Gy) *(116, 117, 119, 123, 405, 406)*, l'interprétation biologique est difficile.

Après 5 fractions d'irradiation, l'ensemble des paramètres étudiés montre une diminution de l'hypoxie tumorale dans les xénogreffes ayant reçu de l'rHuEPO, tant pour la lignée GBM Nan1 que pour la lignée U87. Cependant, après la radiothérapie, qui introduit un facteur de variabilité supplémentaire, les différences observées entre le groupe RT et le groupe RT + RHuEPO ne sont pas toujours significatives.

Une étude clinique récente a démontré que l'existence d'une hypoxie (définie dans cette étude par la présence de valeurs de $pO_2 < 5$ mmHg) en cours de traitement (à mi-RT, après 19,8 Gy), indépendamment du statut hypoxique avant irradiation, s'accompagnait d'une diminution significative de la survie globale (70% *vs* 50% de survie à 3 ans) chez des patientes atteintes de cancer du col de l'utérus *(340)*. Dans ce contexte, le fait que l'action de l'rHuEPO soit maintenue après 5 fractions d'irradiation rend cette stratégie particulièrement intéressante.

En clinique, les stratégies basées sur l'administration d'oxygène hyperbare, de carbogène (avec ou sans nicotinamide) ou de RSR13, visant à augmenter la disponibilité en oxygène pour radiosensibiliser les tumeurs, utilisent, autant que possible, un traitement réitéré, afin que chaque fraction d'irradiation soit réalisée dans les conditions d'oxygénation tumorale les plus favorables *(213, 228, 241)*. Le maintien, après 5 fractions d'irradiation, de l'effet positif apporté par l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale, suggère que chaque fraction d'irradiation successive pourrait bénéficier d'une plus grande quantité d'oxygène. D'après nos résultats, la poursuite du traitement par rHuEPO tout au long du traitement par radiothérapie fractionnée serait bénéfique à l'efficacité des radiations ionisantes.

En résumé

L'injection répétée d'rHuEPO a permis de stimuler l'érythropoïèse chez des souris nude non anémiées, aboutissant à une augmentation de la capacité de transport de l'oxygène par le sang.

Dans les deux modèles de gliomes malins étudiés, l'administration d'rHuEPO a également conduit à une augmentation de la pression partielle en oxygène dans les xénogreffes tumorales, et à une réduction de la proportion de cellules tumorales hypoxiques viables, décrites comme étant directement impliquées dans la radiorésistance et l'agressivité des tumeurs. La corrélation statistiquement significative que nous avons observée entre la concentration sanguine en hémoglobine et la pression partielle en oxygène, confirme l'existence d'un lien de cause à effet entre l'augmentation du transport de l'oxygène et la réduction de l'hypoxie tumorale. La réduction de l'hypoxie tumorale reste cependant modérée, et traduit probablement une modification du gradient de diffusion de l'oxygène dans les tumeurs traitées par l'rHuEPO.

L'ensemble des effets bénéfiques de l'rHuEPO sur le transport de l'oxygène et sur l'hypoxie tumorale ont été non seulement observés avant irradiation mais étaient également maintenus après 5 fractions d'irradiation.

III- CONSEQUENCES SUR L'EXPRESSION DU VEGF

L'angiogenèse est indispensable à la croissance et à la progression des tumeurs d'origine astrocytaire. En général, les lésions de haut grade sont associées à une prolifération vasculaire plus importante. Ainsi, la néovascularisation fait partie des critères OMS pour définir les glioblastomes (astrocytome grade IV) *(21)*.

Dans l'angiogénèse des gliomes malins de haut grade, l'implication du VEGF, puissant facteur pro-angiogénique, a largement été documentée. En particulier, une forte expression du VEGF a été identifiée dans plus de 80% des glioblastomes et dans 40 à 70% des astrocytomes anaplasiques, ces chiffres pouvant varier en fonction des études et de la technique de détection utilisée *(377)*. Mesurée dans le tissu tumoral, la concentration en VEGF est 250 fois plus élevée dans les glioblastomes que dans le cerveau sain *(27)*. Son expression a été corrélée à la densité vasculaire *(27, 377, 407)*. D'autre part, des études expérimentales ont montré que le blocage de l'activité du VEGF, à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique, permettait de réduire la vascularisation et de ralentir la croissance des glioblastomes malins greffés chez la souris *(151)*.

Même si elle n'est pas la seule cause de l'induction du VEGF *(408, 409)*, l'hypoxie constitue un stimulus majeur de l'expression du VEGF dans ces tumeurs. En effet, plusieurs études utilisant soit l'hybridation *in situ,* soit l'immunohistochimie ont montré que l'expression du VEGF était plus intense au niveau des cellules dites "périnécrotiques", c'est-à-dire au niveau des cellules tumorales ou endothéliales localisées au bord de la zone nécrotique, et soumises à de faibles pressions partielles en oxygène *(28, 143, 377, 410)*.

A- Expression des transcrits

1- Avant radiothérapie

L'administration d'rHuEPO ayant permis de réduire en partie l'hypoxie tumorale dans nos deux modèles de gliomes xénogreffés, nous nous sommes intéressés aux répercussions éventuelles de ce phénomène sur l'expression du VEGF, facteur qui a été envisagé dans plusieurs études comme facteur pronostique ou prédictif de réponse *(140)*.

Sachant que la régulation par l'hypoxie, de l'expression du VEGF se fait au niveau de la transcription et de la stabilité de l'ARNm *(154)*, nous avons tout d'abord analysé l'expression des transcrits du gène.

Parmi les six isoformes décrites pour le VEGF (isoformes 121, 145, 165, 183, 189, et 206 résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm), l'expression des variants 121, 165 et 189 a été retrouvée, selon des proportions variables, dans presque tous les tissus étudiés *(152, 154)*. Les amorces oligonucléotidiques choisies pour réaliser la PCR correspondent à des séquences contenues dans l'exon 3 et dans l'exon 8, du gène et permettent de distinguer tous les variants issus de l'épissage alternatif de l'ARNm du VEGF. Dans nos conditions expérimentales, seuls les transcrits 121 et 165 ont été identifiés dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 xénogreffées, révélant une expression très majoritaire de ces deux variants. Le *tableau 29* résume les résultats obtenus.

Tableau 29 : Influence de l'rHuEPO sur l'expression des transcrits $VEGF_{165}$ et $VEGF_{121}$, deux isoformes diffusibles du VEGF avant irradiation (J_1).

		n	**$VEGF_{165}$** Moyenne ± Ecart- Type	**$VEGF_{121}$** Moyenne ± Ecart- Type
GBM Nan1	Témoin	5	1,08 ± 0,23	3,28 ± 0,70
	rHuEPO	5	0,62 ± 0,18	2,06 ± 0,53
U87	Témoin	5	3,47 ± 0,81	3,47 ± 0,64
	rHuEPO	6	2,80 ± 0,82	3,28 ± 0,99

Les résultats représentent des ratios d'expression relative VEGF / GAPDH. *n* : nombre de tumeurs par groupe.

Les isoformes 121, 165, 189 et 206 possèdent des capacités à diffuser dans la matrice extracellulaire différentes. Tandis que le $VEGF_{189}$ et le $VEGF_{206}$ sont séquestrés à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire, les isoformes 121 et 165 correspondent aux formes capables de diffuser librement et possèdent la plus grande capacité à stimuler l'angiogenèse *(152, 154)*. Par ailleurs, ces isoformes sont toutes deux impliquées directement dans la tumorigénèse des gliomes malins *(378, 411)*. Nous avons donc réalisé une analyse globale concernant le VEGF diffusible, en additionnant les *ratio* obtenus pour les deux isoformes *(figure 39)*.

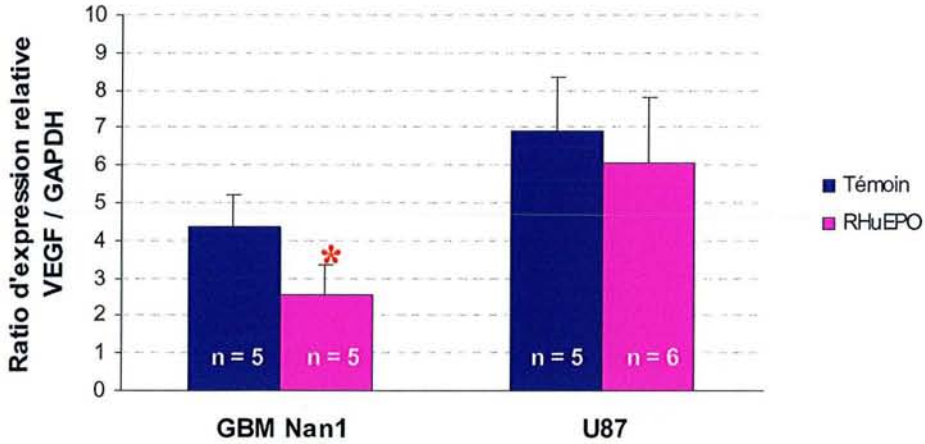


Figure 39 : *Ratio* d'expression relative des transcrits du VEGF diffusible (variants 121 + 165) dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 traitées ou non par rHuEPO avant irradiation (J_1). Les résultats représentent des *ratio* d'expression relative VEGF/GAPDH, et sont exprimés sous forme Moyenne ± Ecart-Type. *n* : nombre de tumeurs par groupe. * $p < 0,05$ (*test U de Mann & Withney*).

Dans les tumeurs témoin, l'expression de l'ARNm du VEGF diffusible est plus élevée dans les tumeurs U87 que dans les tumeurs GBM Nan1. Cette observation corrobore la différence d'hypoxie notée entre les deux lignées tumorales.

Pour la lignée GBM Nan1, nous avons observé une diminution statistiquement significative concernant l'expression des transcrits du VEGF diffusible dans les tumeurs traitées par rHuEPO. Cette diminution d'environ 40% résulte d'une diminution de l'expression des deux isoformes 165 et 121 *(tableau 29)*.

Pour la lignée U87, aucune variation significative n'a pu être mise en évidence. Ceci peut s'expliquer par le fait que la réduction de l'hypoxie tumorale attribuée à l'rHuEPO était de faible amplitude (environ 10%). De plus, des études ont démontré que l'induction de l'expression du VEGF dans les cellules U87 n'était pas seulement due à l'hypoxie, mais qu'elle résultait également de l'activation oncogénique du récepteur à l'EGF ou de l'inactivation du gène PTEN *(408, 409)*.

2- En cours d'irradiation

Etant donné que l'effet bénéfique de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale a été également observé à J_6, nous avons évalué l'expression des transcrits du VEGF après 5 fractions d'irradiation. Le *tableau 30* présente les résultats obtenus pour les variants 121 et 165.

Tableau 30 : Influence de l'rHuEPO sur l'expression des transcrits $VEGF_{165}$ et $VEGF_{121}$, deux isoformes diffusibles du VEGF après 5 fractions d'irradiation (J_6).

		n	**$VEGF_{165}$** Moyenne ± Ecart-Type	**$VEGF_{121}$** Moyenne ± Ecart-Type
GBM Nan1	Témoin	*4*	0,84 ± 0,14	2,54 ± 0,37
	RT	*3*	0,32 ± 0,12	1,60 ± 0,27
	RT + RHuEPO	*3*	0,19 ± 0,08	0,76 ± 0,21
U87	Témoin	*6*	2,44 ± 0,37	2,81 ± 1,23
	RT	*6*	2,35 ± 0,74	2,66 ± 0,81
	RT + RHuEPO	*6*	1,49 ± 0,34	2,20 ± 0,49

Les résultats représentent des ratios d'expression relative VEGF / GAPDH. *n* : nombre de tumeurs par groupe.

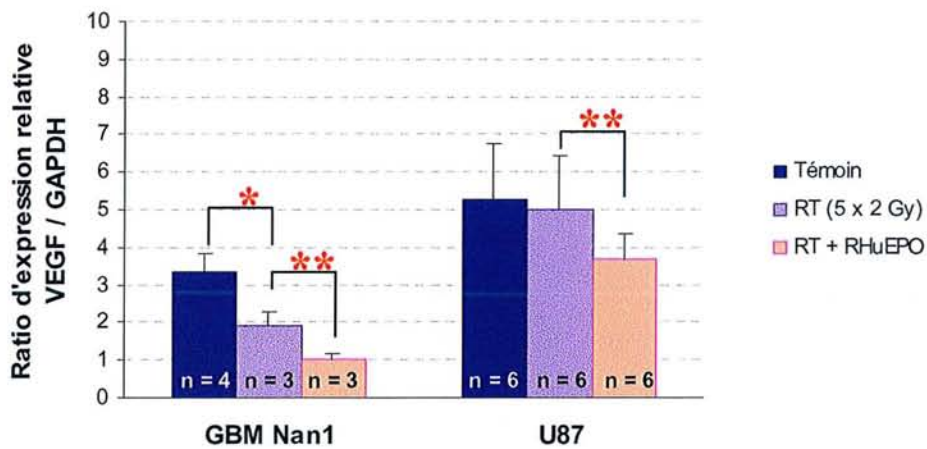


Figure 40 : *Ratio* d'expression relative des transcrits du VEGF diffusible (variants 121 + 165) dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 traitées ou non par rHuEPO après 5 fractions d'irradiation (J_6). Les résultats représentent des *ratio* d'expression relative VEGF/GAPDH, et sont exprimés sous forme Moyenne ± Ecart-Type. *n* : nombre de tumeurs par groupe. Pour l'analyse statistique, le test *U de Mann & Withney* a été appliqué. * comparaison RT *vs* Témoin, $p < 0,05$. ** comparaison RT *vs* RT + RHuEPO, $p < 0,05$.

Des études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont révélé que la radiothérapie provoquait une augmentation de l'expression protéique et de la sécrétion de VEGF *(387, 389, 412)*. En particulier, deux études ont étudié l'effet des radiations ionisantes sur des cellules U87 *in vitro (387, 389)*. La première publication rapporte que, 24 h après une irradiation de 10 Gy, la quantité de VEGF sécrété dans le milieu de culture est multipliée par 2 par rapport à des

cellules non irradiées *(387)*. La deuxième étude montre que la sécrétion de VEGF dans le milieu de culture augmente de manière dose-dépendante pour des irradiations comprises entre 0 et 20 Gy (0, 2, 5, 10, et 20 Gy), et ceci est vrai 18 , 24 , ou 48 h après irradiation *(389)*. Compte tenu des données de la littérature, nous pouvions nous attendre à observer une augmentation de l'expression des transcrits du VEGF dans les tumeurs irradiées. Au contraire, les résultats obtenus pour la lignée GBM Nan1 montrent une réduction significative de l'expression entre les tumeurs témoin et les tumeurs irradiées, et pour la lignée U87, aucune variation du taux de transcrits n'a été observée *(figure 40)*. Le fait d'utiliser une irradiation fractionnée au lieu d'une dose unique est peut-être à l'origine des divergences de résultats.

Par ailleurs, dans les tumeurs traitées par RT + RHuEPO, le taux de transcrits de VEGF diffusible était significativement plus faible que celui mesuré dans les tumeurs traitées par RT seule. Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec la réduction de l'hypoxie tumorale (en particulier, la fraction hypoxique < 5 mmHg) par l'rHuEPO après 5 fractions d'irradiation, suggérant une relation causale entre les deux évènements.

L'expression de l'ARNm du VEGF est sous la dépendance du facteur de transcription HIF-1 *(413)*. Alors qu'en conditions normoxiques, la sous-unité α de HIF-1 est très rapidement dégradée, en présence d'hypoxie, celle-ci est stabilisée, permettant l'activité transcriptionnelle de HIF-1 *(85-87)*. Dans les perspectives de ce travail, des investigations complémentaires concernant l'expression de HIF-1α sont donc envisagées afin de confirmer l'existence d'une relation de cause à effet entre la réduction de l'hypoxie et la réduction de l'expression des transcrits du VEGF.

B- Expression protéique du VEGF

Parallèlement à l'étude des transcrits du VEGF, nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine. Pour cela, nous avons utilisé une approche par western-blot en utilisant un anticorps dirigé contre le VEGF humain.

De nombreux problèmes méthodologiques ont été rencontrés et à l'heure actuelle, tous n'ont pas été solutionnés. Néanmoins, ayant fait l'objet de plusieurs semaines d'investigation, nous tenions à mentionner les quelques observations récurrentes, que nous avons pu faire pour la lignée GBM Nan1.

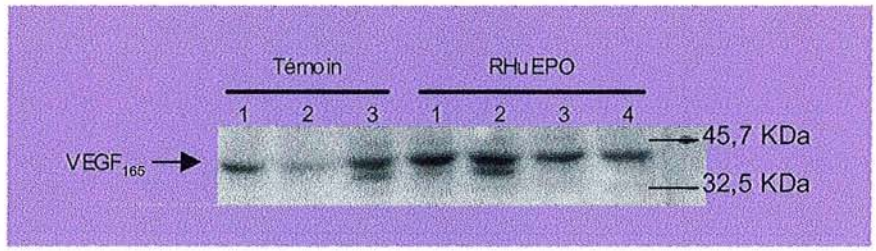


Figure 41 : Film d'autoradiographie représentant l'expression du VEGF dans des tumeurs GBM Nan1. L'expression a été appréciée dans 3 tumeurs témoin et 4 tumeurs traitées par rHuEPO dont le volume atteignait environ 1100 mm^3.

Nous avons pu constater des variations importantes du niveau d'expression du VEGF entre les tumeurs d'un même groupe *(figure 41)*. De plus, pour certaines tumeurs, nous avons observé plusieurs bandes, correspondant aux différentes isoformes majoritaires du VEGF. En effet, d'après les indications du fournisseur, l'anticorps était dirigé contre un épitope correspondant aux acides aminés 1 à 140, séquence commune à toutes les isoformes du VEGF.

Pour réduire les difficultés de lecture liées à la variabilité inter-tumorale, pour chaque bras thérapeutique, nous avons mélangé les extraits protéiques de deux à trois tumeurs prises au hasard. Cette approche fut le seul moyen d'effectuer des observations inter-groupes.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'expression du VEGF dans les tumeurs GBM Nan1 en fonction de leur volume tumoral *(figure 42)*.

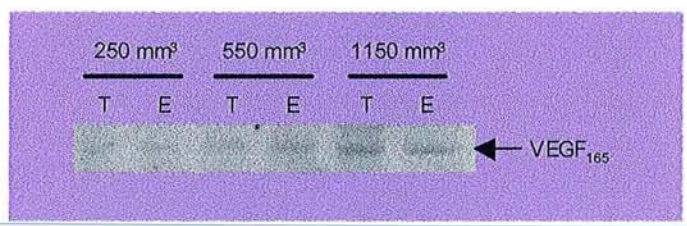


Figure 42 : Expression protéique du VEGF en fonction du volume tumoral, dans des tumeurs GBM Nan1 témoin (T) et traitées par l'rHuEPO (E).

Nous avons constaté que l'expression du VEGF augmentait lorsque les tumeurs étaient de plus gros volume. Cette observation est cohérente avec le rôle prépondérant que joue le VEGF dans la prolifération tumorale des gliomes malins de haut grade *(379)*.

La *figure 43* représente l'expression du VEGF dans les xénogreffes GBM Nan1 appartenant aux différents bras thérapeutiques étudiés.

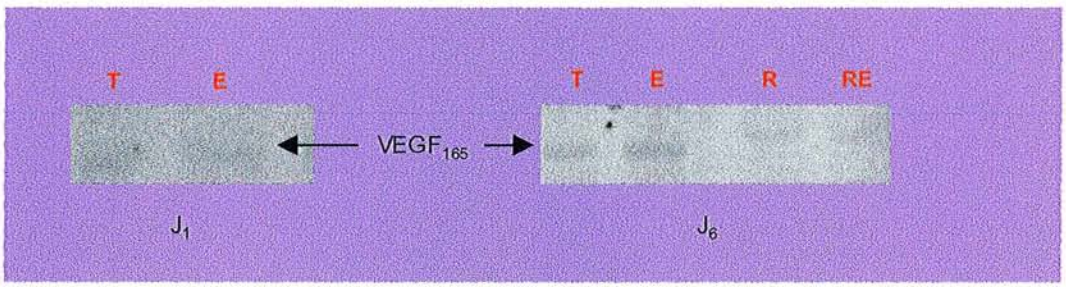


Figure 43 : Influence de l'rHuEPO sur l'expression du VEGF dans des tumeurs GBM Nan1 à J_1 et à J_6. Les abréviations utilisées sont : **T** : tumeurs témoin ; **E** : tumeurs traitées par rHuEPO ; **R** : tumeurs traitées par radiothérapie ; **RE** : tumeurs traitées par radiothérapie et rHuEPO.

Nous n'avons pas observé de différence notoire entre les tumeurs recevant ou non un traitement par rHuEPO. Le film autoradiographique correspondant aux tumeurs prélevées à J_6 suggère éventuellement une légère extinction du signal dans les xénogreffes GBM Nan1 irradiées (avec ou sans rHuEPO) par rapport aux tumeurs témoin.

Cependant, aucune interprétation rationnelle ne peut être faite à partir de ces investigations, compte tenu des nombreux problèmes méthodologiques irrésolus. Tout d'abord, les bandes que nous avons observées correspondaient à des protéines dont le poids moléculaire était de l'ordre de 45 KDa. Cette taille est cohérente avec le fait que toutes les isoformes du VEGF sont sécrétées sous forme d'homodimère de 32 à 46 KDa. Néanmoins, les homodimères sont stabilisés par des ponts disulfure *(414)*: or, lors de la préparation de nos échantillons, nous avons travaillé en conditions réductrices en ajoutant du dithiotréitol.

Nous pensons que l'utilisation d'anticorps plus spécifiques des différentes isoformes permettrait une meilleure identification de ces isoformes et rendrait l'interprétation plus aisée. De plus, nous sommes conscients de la nécessité d'envisager une approche semi-quantitative de l'expression du VEGF, par rapport à une protéine de référence.

Pour pouvoir quantifier avec une meilleure sensibilité, l'influence des traitements sur l'expression du VEGF dans nos modèles tumoraux, nous pourrions envisager une seconde approche méthodologique : l'ELISA (*enzyme linked immunoassay*).

Dans l'éventualité où l'rHuEPO permettrait de réduire l'expression du VEGF au niveau protéique, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'rHuEPO sur d'autres facteurs, tels que les métalloprotéinases de la matrices ou les activateurs du plasminogènes, qui, comme le VEGF, sont impliqués dans l'agressivité tumorale et induits par l'hypoxie *(415)*.

En résumé

Dans nos conditions expérimentales, seuls les transcrits codant pour le $VEGF_{121}$ et pour le $VEGF_{165}$ ont été identifiés dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 xénogreffées. Ces deux variants d'épissage majoritairement présents dans les xénogreffes de gliomes codent pour les deux isoformes capables de diffuser librement dans la matrice extracellulaire et aller interagir avec leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales.

Nos résultats montrent que l'administration répétée d'rHuEPO permet de diminuer l'expression des transcrits du VEGF diffusible, avant l'initiation de la radiothérapie et après cinq fractions d'irradiation. Les variations de l'expression des transcrits du VEGF peuvent être mises en parallèle avec les variations de l'hypoxie tumorale.

Des investigations complémentaires concernant l'expression protéique des différentes isoformes du VEGF seraient nécessaires pour apprécier l'impact de l'rHuEPO sur la biologie des tumeurs.

III- EFFET DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR LA REPONSE A LA RADIOTHERAPIE

A- Etude *in vitro*

Parmi les nombreuses fonctions identifiées pour l'érythropoïétine dans le système hématopoïétique, l'hormone exerce un pouvoir anti-apoptotique sur les précurseurs érythrocytaires. Cette capacité à inhiber l'entrée en apoptose a également été décrite dans le cerveau : l'EPO en interagissant avec son récepteur protège les neurones contre la mort cellulaire induite par exemple par le glutamate ou le NO *(311, 312)*. Il était donc important d'évaluer les répercussions de l'rHuEPO sur la sensibilité des cellules tumorales à l'égard des radiations ionisantes. Afin d'étudier l'effet direct de l'rHuEPO sur les cellules tumorales, nous avons réalisé des expérimentations *in vitro* sur la lignée U87.

Nous avons utilisé la méthode de clonage en dilutions limites, préalablement publiée par Bernhard *et coll. (382)* et reprise par Delmas *et coll. (383)*. Cette méthode est principalement utilisée quand le clonage en double couche d'agar ou en fond de boîte est rendu difficile en raison d'une altération de l'adhésion des cellules. Les graphiques A et B de la *figure 44* représentent la fraction de puits négatifs (en logarithme népérien) en fonction du nombre de cellules initialement ensemencées.

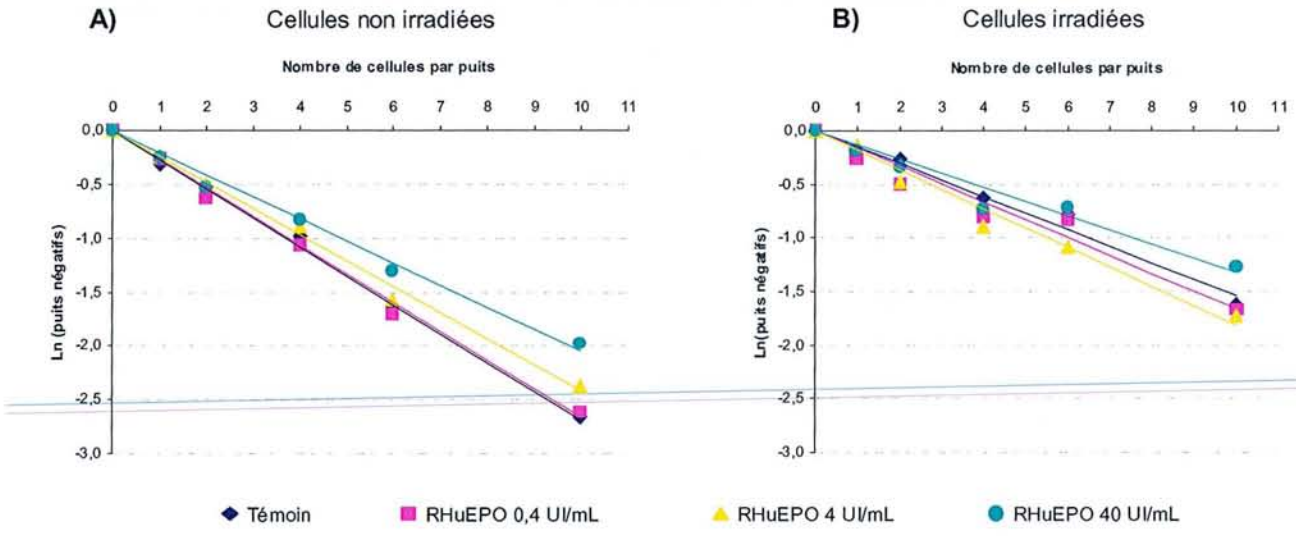


Figure 44 : Effet de l'rHuEPO (concentrations croissantes) sur la survie des cellules U87. **A)** Cellules non irradiées ou **B)** Cellules irradiées (2 Gy). Détermination de la survie cellulaire par la méthode de clonage en dilutions limites publiée par Bernhard *et coll. (382)*. La fraction de puits négatifs (= absence de formation de colonie) pour les différentes concentrations d'ensemencement permet d'obtenir une droite de régression. Chaque point représente la moyenne de 4 expérimentations indépendantes.

Les droites de régression ont été tracées pour chaque condition expérimentale (témoin + différentes concentrations d'rHuEPO pour des cellules irradiées ou non irradiées) : pour chaque traitement, la pente de la droite correspond à la fraction de survie des cellules U87, elle-même représentée sur la *figure 45*.

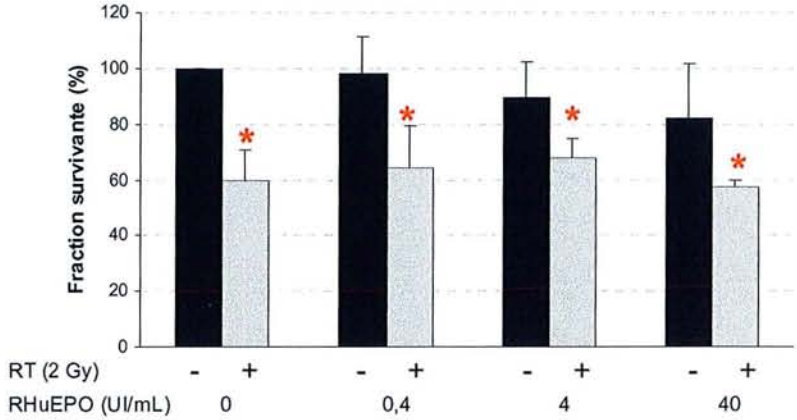


Figure 45 : Effet de l'rHuEPO (concentrations croissantes) et de la radiothérapie (2 Gy) sur la fraction survivante des cellules U87 déterminée par la méthode de clonage en dilutions limites. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin non traité (100%) et représentent la moyenne et les écarts-type obtenus à partir de 4 expérimentations indépendantes. L'analyse statistique a été réalisée en appliquant le test *U de Mann & Withney*. * $p < 0,05$.

Comme pour les expérimentations réalisées avec deux autres méthodes (MTT et comptage des cellules à l'hémocytomètre), nous n'avons pas observé de différence de survie entre les cellules exposées à l'rHuEPO et les cellules témoin.

Les radiations ionisantes à la dose de 2 Gy induisent une réduction significative de la survie cellulaire par rapport au témoin non traité (c'est-à-dire sans radiothérapie et sans rHuEPO). La fraction de survie à 2 Gy (SF_2) était d'environ 0,60. Pour cette lignée, considérée comme un bon modèle de glioblastome radiorésistant, des valeurs similaires ont préalablement été rapportées dans la littérature, pour des cellules cultivées en monocouche ou en sphéroïdes *(380, 416, 417)*.

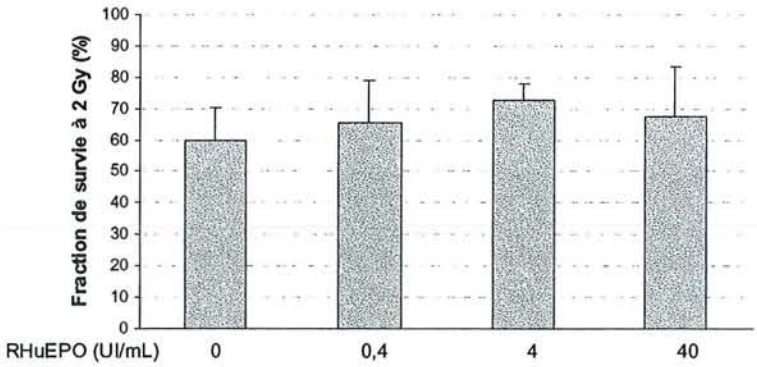


Figure 46 : Effet de l'rHuEPO sur la fraction survivante à 2 Gy (SF_2) des cellules U87. Les résultats sont normalisés par rapport au témoin non irradié et représentent la moyenne et les écarts-type obtenus à partir de 4 expérimentations indépendantes.

Nos résultats montrent également que la SF_2 n'est pas modifiée par l'exposition à l'rHuEPO *(figure 46)*, indiquant que l'rHuEPO n'exerce pas d'effet protecteur direct, vis-à-vis de l'action cytotoxique des radiations ionisantes.

B- Etude *in vivo*

Dès les années 50, les expérimentations de Gray *et coll.* démontraient que l'hypoxie tumorale constituait un facteur limitant à l'efficacité de la radiothérapie : *in vitro*, la dose de radiations ionisantes nécessaire en conditions hypoxiques, pour obtenir un effet cytotoxique donné sur des cellules tumorales, était 2,5 à 3 fois plus importante que celle nécessaire en présence d'oxygène *(6)*. L'importance de l'oxygénation tumorale sur la réponse à la radiothérapie a largement été confirmée sur des modèles animaux, ainsi que chez les patients. En clinique, plusieurs travaux ont démontré que la faible oxygénation tumorale était associée à un taux de contrôle tumoral local et à un taux de survie globale significativement plus faibles chez des patients cancéreux traités par radiothérapie *(8-11, 199)*.

L'rHuEPO ayant permis de réduire l'hypoxie tumorale dans les xénogreffes de gliomes malins, nous avons étudié l'influence de l'rHuEPO sur la réponse de ces mêmes tumeurs à la radiothérapie fractionnée. Pour s'approcher au mieux des modalités d'irradiation utilisées en clinique, nous avons choisi de traiter les tumeurs avec une dose totale de 40 Gy, délivrée à raison d'une fraction de 2 Gy par jour, 5 jours par semaine, pendant 4 semaines.

Sachant que la réduction de l'hypoxie tumorale par l'rHuEPO s'est poursuivie en cours d'irradiation, nous avons choisi de continuer l'adminitration de l'rHuEPO tout au long de la

radiothérapie. Ainsi, les souris ont reçu de l'rHuEPO (0,3 UI/g/j) durant 3 à 4 semaines avant l'initiation de la radiothérapie puis durant les 4 semaines d'irradiation.

1- Suivi du volume tumoral

Pour évaluer l'action antitumorale des traitements, nous avons suivi l'évolution du volume tumoral médian *(figure 47)*.

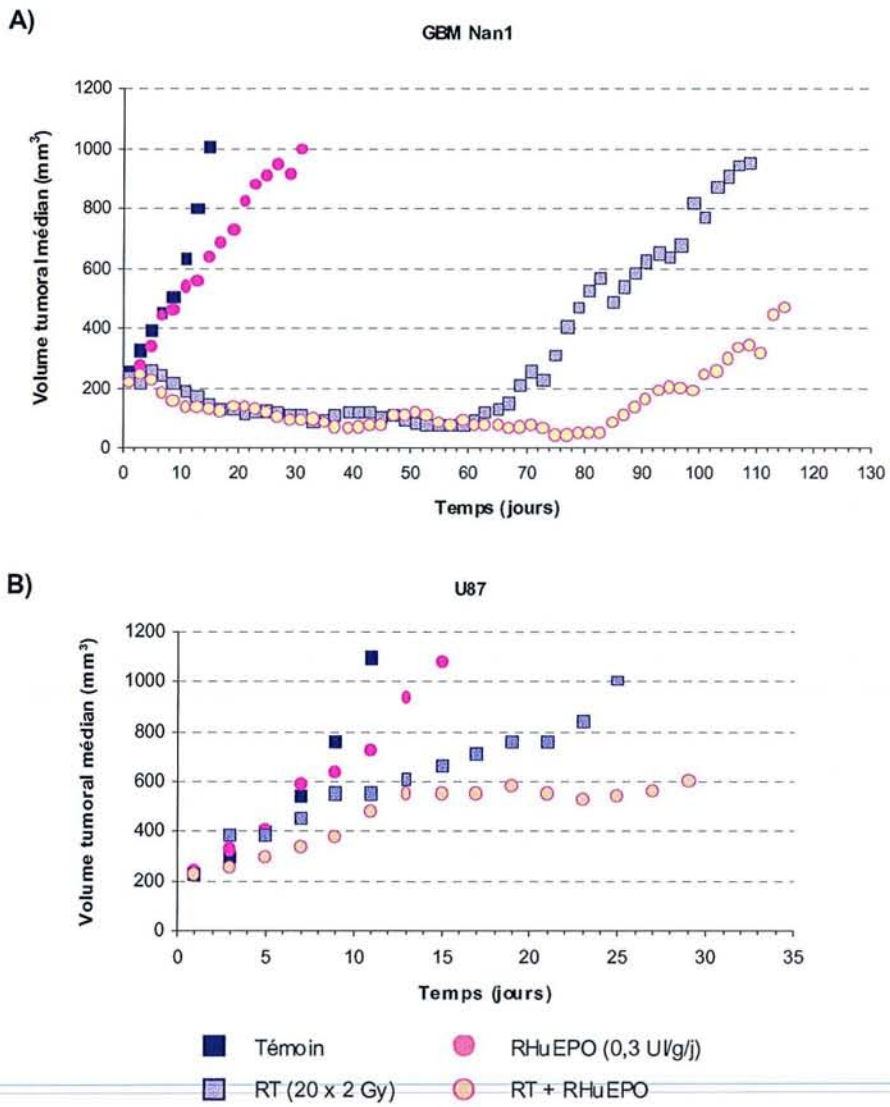


Figure 47 : Evolution du volume tumoral médian des tumeurs GBM Nan1**(A)** et U87 **(B)** xénogreffées chez la souris *nude*. Les quatre groupes thérapeutiques étudiés sont : témoin, rHuEPO, RT et RT + RHuEPO.

Pour les deux modèles de gliomes malins xénogreffés, la radiothérapie induit un retard de croissance des tumeurs. Toutefois, en accord avec la différence de radiosensibilité

visible entre les deux lignées, des différences concernant leur profil de croissance ont été relevées.

Pour les tumeurs GBM Nan1, dès les premières fractions, la radiothérapie induit un arrêt de la prolifération tumorale, et le volume tumoral en cours d'irradiation n'est plus égal qu'à la moitié du volume initial, indiquant qu'une partie du tissu tumoral est détruite par les radiations ionisantes. Malgré une bonne efficacité de la radiothérapie, aucune régression tumorale complète n'a jamais été observée, signifiant qu'il existe même dans la lignée la plus radiosensible, une sous-population de cellules tumorales particulièrement radiorésistante. L'arrêt de la prolifération tumorale se poursuit pendant plusieurs semaines après la fin de la radiothérapie. Puis, nous avons observé une recroissance tumorale.

En présence d'rHuEPO, la phase de recroissance des tumeurs est apparue plus tardivement et progresse plus lentement que pour les tumeurs traitées par radiothérapie seule.

Pour la lignée U87, au contraire, la croissance tumorale s'est poursuivie malgré l'initiation de l'irradiation.

Pour le groupe RT, le traitement induit simplement un ralentissement de la croissance des tumeurs, indiquant que seule une fraction des cellules proliférantes est détruite au fur et à mesure de leur multiplication.

Pour le groupe RT + RHuEPO, au bout d'une dizaine de jours, le volume tumoral médian atteint un plateau, indiquant un arrêt transitoire de la progression tumorale. Cet arrêt s'est poursuivi jusqu'à la fin de la radiothérapie. La recroissance tumorale a été plus ou moins rapide selon les tumeurs.

2- Courbes de Kaplan-Meier

Pour comparer l'efficacité du traitement lorsque la radiothérapie était délivrée seule ou en association avec l'rHuEPO, nous avons tracé les courbes de survie de Kaplan-Meier, en utilisant le "temps de triplement des tumeurs" comme critère de fin d'étude *(figure 48)*.

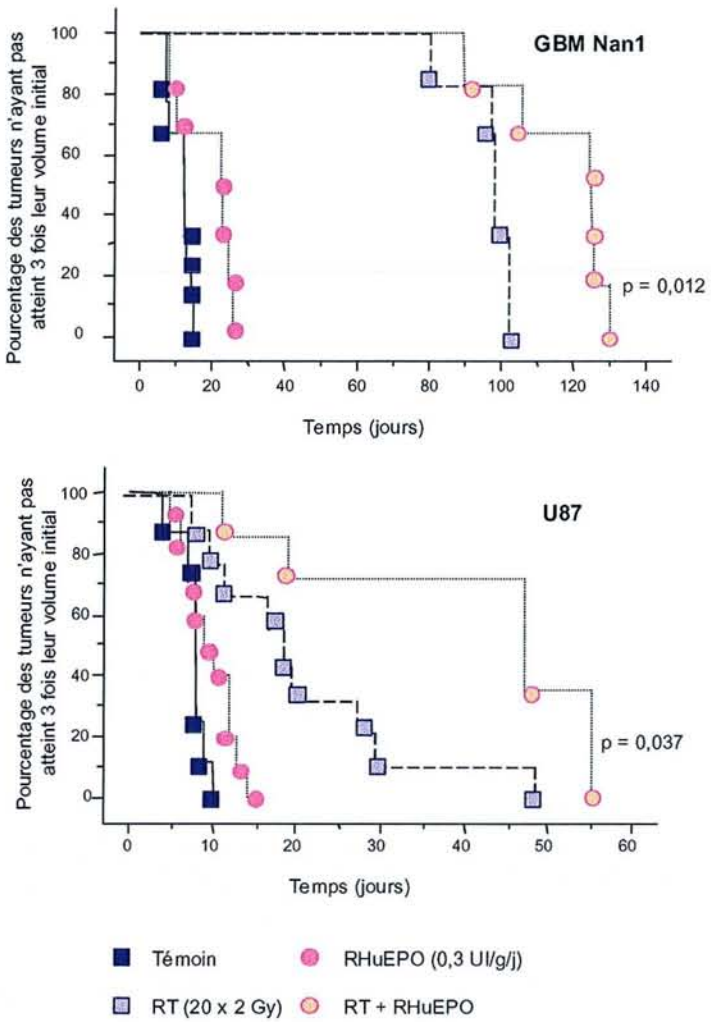


Figure 48 : Influence de l'rHuEPO sur la réponse à la radiothérapie des tumeurs GBM Nan1 et U87 xénogreffées chez la souris *nude*, selon la représentation de Kaplan-Meier. Pour la lignée GBM Nan1, le nombre de tumeurs par groupe était : témoin : 9 ; rHuEPO : 6 ; RT : 6 ; RT + RHuEPO : 6. Pour la lignée U87, ces nombres étaient respectivement de 8, 10, 9, et 8. L'analyse statistique a été réalisée en appliquant le *Log-rank test*. Les valeurs de p sont celles obtenues en comparant les groupes RT *vs* RT + RHuEPO.

L'analyse des courbes de Kaplan Meier confirme que l'rHuEPO seule ne stimule pas le développement des gliomes malins xénogreffés. Au contraire, pour la lignée GBM Nan1, un ralentissement statistiquement significatif de la croissance tumorale ($p = 0,021$) a été induit par l'injection répétée d'rHuEPO. Le temps de triplement *(figure 49)* des tumeurs témoin et des tumeurs traitées par rHuEPO est significativement différent ($11,1 \pm 1,1$ jours *vs* $18,6 \pm 3,5$ jours ; $p = 0,014$).

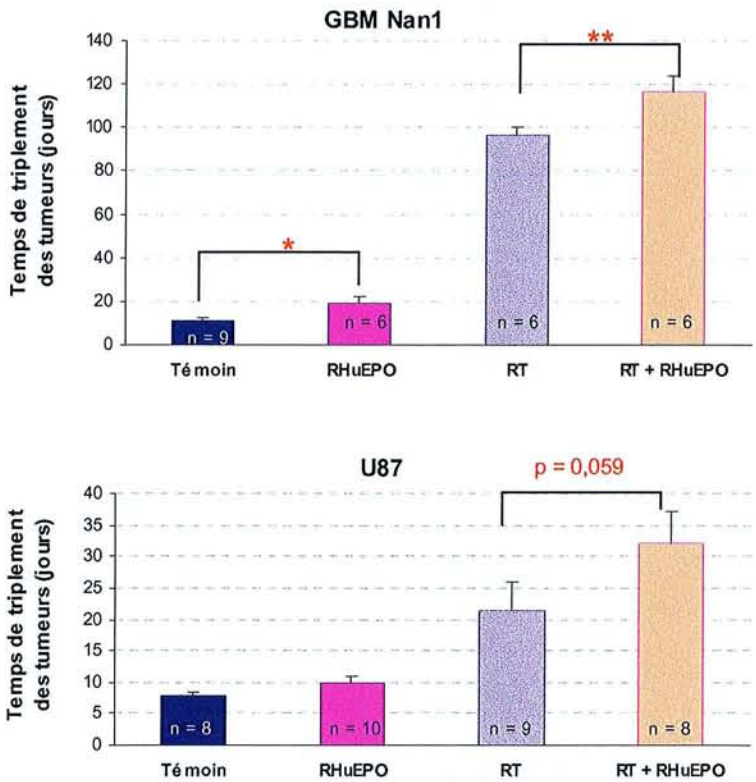


Figure 49 : Temps de triplement des tumeurs GBM Nan1 et U87 en fonction des différents bras thérapeutiques. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne ± erreur standard. n : nombre de tumeurs par groupe. * comparaison RHuEPO *vs* Témoin, $p < 0,05$. ** comparaison RT *vs* RT + RHuEPO, $p < 0,05$.

Cet effet inattendu semble être une conséquence indirecte de l'amélioration de l'oxygénation tumorale. En effet, nous avons vu que la réduction de l'hypoxie tumorale s'accompagnait d'une diminution de l'expression des transcrits du VEGF. Bien qu'aucune répercussion au niveau des protéines n'ait pu être montrée par la technique de Western-blot, il n'est pas exclu que la réduction de l'hypoxie tumorale s'accompagne d'une diminution du VEGF sécrété par les cellules tumorales. Si notre hypothèse s'avérait exacte, la réduction de la croissance tumorale pourrait résulter de la diminution de l'expression de ce facteur, impliqué de façon prépondérante dans la croissance des gliomes malins de haut grade *(379, 411)*.

L'analyse des courbes de Kaplan Meier révèle que l'administration d'rHuEPO permet d'améliorer significativement la réponse des tumeurs GBM Nan1 et U87 à la radiothérapie fractionnée.

Le temps de triplement moyen des tumeurs des groupes RT est de 96,2 ± 3,7 jours pour les tumeurs GBM Nan1 et de 21,4 ± 4,5 jours pour les tumeurs U87. Lorsque les souris irradiées reçoivent des injections d'rHuEPO, celui-ci atteint respectivement 116,7 ± 7,1 jours et 32,0 ± 5,3 jours. Le facteur de potentialisation, correspondant au ratio RT + RHuEPO / RT, est de 1,21 pour la lignée GBM Nan1 et de 1,49 pour la lignée U87.

Jusqu'à présent, la majorité des études pré-cliniques évaluant l'efficacité de l'association RT + RHuEPO ont été réalisée sur des souris anémiées *(368-370, 418)*. L'ensemble de ces études démontre que l'anémie réduit significativement la réponse à la radiothérapie (dose unique ou fractionnée), et que la prévention de l'anémie par l'injection d'rHuEPO permet de restaurer l'effet antitumoral de la radiothérapie.

Seul Joiner *et coll.* ont évalué la radiosensibilité de tumeur NT (carcinome mammaire murin) chez des souris non anémiques recevant de l'rHuEPO *(366)*. Contrairement à nous, ces auteurs n'avaient pas observé d'amélioration de la radiosensibilité tumorale. La différence entre les protocoles d'irradiation mis en œuvre (irradiation dose unique *vs* irradiation fractionnée sur 4 semaines) pourrait expliquer la discordance de résultats entre les deux études. De plus, d'après les données de la littérature, la lignée NT n'est pas une lignée initialement très hypoxique (la fraction hypoxique < 2,5 mmHg est inférieure à 20%, *(419)*) et Joiner *et coll.* n'ont pas évalué l'effet de l'rHuEPO sur l'oxygénation de leurs tumeurs.

Des essais thérapeutiques ont débuté pour évaluer l'intérêt d'administrer de l'rHuEPO aux patients cancéreux devant recevoir un traitement qui comporte de la radiothérapie.

Une étude rétrospective sur 191 patients, porteurs de tumeurs ORL (cavité orale et oropharynx) et traités par radio-chimiothérapie néo-adjuvante et chirurgie, a confirmé que l'administration d'rHuEPO pour maintenir un taux d'hémoglobine > 14,5 g/dL permettait de préserver un taux de contrôle tumoral et un taux de survie équivalents à ceux obtenus chez des patients dont la concentration en hémoglobine était initialement > 14,5 g/dL *(372)*.

Les résultats des essais de phase III apparaissent plus contradictoires. Une première étude menée chez des patientes atteintes de cancers pelviens a montré une amélioration de la survie sans progression à 4 ans quand les malades recevaient de l'rHuEPO durant la radiothérapie conventionnelle *(373)*. Cet essai n'ayant pas encore fait l'objet d'un article détaillé (publication sous forme de résumé à *l'European Conference of Clinical Oncology*, Lisbonne 2001), aucune analyse critique des données concernant cette étude n'est possible.
A l'inverse, des résultats négatifs ont été rapportés à l'issue du premier essai randomisé, en double-aveugle contre placebo, réalisé chez des patients atteints de cancers de la tête et du cou et traités par radiothérapie conventionnelle. Dans cette étude, l'administration d'rHuEPO s'est révélée délétère pour les patients en terme de contrôle locorégional, en terme de survie

sans progression, et en terme de survie globale *(375)*. On peut regretter que les auteurs n'aient pas analysé les résultats dans les sous-groupes de patients non-fumeurs. En effet, compte tenu que le monoxyde de carbone libéré par la cigarette réduit la disponibilité en oxygène pour les tissus, l'analyse statistique globale à partir de groupes comportant respectivement 66% (groupe rHuEPO) et 53% (groupe placebo) de fumeurs masque peut-être une partie du potentiel de l'rHuEPO.

Dans les xénogreffes de gliomes malins, l'rHuEPO provoque deux types de modifications pouvant concourir à l'amélioration de la réponse à la radiothérapie fractionnée.
D'une part, elle permet que l'oxygène, élément clé des réactions radiochimiques et de la formation des espèces radicalaires toxiques *(4)*, soit délivré en plus grande quantité au niveau des tumeurs. Elle permet de rendre chaque irradiation biologiquement plus efficace, se traduisant par un plus grand nombre de lésions radio-induites.
D'autre part, elle permet de réduire la proportion de cellules tumorales hypoxiques viables. Or, cette sous-population cellulaire possède des propriétés génotypiques et phénotypiques (en terme de survie cellulaire, de capacité de réparation, d'invasion,...) qui les rendent particulièrement résistants aux traitements anticancéreux *(5)*. En ce sens, on peut dire que l'rHuEPO modifie les propriétés biologiques des tumeurs. Cet effet mal appréhendé semble important car il permettrait d'expliquer que l'effet bénéfique de l'rHuEPO s'exerce également pour des agents anticancéreux tels que le cyclophosphamide *(371)*, la gemcitabine ou le cisplatine *(420)* dont l'activité cytotoxique n'est pas directement dépendante de l'oxygène.

L'augmentation de la disponibilité en oxygène et la modification des propriétés biologiques des tumeurs par l'rHuEPO sont deux phénomènes interdépendants et indissociables, et seules des investigations plus appronfondies pourraient permettre d'évaluer le rôle joué par chaque processus dans l'amélioration de l'efficacité de la radiothérapie.

En résumé

Alors que l'EPO endogène est connue pour exercer un pouvoir anti-apoptotique sur les précurseurs érythrocytaires et sur les neurones, nos expérimentations in vitro sur la lignée U87, montrant que la SF_2 n'était pas modifiée par l'exposition des cellules à l'rHuEPO, ont permis de vérifier que l'rHuEPO n'exerçait pas d'effet protecteur direct vis-à-vis de l'action cytotoxique des radiations ionisantes.

In vivo, nous avons constaté que l'rHuEPO seule ralentissait légèrement mais significativement la croissance des tumeurs GBM Nan1. Cet effet inattendu semble être une conséquence indirecte de l'amélioration de l'oxygénation tumorale.

Pour nos deux modèles de gliomes malins xénogreffés, l'rHuEPO, en augmentant la disponibilité en oxygène pour les tumeurs, a permis d'améliorer de façon significative la réponse des tumeurs à la radiothérapie fractionnée. Le facteur de potentialisation atteignait 1,21 pour la lignée GBM Nan1 et 1,49 pour la lignée U87.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, notre but était de déterminer si l'administration d'rHuEPO pouvait constituer un moyen de lutter contre l'hypoxie tumorale, en vue d'améliorer secondairement la radiosensibilité de gliomes malins humains (GBM Nan1 et U87) xénogreffés chez des souris *nude* non anémiques.

Plusieurs travaux ont démontré la présence de récepteurs à l'EPO (R-EPO) et certains ont suggéré la possibilité que l'érythropoïétine endogène ou recombinante puisse stimuler la croissance tumorale. Aussi, en premier lieu, nous avons vérifié que l'administration d'rHuEPO ne favorisait pas la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo* dans nos modèles de gliomes malins de haut grade. Pour compléter nos résultats et conforter nos interprétations, il est envisagé dans une étude ultérieure de déterminer si des R-EPO fonctionnels sont présents à la surface des cellules des deux lignées tumorales étudiées. Cette perspective s'inscrit dans un projet de "screening" plus large, qui consistera à évaluer sur un panel de lignées tumorales *in vivo*, l'effet de l'rHuEPO sur la croissance tumorale en fonction de l'expression et de la fonctionnalité des R-EPO dans ces mêmes lignées.

Après nous être assuré que l'rHuEPO ne favorisait pas la prolifération des gliomes malins xénogreffés, nous avons vérifié que l'injection d'rHuEPO permettait de stimuler l'érythropoïèse chez des souris *nude* non anémiées, aboutissant à une augmentation de la capacité de transport de l'oxygène par le sang.

Dans les deux modèles de gliomes malins étudiés, l'administration d'rHuEPO a également conduit à une augmentation de la pression partielle en oxygène dans les xénogreffes tumorales, et à une réduction de la proportion de cellules tumorales hypoxiques viables, décrites comme étant directement impliquées dans la radiorésistance et l'agressivité des tumeurs. La corrélation étroite que nous avons observée entre la concentration sanguine en hémoglobine et la pression partielle en oxygène, confirme l'existence d'un lien de cause à effet entre l'augmentation du transport de l'oxygène et la réduction de l'hypoxie tumorale.

Les effets bénéfiques de l'rHuEPO sur le transport de l'oxygène et sur l'hypoxie tumorale sont non seulement observés avant irradiation mais également maintenus après 5 fractions d'irradiation.

D'après les résultats obtenus, l'rHuEPO constitue un moyen de lutter contre l'hypoxie tumorale, mais son effet reste modéré et correspond probablement à une modification du gradient de diffusion de l'oxygène dans les tumeurs traitées par l'rHuEPO. Il serait probablement intéressant d'associer l'rHuEPO avec d'autres stratégies de lutte contre

l'hypoxie, telles que le carbogène, le RSR13 ou la tirapazamine, présentant des modes d'action complémentaires.

Dans la pratique clinique actuelle, l'administration d'rHuEPO est envisagée afin de traiter une anémie déjà installée, le plus souvent pour améliorer la qualité de vie des malades. Nos résultats, ainsi que les données expérimentales de Vaupel *et coll. (368, 370)*, concernant l'effet de l'rHuEPO sur les taux d'hémoglobine, soulignent l'intérêt de délivrer l'rHuEPO en tant que thérapie préventive, afin d'empêcher au moins en partie, l'installation ou l'aggravation d'une anémie chez les patients cancéreux.

A notre connaissance, aucune étude clinique n'a évalué, à ce jour, le devenir de l'hypoxie tumorale chez les patients recevant de l'rHuEPO, afin de valider les observations pré-cliniques. Toutefois, compte tenu de son mode d'action, on peut supposer que l'rHuEPO n'aura d'intérêt en clinique que dans un cadre d'utilisation bien délimité. En particulier, on peut se demander si l'rHuEPO administrée à des patients tabagiques peut exercer une action bénéfique, du fait de la transformation de l'oxyhémoglobine en carboxyhémoglobine.

Dans les tumeurs, l'hypoxie participe à l'augmentation de l'agressivité tumorale. En effet, les cellules tumorales capables de survivre dans des conditions extrêmement défavorables (hypoxie, pH acide,...) possèdent une plus grande propension à sécréter des facteurs impliqués dans la prolifération tumorale et dans l'invasion locale ou à distance. Parallèlement, l'hypoxie tumorale est responsable d'une perte d'efficacité des traitements, et plus particulièrement des traitements dépendant de l'oxygène, tels que la radiothérapie conventionnelle.

Dans les gliomes malins, l'agressivité tumorale est étroitement liée à l'angiogenèse tumorale. Le VEGF étant connu comme le facteur pro-angiogénique le plus puissant, et l'hypoxie étant un inducteur majeur de son expression, nous avons évalué l'impact de l'rHuEPO sur l'expression du VEGF, au niveau des transcrits et au niveau de la protéine.
Dans nos conditions expérimentales, seuls les transcrits codant pour le $VEGF_{121}$ et pour le $VEGF_{165}$ ont été identifiés dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 xénogreffées. Ces deux variants majoritairement présents dans les xénogreffes de gliomes codent pour les deux isoformes capables de diffuser librement dans la matrice extracellulaire et aller interagir avec leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Nos résultats montrent que l'administration répétée d'rHuEPO permet de diminuer l'expression de l'ARNm du VEGF diffusible, avant l'initiation de la radiothérapie et après 5 fractions d'irradiation. Les variations de l'expression des transcrits du VEGF peuvent être mises en parallèle avec les variations de l'hypoxie tumorale. A notre connaissance, aucune étude n'a évalué, à ce jour, l'influence de l'rHuEPO sur l'expression du VEGF. Ces résultats nécessitent d'être confirmés au niveau de

l'expression protéique. Pour cela, la technique de western-blot doit être améliorée avec notamment l'utilisation d'anticorps spécifiques des différents isoformes du VEGF. De plus, une analyse quantitative de l'expression du VEGF par une technique ELISA est envisagée.

L'expression de l'ARNm du VEGF est sous la dépendance du facteur de transcription HIF-1 dont la sous-unité α est directement régulée par l'hypoxie. Des investigations complémentaires concernant l'expression de HIF-1α sont donc envisagées afin de confirmer l'existence d'une relation de cause à effet entre la réduction de l'hypoxie et la réduction de l'expression des transcrits du VEGF.

L'effet cytotoxique de la radiothérapie étant dépendant de la présence d'oxygène, l'objectif final a été de déterminer si l'administration d'rHuEPO pouvait permettre d'améliorer la réponse à la radiothérapie fractionnée des deux modèles de gliomes xénogreffés, en utilisant des conditions de traitement proches de celles réalisées en pratique clinique humaine.

Alors que l'EPO endogène est connue pour exercer un pouvoir anti-apoptotique sur les précurseurs érythrocytaires et sur les neurones, nous avons réalisé des expérimentations *in vitro* afin de vérifier que l'rHuEPO n'exerçait pas d'effet protecteur direct vis-à-vis de l'action cytotoxique des radiations ionisantes. Nos résultats ont montré que la SF_2 n'était pas modifiée par l'exposition des cellules U87 à l'rHuEPO.

In vivo, nous avons constaté que l'rHuEPO seule ralentissait significativement la croissance des tumeurs GBM Nan1. Cet effet pourrait s'expliquer par une réduction de l'agressivité tumorale résultant de l'amélioration de l'oxygénation tumorale. Pour nos deux modèles de gliomes malins xénogreffés, l'rHuEPO, en augmentant la disponibilité en oxygène pour les tumeurs, a permis d'améliorer de façon significative la réponse des tumeurs à la radiothérapie fractionnée. Le facteur de potentialisation atteignait 1,21 pour la lignée GBM Nan1 et 1,49 pour la lignée U87.

Chez l'Homme, il a déjà été prouvé que l'administration d'rHuEPO permettait d'améliorer la qualité de vie des patients cancéreux *(326, 327, 345)*. Sous réserve que des essais cliniques valident nos résultats expérimentaux, l'rHuEPO pourrait présenter un intérêt thérapeutique en tant qu'agent radiosensibilisant non cytotoxique, en vue d'améliorer l'index thérapeutique de la radiothérapie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Knisely JP, Rockwell S. Importance of hypoxia in the biology and treatment of brain tumors. Neuroimaging Clin N Am 2002; 12: 525-536.

2. Becker A, Stadler P, Lavey RS, *et al.* Severe anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 46: 459-466.

3. Vaupel P, Mayer A, Briest S, *et al.* Oxygenation gain factor: A novel parameter characterizing the association between hemoglobin level and the oxygenation status of breast cancers. Cancer Res 2003; 63: 7634-7637.

4. Brown JM. The hypoxic cell: A target for selective cancer therapy--Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. Cancer Res 1999; 59: 5863-5870.

5. Hockel M, Vaupel P. Biological consequences of tumor hypoxia. Semin Oncol 2001; 28: 36-41.

6. Gray LH, Conger AD, Ebert M, *et al.* The concentration of oxygen in tisuues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. Br. J. Radiol. 1953; 26: 638-648.

7. Cygler J, Klassen NV, Ross CK, *et al.* The survival of aerobic and anoxic human glioma and melanoma cells after irradiation at ultrahigh and clinical dose rates. Radiat Res 1994; 140: 79-84.

8. Gatenby RA, Kessler HB, Rosenblum JS, *et al.* Oxygen distribution in squamous cell carcinoma metastases and its relationship to outcome of radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1988; 14: 831-838.

9. Nordsmark M, Hoyer M, Keller J, *et al.* The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996; 35: 701-708.

10. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, *et al.* Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 38: 285-289.

11. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, *et al.* Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. Radiother Oncol 1998; 48: 149-156.

12. Wouters BG, Weppler SA, Koritzinsky M, *et al.* Hypoxia as a target for combined modality treatments. Eur J Cancer 2002; 38: 240-257.

13. Greco O, Marples B, Joiner MC, *et al.* How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy. J Cell Physiol 2003; 197: 312-325.

14. Kelleher DK, Mattheinsen U, Thews O, *et al.* Blood flow, oxygenation, and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats. Cancer Res 1996; 56: 4728-4734.

15. Fleury A, Menegoz F, Grosclaude P, *et al.* Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. Cancer 1997; 79: 1195-1202.

16. Legler JM, Gloeckler Ries LA, Smith MA, *et al.* Brain and other central nervous system cancers: Recent trends in incidence and mortality. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 2050A-22051.

17. Taillandier L. Un modèle de xénogreffes de gliomes humains et son utilisation en recherches pré-cliniques biologique et thérapeutique. Biologie - Santé. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2003: pp267.

18. Fleury A. SM. Epidémiologie des gliomes. In O. Chinot PM ed. Biologie des tumeurs cérébrales gliales. Editions Espaces 34 ed. Montpellier, 1996:51-76.

19. Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, *et al.* Descriptive epidemiology of primary brain and cns tumors: Results from the central brain tumor registry of the united states, 1990-1994. Neuro-oncol 1999; 1: 14-25.

20. Leuraud P. Impact pronostique et thérapeutique du génotypage des méningiomes et des oligodendrogliomes. Université Paris VI, 2003: pp277.

21. Darcel. Présentation critique des classifications histopronostiques.
In O. Chinot PM ed. Biologie des tumeurs cérébrales gliales. Editions Espaces 34 ed. Montpellier, 1996:31-47.

22. Holland EC. Gliomagenesis: Genetic alterations and mouse models. Nat Rev Genet 2001; 2: 120-129.

23. Honnorat J. Concomitant chemoradiation and malignant gliomas in adults.
In Mornex F, Mazeron JJ, Droz JP, *et al. eds*. Concomitant chemoradiation : Current status and future. Elsevier ed. Paris, 1999:83-91.

24. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF, *et al.* Primary brain tumours in adults. Lancet 2003; 361: 323-331.

25. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, *et al.* Malignant glioma: Genetics and biology of a grave matter. Genes Dev 2001; 15: 1311-1333.

26. Sanson M, Marie Y, Huguet S, *et al.* [genes implicated in glial tumors]. Morphologie 2000; 84: 51-55.

27. Takano S, Yoshii Y, Kondo S, *et al.* Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients. Cancer Res 1996; 56: 2185-2190.

28. Plate KH, Breier G, Weich HA, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. Nature 1992; 359: 845-848.

29. Rampling R, Cruickshank G, Lewis AD, *et al.* Direct measurement of pO_2 distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 29: 427-431.

30. Collingridge DR, Piepmeier JM, Rockwell S, *et al.* Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. Radiother Oncol 1999; 53: 127-131.

31. Monjour A, Poisson M, Delattre JY. Chimiothérapie des tumeurs cérébrales primitives malignes. La Lettre du Cancérologue. 1995; 4: 49-67.

32. McL. Black P. Brain tumors. (second of two parts). The New England Journal of Medecine. 1991; 324: 1555-1564.

33. McL. Black P. Brain tumors. (first of two parts). The New England Journal of Medecine. 1991; 324: 1471-1476.

34. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, *et al.* Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. Cancer 1993; 71: 2585-2597.

35. Deen DF, Chiarodo A, Grimm EA, *et al.* Brain tumor working group report on the 9th international conference on brain tumor research and therapy. Organ system program, National Cancer Institute. J Neurooncol 1993; 16: 243-272.

36. Prados MD, Levin V. Biology and treatment of malignant glioma. Semin Oncol 2000; 27: 1-10.

37. Chastagner P, Bouffet E, Grill J, *et al.* What have we learnt from previous phase ii trials to help in the management of childhood brain tumours? Eur J Cancer 2001; 37: 1981-1993.

38. Stewart LA. Chemotherapy in adult high-grade glioma: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. Lancet 2002; 359: 1011-1018.

39. Louis E, Carpentier A, Delattre JY. [Update on neuro-oncology]. Bull Cancer 2002; 89: 131-137.

40. Yung WK. Temozolomide in malignant gliomas. Semin Oncol 2000; 27: 27-34.

41. Yung WK, Albright RE, Olson J, *et al.* A phase ii study of temozolomide vs. Procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. Br J Cancer 2000; 83: 588-593.

42. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. Clin Cancer Res 2000; 6: 2585-2597.

43. Friedman HS. Temozolomide in early stages of newly diagnosed malignant glioma and neoplastic meningitis. Semin Oncol 2000; 27: 35-40.

44. Mornex F, Favaudon V, Mazeron JJ. [the effect of radiation on malignant cells]. Rev Prat 1994; 44: 1003-1010.

45. Yarnold J. Molecular aspects of cellular responses to radiotherapy. Radiother Oncol 1997; 44: 1-7.

46. Olive PL. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. Radiat Res 1998; 150: S42-51.

47. Rydberg B. Clusters of DNA damage induced by ionizing radiation: Formation of short DNA fragments. Ii. Experimental detection. Radiat Res 1996; 145: 200-209.

48. Averbeck D. [mechanisms of repair and radiation-induced mutagenesis in higher eukaryotes]. Cancer Radiother 2000; 4: 335-354.

49. Dianov GL, O'Neill P, Goodhead DT. Securing genome stability by orchestrating DNA repair: Removal of radiation-induced clustered lesions in DNA. Bioessays 2001; 23: 745-749.

50. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet 2001; 27: 247-254.

51. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. Nature 2000; 408: 433-439.

52. Wahl GM, Carr AM. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: Insights from yeast and p53. Nat Cell Biol 2001; 3: E277-286.

53. Herceg Z, Wang ZQ. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. Mutat Res 2001; 477: 97-110.

54. Rotman G, Shiloh Y. Atm: A mediator of multiple responses to genotoxic stress. Oncogene 1999; 18: 6135-6144.

55. Fried LM, Koumenis C, Peterson SR, *et al.* The DNA damage response in DNA-dependent protein kinase-deficient SCID mouse cells: Replication protein a hyperphosphorylation and p53 induction. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 13825-13830.

56. Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, *et al.* DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. Nature 1998; 394: 700-704.

57. Muller C, Rodrigo G, Calsou P, *et al.* [DNA-dependent protein kinase: A major protein involved in the cellular response to ionizing radiation]. Bull Cancer 1999; 86: 977-983.

58. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. Nature 2000; 408: 307-310.

59. Szumiel I. Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells. Radiat Res 1998; 150: S92-101.

60. Favaudon V. [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. Cancer Radiother 2000; 4: 355-368.

61. Jeggo PA. DNA breakage and repair. Adv Genet 1998; 38: 185-218.

62. Meyn RE, Stephens LC, Milas L. Programmed cell death and radioresistance. Cancer Metastasis Rev 1996; 15: 119-131.

63. Dewey WC, Ling CC, Meyn RE. Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 33: 781-796.

64. Illidge TM. Radiation-induced apoptosis. Clin Oncol (R Coll Radiol) 1998; 10: 3-13.

65. Zhivotovsky B, Joseph B, Orrenius S. Tumor radiosensitivity and apoptosis. Exp Cell Res 1999; 248: 10-17.

66. Leskov KS, Criswell T, Antonio S, *et al.* When X-ray-inducible proteins meet DNA double strand break repair. Semin Radiat Oncol 2001; 11: 352-372.

67. Barcellos-Hoff MH. How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. Radiat Res 1998; 150: S109-120.

68. Hallahan DE, Virudachalam S, Sherman ML, *et al.* Tumor necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. Cancer Res 1991; 51: 4565-4569.

69. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M. Oxygen status of malignant tumors: Pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. Semin Oncol 2001; 28: 29-35.

70. Rosen EM, Fan S, Rockwell S, *et al.* The molecular and cellular basis of radiosensitivity: Implications for understanding how normal tissues and tumors respond to therapeutic radiation. Cancer Invest 1999; 17: 56-72.

71. Withers HR, Taylor JM, Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. Acta Oncol 1988; 27: 131-146.

72. Sham E, Durand RE. Cell kinetics and repopulation parameters of irradiated xenograft tumours in scid mice: Comparison of two dose-fractionation regimens. Eur J Cancer 1999; 35: 850-858.

73. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review. Cancer Res 1989; 49: 6449-6465.

74. Czyzyk-Krzeska MF. Molecular aspects of oxygen sensing in physiological adaptation to hypoxia. Respir Physiol 1997; 110: 99-111.

75. Wouters BG, Koritzinsky M, Chiu RK, *et al.* Modulation of cell death in the tumor microenvironment. Semin Radiat Oncol 2003; 13: 31-41.

76. Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, *et al.* Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93: 9493-9498.

77. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, *et al.* Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase perk and phosphorylation of the translation initiation factor eif2alpha. Mol Cell Biol 2002; 22: 7405-7416.

78. Giaccia AJ. Hypoxic stress proteins: Survival of the fittest. Semin Radiat Oncol 1996; 6: 46-58.

79. Pugh CW, Tan CC, Jones RW, *et al.* Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88: 10553-10557.

80. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 1992; 12: 5447-5454.

81. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90: 4304-4308.

82. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular O_2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 5510-5514.

83. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1995; 270: 1230-1237.

84. Gothié E, Pouysségur J. HIF-1 : Régulateur central de l'hypoxie. Médecine/Sciences 2002; 18: 70-78.

85. Zhu H, Bunn HF. Signal transduction. How do cells sense oxygen? Science 2001; 292: 449-451.

86. Ivan M, Kondo K, Yang H, *et al.* HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O_2 sensing. Science 2001; 292: 464-468. Epub 2001 Apr 2005.

87. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, *et al.* Targeting of HIF-alpha to the von hippel-lindau ubiquitylation complex by O_2-regulated prolyl hydroxylation. Science 2001; 292: 468-472. Epub 2001 Apr 2005.

88. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. Biochem Pharmacol 2002; 64: 993-998.

89. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: Pathophysiology and therapeutics. Trends Mol Med 2002; 8: S62-67.

90. Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Oncogene 2001; 20: 5779-5788.

91. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 2000; 275: 26765-26771.

92. Feldser D, Agani F, Iyer NV, *et al.* Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. Cancer Res 1999; 59: 3915-3918.

93. Zaman K, Ryu H, Hall D, *et al.* Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and atf-1/creb and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1), and erythropoietin. J Neurosci 1999; 19: 9821-9830.

94. Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, *et al.* Role of hif-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. Nature 1998; 394: 485-490.

95. Piret JP, Mottet D, Raes M, *et al.* Is hif-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? Biochem Pharmacol 2002; 64: 889-892.

96. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. Br. J. Cancer 1955; 9: 539-549.

97. Hockel M, Schlenger K, Knoop C, *et al.* Oxygenation of carcinomas of the uterine cervix: Evaluation by computerized O_2 tension measurements. Cancer Res 1991; 51: 6098-6102.

98. Brizel DM, Rosner GL, Harrelson J, *et al.* Pretreatment oxygenation profiles of human soft tissue sarcomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 30: 635-642.

99. Nordsmark M, Overgaard M, Overgaard J. Pretreatment oxygenation predicts radiation response in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Radiother Oncol 1996; 41: 31-39.

100. Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, *et al.* Oxygenation of human tumors: Evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O_2 tension measurements. Cancer Res 1991; 51: 3316-3322.

101. Movsas B, Chapman JD, Hanlon AL, *et al.* Hypoxia in human prostate carcinoma: An Eppendorf pO_2 study. Am J Clin Oncol 2001; 24: 458-461.

102. Nordsmark M, Bentzen SM, Overgaard J. Measurement of human tumour oxygenation status by a polarographic needle electrode. An analysis of inter- and intratumour heterogeneity. Acta Oncol 1994; 33: 383-389.

103. Becker A, Hansgen G, Bloching M, *et al.* Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: Comparison of primary tumors, neck node metastases, and normal tissue. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 42: 35-41.

104. Lartigau E, Lusinchi A, Weeger P, *et al.* Variations in tumour oxygen tension (pO_2) during accelerated radiotherapy of head and neck carcinoma. Eur J Cancer 1998; 34: 856-861.

105. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, *et al.* Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. Cancer Res 1996; 56: 941-943.

106. Rijken PF, Bernsen HJ, Peters JP, *et al.* Spatial relationship between hypoxia and the (perfused) vascular network in a human glioma xenograft: A quantitative multi-parameter analysis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 48: 571-582.

107. Fenton BM, Paoni SF, Beauchamp BK, *et al.* Zonal image analysis of tumour vascular perfusion, hypoxia, and necrosis. Br J Cancer 2002; 86: 1831-1836.

108. Ljungkvist AS, Bussink J, Rijken PF, *et al.* Changes in tumor hypoxia measured with a double hypoxic marker technique. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 48: 1529-1538.

109. Rodriguez R, Ritter MA, Fowler JF, *et al.* Kinetics of cell labeling and thymidine replacement after continuous infusion of halogenated pyrimidines *in vivo*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 29: 105-113.

110. Brown JM. Exploiting the hypoxic cancer cell: Mechanisms and therapeutic strategies. Mol Med Today 2000; 6: 157-162.

111. Evans SM, Joiner B, Jenkins WT, *et al.* Identification of hypoxia in cells and tissues of epigastric 9L rat glioma using EF5 *[2-(2-nitro-1h-imidazol-1-yl)-n-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl) acetamide]*. Br J Cancer 1995; 72: 875-882.

112. Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: Radiobiological effects. Cancer Res 1987; 47: 597-601.

113. Grunt TW, Lametschwandtner A, Staindl O. The vascular pattern of basal cell tumors: Light microscopy and scanning electron microscopic study on vascular corrosion casts. Microvasc Res 1985; 29: 371-386.

114. Shah-Yukich AA, Nelson AC. Characterization of solid tumor microvasculature: A three-dimensional analysis using the polymer casting technique. Lab Invest 1988; 58: 236-244.

115. Dewhirst MW, Tso CY, Oliver R, *et al.* Morphologic and hemodynamic comparison of tumor and healing normal tissue microvasculature. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 17: 91-99.

116. Koutcher JA, Alfieri AA, Devitt ML, *et al.* Quantitative changes in tumor metabolism, partial pressure of oxygen, and radiobiological oxygenation status postradiation. Cancer Res 1992; 52: 4620-4627.

117. Goda F, O'Hara JA, Rhodes ES, *et al.* Changes of oxygen tension in experimental tumors after a single dose of x-ray irradiation. Cancer Res 1995; 55: 2249-2252.

118. Milas L, Hunter N, Mason KA, *et al.* Tumor reoxygenation as a mechanism of taxol-induced enhancement of tumor radioresponse. Acta Oncol 1995; 34: 409-412.

119. Kakeji Y, Maehara Y, Ikebe M, *et al.* Dynamics of tumor oxygenation, CD31 staining and transforming growth factor-beta levels after treatment with radiation or cyclophosphamide in the rat 13762 mammary carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 37: 1115-1123.

120. Stuben G, Thews O, Pottgen C, *et al.* Tumour oxygenation during fractionated radiotherapy--comparison with size-matched controls. Acta Oncol 1999; 38: 209-213.

121. Zywietz F, Reeker W, Kochs E. Tumor oxygenation in a transplanted rat rhabdomyosarcoma during fractionated irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 32: 1391-1400.

122. Olive PL. Radiation-induced reoxygenation in the SCCVII murine tumour: Evidence for a decrease in oxygen consumption and an increase in tumour perfusion. Radiother Oncol 1994; 32: 37-46.

123. Bussink J, Kaanders JH, Rijken PF, *et al.* Changes in blood perfusion and hypoxia after irradiation of a human squamous cell carcinoma xenograft tumor line. Radiat Res 2000; 153: 398-404.

124. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, *et al.* Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. Cancer Res 1999; 59: 5830-5835.

125. Talks KL, Turley H, Gatter KC, *et al.* The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. Am J Pathol 2000; 157: 411-421.

126. Haugland HK, Vukovic V, Pintilie M, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in cervical carcinomas: Correlation with tumor oxygenation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002; 53: 854-861.

127. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: Association with angiogenesis, invasion, and progression. Cancer 2000; 88: 2606-2618.

128. Sondergaard KL, Hilton DA, Penney M, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in tumours of patients with glioblastoma. Neuropathol Appl Neurobiol 2002; 28: 210-217.

129. Smith JS, Tachibana I, Passe SM, *et al.* PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. J Natl Cancer Inst 2001; 93: 1246-1256.

130. Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. Crit Rev Biochem Mol Biol 2000; 35: 71-103.

131. Ryan HE, Poloni M, McNulty W, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. Cancer Res 2000; 60: 4010-4015.

132. Kung AL, Wang S, Klco JM, *et al.* Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. Nat Med 2000; 6: 1335-1340.

133. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. Trends Biochem Sci 1999; 24: 68-72.

134. Semenza GL, Roth PH, Fang HM, *et al.* Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 1994; 269: 23757-23763.

135. Airley R, Loncaster J, Davidson S, *et al.* Glucose transporter GLUT-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. Clin Cancer Res 2001; 7: 928-934.

136. Gingras D, Béliveau R. L'angiogenèse tumorale : Une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. Médecine/Sciences 1997; 9: 23-29.

137. Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. Acta Radiol Oncol 1984; 23: 217-225.

138. Folkman J. Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. N Engl J Med 1971; 285: 1182-1186.

139. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst 1990; 82: 4-6.

140. Poon RT, Fan ST, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. J Clin Oncol 2001; 19: 1207-1225.

141. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med 1995; 1: 149-153.

142. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. Semin Cancer Biol 2003; 13: 159-167.

143. Shweiki D, Itin A, Soffer D, *et al.* Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992; 359: 843-845.

144. Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, *et al.* Persistence of microscopic human cancers in mice: Alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. Faseb J 2002; 16: 1361-1370.

145. Vandenbunder B. Angiogenèse et remodelage vasculaire au début du développement tumoral. Médecine/Sciences 2000; 16: 281-283.

146. Dvorak HF, Nagy JA, Berse B, *et al.* Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. Ann N Y Acad Sci 1992; 667: 101-111.

147. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer 2003; 3: 401-410.

148. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, *et al.* Mosaic blood vessels in tumors: Frequency of cancer cells in contact with flowing blood. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 14608-14613.

149. Takahashi Y, Bucana CD, Liu W, *et al.* Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: Role of infiltrating cells. J Natl Cancer Inst 1996; 88: 1146-1151.

150. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 1983; 219: 983-985.

151. Kim KJ, Li B, Winer J, *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. Nature 1993; 362: 841-844.

152. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. Faseb J 1999; 13: 9-22.

153. Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. J Cell Sci 2001; 114: 853-865.

154. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev 1997; 18: 4-25.

155. Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol Rev 2000; 52: 237-268.

156. Griffiths JR, Robinson SP. The oxylite: A fibre-optic oxygen sensor. Br J Radiol 1999; 72: 627-630.

157. Nozue M, Lee I, Yuan F, *et al.* Interlaboratory variation in oxygen tension measurement by Eppendorf "histograph" and comparison with hypoxic marker. J Surg Oncol 1997; 66: 30-38.

158. Braun RD, Lanzen JL, Snyder SA, *et al.* Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using oxylite or microelectrodes in rodents. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280: H2533-2544.

159. Collingridge DR, Young WK, Vojnovic B, *et al.* Measurement of tumor oxygenation: A comparison between polarographic needle electrodes and a time-resolved luminescence-based optical sensor. Radiat Res 1997; 147: 329-334.

160. Seddon BM, Honess DJ, Vojnovic B, *et al.* Measurement of tumor oxygenation: *In vivo* comparison of a luminescence fiber-optic sensor and a polarographic electrode in the P22 tumor. Radiat Res 2001; 155: 837-846.

161. Raleigh JA, Dewhirst MW, Thrall DE. Measuring tumor hypoxia. Semin Radiat Oncol 1996; 6: 37-45.

162. Urano M, Chen Y, Humm J, *et al.* Measurements of tumor tissue oxygen tension using a time-resolved luminescence-based optical oxylite probe: Comparison with a paired survival assay
The Oxylite: A fibre-optic oxygen sensor. Radiat Res 2002; 158: 167-173.

163. Varghese AJ, Gulyas S, Mohindra JK. Hypoxia-dependent reduction of 1-(2-nitro-1-imidazolyl)-3-methoxy-2-propanol by chinese hamster ovary cells and KHT tumor cells *in vitro* and *in vivo*. Cancer Res 1976; 36: 3761-3765.

164. Koch CJ, Stobbe CC, Baer KA. Metabolism induced binding of 14C-misonidazole to hypoxic cells: Kinetic dependence on oxygen concentration and misonidazole concentration. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1984; 10: 1327-1331.

165. Urtasun RC, Koch CJ, Franko AJ, *et al.* A novel technique for measuring human tissue pO_2 at the cellular level. Br J Cancer 1986; 54: 453-457.

166. Varghese AJ, Whitmore GF. Binding to cellular macromolecules as a possible mechanism for the cytotoxicity of misonidazole. Cancer Res 1980; 40: 2165-2169.

167. Raleigh JA, Chou SC, Arteel GE, *et al.* Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. Radiat Res 1999; 151: 580-589.

168. Koch CJ, Evans SM, Lord EM. Oxygen dependence of cellular uptake of EF5 [*2-(2-nitro-1h-imidazol-1-yl)-n-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl)a cet amide]* : Analysis of drug adducts by fluorescent antibodies *vs* bound radioactivity. Br J Cancer 1995; 72: 869-874.

169. Raleigh JA, Miller GG, Franko AJ, *et al.* Fluorescence immunohistochemical detection of hypoxic cells in spheroids and tumours. Br J Cancer 1987; 56: 395-400.

170. Raleigh JA, Chou SC, Bono EL, *et al.* Semiquantitative immunohistochemical analysis for hypoxia in human tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 49: 569-574.

171. Evans SM, Hahn SM, Magarelli DP, *et al.* Hypoxia in human intraperitoneal and extremity sarcomas. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 49: 587-596.

172. Nordsmark M, Loncaster J, Aquino-Parsons C, *et al.* Measurements of hypoxia using pimonidazole and polarographic oxygen-sensitive electrodes in human cervix carcinomas. Radiother Oncol 2003; 67: 35-44.

173. Koch CJ, Hahn SM, Rockwell K, Jr., *et al.* Pharmacokinetics of EF5 *[2-(2-nitro-1-h-imidazol-1-yl)-n-(2,2,3,3,3-pentafluoropropyl) acetamide]* in human patients: Implications for hypoxia measurements *in vivo* by 2-nitroimidazoles. Cancer Chemother Pharmacol 2001; 48: 177-187.

174. Evans SM, Hahn S, Pook DR, *et al.* Detection of hypoxia in human squamous cell carcinoma by EF5 binding. Cancer Res 2000; 60: 2018-2024.

175. Nordsmark M, Loncaster J, Chou SC, *et al.* Invasive oxygen measurements and pimonidazole labeling in human cervix carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 49: 581-586.

176. Jenkins WT, Evans SM, Koch CJ. Hypoxia and necrosis in rat 9L glioma and Morris 7777 hepatoma tumors: Comparative measurements using EF5 binding and the Eppendorf needle electrode. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 46: 1005-1017.

177. Aquino-Parsons C, Green A, Minchinton AI. Oxygen tension in primary gynaecological tumours: The influence of carbon dioxide concentration. Radiother Oncol 2000; 57: 45-51.

178. Kaanders JH, Wijffels KI, Marres HA, *et al.* Pimonidazole binding and tumor vascularity predict for treatment outcome in head and neck cancer. Cancer Res 2002; 62: 7066-7074.

179. Bussink J, Kaanders JH, van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: Clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. Radiother Oncol 2003; 67: 3-15.

180. Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. Am J Pathol 1995; 147: 9-19.

181. Mellanen P, Minn H, Grenman R, *et al.* Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. Int J Cancer 1994; 56: 622-629.

182. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, *et al.* Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. Am J Pathol 2001; 158: 905-919.

183. Smith BD, Smith GL, Carter D, *et al.* Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol 2000; 18: 2046-2052.

184. Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, *et al.* Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. J Clin Oncol 2001; 19: 3660-3668.

185. Birner P, Gatterbauer B, Oberhuber G, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha in oligodendrogliomas: Its impact on prognosis and on neoangiogenesis. Cancer 2001; 92: 165-171.

186. Vukovic V, Haugland HK, Nicklee T, *et al.* Hypoxia-inducible factor-1alpha is an intrinsic marker for hypoxia in cervical cancer xenografts. Cancer Res 2001; 61: 7394-7398.

187. Airley RE, Loncaster J, Raleigh JA, *et al.* GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: Relationship to pimonidazole binding. Int J Cancer 2003; 104: 85-91.

188. Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, *et al.* Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. Radiother Oncol 1998; 46: 229-237.

189. Bentzen L, Keiding S, Nordsmark M, *et al.* Tumour oxygenation assessed by 18F-fluoromisonidazole PET and polarographic needle electrodes in human soft tissue tumours. Radiother Oncol 2003; 67: 339-344.

190. Hunjan S, Mason RP, Constantinescu A, *et al.* Regional tumor oximetry: 19F NMR spectroscopy of hexafluorobenzene. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 41: 161-171.

191. Mason RP, Hunjan S, Constantinescu A, *et al.* Tumor oxymetry : Comparison of 19f-mr epi and electrodes. In Dunn JF, Swartz HM eds. Oxygen transport to tissue xxiv: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.

192. Gallez B, Jordan BF, Baudelet C, *et al.* Pharmacological modifications of the partial pressure of oxygen in murine tumors: Evaluation using *in vivo* EPR oximetry. Magn Reson Med 1999; 42: 627-630.

193. Mahy P, De Bast M, Gallez B, *et al.* In vivo colocalization of 2-nitroimidazole EF5 fluorescence intensity and electron paramagnetic resonance oximetry in mouse tumors. Radiother Oncol 2003; 67: 53-61.

194. Fyles A, Milosevic M, Hedley D, *et al.* Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. J Clin Oncol 2002; 20: 680-687.

195. Hockel M, Schlenger K, Mitze M, *et al.* Hypoxia and radiation response in human tumors. Semin Radiat Oncol 1996; 6: 3-9.

196. Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85: 9533-9537.

197. Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: Involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. Br J Cancer 1999; 80: 1697-1707.

198. De Jaeger K, Kavanagh MC, Hill RP. Relationship of hypoxia to metastatic ability in rodent tumours. Br J Cancer 2001; 84: 1280-1285.

199. Hockel M, Schlenger K, Aral B, *et al.* Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. Cancer Res 1996; 56: 4509-4515.

200. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, *et al.* Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. Nature 1996; 379: 88-91.

201. Hockel M, Schlenger K, Hockel S, *et al.* Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. Cancer Res 1999; 59: 4525-4528.

202. Yuan J, Glazer PM. Mutagenesis induced by the tumor microenvironment. Mutat Res 1998; 400: 439-446.

203. Russo CA, Weber TK, Volpe CM, *et al.* An anoxia inducible endonuclease and enhanced DNA breakage as contributors to genomic instability in cancer. Cancer Res 1995; 55: 1122-1128.

204. Reynolds TY, Rockwell S, Glazer PM. Genetic instability induced by the tumor microenvironment. Cancer Res 1996; 56: 5754-5757.

205. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, *et al.* Oxygenation of head and neck cancer: Changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. Radiother Oncol 1999; 53: 113-117.

206. Teicher BA, Holden SA, al-Achi A, *et al.* Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSAIIC murine fibrosarcoma. Cancer Res 1990; 50: 3339-3344.

207. Rice GC, Hoy C, Schimke RT. Transient hypoxia enhances the frequency of dihydrofolate reductase gene amplification in chinese hamster ovary cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 5978-5982.

208. Overgaard J, Horsman MR. Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen and sensitizers. Semin Radiat Oncol 1996; 6: 10-21.

209. Rojas A, Stewart FA, Smith KA, *et al.* Effect of anemia on tumor radiosensitivity under normo and hyperbaric conditions. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1987; 13: 1681-1689.

210. McCormack M, Nias AH, Smith E. Chronic anaemia, hyperbaric oxygen and tumour radiosensitivity. Br J Radiol 1990; 63: 752-759.

211. Kunugita N, Kohshi K, Kinoshita Y, *et al.* Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models. Cancer Lett 2001; 164: 149-154.

212. Hartmann KA, van der Kleij AJ, Carl UM, *et al.* Effects of hyperbaric oxygen and normobaric carbogen on the radiation response of the rat rhabdomyosarcoma R1H. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 51: 1037-1044.

213. Henk JM, Kunkler PB, Smith CW. Radiotherapy and hyperbaric oxygen in head and neck cancer. Final report of first controlled clinical trial. Lancet 1977; 2: 101-103.

214. Fletcher GH, Lindberg RD, Caderao JB, *et al.* Hyperbaric oxygen as a radiotherapeutic adjuvant in advanced cancer of the uterine cervix: Preliminary results of a randomized trial. Cancer 1977; 39: 617-623.

215. Stuben G, Stuschke M, Knuhmann K, *et al.* The effect of combined nicotinamide and carbogen treatments in human tumour xenografts: Oxygenation and tumour control studies. Radiother Oncol 1998; 48: 143-148.

216. Lanzen JL, Braun RD, Ong AL, *et al.* Variability in blood flow and pO_2 in tumors in response to carbogen breathing. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 42: 855-859.

217. Horsman MR, Nordsmark M, Khalil AA, *et al.* Reducing acute and chronic hypoxia in tumours by combining nicotinamide with carbogen breathing. Acta Oncol 1994; 33: 371-376.

218. Peters CE, Chaplin DJ, Hirst DG. Nicotinamide reduces tumour interstitial fluid pressure in a dose- and time-dependent manner. Br J Radiol 1997; 70: 160-167.

219. Fenton BM. The effects of carbogen and nicotinamide on intravascular oxyhaemoglobin saturations in SCCVII and KHT murine tumours. Br J Cancer 1995; 71: 945-949.

220. Fenton BM, Lord EM, Paoni SF. Enhancement of tumor perfusion and oxygenation by carbogen and nicotinamide during single- and multifraction irradiation. Radiat Res 2000; 153: 75-83.

221. Bussink J, Kaanders JH, Rijken PF, *et al.* Vascular architecture and microenvironmental parameters in human squamous cell carcinoma xenografts: Effects of carbogen and nicotinamide. Radiother Oncol 1999; 50: 173-184.

222. Horsman MR, Siemann DW, Chaplin DJ, *et al.* Nicotinamide as a radiosensitizer in tumours and normal tissues: The importance of drug dose and timing. Radiother Oncol 1997; 45: 167-174.

223. Siemann DW, Horsman MR, Chaplin DJ. The radiation response of KHT sarcomas following nicotinamide treatment and carbogen breathing. Radiother Oncol 1994; 31: 117-122.

224. Sun LQ, Coucke PA, Mirimanoff RO, *et al.* Fractionated irradiation combined with carbogen breathing and nicotinamide of two human glioblastomas grafted in *nude* mice. Radiat Res 2001; 155: 26-31.

225. Aquino-Parsons C, Lim P, Green A, *et al.* Carbogen inhalation in cervical cancer: Assessment of oxygenation change. Gynecol Oncol 1999; 74: 259-264.

226. Partridge SE, Aquino-Parsons C, Luo C, *et al.* A pilot study comparing intratumoral oxygenation using the comet assay following 2.5% and 5% carbogen and 100% oxygen. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 49: 575-580.

227. Bernier J, Denekamp J, Rojas A, *et al.* Arcon: Accelerated radiotherapy with carbogen and nicotinamide in head and neck squamous cell carcinomas. The experience of the co-operative group of radiotherapy of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Radiother Oncol 2000; 55: 111-119.

228. Kaanders JH, Pop LA, Marres HA, *et al.* Arcon: Experience in 215 patients with advanced head-and-neck cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2002; 52: 769-778.

229. Fatigante L, Ducci F, Cartei F, *et al.* Carbogen and nicotinamide combined with unconventional radiotherapy in glioblastoma multiforme: A new modality treatment. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 37: 499-504.

230. Miralbell R, Mornex F, Greiner R, *et al.* Accelerated radiotherapy, carbogen, and nicotinamide in glioblastoma multiforme: Report of European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 22933. J Clin Oncol 1999; 17: 3143-3149.

231. Simon JM, Noel G, Chiras J, *et al.* Radiotherapy and chemotherapy with or without carbogen and nicotinamide in inoperable biopsy-proven glioblastoma multiforme. Radiother Oncol 2003; 67: 45-51.

232. Pickles T, Graham P, Syndikus I, *et al.* Tolerance of nicotinamide and carbogen with radiation therapy for glioblastoma. Radiother Oncol 1996; 40: 245-247.

233. Rowinsky EK. Novel radiation sensitizers targeting tissue hypoxia. Oncology (Huntingt) 1999; 13: 61-70.

234. Levine EA, Vijayakumar S. Blood transfusion in patients receiving radical radiotherapy : A reappraisal. Onkologie 1993; 16: 79-87.

235. Linberg R, Conover CD, Shum KL, *et al.* Increased tissue oxygenation and enhanced radiation sensitivity of solid tumors in rodents following polyethylene glycol conjugated bovine hemoglobin administration. In Vivo 1998; 12: 167-173.

236. Teicher BA, Wong JS, Takeuchi H, *et al.* Allosteric effectors of hemoglobin as modulators of chemotherapy and radiation therapy in vitro and in vivo. Cancer Chemother Pharmacol 1998; 42: 24-30.

237. Amorino GP, Lee H, Holburn GE, *et al.* Enhancement of tumor oxygenation and radiation response by the allosteric effector of hemoglobin, RSR13. Radiat Res 2001; 156: 294-300.

238. Kavanagh BD, Steffen RP, Chan D, *et al.* RSR13 modulates tumor hypoxia and HIF-1-alpha expression in H226 xenografts *in vivo*. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 57: S321-322.

239. Khandelwal SR, Kavanagh BD, Lin PS, *et al.* Rsr13, an allosteric effector of haemoglobin, and carbogen radiosensitize FSAII and SCCVII tumours in C3H mice. Br J Cancer 1999; 79: 814-820.

240. Kleinberg L, Grossman SA, Carson K, *et al.* Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with RSR13 and radiotherapy: Results of a phase ii new approaches to brain tumor therapy cns consortium safety and efficacy study. J Clin Oncol 2002; 20: 3149-3155.

241. Shaw E, Scott C, Suh J, *et al.* Rsr13 plus cranial radiation therapy in patients with brain metastases: Comparison with the radiation therapy oncology group recursive partitioning analysis brain metastases database. J Clin Oncol 2003; 21: 2364-2371.

242. Boucher L, Chassaigne M, Ropars C. Internalization and distribution of inositol hexakisphosphate in red blood cells. Biotechnol Appl Biochem 1996; 24: 73-78.

243. Ropars C, Chassaigne M, Avenard G. Engineered erythrocytes: Influence of p50 rightward shift and oxemia on oxygen transport to tissues. Med Biol Eng Comput 1998; 36: 508-512.

244. Taylor YC, Brown JM. Radiosensitization in multifraction schedules. II. Greater sensitization by 2-nitroimidazoles than by oxygen. Radiat Res 1987; 112: 134-145.

245. Chapman JD, Lee J, Meeker BE. Keynote address: Cellular reduction of nitroimidazole drugs: Potential for selective chemotherapy and diagnosis of hypoxic cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 16: 911-917.

246. Urtasun R, Band P, Chapman JD, *et al.* Radiation and high-dose metronidazole in supratentorial glioblastomas. N Engl J Med 1976; 294: 1364-1367.

247. Grigsby PW, Winter K, Wasserman TH, *et al.* Irradiation with or without misonidazole for patients with stages IIIb and IVa carcinoma of the cervix: Final results of RTOG 80-05. Radiation therapy oncology group. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999; 44: 513-517.

248. Overgaard J, Hansen HS, Overgaard M, *et al.* A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the danish head and neck cancer study (DAHANCA) protocol 5-85. Radiother Oncol 1998; 46: 135-146.

249. Henk JM, Bishop K, Shepherd SF. Treatment of head and neck cancer with CHART and nimorazole: Phase II study. Radiother Oncol 2003; 66: 65-70.

250. Evans JW, Yudoh K, Delahoussaye YM, *et al.* Tirapazamine is metabolized to its DNA-damaging radical by intranuclear enzymes. Cancer Res 1998; 58: 2098-2101.

251. Lee DJ, Trotti A, Spencer S, *et al.* Concurrent tirapazamine and radiotherapy for advanced head and neck carcinomas: A phase II study. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 42: 811-815.

252. Del Rowe J, Scott C, Werner-Wasik M, *et al.* Single-arm, open-label phase II study of intravenously administered tirapazamine and radiation therapy for glioblastoma multiforme. J Clin Oncol 2000; 18: 1254-1259.

253. Shibata T, Giaccia AJ, Brown JM. Hypoxia-inducible regulation of a prodrug-activating enzyme for tumor-specific gene therapy. Neoplasia 2002; 4: 40-48.

254. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer 2003; 3: 721-732.

255. Jelkmann W. Erythropoietin: Structure, control of production, and function. Physiol Rev 1992; 72: 449-489.

256. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene. Blood 1999; 94: 1864-1877.

257. Fisher JW. Erythropoietin: Physiology and pharmacology update. Exp Biol Med (Maywood) 2003; 228: 1-14.

258. Erslev A. Humoral regulation of red cell production. Blood 1953; 8: 349-357.

259. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. J Biol Chem 1977; 252: 5558-5564.

260. Lai PH, Everett R, Wang FF, *et al.* Structural characterization of human erythropoietin. J Biol Chem 1986; 261: 3116-3121.

261. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, *et al.* Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 1985; 313: 806-810.

262. Lin FK, Suggs S, Lin CH, *et al.* Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82: 7580-7584.

263. Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, *et al.* Role of the kidney in erythropoiesis. Nature 1957; 179: 633-634.

264. Dame C, Fahnenstich H, Freitag P, *et al.* Erythropoietin mRNA expression in human fetal and neonatal tissue. Blood 1998; 92: 3218-3225.

265. Powell JS, Berkner KL, Lebo RV, *et al.* Human erythropoietin gene: High level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 6465-6469.

266. Beru N, McDonald J, Lacombe C, *et al.* Expression of the erythropoietin gene. Mol Cell Biol 1986; 6: 2571-2575.

267. Recny MA, Scoble HA, Kim Y. Structural characterization of natural human urinary and recombinant DNA-derived erythropoietin. Identification of des-arginine 166 erythropoietin. J Biol Chem 1987; 262: 17156-17163.

268. Lappin T. The cellular biology of erythropoietin receptors. Oncologist 2003; 8: 15-18.

269. Sasaki H, Bothner B, Dell A, *et al.* Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. J Biol Chem 1987; 262: 12059-12076.

270. Kendall RG. Erythropoietin. Clin Lab Haematol 2001; 23: 71-80.

271. Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG. Epo's alter ego: Erythropoietin has multiple actions. Stem Cells 2002; 20: 485-492.

272. Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. Mol Cell Biol 1986; 6: 2731-2733.

273. Beck I, Ramirez S, Weinmann R, *et al.* Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. J Biol Chem 1991; 266: 15563-15566.

274. Klingmuller U. The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells--signals emanating from the erythropoietin receptor. Eur J Biochem 1997; 249: 637-647.

275. Koury MJ, Bondurant MC. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. Science 1990; 248: 378-381.

276. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, *et al.* Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. Genes Dev 1996; 10: 154-164.

277. Acs G, Acs P, Beckwith SM, *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. Cancer Res 2001; 61: 3561-3565.

278. Arcasoy MO, Amin K, Karayal AF, *et al.* Functional significance of erythropoietin receptor expression in breast cancer. Lab Invest 2002; 82: 911-918.

279. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, *et al.* Signal transduction in the erythropoietin receptor system. Exp Cell Res 1999; 253: 143-156.

280. Silva M, Benito A, Sanz C, *et al.* Erythropoietin can induce the expression of Bcl-x(L) through STAT5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. J Biol Chem 1999; 274: 22165-22169.

281. Bittorf T, Seiler J, Ludtke B, *et al.* Activation of STAT5 during EPO-directed suppression of apoptosis. Cell Signal 2000; 12: 23-30.

282. Lawson AE, Bao H, Wickrema A, *et al.* Phosphatase inhibition promotes antiapoptotic but not proliferative signaling pathways in erythropoietin-dependent HCD57 cells. Blood 2000; 96: 2084-2092.

283. Jacobs-Helber SM, Ryan JJ, Sawyer ST. JNK and p38 are activated by erythropoietin (EPO) but are not induced in apoptosis following epo withdrawal in EPO-dependent HCD57 cells. Blood 2000; 96: 933-940.

284. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, *et al.* Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. Am J Physiol 1992; 263: F474-481.

285. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, *et al.* A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. J Biol Chem 1994; 269: 19488-19493.

286. Digicaylioglu M, Bichet S, Marti HH, *et al.* Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 3717-3720.

287. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, *et al.* Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. J Biol Chem 1998; 273: 25381-25387.

288. Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, *et al.* Sites of erythropoietin production. Kidney Int 1997; 51: 393-401.

289. Marti HH, Wenger RH, Rivas LA, *et al.* Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. Eur J Neurosci 1996; 8: 666-676.

290. Juul SE, Anderson DK, Li Y, *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. Pediatr Res 1998; 43: 40-49.

291. Conrad KP, Benyo DF, Westerhausen-Larsen A, *et al.* Expression of erythropoietin by the human placenta. Faseb J 1996; 10: 760-768.

292. Yasuda Y, Fujita Y, Musha T, *et al.* Expression of erythropoietin in human female reproductive organs. Ital J Anat Embryol 2001; 106: 215-222.

293. Batra S, Perelman N, Luck LR, *et al.* Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival. Lab Invest 2003; 83: 1477-1487.

294. Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, *et al.* Erythropoietin is involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. Carcinogenesis 2002; 23: 1797-1805.

295. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, *et al.* Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. Carcinogenesis 2003; 24: 1021-1029.

296. Masuda S, Nagao M, Takahata K, *et al.* Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. J Biol Chem 1993; 268: 11208-11216.

297. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. J Neuropathol Exp Neurol 2001; 60: 386-392.

298. Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. Kidney Int 1999; 55: 808-820.

299. Westenfelder C, Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. Kidney Int 2000; 58: 647-657.

300. Acs G, Zhang PJ, Rebbeck TR, *et al.* Immunohistochemical expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in breast carcinoma. Cancer 2002; 95: 969-981.

301. Ribatti D, Marzullo A, Nico B, *et al.* Erythropoietin as an angiogenic factor in gastric carcinoma. Histopathology 2003; 42: 246-250.

302. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, *et al.* Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87: 5978-5982.

303. Yamaji R, Okada T, Moriya M, *et al.* Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mrna. Eur J Biochem 1996; 239: 494-500.

304. Morishita E, Masuda S, Nagao M, *et al.* Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. Neuroscience 1997; 76: 105-116.

305. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, *et al. In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95: 4635-4640.

306. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, *et al.* Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. Biochem Biophys Res Commun 1998; 253: 26-32.

307. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, *et al.* A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 1999; 19: 643-651.

308. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, *et al.* Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med 2002; 8: 495-505.

309. Xenocostas A, Cheung WK, Farrell FX, *et al.* Recombinant human erythropoietin crosses the blood brain barrier : The pharmacokinetics of rhepo in the cerebrospinal fluid after intravenous administration. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2003; 22: 230.

310. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, *et al.* Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury
an advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97: 10526-10531.

311. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between jak2 and nf-kappab signalling cascades. Nature 2001; 412: 641-647.

312. Juul S. Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage. Acta Paediatr Suppl 2002; 91: 36-42.

313. Carlini RG, Dusso AS, Obialo CI, *et al.* Recombinant human erythropoietin (rhuepo) increases endothelin-1 release by endothelial cells. Kidney Int 1993; 43: 1010-1014.

314. Carlini RG, Alonzo EJ, Dominguez J, *et al.* Effect of recombinant human erythropoietin on endothelial cell apoptosis. Kidney Int 1999; 55: 546-553.

315. Ribatti D, Presta M, Vacca A, *et al.* Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization *in vivo*. Blood 1999; 93: 2627-2636.

316. Foresta C, Mioni R, Bordon P, *et al.* Erythropoietin stimulates testosterone production in man. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78: 753-756.

317. Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, *et al.* Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates. Pediatr Res 1999; 46: 263-268.

318. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, *et al.* Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in *nude* mice. Br J Cancer 2001; 84: 836-843.

319. Ludwig H, Strasser K. Symptomatology of anemia. Semin Oncol 2001; 28: 7-14.

320. Bron D, Meuleman N, Mascaux C. Biological basis of anemia. Semin Oncol 2001; 28: 1-6.

321. Harrison L, Shasha D, Shiaova L, *et al.* Prevalence of anemia in cancer patients undergoing radiation therapy. Semin Oncol 2001; 28: 54-59.

322. Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. Blood 1992; 79: 1987-1994.

323. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, *et al.* Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. N Engl J Med 1990; 322: 1689-1692.

324. Demetri GD, Kris M, Wade J, *et al.* Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: Results from a prospective community oncology study. Procrit study group. J Clin Oncol 1998; 16: 3412-3425.

325. Cella D, Zagari MJ, Vandoros C, *et al.* Epoetin alfa treatment results in clinically significant improvements in quality of life in anemic cancer patients when referenced to the general population. J Clin Oncol 2003; 21: 366-373.

326. Littlewood TJ, Bajetta E, Nortier JW, *et al.* Effects of epoetin alfa on hematologic parameters and quality of life in cancer patients receiving nonplatinum chemotherapy: Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Oncol 2001; 19: 2865-2874.

327. Fallowfield L, Gagnon D, Zagari M, *et al.* Multivariate regression analyses of data from a randomised, double-blind, placebo-controlled study confirm quality of life benefit of epoetin alfa in patients receiving non-platinum chemotherapy. Br J Cancer 2002; 87: 1341-1353.

328. Evans JC, Bergsjo P. The influence of anemia on the results of radiotherapy in carcinoma of the cervix. Radiology 1965; 84: 709-717.

329. Harrison LB, Chadha M, Hill RJ, *et al.* Impact of tumor hypoxia and anemia on radiation therapy outcomes. Oncologist 2002; 7: 492-508.

330. Thomas GM. Raising hemoglobin: An opportunity for increasing survival? Oncology 2002; 63: 19-28.

331. Cella D, Dobrez D, Glaspy J. Control of cancer-related anemia with erythropoietic agents: A review of evidence for improved quality of life and clinical outcomes. Ann Oncol 2003; 14: 511-519.

332. Langer CJ, Hirsch FR, Cortes-Funes H, *et al.* Targeted molecular mechanisms of epoetin alfa. Lung Cancer 2003; 41: S133-145.

333. Grogan M, Thomas GM, Melamed I, *et al.* The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. Cancer 1999; 86: 1528-1536.

334. Frommhold H, Guttenberger R, Henke M. The impact of blood hemoglobin content on the outcome of radiotherapy. The Freiburg experience. Strahlenther Onkol 1998; 174 Suppl 4: 31-34.

335. Wigren T, Oksanen H, Kellokumpu-Lehtinen P. A practical prognostic index for inoperable non-small-cell lung cancer. J Cancer Res Clin Oncol 1997; 123: 259-266.

336. Girinski T, Pejovic-Lenfant MH, Bourhis J, *et al.* Prognostic value of hemoglobin concentrations and blood transfusions in advanced carcinoma of the cervix treated by radiation therapy: Results of a retrospective study of 386 patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 16: 37-42.

337. van Acht MJ, Hermans J, Boks DE, *et al.* The prognostic value of hemoglobin and a decrease in hemoglobin during radiotherapy in laryngeal carcinoma. Radiother Oncol 1992; 23: 229-235.

338. Tarnawski R, Skladowski K, Maciejewski B. Prognostic value of hemoglobin concentration in radiotherapy for cancer of supraglottic larynx. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997; 38: 1007-1011.

339. Logsdon MD, Eifel PJ. Figo IIIb squamous cell carcinoma of the cervix: An analysis of prognostic factors emphasizing the balance between external beam and intracavitary radiation therapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999; 43: 763-775.

340. Dunst J, Kuhnt T, Strauss HG, *et al.* Anemia in cervical cancers: Impact on survival, patterns of relapse, and association with hypoxia and angiogenesis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 56: 778-787.

341. Lutterbach J, Guttenberger R. Anemia is associated with decreased local control of surgically treated squamous cell carcinomas of the glottic larynx. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2000; 48: 1345-1350.

342. Jazieh AR, Hussain M, Howington JA, *et al.* Prognostic factors in patients with surgically resected stages I and II non-small cell lung cancer. Ann Thorac Surg 2000; 70: 1168-1171.

343. Munstedt K, Kovacic M, Zygmunt M, *et al.* Impact of hemoglobin levels before and during chemotherapy on survival of patients with ovarian cancer. Int J Oncol 2003; 23: 837-843.

344. Waters JS, O'Brien ME, Ashley S. Management of anemia in patients receiving chemotherapy. J Clin Oncol 2002; 20: 601-603.

345. Shasha D, George MJ, Harrison LB. Once-weekly dosing of epoetin-alpha increases hemoglobin and improves quality of life in anemic cancer patients receiving radiation therapy either concomitantly or sequentially with chemotherapy. Cancer 2003; 98: 1072-1079.

346. Stadler P, Feldmann HJ, Creighton C, *et al.* Changes in tumor oxygenation during combined treatment with split-course radiotherapy and chemotherapy in patients with head and neck cancer. Radiother Oncol 1998; 48: 157-164.

347. Knocke TH, Weitmann HD, Feldmann HJ, *et al.* Intratumoral pO_2-measurements as predictive assay in the treatment of carcinoma of the uterine cervix. Radiother Oncol 1999; 53: 99-104.

348. Egrie JC, Strickland TW, Lane J, *et al.* Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. Immunobiology 1986; 172: 213-224.

349. Krantz SB. Erythropoietin. Blood 1991; 77: 419-434.

350. Winearls CG, Oliver DO, Pippard MJ, *et al.* Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. Lancet 1986; 2: 1175-1178.

351. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, *et al.* Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. N Engl J Med 1987; 316: 73-78.

352. Eschbach JW, Kelly MR, Haley NR, *et al.* Treatment of the anemia of progressive renal failure with recombinant human erythropoietin. N Engl J Med 1989; 321: 158-163.

353. Nonnast-Daniel B, Deschodt G, Brunkhorst R, *et al.* Long-term effects of treatment with recombinant human erythropoietin on haemodynamics and tissue oxygenation in patients with renal anaemia. Nephrol Dial Transplant 1990; 5: 444-448.

354. Landgraf H, Grutzmacher P, Garcia-Bartels C, *et al.* Effect of erythropoietin treatment on tissue oxygenation in patients with severe transfusion dependent renal anaemia. Eur J Med 1993; 2: 393-397.

355. Raine AE. Hypertension, blood viscosity, and cardiovascular morbidity in renal failure: Implications of erythropoietin therapy. Lancet 1988; 1: 97-100.

356. Casadevall N, Nataf J, Viron B, *et al.* Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. N Engl J Med 2002; 346: 469-475.

357. Samol J, Littlewood TJ. The efficacy of rhuepo in cancer-related anaemia. Br J Haematol 2003; 121: 3-11.

358. Miller CB, Platanias LC, Mills SR, *et al.* Phase I-II trial of erythropoietin in the treatment of cisplatin-associated anemia. J Natl Cancer Inst 1992; 84: 98-103.

359. Cascinu S, Fedeli A, Del Ferro E, *et al.* Recombinant human erythropoietin treatment in cisplatin-associated anemia: A randomized, double-blind trial with placebo. J Clin Oncol 1994; 12: 1058-1062.

360. Gabrilove JL, Cleeland CS, Livingston RB, *et al.* Clinical evaluation of once-weekly dosing of epoetin alfa in chemotherapy patients: Improvements in hemoglobin and quality of life are similar to three-times-weekly dosing. J Clin Oncol 2001; 19: 2875-2882.

361. Berdel WE, Oberberg D, Reufi B, *et al.* Studies on the role of recombinant human erythropoietin in the growth regulation of human nonhematopoietic tumor cells *in vitro*. Ann Hematol 1991; 63: 5-8.

362. Rosti V, Pedrazzoli P, Ponchio L, *et al.* Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro. Haematologica 1993; 78: 208-212.

363. Bauer E, Danhauser-Riedl S, De Riese W, *et al.* Effect of recombinant human erythropoietin on clonogenic growth of primary human tumor specimens in vitro. Onkologie 1992; 15: 254-258.

364. Wollman Y, Westphal G, Blum M, *et al.* The effect of human recombinant erythropoietin on the growth of a human neuroblastoma cell line. Life Sci 1996; 59: 315-322.

365. Westphal G, Niederberger E, Blum C, *et al.* Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: Expression and aspects regarding functionality. Tumori 2002; 88: 150-159.

366. Joiner B, Hirst VK, McKeown SR, *et al.* The effect of recombinant human erythropoietin treatment on tumour radiosensitivity and cancer-associated anaemia in the mouse. Br J Cancer 1993; 68: 720-726.

367. Mittelman M, Neumann D, Peled A, *et al.* Erythropoietin induces tumor regression and antitumor immune responses in murine myeloma models. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 5181-5186.

368. Thews O, Koenig R, Kelleher DK, *et al.* Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. Br J Cancer 1998; 78: 752-756.

369. Stuben G, Thews O, Pottgen C, *et al.* Recombinant human erythropoietin increases the radiosensitivity of xenografted human tumours in anaemic nude mice. J Cancer Res Clin Oncol 2001; 127: 346-350.

370. Stuben G, Pottgen C, Knuhmann K, *et al.* Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in radiosensitivity of experimental human tumors in nude mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2003; 55: 1358-1362.

371. Thews O, Kelleher DK, Vaupel P. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. Cancer Res 2001; 61: 1358-1361.

372. Glaser CM, Millesi W, Kornek GV, *et al.* Impact of hemoglobin level and use of recombinant erythropoietin on efficacy of preoperative chemoradiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001; 50: 705-715.

373. Antonadou D, Cardamakis E, Puglisi M, *et al.* Erythropoietin enhances radiation treatment efficacy in patients with pelvic malignancies. Final results of a randomized phase III study. European Conference Clinical Oncology. Lisbon, 2001.

374. Leyland-Jones B. Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly. Lancet Oncol 2003; 4: 459-460.

375. Henke M, Laszig R, Rube C, *et al.* Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: Randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet 2003; 362: 1255-1260.

376. Ke LD, Shi YX, Im SA, *et al.* The relevance of cell proliferation, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor production to angiogenesis and tumorigenicity in human glioma cell lines. Clin Cancer Res 2000; 6: 2562-2572.

377. Chaudhry IH, O'Donovan DG, Brenchley PE, *et al.* Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. Histopathology 2001; 39: 409-415.

378. Ke LD, Shi YX, Yung WK. VEGF(121), VEGF(165) overexpression enhances tumorigenicity in u251 mg but not in ng-1 glioma cells. Cancer Res 2002; 62: 1854-1861.

379. Sonoda Y, Kanamori M, Deen DF, *et al.* Overexpression of vascular endothelial growth factor isoforms drives oxygenation and growth but not progression to glioblastoma multiforme in a human model of gliomagenesis. Cancer Res 2003; 63: 1962-1968.

380. Taghian A, Suit H, Pardo F, *et al. In vitro* intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 23: 55-62.

381. Taghian A, DuBois W, Budach W, *et al. In vivo* radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1995; 32: 99-104.

382. Bernhard EJ, McKenna WG, Hamilton AD, *et al.* Inhibiting ras prenylation increases the radiosensitivity of human tumor cell lines with activating mutations of ras oncogenes. Cancer Res 1998; 58: 1754-1761.

383. Delmas C, Heliez C, Cohen-Jonathan E, *et al.* Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. Int J Cancer 2002; 100: 43-48.

384. Cohen-Jonathan E, Evans SM, Koch CJ, *et al.* The farnesyltransferase inhibitor l744,832 reduces hypoxia in tumors expressing activated H-Ras. Cancer Res 2001; 61: 2289-2293.

385. Dill - Bour C. Distribution intracellulaire des anthracyclines : Implication dans le processus de mort cellulaire induite et le phénotype de résistance pléïotrope. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2001. : pp174.

386. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of rna isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-159.

387. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, *et al.* Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. Cancer Res 1999; 59: 3374-3378.

388. Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, *et al.* Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. Int J Cancer 2003; 105: 176-181.

389. Lund EL, Hog A, Olsen MW, *et al.* Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma. Int J Cancer 2004; 108: 833-838.

390. Wong MP, Chan SY, Fu KH, *et al.* The angiopoietins, tie2 and vascular endothelial growth factor are differentially expressed in the transformation of normal lung to non-small cell lung carcinomas. Lung Cancer 2000; 29: 11-22.

391. Whitacre CM, Feyes DK, Satoh T, *et al.* Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer PC4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. Clin Cancer Res 2000; 6: 2021-2027.

392. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

393. Chastagner P, Pinel S, Merlin JL, *et al.* Influence of overall treatment time of topotecan and radiotherapy administered alone or in combination in two xenografted human glioblastoma multiforme. Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2001; 20: 237.

394. Carlini RG, Reyes AA, Rothstein M. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis *in vitro*. Kidney Int 1995; 47: 740-745.

395. Bernsen HJ, Rijken PF, Oostendorp T, *et al.* Vascularity and perfusion of human gliomas xenografted in the athymic nude mouse. Br J Cancer 1995; 71: 721-726.

396. Antunes L, Angioi-Duprez KS, Bracard SR, *et al.* Analysis of tissue chimerism in *nude* mouse brain and abdominal xenograft models of human glioblastoma multiforme: What does it tell us about the models and about glioblastoma biology and therapy? J Histochem Cytochem 2000; 48: 847-858.

397. Blackwell KL, Kirkpatrick JP, Snyder SA, *et al.* Human recombinant erythropoietin significantly improves tumor oxygenation independent of its effects on hemoglobin. Cancer Res 2003; 63: 6162-6165.

398. Adam MF, Dorie MJ, Brown JM. Oxygen tension measurements of tumors growing in mice. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1999; 45: 171-180.

399. Hirst DG. Oxygen delivery to tumors. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1986; 12: 1271-1277.

400. Durand RE, Raleigh JA. Identification of nonproliferating but viable hypoxic tumor cells *in vivo*. Cancer Res 1998; 58: 3547-3550.

401. Lee J, Siemann DW, Koch CJ, *et al.* Direct relationship between radiobiological hypoxia in tumors and monoclonal antibody detection of EF5 cellular adducts. Int J Cancer 1996; 67: 372-378.

402. Busch TM, Hahn SM, Evans SM, *et al.* Depletion of tumor oxygenation during photodynamic therapy: Detection by the hypoxia marker EF3 *[2-(2-nitroimidazol-1[h]-yl)-n-(3,3,3-trifluoropropyl)acetamide]*. Cancer Res 2000; 60: 2636-2642.

403. Tozer GM, Bhujwalla ZM, Griffiths JR, *et al.* Phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and blood perfusion of the RIF-1 tumor following X-irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1989; 16: 155-164.

404. Goda F, Bacic G, O'Hara JA, *et al.* The relationship between partial pressure of oxygen and perfusion in two murine tumors after x-ray irradiation: A combined gadopentetate dimeglumine dynamic magnetic resonance imaging and in vivo electron paramagnetic resonance oximetry study. Cancer Res 1996; 56: 3344-3349.

405. Vaupel P, Frinak S, O'Hara M. Direct measurement of reoxygenation in malignant mammary tumors after a single large dose of irradiation. Adv Exp Med Biol 1984; 180: 773-782.

406. Grau C, Overgaard J. The influence of radiation dose on the magnitude and kinetics of reoxygenation in a c3h mammary carcinoma. Radiat Res 1990; 122: 309-315.

407. Samoto K, Ikezaki K, Ono M, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor and its possible relation with neovascularization in human brain tumors. Cancer Res 1995; 55: 1189-1193.

408. Maity A, Pore N, Lee J, *et al.* Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. Cancer Res 2000; 60: 5879-5886.

409. Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, *et al.* PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal vegf promoter. Cancer Res 2003; 63: 236-241.

410. Damert A, Machein M, Breier G, *et al.* Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms. Cancer Res 1997; 57: 3860-3864.

411. Guo P, Xu L, Pan S, *et al.* Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites. Cancer Res 2001; 61: 8569-8577.

412. Abdollahi A, Lipson KE, Han X, *et al.* SU5416 and SU6668 attenuate the angiogenic effects of radiation-induced tumor cell growth factor production and amplify the direct anti-endothelial action of radiation in vitro. Cancer Res 2003; 63: 3755-3763.

413. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. Mol Cell Biol 1996; 16: 4604-4613.

414. Potgens AJ, Lubsen NH, van Altena MC, *et al.* Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from cys to ser mutations. J Biol Chem 1994; 269: 32879-32885.

415. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: Angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. Eur J Cancer 2000; 36: 1649-1660.

416. Stuschke M, Budach V, Budach W, *et al.* Radioresponsiveness, sublethal damage repair and stem cell rate in spheroids from three human tumor lines: Comparison with xenograft data. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1992; 24: 119-126.

417. Stuschke M, Budach V, Kalff RL, *et al.* Spheroid control of malignant glioma cell lines after fractionated irradiation: Relation to the surviving fractions at 2 Gy and colony forming efficiencies in a soft agar clonogenic assay. Radiother Oncol 1993; 27: 245-251.

418. Stuben G, Thews O, Pottgen C, *et al.* Impact of anemia prevention by recombinant human erythropoietin on the sensitivity of xenografted glioblastomas to fractionated irradiation. Strahlenther Onkol 2003; 179: 620-625.

419. Horsman MR, Khalil AA, Siemann DW, *et al.* Relationship between radiobiological hypoxia in tumors and electrode measurements of tumor oxygenation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1994; 29: 439-442.

420. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Toomey D. Erythropoietin enhances the antitumor efficacy of a cisplatin and gemcitabine chemotherapy regime in a murine model of lewis lung canrcinoma. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2004: 509.

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire
Ang-1 et -2 : angiopoïétine-1 et -2
ARCON : ***a**ccelerated **r**adiotherapy combined with **c**arbogen and **n**icotinamide*
ARNm : ARN messager
ARNT1 : ***a**ryl **h**ydrocarbon **r**eceptor **n**uclear translocator **1***
ATCC : ***A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection*
ATM : ***a**taxia **t**elengiectasia **m**utated*
ATP : **a**dénosine **tri**phosphate
BER : ***b**ase **e**xcision **r**epair* = système de réparation par excision de bases
BET : **b**romure d'**éth**idium
bFGF : ***b**asic **f**ibroblast **g**rowth **f**actor*
BFU-E : ***b**urst **f**orming **u**nits-**e**rythroïd*
BHE : **b**arrière **h**émato-**e**ncéphalique
BSA : albumine sérique bovine
BrdUrd : **br**omo**d**éoxy**uri**dine
CDK : ***c**yclin-**d**ependant **k**inase*
CFU-E : ***c**olony **f**orming **u**nits-**e**rythroïd*
CHART : ***C**ontinuous **H**yperfractinated **A**ccelerated **R**adiation **T**herapy*
CHO : ***c**hinese **h**amster **o**vary*
CO : monoxyde de carbone
CO_2 : dioxide de carbone
Cy3 : *Cyanine dye 3*
DAHANCA : ***D**anish **H**ead **a**nd **N**eck **Ca**ncer*
DAPI : 4'6-**di**amidino-2-**p**henyl**i**ndole
DNA-PK : ***DNA**-dependant **p**rotein **k**inase*
DO : **d**ensité **o**ptique
Domaine SH2 : ***S**rc **h**omology 2 domain*
2,3-DPG : 2,3-**di**phos**p**ho**g**lycérate
DTT : **di**thi**t**réitol
EDTA : ***e**thylene **d**iamine **t**etraacetic **a**cid*
EGF : ***e**pidermal **g**rowth **f**actor*
EORTC : ***E**uropean **O**rganization for **R**esearch and **T**reatment **C**ancer*
EPO : **é**rythro**po**ïétine endogène
Eppi : **e**au **p**our **p**réparation **i**njectable
EPR : ***e**lectron **p**aramagnetic **r**esonance*
ERO : **e**spèces **r**éactives de l'**o**xygène
[^{18}F]-FDG : [^{18}F]-**fluoro**d**é**oxy**g**lucose, où [^{18}F] est un isotope du fluor émetteur de positons
FGF : ***f**ibroblast **g**rowth **f**actor*
FIH-1 : ***f**actor **i**nhibiting **H**IF-**1***
GAPDH : **G**lycér**a**ldéhyde-3-**p**hosphate **dé**s**h**ydrogénase
G-CSF : ***g**ranulocyte **c**olony-**s**timulating **f**actor*
GLUT : transporteur du **glu**cose
GM-CSF : ***g**ranulocyte/**m**acrophage **c**olony-**s**timulating **f**actor*
Grb2 : ***g**rowth **f**actor **r**eceptor **b**inding protein **2***

Gy : Gray
HIF-1 : ***hypoxia inducible factor-1***
HR : ***homologous recombination*** = système de réparation par recombinaison homologue
HRE : ***hypoxia responsive element***
HUVEC : ***human umbilical cord endothelial cell***
IA : index **a**poptotique
IdUrd : **I**odod**é**oxy**uri**dine
IGF : ***insuline-like growth factor***
IGF-BP 1 : ***insuline-like growth*** factor-**b**inding **p**rotein **1**
IgG : **I**mmuno**g**lobuline **G**
IL : ***interleukine***
JAK2 : ***Janus kinase 2***
kDa : kiloDalton
MAPK : ***mitogen activated protein kinase***
MDM2 : ***mouse double minute 2***
MMP : ***matrix metalloproteinase***
MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NER : ***nucleotides excision repair*** = système de réparation par excision de nucléotides
NF-κB : **n**uclear **f**actor κB
NHEJ : ***non-homologous end-joining*** = système de réparation par religation non homologue
NO : **o**xide **n**itrique
NOS 2 : *Nitric oxide synthetase 2*
O_2 : dioxygène ou oxygène moléculaire
OMS : **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté
PAI-1 : **p**lasminogen **a**ctivator **i**nhibitor-1
PARP : **p**oly(ADP-**r**ibose) **p**olymérase
PBS : ***phosphate-buffered saline***
PCNA *: proliferating cell nuclear antigen),*
PDGF : ***platelet derived growth factor***
PEG : **p**oly**é**thylène**g**lycol
PEG-Hb : hémoglobine bovine purifiée couplée à du polyéthylèneglycol
PI3K : **p**hosphat**i**dylinositol **3**-kinase
PLCγ: **p**hospholipase **C**γ
PMSF : ***phenylmethylsulfonyle fluoride***
pO_2 : pression partielle en oxygène
pRb : **p**rotéine du **r**étino**b**lastome.
Pro : **Pro**line
PTEN : ***phosphatase ans tensin homolog deleted on chromosome 10***
pVHL : **p**rotéine von **H**ippel-**L**indau
R-EGF : **r**écepteur à l'**EGF**
R-EPO : **r**écepteur à l'**é**rythro**p**oïétine
RER : **r**atio d'**e**xpression **r**elative
rHuEPO : *recombinant human erythropoietin*
RMN : **r**ésonance **m**agnétique **n**ucléaire
RT-PCR : *reverse transcription and polymerase chain reaction*
RTK : **r**écepteur à activité **T**yrosine **k**inase

SCF : ***stem cell factor***

SDS : ***sodium dodecylsulfate***

SF_2 : ***surviving fraction following a dose of 2 Gy***

STAT : ***signal transducer and activator of transcription***

TBST : **tris buffer saline-tween 20**

TCD_{50} : **tumor control dose 50**

TEMED : N,N,N', N'-**tétra-méthyl-éthylènediamine**

TEP : **tomographie par émission de positons**

TGFβ : ***Transforming growth factor β***

TNFα : ***tumor necrosis factor α***

t-PA : activateur du plasminogène de type tissulaire

TPZ : **tirapazamine**

Tyr : Tyrosine

VEGF/VPF : ***vascular endothelial growth factor / vascular permeability factor***

VEGF-R1 : Récepteur au VEGF de type 1

UI : Unité Internationale

u-PA : activateur du plasminogène de type urokinase

vs : versus

LISTES DES TABLEAUX ET DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Types histologiques des tumeurs astrocytaires selon la classification de l'OMS et données pronostiques..... **4**

Tableau 2 : Principaux gènes cibles du facteur de transcription HIF-1. ..... **28**

Tableau 3 : Principaux facteurs endogènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse..... **35**

MATERIEL ET METHODES

Tableau 4 : Milieu de culture des cellules U87..... **90**

Tableau 5 : Solution de blocage des sites antigéniques aspécifiques. **103**

Tableau 6 : Solution diluante de l'anticorps. **103**

Tableau 7 : Caractéristiques des fluorochromes étudiés. **104**

Tableau 8 : Composition des blocs filtres utilisés. **105**

Tableau 9 : Etapes de déshydratation et d'imprégnation des fragments tumoraux..... **106**

Tableau 10 : Etapes de déparaffinage des lames..... **107**

Tableau 11 : Composition de la solution diluante. **107**

Tableau 12 : Bains de contre coloration et de déshydratation. **108**

Tableau 13 : Composition du mélange pour la réaction de transcription inverse. **110**

Tableau 14 : Description des amorces spécifiques utilisées pour la PCR. **111**

Tableau 15 : Composition du mélange pour l'amplification du gène codant pour le VEGF..... **112**

Tableau 16 : Cycles d'amplification du gène codant pour le VEGF. **112**

Tableau 17 : Composition du tampon de lyse de type RIPA..... **114**

Tableau 18 : Composition des gels d'acrylamide..... **15**

Tableau 19 : Composition du tampon de transfert..... **116**

Tableau 20 : Protocole d'activation des membranes. **116**

Tableau 21 : Solution de saturation des membranes..... **117**

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 22 : Temps de doublement des cellules U87. ..... **120**

Tableau 23 : Délai séparant le jour de la greffe (J_G) et le jour où le volume tumoral atteint 250 ± 50 mm^3 (J_1). **123**

Tableau 24 : Densité vasculaire déterminée à partir du comptage des vaisseaux sanguins intra-tumoraux marqués par l'anticorps anti-collagène IV..... **126**

Tableau 25 : Effet de l'rHuEPO sur la concentration sanguine en hémoglobine avant irradiation (J_1). **131**

Tableau 26 : Evolution du taux d'hémoglobine en fonction du volume des tumeurs GBM Nan1. **132**

Tableau 27 : Effet de l'rHuEPO sur la concentration sanguine en hémoglobine après 5 fractions d'irradiation (J_6). **134**

Tableau 28 : Effet de l'rHuEPO sur la pression partielle en oxygène de xénogreffes GBM Nan1 après administration tardive de l'rHuEPO..... **142**

Tableau 29 : Influence de l'rHuEPO sur l'expression des transcrits $VEGF_{165}$ et $VEGF_{121}$, deux isoformes diffusibles du VEGF avant irradiation (J_1). **156**

Tableau 30 : Influence de l'rHuEPO sur l'expression des transcrits $VEGF_{165}$ et $VEGF_{121}$, deux isoformes diffusibles du VEGF après 5 fractions d'irradiation..... **158**

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Voies de transduction du signal activées en réponse aux dommages de l'ADN radio-induits. **14**

Figure 2 : Les différents types de mort cellulaire après irradiation..... **18**

Figure 3 : Régulation de l'activité de HIF-1 par l'hypoxie. **25**

Figure 4 : Voies de transduction du signal impliquées dans l'expression et l'activation de HIF-1.. **27**

Figure 5 : Les deux formes d'hypoxie..... **31**

Figure 6 : Les étapes de la formation des néo-vaisseaux tumoraux..... **38**

Figure 7 : **A)** Structure de l'EF5. **B)** Schéma de l'activation par réduction du pimonidazole..... **45**

Figure 8 : Radiosensibilité relative en fonction de la pression partielle en oxygène dans l'environnement cellulaire..... **52**

Figure 9 : Le misonidazole en tant que radiosensibilisant des cellules hypoxiques..... **58**

Figure 10 : Mécanisme de la cytotoxicité de la tirapazamine à l'égard des cellules hypoxiques.... **60**

Figure 11 : Structure primaire de l'érythropoïétine mature circulante. **65**

Figure 12 : Cellules hématopoïétiques cibles de l'EPO. **67**

Figure 13 : Boucle de régulation de l'érythropoïèse..... **68**

Figure 14 : Structure du récepteur à l'érythropoïétine..... **70**

Figure 15 : Activation de la voie de signalisation impliquant les protéines JAK2 et STAT5. ..... **71**

Figure 16 : Principales cascades de signalisation intracellulaire activées par la fixation de l'EPO sur son récepteur..... **72**

MATERIEL ET METHODES

Figure 17 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental *in vivo* mis en œuvre dans notre étude. **96**

Figure 18 : Appareil de radiothérapie de type Muller RT 100® utilisé pour l'irradiation des souris *nude*. **98**

Figure 19 : pO_2-Histograph, Eppendorf™ utilisé pour mesurer la pression partielle en oxygène intratumorale. **100**

Figure 20 : Schéma du système de transfert semi-sec des protéines. **116**

RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 21 : Courbe de croissance des cellules U87. ..... **120**

Figure 22 : Effet de concentrations croissantes d'rHuEPO et de différents temps de contact sur la prolifération et la viabilité des cellules U87 évaluée par le test MTT. **121**

Figure 23 : Courbe de croissance des tumeurs GBM Nan1 traitées ou non par rHuEPO.124

Figure 24 : Courbe de croissance des tumeurs U87 traitées ou non par rHuEPO..... **124**

Figure 25 : Images représentatives de la vascularisation tumorale dans les xénogreffes. **126**

Figure 26 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental *in vivo* mis en œuvre dans notre étude. **129**

Figure 27: Profils de mesures de pO_2 obtenus à l'aide du *pO_2-Histograph, Eppendorf.* **135**

Figure 28 : Histogrammes de distribution des valeurs de pO_2. ..... **137**

Figure 29 : PO_2 moyenne et pO_2 médiane mesurées avant irradiation (J_1). **138**

Figure 30 : Fraction hypoxique < 2,5 mmHg et fraction hypoxique < 5 mmHg mesurées avant irradiation (J_1)..... **139**

Figure 31: Corrélation entre le taux d'hémoglobine et la pO_2 médiane ou la fraction hypoxique inférieure à 2,5 mmHg..... **143**

Figure 32 : Validation des champs d'observation par recouvrement de la fluorescence rouge du Cy3, et de la fluorescence bleue du DAPI, caractéristique des noyaux des cellules. **145**

Figure 33 : Images représentatives de la liaison de l'EF5 dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 à J1. ..... **146**

Figure 34 : Evaluation de la liaison de l'EF5 par l'intensité de fluorescence dans les tumeurs GBM Nan1 et U87..... **147**

Figure 35 : Evaluation relative de la liaison de l'EF5 dans les tumeurs GBM Nan1 et U87. ..... **148**

Figure 36 : Représentation schématique de la modification du gradient de diffusion de l'oxygène par l'rHuEPO. **150**

Figure 37 : PO_2 moyenne et pO_2 médiane mesurées après 5 fractions de 2 Gy (J_6) dans les tumeurs GBM Nan1 et dans les tumeurs U87. ..... **151**

Figure 38 : Fraction hypoxique inférieure à 2,5 mmHg et fraction hypoxique inférieure à 5 mmHg mesurées après 5 fractions de 2 Gy (J_6) dans les tumeurs GBM Nan1 et dans les tumeurs U87. **152**

Figure 39 : *Ratio* d'expression relative des transcrits du VEGF diffusible dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 avant irradiation (J_1) **157**

Figure 40 : *Ratio* d'expression relative des transcrits du VEGF diffusible dans les tumeurs GBM Nan1 et U87 après 5 fractions d'irradiation (J_6). **158**

Figure 41 : Film d'autoradiographie représentant l'expression du VEGF dans des tumeurs GBM Nan1. ..... **160**

Figure 42 : Expression protéique du VEGF en fonction du volume tumoral **160**

Figure 43 : Influence de l'rHuEPO sur l'expression du VEGF dans des tumeurs GBM Nan1 à J_1 et à J_6 ..... **161**

Figure 44 : Effet de l'rHuEPO sur la survie des cellules U87 ..... **163**

Figure 45 : Effet de l'rHuEPO et de la radiothérapie (2 Gy) sur la fraction survivante des cellules U87 déterminée par la méthode de clonage en dilutions limites. **164**

Figure 46 : Effet de l'rHuEPO sur la SF_2 des cellules U87 ..... **165**

Figure 47 : Evolution du volume tumoral médian des tumeurs GBM Nan1 et U87 xénogreffées. **166**

Figure 48 : Influence de l'rHuEPO sur la réponse à la radiothérapie des tumeurs GBM Nan1 et U87 xénogreffées selon la représentation de Kaplan-Meier. **168**

Figure 49 : Temps de triplement des tumeurs GBM Nan1 et U87. ..... **169**

PUBLICATIONS, COMMUNICATION ECRITES ET ORALES

Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., Vol. 59, No. 1, pp. 250–259, 2004
Copyright © 2004 Elsevier Inc.
Printed in the USA. All rights reserved
0360-3016/04/$–see front matter

ELSEVIER

doi:10.1016/j.ijrobp.2003.12.022

BIOLOGY CONTRIBUTION

ERYTHROPOIETIN-INDUCED REDUCTION OF HYPOXIA BEFORE AND DURING FRACTIONATED IRRADIATION CONTRIBUTES TO IMPROVEMENT OF RADIORESPONSE IN HUMAN GLIOMA XENOGRAFTS

SOPHIE PINEL, PHARM.D.,* MURIEL BARBERI-HEYOB, PH.D.,*
ELIZABETH COHEN-JONATHAN, M.D., PH.D.,†‡ JEAN-LOUIS MERLIN, PHARM.D., PH.D.,*
CAROLINE DELMAS, M.SC.,‡ FRANÇOIS PLENAT, M.D., PH.D.,§ AND PASCAL CHASTAGNER, M.D., PH.D.‖

*Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France; §Laboratoire d'Histo-Pathologie Expérimentale, Faculté de Médecine, Vandœuvre-lès-Nancy, France; ‖Département d'Oncologie Pédiatrique, CHU, Vandœuvre-lès-Nancy, France; †Département de Radiothérapie and ‡Unité INSERM U 563, Institut Claudius Régaud, Toulouse, France

Purpose: Our study investigated the influence of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) treatment, inducing raised hemoglobin levels in nonanemic mice, on intratumor oxygenation before and during fractionated irradiation. Furthermore, the consequences of rHuEPO administration on tumor response to fractionated radiotherapy (RT) were evaluated.

Methods and Materials: Experiments were performed on two human malignant glioma (GBM Nan1 and U87) xenografted in nude mice. RHuEPO was daily delivered (0.3 IU/g/day, 5 days/week). Tumor hypoxia was assessed before (T1) and during (T6) fractionated irradiation using *(1)* pO_2-Histograph (Eppendorf, Hamburg, Germany) and *(2)* the EF5-binding assay. Vascular density was determined using type IV collagen immunostaining. To assess RT efficacy, the irradiation schedule was 20 fractions of 2 Gy, once daily, 5 days/week over 4 weeks.

Results: At T1, hemoglobin levels in rHuEPO-treated mice were significantly increased. Percentage of pO_2 values <2.5 mm Hg was reduced in rHuEPO-treated tumors as compared with control groups (37.1 ± 19.1% vs. 58.5 ± 27.0%; $p = 0.009$ for GBM Nan1; 81.6 ± 13.4% vs. 91.5 ± 8.3%; $p = 0.035$ for U87). The decrease of viable hypoxic tumor cells fraction after rHuEPO was confirmed by the EF5-binding assay. Vascular density was not altered after rHuEPO treatment. At T6, rHuEPO reduced the hypoxic fraction by about 20% ($p = 0.036$ and $p = 0.171$) in GBM Nan1 and U87 irradiated tumors. RHuEPO did not influence tumor growth by itself. RT alone or combined with rHuEPO induced a significant tumor growth delay. Finally, rHuEPO significantly enhanced RT efficacy ($p = 0.012$ in GBM Nan1 and $p = 0.037$ in U87), resulting in radiopotentiation ratios of 1.21 and 1.54 for respective models.

Conclusions: Our results indicate that rHuEPO, by enhancing blood oxygen–carrying capacity, decreases intrinsic tumor hypoxia and maintains its effect during fractionated irradiation in malignant glioma xenografts. Therefore, rHuEPO contributes to radiosensitize these tumors. © **2004 Elsevier Inc.**

Fractionated radiotherapy, Malignant glioma, pO_2, Hypoxic marker, Vascular density.

INTRODUCTION

Hypoxia has long been recognized as a major cause of radiation therapy failure in the local control of malignancies. The presence of low oxygen partial pressure (pO_2) levels can confer cell protection from ionizing radiation, and it has been shown that an approximately 2–3 times higher radiation dose is necessary to kill hypoxic cells vs. well-oxygenated cells (1, 2).

More recent studies have demonstrated that hypoxia may also contribute to phenotypic heterogeneity and enhance malignant progression (3). Overcoming hypoxia is therefore a fundamental aspect of improving nonsurgical cancer treatment efficacy. Thus several trials (using hyperbaric oxygen, oxygen and carbogen breathing, hypoxic cell radiosensitizers, or blood transfusions) have been conducted in an attempt to reverse hypoxia in solid tumors. In a meta-analysis concerning these clinical trials, Overgaard and Horsman (4)

Reprint requests to: Pascal Chastagner, M.D., Ph.D., Département d'Oncologie Pédiatrique, Médecine Infantile II, Hôpital d'Enfants, Allée du Morvan, 54 500 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel: (+33) 3-83-15-46-37; Fax: (+33) 3-83-15-45-51; E-mail: p.chastagner@chu-nancy.fr

Supported by the Alexis Vautrin Center Cancer Research Funds and the French "Association pour la Recherche sur le Cancer."

Acknowledgments—We wish to thank Dr. C. J. Koch who kindly provided EF5 and the Cy3-conjugated ELK3-51 monoclonal antibody. We thank Pr. A. Duprez for his very helpful suggestions and the Radiation Therapy Department of the Alexis Vautrin Center, in particular Dr. C. Marchal and Dr. S. Hoffstetter. We are thankful to Dr E. Desandes (Statistics Department of Alexis Vautrin Center) for his help to perform statistical analysis.

Received Aug 25, 2003, and in revised form Dec 8, 2003. Accepted for publication Dec 10, 2003.

showed a significant improvement in local tumor control and in survival for patients with head–and–neck cancer receiving treatments to overcome tumor hypoxia.

Among different parameters involved in tumor hypoxia (5, 6), severely hypoxic regions can arise from reduced oxygen-carrying capacity of the blood. Actually, experimental and clinical data have provided evidence of a strong relationship between decreased hemoglobin level and a poor oxygenation status in solid tumors (7–10). As demonstrated by Becker *et al.* in patients with head–and–neck cancer, severe anemia leads to a significantly lower median tumor pO_2 and a higher fraction of hypoxic pO_2 values (8, 9).

Additionally, numerous studies have reported that anemia in patients undergoing radiation therapy was associated with an impaired outcome (11, 12). Authors hypothesized that the reduced oxygen-carrying capacity of the blood in anemic patients might decrease the arterial oxygen supply to the tumor, leading to a reduction of the therapeutic effect of radiotherapy (RT) (9, 13).

Because anemia commonly occurs in cancer patients, therefore limiting the oxygen availability to tumor tissue, maintenance of the red blood cell volume may constitute a fundamental aspect to reverse tumor hypoxia. Vaupel and coworkers, to test this hypothesis, used recombinant human erythropoietin (rHuEPO) to prevent anticancer therapy–induced anemia from developing in tumor-bearing rodents; they have investigated the consequences of this anemia correction on tumor oxygenation and the RT efficiency (14–17). They first reported that rHuEPO administration resulted in a significant increase in the median pO_2 (14); in subsequent studies, they showed that rHuEPO treatment significantly enhanced tumor radiosensitivity after a single dose of ionizing radiation (15–17).

The present study aimed at evaluating, for the first time, rHuEPO effects on tumor hypoxia before and during fractionated irradiation in nonanemic nude mice, taking into account the fraction of viable hypoxic tumor cells and its consequences on tumor response to fractionated RT. Experiments were performed on two human high-grade glioma tumor lines expressing radically different radiosensitivity (18).

METHODS AND MATERIALS

Animals and tumor models

Six- to eight-week-old, pathogen-free, athymic Ncr/Sed nude (*nu/nu*) mice were obtained from Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France). Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines. All experiments were carried out under general anesthesia achieved by intraperitoneal injection of 250 μL of 10 mg/mL ketamine (Panpharma, Fougères, France).

Two human malignant glioma models were used for this study.

The first model (GBM Nan1) was derived from a previously untreated malignant glioma of a 64-year-old woman (according to the World Health Organization grading, 1993). This tumor was directly transplanted into nude mice and maintained *in vivo* by sequential passages in nude mice. The pathologic and immunohistochemical characteristics were unchanged with the successive passages.

For the experiments, source tumors were excised, cleaned from necrotic tissue, cut into small chunks, and transplanted subcutaneously in either of the hind legs of each mouse.

The second model was obtained by injecting subcutaneously into both hind legs of each mouse, a suspension of U87 human malignant glioma cells (10^6 cells in 0.1 mL 0.9% NaCl), described in the *American Type Culture Collection (HTB-14).*

Tumor size was determined 3 times per week by measuring two larger perpendicular diameters with a caliper. Tumor volume (V) was calculated as $V = 1/2 \times$ larger diameter $\times$ (smaller diameter)^2.

Treatments

RHuEPO (EPREX), provided by Ortho-Biotech (France), was diluted in sterile water to a final concentration of 30 IU/mL. RHuEPO was injected subcutaneously at a dose of 0.3 IU/g of body weight, once daily, 5 days/week. In GBM Nan1 tumor model, rHuEPO injections were started 1 to 3 days after tumor implantation. In the U87 tumor model, rHuEPO was delivered as soon as a microtumor (approximately 1 mm in diameter) was observed. RHuEPO was administered 3 to 4 weeks before T1. In "RT + rHuEPO" mice groups, daily injections were maintained during the entire ionizing radiation treatment.

Fractionated RT alone or in combination with rHuEPO was started when the tumor volume reached 250 ± 50 mm^3.

To evaluate antitumor efficacy of radiation treatments, glioma xenografts were irradiated with 40 Gy (20 fractions of 2 Gy, once daily, 5 days/week over 4 weeks), following the same irradiation procedure as previously described (19).

The time needed for a tumor to triple its initial volume was used as the treatment endpoint.

Times corresponding to the beginning and the end of radiation treatment were defined as T1 and T29, respectively.

To determine the biologic parameters (i.e., hemoglobin concentrations and intratumor pO_2) in the course of fractionated irradiation, tumors were irradiated with 10 Gy (five fractions of 2 Gy, once daily, 5 days/week). Biologic parameter measurements were performed approximately 24 h after the last fraction of ionizing radiation (defined as T6).

Measurement of hemoglobin concentration

A blood sample (80 μL) was taken from the tail vein of mice by transecting the last few millimeters of the tail, and blood was drawn into a small capillary tube (Clinitubes, Radiometer, Neuilly Plaisance, France). Hemoglobin concentration was measured using a cyanmethemoglobin method (Hemoglobin kit 525A, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). All results were normalized to hemoglobin concentrations determined in a mice control group with

a multiparameter automated hematology analyzer (Coulter Counter M^5 30).

Polarographic measurements of tumor oxygenation (pO_2)

In the GBM Nan1 and U87 tumor model, intratumor pO_2 measurements were performed at three different times (T1, T6, and T29). The pO_2 was measured polarographically using the pO_2-Histograph (Eppendorf, Hamburg, Germany). Anesthetized mice were immobilized by taping limb extremities on a polystyrene plate, taking care of not to induce ischemia on animal tissue.

The instrument calibration and probe insertion into the tumor was performed as previously described (18, 20). Intratumor probe progression was set to 0.4 mm forward step and a 0.2 mm retraction step for each reading, and automatic probe advancement was started after the pO_2 values had stabilized. The oxygen tension was evaluated at least from 4 different electrode tracks per tumor; a minimum of 12 measurements per track was recorded. Mean and median pO_2 values and percentages of pO_2 values <2.5 mm Hg and <5 mm Hg were calculated using the pO_2 Pool (version 1.2) software provided by Eppendorf.

EF5 detection of hypoxia

EF5 is a pentafluorinated-etanidazole derivative selectively metabolized into viable hypoxic cells; its metabolites form adducts with cellular macromolecules. As previously described, localized areas of tumor hypoxia were assessed in frozen tissue sections by immunohistochemical identification of sites of EF5 metabolism using a specific monoclonal antibody ELK3-51 conjugated to the fluorochrome Cy3 (21, 22). EF5 and the Cy3-conjugated ELK3-51 monoclonal antibody were kindly provided by Dr C. J. Koch (Department of Radiation Oncology, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA).

Briefly, when tumor volume reached 250 ± 50 mm^3 (i.e., at T1), the GBM Nan1 or U87 grafted mice were injected intravenously with EF5 (0.01 mL/g body weight of a 10 mM in 0.9% saline), followed by an equal volume intraperitoneal injection 30 min later. Three hours after the first EF5 injection, mice were sacrificed and tumors were excised. From each tumor, several slices were cut and frozen in liquid nitrogen. EF5 adducts were then detected by direct immunofluorescence on 5-μm thick, 4% (m/v) formaldehyde-fixed, frozen sections using the Cy3-conjugated ELK3-51 monoclonal antibody (75 μg/mL) (22).

Fluorescence measurements were performed using an upright epifluorescence microscope (AX70 PROVIS, Olympus, France) fitted with a 100 W high-pressure mercury vapor lamp and a 10× objective. Fluorescent images of EF5/ELK3-51-Cy3 staining were recorded using a Peltier cooled (−25° C) charge-coupled device camera (DP50, Olympus, France) during a strictly controlled integration time. No interfering autofluorescence signal was observed in our experimental conditions. Ten fields per tumor, 1392 × 1040 pixels each, were recorded. After transformation of fluorescent images into grayscale images (range, 0–255), the immunofluorescent signal was analyzed and quantified using AnalySIS 3.1 software (SIS, Munster, Germany) to count the number of pixels of each gray intensity.

Vascular density analysis

Mice bearing human glioma xenografts were sacrificed and tumors were excised at T1 and T29. Because preliminary studies had shown that the tumor vascular basement membrane appeared continuous on sections immunostained for murine type IV collagen, microvessels were counted on sections immunostained for this antigen. Immunohistochemistry was performed on 5-μm thick, formaldehyde-fixed, paraffin-embedded sections of every tumor xenografts. After section dewaxing, formaldehyde fixation was inverted by pressure cooking the sections in 0.1 M citrate buffer (pH 6.0). Tissue sections were then enzyme-digested in a trypsin solution (0.1% m/v in 0.4% m/v $CaCl_2$) for 10 min at 37° C. Sections were incubated overnight at 4° C with a rabbit anti-mouse type IV collagen polyclonal antibody (Novotec, St Martin La Garenne, France; diluted 1:4000). Detection of the tissue-bound primary antibody was performed using a biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulin G (DAKO, Trappes, France diluted 1:200) and a streptavidin-peroxidase detection system (DAKO, Trappes, France diluted 1:200). Bound peroxidase was identified using the Vector *NovaRED* substrate (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). After a final washing step in tap water, tissue sections were counterstained with hematoxylin.

Each histologic section was scanned at low magnification (10×), and five fields were selected within areas of highest vascular density for grading. The total number of vessels in these five fields was then counted.

Statistical analysis

For hemoglobin concentrations, mean and median pO_2, percentages of pO_2 values <2.5 mm Hg or <5 mm Hg, and blood vessels counts, the statistical analysis was performed using the nonparametric Mann-Whitney U test.

Cumulative histograms (Fig. 1) were compared using a multiple linear regression analysis.

Tumor tripling times results are expressed as means ± SE. Efficacy of different treatments was presented according to the Kaplan-Meier model, considering the percentage of tumors not having reached 3 times their initial volume as the end point. Statistical analysis was conducted through the log–rank test.

For all tests used, p values <0.05 were considered significant.

RESULTS

rHuEPO-induced high hemoglobin levels

We assessed blood hemoglobin concentrations before irradiation (T1) to confirm the pharmacologic activity of rHuEPO in nonanemic nude mice, which should result in a

Table 1. Effect of rHuEPO on hemoglobin level before and after irradiation for mice bearing GBM Nan1 or U87 tumors

	Hemoglobin level (g/dL)														
	GBM Nan1									U87					
	T1			T6			T29			T1			T6		
	n	Mean ± SD	*p*	*n*	Mean ± SD	*p*	*n*	Mean ± SD	*p*	*n*	Mean ± SD	*p*	*n*	Mean ± SD	*p*
Control	6	15.6 ± 1.3	0.024*	9	16.0 ± 0.4	0.008*	6	14.4 ± 1.0	0.020*	12	15.5 ± 1.4	0.002*	7	14.0 ± 1.2	0.013*
rHuEPO	8	19.4 ± 2.8		11	18.0 ± 1.9		8	15.9 ± 1.0		11	17.7 ± 1.9		7	16.5 ± 1.5	
RT				11	14.7 ± 1.6	0.013†		ND					6	14.3 ± 0.9	0.044†
RT + rHuEPO				11	16.8 ± 2.6			ND					6	16.0 ± 1.5	

Abbreviations: rHuEPO = recombinant human erythropoietin; SD = standard deviation; RT = radiotherapy; *n* = number of mice per group; ND = not determined.

Hemoglobin concentrations were measured before (T1) and after (T6) irradiation. Measurements performed at T29 reflect rHuEPO influence after tumor growth see details in Material and Methods.

* *p* values concerning comparison vs. control (Mann-Whitney U-test).

† *p* values concerning comparison between RT and RT + rHuEPO (Mann-Whitney U-test).

boost of erythropoiesis associated with hemoglobin level above normal values. Results are presented in Table 1.

After exposure to rHuEPO for 3 to 4 weeks (T1), a significantly higher hemoglobin level was recorded in rHuEPO-treated mice groups as compared with in untreated control groups. Actually, daily rHuEPO injections led to an increase of hemoglobin level of about 25% and 15% in GBM Nan1 and U87 tumor-bearing mice at T1, respectively (i.e., at the theoretical time of irradiation onset).

In both glioma models, hemoglobin concentrations were also measured after five fractions of irradiation. RHuEPO injections resulted in a statistically significant increase of hemoglobin level (about 15% and 10%, respectively, in GBM Nan1 and U87 tumor-bearing mice) in irradiated mice groups.

In GBM Nan1 tumor-bearing mice receiving or not receiving rHuEPO, measurements performed at T29 showed a decline in hemoglobin concentrations associated with tumor growth. Despite the important decrease observed in rHuEPO-treated animals at T29, hemoglobin levels remained equal to values measured in the untreated control group at T1 (Table 1).

rHuEPO-induced decrease of tumor hypoxia

The partial pressure of oxygen in GBM Nan1 and U87 tumors was determined using the pO_2-Histograph (Eppendorf) before and after fractionated RT (Table 2 and Table 3).

At T1, rHuEPO exposure led to a significant decrease of the highly hypoxic fraction, defined as the percentage of pO_2 values <2.5 mm Hg. Likewise, the increase of mean and median pO_2 values highlighted an improvement of tumor tissue oxygenation in rHuEPO-treated tumors (Table 2).

On the other hand, in irradiated glioma xenografts (T6), pO_2 data showed a decrease in tumor hypoxia when mice received rHuEPO treatment, suggesting that the positive effect of rHuEPO on tumor tissue oxygenation was maintained after five fractions of ionizing radiation (Table 3). It is noteworthy that differences between rHuEPO-treated and untreated tumors were more marked after fractionated irradiation.

Data recorded for unirradiated GBM Nan1 xenografts at T29 also suggested a diminution of hypoxic fraction even for large tumors (≃1000 mm^3). Actually, the percentage of pO_2 values <2.5 mm Hg was 65.6 ± 27.4% in the control

Table 2. Effect of rHuEPO on intratumor pO_2 in GBM Nan1 and in U87 tumors before irradiation (T1)

		Before irradiation (T1)								
			Mean pO_2		Median pO_2		% of pO_2 values <2.5 mm Hg		% of pO_2 values <5 mm Hg	
		n	Mean ± SD	*p*	Mean ± SD	*p*	Mean ± SD	*p*	Mean ± SD	*p*
GBM Nan1	Control	21	5.0 ± 4.4	0.027*	2.3 ± 1.5	0.019	58.5 ± 27.0	0.009	81.6 ± 16.8	0.072
	rHuEPO	15	8.1 ± 4.9		4.4 ± 3.9		37.1 ± 19.1		69.5 ± 22.5	
U87	Control	13	1.9 ± 0.8	0.040	1.3 ± 0.3	0.051	91.5 ± 8.3	0.035	97.2 ± 5.2	0.001
	rHuEPO	13	3.7 ± 3.0		1.5 ± 0.3		81.6 ± 13.4		89.7 ± 9.5	

Abbreviations: rHuEPO = recombinant human erythropoetin; pO_2 = oxygen partial pressure; SD = standard deviation; *n* = number of tumors per group.

* *p* values concerning comparison versus control (Mann-Whitney U-test).

Table 3. Effect of rHuEPO on intratumor pO_2 in GBM Nan1 and in U87 tumors after irradiation (T6)

		After irradiation (T6)								
			Mean pO_2		Median pO_2		% of pO_2 values <2.5 mm Hg		% of pO_2 values <5 mm Hg	
		n	Mean ± SD	p	Mean ± SD	p	Mean ± SD	p	Mean ± SD	p
GBM Nan1	Control	10	4.8 ± 3.3		1.4 ± 0.9		73.2 ± 15.9		81.7 ± 12.4	
	RT	11	4.0 ± 2.0	0.018*	1.5 ± 0.7	0.055*	69.0 ± 15.1	0.036*	80.5 ± 12.5	0.022*
	RT + rHuEPO	15	9.5 ± 6.9		4.7 ± 5.1		47.9 ± 22.5		62.3 ± 19.3	
U87	Control	8	2.5 ± 2.0		1.4 ± 0.5		85.1 ± 12.7		94.6 ± 7.5	
	RT	9	3.5 ± 2.3	0.022*	1.6 ± 0.7	0.144*	74.5 ± 21.6	0.171*	88.9 ± 12.5	0.046*
	RT + rHuEPO	9	7.8 ± 5.4		2.7 ± 2.7		54.6 ± 24.3		74.3 ± 17.7	

Abbreviations as in Table 2.
* p values concerning comparison between RT and RT + rHuEPO (Mann-Whitney U-test).

group and 32.1 ± 18.8% in rHuEPO-treated tumors (p = 0.062), although median tumor sizes were similar in both groups (1020 mm^3) in the "control" group and 1016 mm^3 in "rHuEPO" tumors (p = 0.714).

In GBM Nan1 and U87 glioma xenografts, we used the immunohistochemical detection of EF5 adducts to assess tumor hypoxia intensity as well as the pattern of its distribution. Representative images corresponding, respectively, to moderate and maximal EF5 binding at T1 are shown in Fig. 2. Patterns and absolute levels of EF5 binding substantially varied in the same tumor and between the tumors of the same group. Nevertheless, brightness and the extent of regions corresponding to moderate and maximal EF5 metabolism were reduced in rHuEPO-treated tumors as compared with control tumors.

Cumulative histograms representing the distribution of pixel numbers as a function of gray intensities were plotted for each xenografted glioma model (Fig. 1). Quantitative image analysis highlighted a left shift of the histogram distribution obtained in the rHuEPO tumor group, as compared with the control tumor group. Given that high grayscale levels correspond to high fluorescence intensities, our data reveal a decrease of viable hypoxic tumor cells fraction in GBM Nan1 and U87 xenografts treated by rHuEPO (Fig. 1).

Tumor vascular density

Considering that rHuEPO could exert a proangiogenic activity and in such a case could affect tumor oxygenation, we examined the influence of rHuEPO on tumor vasculature in both glioma xenografts.

In GBM Nan1 xenografts at T1 and T29, vascular density in rHuEPO-treated tumors was comparable to those observed in untreated control tumors. Actually, cumulative microvessel counts (expressed as mean ± SD) were equal to 24 ± 7.0 (median, 24.5) in control tumors vs. 39 ± 26.2 (median, 28.5) in rHuEPO-treated tumors at T1. At T29, microvessel density was 38 ± 6.4 (median, 34) in control tumors vs. 37 ± 6.4 (median, 33.5) in rHuEPO-treated tumors. Moreover, with the technique used, no morphologic alteration of blood vessels was detected in tumors treated with rHuEPO as compared with control tumors (Fig. 3). Similar results were obtained in U87 glioma tumors (data not shown).

Treatment efficacy

The response of glioma xenografts to radiation therapy was assessed using a Kaplan-Meier analysis; the time needed for a tumor to triple its initial volume was used as the treatment endpoint (Fig. 4).

RHuEPO alone was not found to influence tumor growth. Conversely, ionizing radiation alone or in association with rHuEPO induced a significant tumor growth delay compared with control tumors. Further, tumor response to fractionated irradiation was enhanced when the animals received rHuEPO (log–rank test between the RT group and RT + rHuEPO group: p = 0.012 in GBM Nan1 and p = 0.037 in U87 tumors). Radiation therapy yielded a mean tripling time of 96.2 ± 3.7 days in GBM Nan1 tumors and 21.4 ± 4.5 days in U87 tumors. In the RT + rHuEPO group, mean tripling times increased up to 116.7 ± 7.1 day in GBM Nan1 and 33.0 ± 8.7 days in U87 tumors. The radiopotentiation ratios (calculated as RT + rHuEPO-treated/RT-treated) were, respectively, 1.21 for GBM Nan1 and 1.54 for U87 glioma xenografts.

DISCUSSION

The presence of hypoxic cells in human malignant tumors is widely considered as a potential therapeutic problem because it renders solid tumors more resistant to ionizing radiation (23–26). In particular, it was demonstrated that high-grade gliomas present poor oxygenation, which may contribute to their known radioresistance (27, 28).

The causes of tumor hypoxia are multiple but there is emerging evidence that appropriate oxygen delivery is one of the critical parameters influencing tumor oxygen status (6).

Several therapeutic approaches have focused on the improvement of tumor oxygenation to overcome hypoxia-related radioresistance (4). One such strategy is the use of

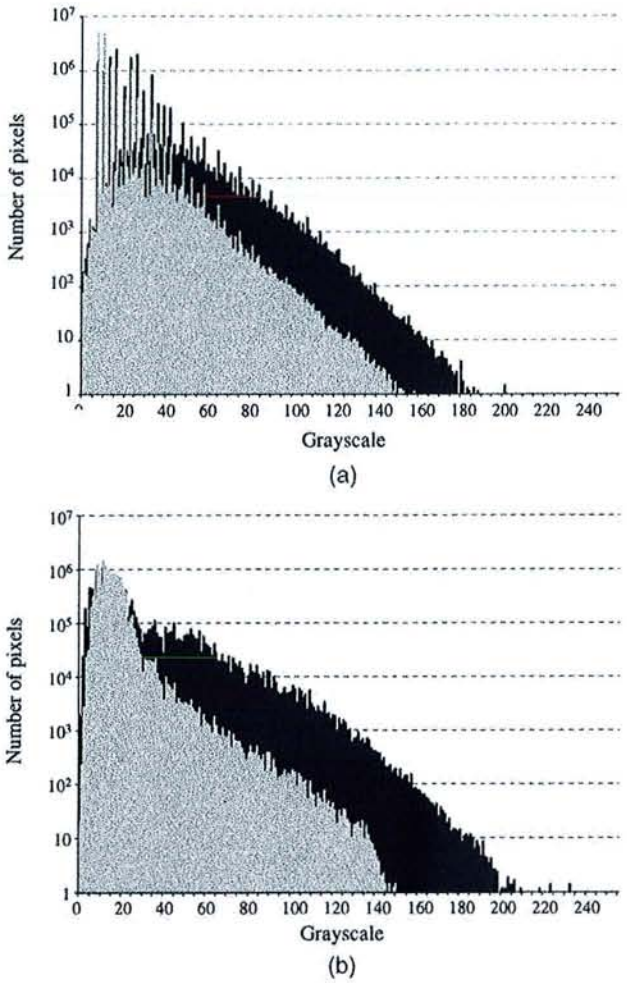


Fig. 1. Quantitative evaluation of EF5 binding in GBM Nan1 (a) and U87 tumors (b). Fluorescent images were transformed into grayscale images with high gray levels (range, 0–255) corresponding to high fluorescence intensities. For each tissue section, the number of pixels of each gray intensity was determined in 10 individual fields (10× magnification). Values recorded from these 10 fields were added to calculate the number of pixels of each gray intensity for each tumor. In each group, data from four tumors were pooled and mean histograms were plotted: control tumor group (black) and recombinant human erythropoietin–treated tumor group (gray). Statistical analysis was performed using a multiple linear regression analysis, p values were <0.001.

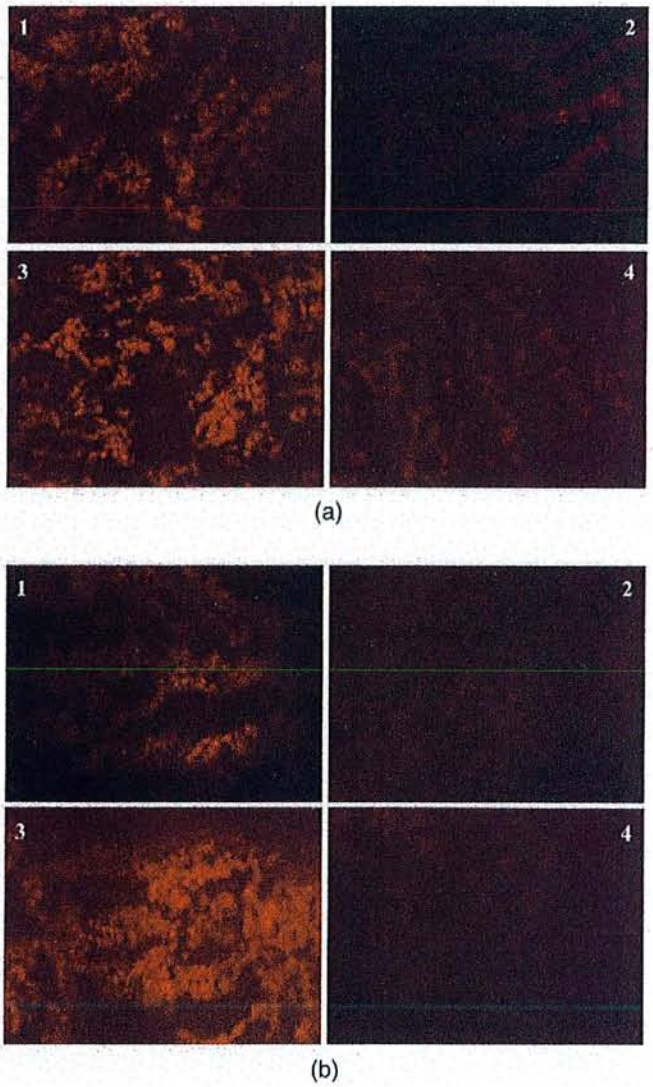


Fig. 2. Photomicrographs of patterns of EF5 binding in GBM Nan1 (a) and in U87 (b) tumors without (a1, a3, b1, b3) or with recombinant human erythropoietin treatment (Ea2, a4, b2, b4). When tumor volume reached 250 ± 50 mm^3 (i.e., T1), tumor bearing-mice (at least $n = 4$ in each group) were injected with EF5. Sites of EF5 binding were immunohistochemically detected using the Cy3-conjugated ELK3-51 monoclonal antibody. Hypoxic areas appear in red (scanned at ×10 magnification). Representative images corresponding to moderate (a1, a2, b1, b2), and maximal (a3, a4, b3, b4) EF5 binding are shown.

rHuEPO, which has been able to reverse anemia-induced hypoxia (14, 29). In the present study, the consequences of raised hemoglobin levels achieved with rHuEPO administration on oxygenation and radioresponse of xenografted human gliomas were evaluated.

To achieve improved hemoglobin levels before the target volume was reached and RT begun, the early initiation of rHuEPO treatment after tumor implant and daily injections were required because of the rapid growth of the malignant tumors used. This treatment schedule differs from the clinical practice because rHuEPO is generally administered in patients at a late stage of the disease. Even though a clinical rHuEPO schedule could not be exactly reproduced in these animal models, delivered doses (0.3 IU/g/days, 5 days/week, for 3–4 weeks) were clinically relevant as compared with doses administered for cancer-associated anemia treatment (30–32). Furthermore, total doses of rHuEPO were also comparable to those used in previous studies (14, 33). The increase in hemoglobin levels observed for both glioma models at the beginning of radiation treatment (T1) is in the same range as the increase reported by Kelleher *et al.* (14). In other words, the administration schedule of rHuEPO used allowed us to achieve raised hemoglobin levels, reflecting an improved oxygen-carrying capacity of the blood at the time of RT onset.

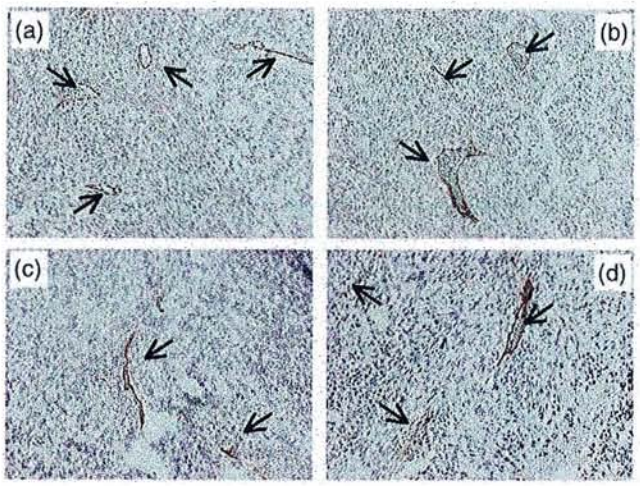


Fig. 3. Immunohistochemical detection of blood vessels based on type IV collagen staining. Mice bearing GBM Nan1 tumor, untreated (a, c) or treated by recombinant human erythropoietin (b, d), were sacrificed at T1 (a, b) and at T29 (c,d). The arrows indicate blood microvessels in representative areas (10× magnification).

Prolonging rHuEPO-treatment during irradiation allowed us to maintain high hemoglobin levels in irradiated mice. These results are attractive because clinical trials have demonstrated that the critical hemoglobin level necessary to obtain a therapeutic benefit is one achieved and maintained during RT, rather than the baseline level (10, 34, 35). A decline of hemoglobin concentrations was found at T29 despite continuing rHuEPO administration. This effect, also reported by Joiner *et al.*,suggests that physiologic and biologic mechanisms may counteract the action of exogenously administered rHuEPO in mice bearing large tumors (>1000 mm^3) (33). Nevertheless, despite the tumor growth, hemoglobin concentrations always remained at least equal to the initial control values, meaning that daily injections of rHuEPO at a dose of 0.3 IU/g was sufficient to prevent anemia to occur.

The GBM Nan1 and U87 control tumors were characterized by a large proportion of low pO_2 values (about 60% and 90% of pO_2 values <2.5 mm Hg, respectively). Because the localization of the oxygen-sensitive probe within tumor was not controlled during pO_2 measurements, this technique provided general data without distinguishing the measurements performed in necrotic or hemorrhaged areas. Thus it appeared interesting to complete these data using the EF5 binding technique (21, 22) because it allows the detection of viable hypoxic tumor cells on a cell-to-cell basis, which constitutes the most relevant marker for the risk of radioresistance. The distribution of EF5 binding observed in the two glioma control groups highlighted that the low pO_2 values recorded were, at least in part, a sign of the presence of numerous viable hypoxic tumor cells in malignant glioma xenografts. Moreover, because it was demonstrated *in vitro* and *in vivo* that the fluorescence intensity varies inversely to oxygen level (21, 22), the highest intensities of fluorescence observed suggested the presence of extremely low oxygen level in a part of these hypoxic tumor cells.

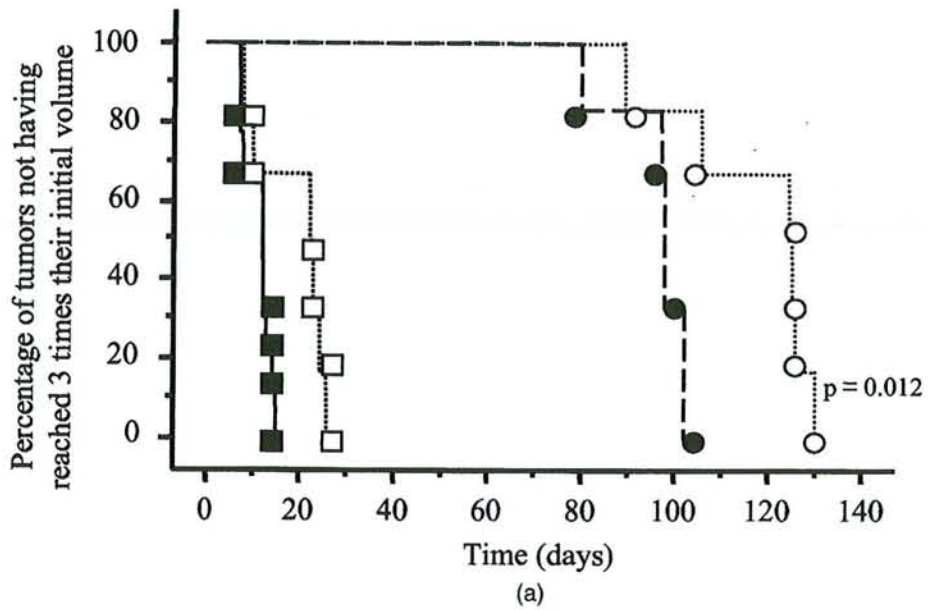
In relation to the increase of hemoglobin level, hypoxia in GBM Nan1 and U87 xenografts was significantly reduced at T1 in mice receiving rHuEPO. Similarly, rHuEPO-treated tumors exhibited more limited patterns and lower levels of EF5 binding than in untreated control tumors. This revealed a critical decrease of viable hypoxic tumor cell fraction in glioma xenografts exposed to rHuEPO, and, particularly, an obvious decrease in highly hypoxic cell subpopulation.

Our results differ from previous data published by Kelleher *et al.*, which did not show an improvement of the oxygenation (evaluated by the pO_2 Histograph method) in rHuEPO-treated animals (without preliminary induced anemia) (14). In fact, the schedule of rHuEPO delivery (six injections of 1 IU/g over 14 days) used by Kelleher *et al.* induced a fast increase in hemoglobin concentrations; this effect was associated with a significant decrease in tumor blood flow. Consequently, oxygen availability for tumor was not increased under rHuEPO treatment in their experiment. Conversely, Joiner *et al.*,using an rHuEPO administration schedule close to ours (5 IU/mouse/day [i.e., approximately 0.2 IU/g/day, 5 days/week, over 24 days]) demonstrated that rHuEPO treatment did not alter tumor blood flow, likely because high hemoglobin levels were progressively reached (33).

Several authors reported that rHuEPO could exert a proangiogenic activity *in vitro* and *in vivo* (36–38). Furthermore, EPO receptors have been recently discovered in breast carcinoma vasculature (39). Considering these data, the significant reduction in tumor hypoxia observed when the two glioma xenografts were exposed to rHuEPO may either result from increased oxygen delivery (via an increased red cell mass) or from angiogenesis stimulation. Because the vessel density was not found to be modified in rHuEPO-treated tumors, our results suggest that the mechanism by which rHuEPO contributes to improve tumor oxygenation should only occur via enhanced oxygen carrying capacity of the blood and enhanced oxygen delivery to the tumor. Moreover, the positive correlation noticed between hemoglobin concentrations and the percentages of pO_2 values <2.5 mm Hg (data not shown) is also consistent with the major implication of the increase of oxygen carrying into the decrease of tumor hypoxia.

Two distinct types of hypoxia are classically identified in tumors: the diffusion-limited chronic hypoxia (40) and the perfusion-limited acute hypoxia, which is thought to result from intermittent impairment of blood flow (41, 42). Both chronic and acute mechanisms are responsible for the presence of hypoxic cells in tumors (3). Because rHuEPO did not affect tumor vasculature, the hypoxia reduction observed under rHuEPO treatment likely corresponds to its action on the oxygen diffusion limitations.

PO_2 measurements performed after five fractions of 2 Gy showed that no significant alteration of oxygenation status occurred in human glioma xenografts receiving fractionated RT alone. These observations are in agreement with previ-



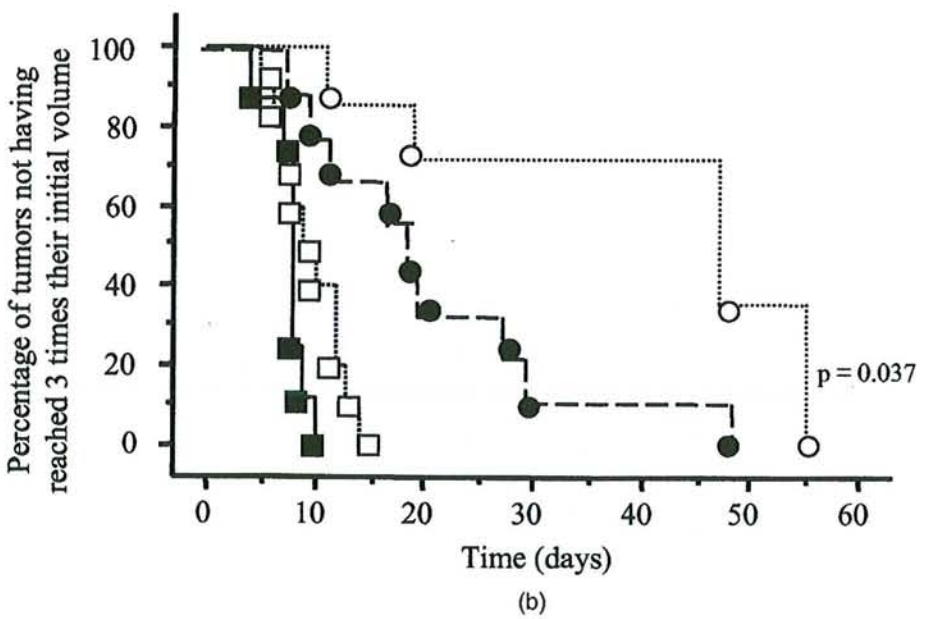


Fig. 4. Influence of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) administration on tumor response to radiotherapy. (a) GBM Nan1 tumor line (at least six mice per group). (b) U87 tumor line (at least seven mice per group). Mice were randomly assigned in four groups: control (black squares), rHuEPO (white squares), radiotherapy (RT) (black circles), and RT + rHuEPO (white circles). The radiation therapy began when tumor volume reached 250 ± 50 mm^3 (i.e., T1) and consisted in a daily fraction of 2 Gy, 5 days/week, for 20 fractions. Results are expressed as Kaplan-Meier plots, considering the percentage of tumors not having reached 3 times their initial volume as the end point. Statistical analysis was performed using the log–rank test (p values represent comparison "RT" vs. "RT + rHuEPO").

ously published data obtained with similar experimental radiation schedules (43–45).

Moreover, this is the first study demonstrating that rHuEPO influences the oxygenation status in xenografts not only before but also during fractionated irradiation. According to recently reported clinical results (10), maintenance of an improved tumor oxygenation during fractionated RT could be the most critical parameter regarding to radiation therapy efficacy in patients. Therefore, our findings could be attractive for future clinical practice. Additionally, radiation treatment seems to favor rHuEPO activity because the positive effect of rHuEPO on intratumor oxygenation appeared more marked in irradiated glioma xenografts than in unirradiated tumors. Because radiation-induced cell death may occur preferably for tumor cells close to blood vessels known as being the most radiosensitive (1, 46), we could hypothesize that oxygen diffusion under rHuEPO exposure might be facilitated.

In contrast to recently reported experiments (47, 48), rHuEPO alone was not found to promote tumor growth in our models. Further EPO receptor expression and functionality studies could elucidate this discrepancy. Moreover, rHuEPO-related decrease of tumor hypoxia before and during RT resulted in an improvement of the response of human glioma xenografts to fractionated irradiation. Only Joiner *et al.* have previously measured tumor radiosensitivity in mice exhibiting rHuEPO-induced high hematocrit (33); no significant difference was reported between control and rHuEPO-treated animals. The main explanation for this discrepancy could be related to the irradiation schedule. Whereas a fractionated irradiation protocol was applied in the present study, a single dose of radiation was used by Joiner *et al.* to treat the murine carcinoma NT xenografts. Because the benefit induced by rHuEPO likely depends on its influence on tumor hypoxia during fractionated irradiation, preclinical trial conclusions about RT efficacy may be greatly influenced by the irradiation schedule.

In conclusion, the present study shows that rHuEPO, via an improvement of the oxygen-carrying capacity, provides an effective strategy for reducing intrinsic hypoxia in human high-grade gliomas and maintaining this positive effect during fractionated irradiation. Consequently, rHuEPO contributes to enhance the response of these tumors to ionizing radiation.

These positive effects of rHuEPO on human high-grade glioma xenografted in nude mice are particularly interesting because our investigations were designed following a clinically relevant fractionation schedule for RT. If subsequent clinical trials confirm these preclinical results, this therapeutic advantage would be added to the well-documented benefit provided by rHuEPO treatment on quality of life in anemic cancer patients (32, 49).

REFERENCES

1. Gray LH, Conger AD, Ebert M, *et al.* The concentration of oxygen in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 1953;26:638–648.
2. Cygler J, Klassen NV, Ross CK, *et al.* The survival of aerobic and anoxic human glioma and melanoma cells after irradiation at ultrahigh and clinical dose rates. *Radiat Res* 1994;140:79–84.
3. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: Angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000;36:1649–1660.
4. Overgaard J, Horsman MR. Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen and sensitizers. *Semin Radiat Oncol* 1996;6:10–21.
5. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: A review. *Cancer Res* 1989;49:6449–6465.
6. Fyles AW, Milosevic M, Pintilie M, *et al.* Anemia, hypoxia and transfusion in patients with cervix cancer: A review. *Radiother Oncol* 2000;57:13–19.
7. Hill RP, Bush RS, Yeung P. The effect of anaemia on the fraction of hypoxic cells in an experimental tumour. *Br J Radiol* 1971;44:299–304.
8. Becker A, Hansgen G, Bloching M, *et al.* Oxygenation of squamous cell carcinoma of the head and neck: Comparison of primary tumors, neck node metastases, and normal tissue. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:35–41.
9. Becker A, Stadler P, Lavey RS, *et al.* Severe anemia is associated with poor tumor oxygenation in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;46:459–466.
10. Dunst J, Kuhnt T, Strauss HG, *et al.* Anemia in cervical cancers: Impact on survival, patterns of relapse, and association with hypoxia and angiogenesis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:778–787.
11. Dunst J. Hemoglobin level and anemia in radiation oncology: Prognostic impact and therapeutic implications. *Semin Oncol* 2000;27:4–8 ; discussion 16–17.
12. Thomas GM. Raising hemoglobin: An opportunity for increasing survival? *Oncology* 2002;63:19–28.
13. Harrison LB, Shasha D, Homel P. Prevalence of anemia in cancer patients undergoing radiotherapy: Prognostic significance and treatment. *Oncology* 2002;63:11–18.
14. Kelleher DK, Mattheinsen U, Thews O, *et al.* Blood flow, oxygenation, and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats. *Cancer Res* 1996;56:4728–4734.
15. Thews O, Koenig R, Kelleher DK, *et al.* Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. *Br J Cancer* 1998;78:752–756.
16. Stuben G, Thews O, Pottgen C, *et al.* Recombinant human erythropoietin increases the radiosensitivity of xenografted human tumours in anaemic nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:346–350.
17. Stuben G, Pottgen C, Knuhmann K, *et al.* Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in radiosensitivity of experimental human tumors in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;55:1358–1362.
18. Chastagner P, Pinel S, Merlin JL, *et al.* Influence of overall treatment time of topotecan and radiotherapy administered alone or in combination in two xenografted human glioblastoma multiforme. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001;20:237.
19. Chastagner P, Merlin JL, Marchal C, *et al.* In vivo potentiation of radiation response by topotecan in human rhabdomyosarcoma xenografted into nude mice. *Clin Cancer Res* 2000;6:3327–3333.
20. Coutier S, Bezdetnaya LN, Foster TH, *et al.* Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice. *Radiat Res* 2002;158:339–345.
21. Koch CJ, Evans SM, Lord EM. Oxygen dependence of cellular uptake of ef5[2-(2-nitro-1h-imidazol-1-yl)-n-(2, 2, 3, 3, 3-pentafluoropropyl)a cet amide]: Analysis of drug adducts by fluorescent antibodies vs bound radioactivity. *Br J Cancer* 1995;72:869–874.
22. Cohen-Jonathan E, Evans SM, Koch CJ, *et al.* The farnesyltransferase inhibitor l744, 832 reduces hypoxia in tumors expressing activated h-ras. *Cancer Res* 2001;61:2289–2293.
23. Hockel M, Schlenger K, Aral B, *et al.* Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996;56:4509–4515.
24. Nordsmark M, Hoyer M, Keller J, *et al.* The relationship between tumor oxygenation and cell proliferation in human soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;35:701–708.
25. Brizel DM, Sibley GS, Prosnitz LR, *et al.* Tumor hypoxia

adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;38:285–289.
26. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, *et al.* Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer [published erratum appears in Radiother Oncol 1999;50:371]. *Radiother Oncol* 1998;48:149–156.
27. Rampling R, Cruickshank G, Lewis AD, *et al.* Direct measurement of po2 distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;29:427–431.
28. Collingridge DR, Piepmeier JM, Rockwell S, *et al.* Polarographic measurements of oxygen tension in human glioma and surrounding peritumoural brain tissue. *Radiother Oncol* 1999; 53:127–131.
29. Levine EA, Vijayakumar S. Blood transfusion in patients receiving radical radiotherapy: A reappraisal. *Onkologie* 1993; 16:79–87.
30. Vijayakumar S, Roach M, 3rd, Wara W, *et al.* Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy: Preliminary results of a randomized, open-labeled, phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993;26:721–729.
31. Olsson AM, Svensson JH, Sundstrom J, *et al.* Erythropoietin treatment in metastatic breast cancer—effects on Hb, quality of life and need for transfusion. *Acta Oncol* 2002;41:517–524.
32. Fallowfield L, Gagnon D, Zagari M, *et al.* Multivariate regression analyses of data from a randomised, double-blind, placebo-controlled study confirm quality of life benefit of epoetin alfa in patients receiving non-platinum chemotherapy. *Br J Cancer* 2002;87:1341–1353.
33. Joiner B, Hirst VK, McKeown SR, *et al.* The effect of recombinant human erythropoietin treatment on tumour radiosensitivity and cancer-associated anaemia in the mouse. *Br J Cancer* 1993;68:720–726.
34. Dunst J. The use of epoetin alfa to increase and maintain hemoglobin levels during radiotherapy. *Semin Oncol* 2001;28: 42–48.
35. Littlewood TJ. The impact of hemoglobin levels on treatment outcomes in patients with cancer. *Semin Oncol* 2001;28:49–53.
36. Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, *et al.* Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:5978–5982.
37. Ribatti D, Presta M, Vacca A, *et al.* Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; 93:2627–2636.
38. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, *et al.* Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998;273:25381–25387.
39. Acs G, Acs P, Beckwith SM, *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3561–3565.
40. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955;9:539–549.
41. Brown JM, Yu NY. Cytotoxicity of misonidazole in vivo under conditions of prolonged contact of drug with the tumour cells. *Br J Radiol* 1979;52:893–896.
42. Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE. Intermittent blood flow in a murine tumor: Radiobiological effects. *Cancer Res* 1987;47: 597–601.
43. Zywietz F, Reeker W, Kochs E. Tumor oxygenation in a transplanted rat rhabdomyosarcoma during fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1391–1400.
44. Brizel DM, Dodge RK, Clough RW, *et al.* Oxygenation of head and neck cancer: Changes during radiotherapy and impact on treatment outcome. *Radiother Oncol* 1999;53:113–117.
45. Stuben G, Thews O, Pottgen C, *et al.* Tumour oxygenation during fractionated radiotherapy—comparison with size-matched controls. *Acta Oncol* 1999;38:209–213.
46. Brown JM. The hypoxic cell: A target for selective cancer therapy—eighteenth Bruce F. Cain memorial award lecture. *Cancer Res* 1999;59:5863–5870.
47. Yasuda Y, Musha T, Tanaka H, *et al.* Inhibition of erythropoietin signalling destroys xenografts of ovarian and uterine cancers in nude mice. *Br J Cancer* 2001;84:836–843.
48. Yasuda Y, Fujita Y, Matsuo T, *et al.* Erythropoietin regulates tumour growth of human malignancies. *Carcinogenesis* 2003; 24:1021–1029.
49. Littlewood TJ, Cella D, Nortier JW. Erythropoietin improves quality of life. *Lancet Oncol* 2002;3:459–460.

PUBLICATIONS
COMMUNICATIONS ORALES ET ECRITES

PUBLICATIONS

Erythropoietin induced-reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts.
S. Pinel, M. Barberi-Heyob, E. Cohen-Jonathan, J-L. Merlin, C. Delmas, F. Plénat, P. Chastagner. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2004*

The detrimental effect of treatment time protraction on the radioresponse is compensated by concomitant topotecan on high grade glioma xenografts.
S. Pinel, P. Chastagner, J-L. Merlin, C. Marchal, M. Barberi-Heyob *(Soumis)*

RESUMES PUBLIES

VEGF transcripts expression in relation to erythropoietin-induced reduced of tumor hypoxia.
S. Pinel, M. Barberi-Heyob, J.L. Merlin, P. Chastagner.
American Association for Cancer Research, 95ème Congrès annuel, Orlando, 27-31Mars, 2004
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2003, abstract n°4137

Erythropoietin induced-high hemoglobin levels reduce hypoxia and improve tumor tissue response to ionizing radiation in human glioma xenografts.
S. Pinel, P. Chastagner, E. Cohen-Jonathan Moyal, M. Barberi-Heyob, J-L. Merlin.
American Association for Cancer Research, 94ème Congrès annuel, Washington, 11-14 Juillet, 2003
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2003, abstract n°4467 + présentation du poster

Influence of recombinant human erythropoietin on the radio-response of human glioma xenografts.
S. Pinel, P. Chastagner, M. Barberi-Heyob, JL. Merlin
American Society of Clinical Oncology, 38ème Congrès annuel, Orlando, 18-21 Mai, 2002
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2002, abstract n°3025.

Influence of overall treatment time of topotecan (TPT) and radiotherapy (RT) administered alone or in combination in two xenografted human glioblastoma multiforme (GBM).
P. Chastagner, S. Pinel, J.L. Merlin, M. Barberi-Heyob, P.Bey.
American Society of Clinical Oncology, 37ème Congrès annuel, San Francisco, 12-15 Mai, 2001
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 2001, abstract n°237.

Efficacy of temozolomide on three human rhabdomyosarcoma (RMS) tumor xenografts.
P. Chastagner, S. Pinel, J.L. Merlin, M. Barberi-Heyob.
American Association for Cancer Research, 92ème Congrès annuel, New Orleans, 24-28 Mars, 2001
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2001, abstract n°1749.

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 3

LES GLIOMES MALINS 3

I- EPIDEMIOLOGIE 3
A- Epidémiologie descriptive 3
B- Facteurs de risque des gliomes cérébraux 3

II- DESCRIPTION HISTO-PATHOLOGIQUE ET BIOLOGIQUE DES GLIOMES 4
A- La classification histo-pronostique des gliomes 4
B- Profil moléculaire et biologique des gliomes malins de haut grade 5
1- Profil génétique des gliomes malins de haut grade 5
2- Propriétés biologiques des gliomes malins de haut grade 5

III- PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE ET LIMITES DES TRAITEMENTS 6
A- Particularités des tumeurs cérébrales 6
B- Traitements des gliomes malins 7
1- La chirurgie 7
2- La radiothérapie 7
3- La chimiothérapie 8

LA RADIOTHERAPIE 10

I- ACTION DES RAYONNEMENTS IONISANTS AU NIVEAU CELLULAIRE 10
A- Interactions rayonnements-matière 10
B- Réactions radio-chimiques 10
1- L'effet direct des rayonnements ionisants 11
2- L'effet indirect des rayonnements ionisants : la radiolyse de l'eau . 11

C- Les dommages cellulaires radio-induits 12
1- Au niveau cytoplasmique 13
2- Au niveau membranaire 13
3- Au niveau de l'ADN 13
II- LA REPONSE CELLULAIRE A L'IRRADIATION 14
1- Détection des dommages de l'ADN radio-induits 15
2- Protéines clés impliquées dans la transduction du signal 15
3- Irradiation et régulation du cycle cellulaire 15
4- Réparation des dommages de l'ADN radio-induits 16
5- La mort cellulaire radio-induite 16
5.1. La mort cellulaire reproductive 16
5.2. La nécrose 17
5.3. L'apoptose 17
6- Létalité des lésions radio-induites 19

III- EFFICACITE DE LA RADIOTHERAPIE 19
A- Paramètres inhérents à la tumeur irradiée 9
B- Paramètres inhérents aux modalités de traitement 20

L'HYPOXIE TUMORALE 22

I- PHYSIOLOGIE DE L'OXYGENATION TISSULAIRE 22
A- Paramètres influençant l'oxygénation tissulaire 22
B- Mécanismes physiologiques d'adaptation à l'hypoxie tissulaire 22
1- Réponse adaptative à l'échelle de l'organisme 23
2- Réponse adaptative à l'échelle cellulaire 23
3- Réponse adaptative à l'échelle moléculaire : implication de HIF-1 . 24
3.1. Régulation de HIF-1 par l'hypoxie 24
3.2. Régulation de HIF-1 indépendante de l'hypoxie 26
3.3. HIF-1 : régulateur central de l'expression de gènes en conditions hypoxiques 27
3.4. HIF-1 : protéine anti- et pro-apoptotique 28

II- PHYSIOPATHOLOGIE DE L'HYPOXIE TUMORALE 29
A- Mise en évidence et caractéristiques de l'hypoxie tumorale 29
B- Origine de l'hypoxie tumorale 30
1- L'hypoxie chronique 30

2- L'hypoxie aiguë 31
3- Autres facteurs favorisant l'hypoxie tumorale 32
C- Tolérance des cellules tumorales vis-à-vis de l'hypoxie 32
1- Implication de HIF-1dans la progression tumorale 33
1.1. Surexpression de HIF-1α dans les tumeurs 33
1.2. Induction de l'expression de HIF-1α dans les tumeurs 33
1.3. Importance de HIF-1α dans la progression tumorale 34
2- Déplacement du métabolisme vers la glycolyse 34
3- L'angiogenèse tumorale 35
3.1. Nécessité de l'angiogenèse tumorale 35
3.2. Mécanismes de l'angiogenèse tumorale 36
3.3. Caractéristiques de l'angiogénèse tumorale 39
3.4. Le VEGF : principal facteur pro-angiogénique 39
D- Méthodes de mesure de l'hypoxie tumorale 40
1- Les sondes polarographiques sensibles à l'oxygène 41
1.1. Présentation et principe du système pO_2 Histograph, Eppendorf™ 41
1.2. Avantages et inconvénients 42
2- Les fibres optiques sensibles à l'oxygène 42
2.1. Présentation et principe du système OxyLite 42
2.2. Avantages et inconvénients 43
2.3. Validation du système OxyLite 43
3- Limites d'utilisation des systèmes pO_2 Histograph et OxyLite 43
4- Les marqueurs exogènes d'hypoxie: les dérivés nitro-imidazolés.. 44
4.1. Principe 44
4.2. Avantages et inconvénients 46
4.3. Validation de la méthode 46
5- Les marqueurs endogènes d'hypoxie 47
5.1. Densité vasculaire et VEGF 47
5.2. HIF-1α, Glut-1 et CA9 47
6- Les techniques d'imagerie médicale 48
E- Conséquences biologiques et thérapeutiques de l'hypoxie tumorale... 49
1- Conséquences biologiques de l'hypoxie tumorale 49
1.1. Mise en évidence de l'augmentation de l'agressivité des tumeurs hypoxiques 49
1.2. Contribution de l'hypoxie tumorale à la sélection de clones agressifs 49
1.3. Contribution de l'hypoxie à l'instabilité génomique 50
2- Conséquences thérapeutiques de l'hypoxie tumorale 51
2.1. Impact de l'hypoxie tumorale sur l'efficacité de la radiothérapie 51

2.2. Hypoxie tumorale et efficacité de la chirurgie *53*
2.3. Hypoxie tumorale et efficacité de la chimiothérapie *53*

III- LUTTER CONTRE LA RESISTANCE INHERENTE A L'HYPOXIE TUMORALE.... 54
A- Stratégies visant à augmenter la disponibilité en oxygène au niveau tumoral 54
1- Oxygène hyperbare 54
2- Inhalation de carbogène et injection de nicotinamide..... 55
3- Modulation du transport et de la libération de l'oxygène au niveau des tissus hypoxiques 56
3.1. Les transfusions sanguines *56*
3.2. L'hémoglobine modifiée *57*
3.3. Les modulateurs allostériques de l'hémoglobine *57*
B- Stratégies ciblant les cellules hypoxiques 58
1- Radiosensibilisants des cellules hypoxiques : dérivés nitro-imidazolés 58
2- Cytotoxiques des cellules hypoxiques 59
3- Nouvelles approches..... 61
3.1. Thérapie génique *61*
3.2. Inhibiteurs de HIF-1 ..... *61*
4- Conclusion 61

L'ERYTHROPOIETINE 63

I- L'ERYTHROPOIETINE ENDOGENE..... 63
A- Erythropoïétine endogène et hématopoïèse 63
1- Découverte de l'érythropoïétine endogène..... 63
2- Sites de production de l'érythropoïétine 63
2.1. Production rénale *63*
2.2. Production hépatique *64*
3- Structure de l'érythropoïétine humaine..... 64
4- Contrôle de la production de l'érythropoïétine..... 65
4.1. Contrôle par l'hypoxie tissulaire *65*
4.2. Régulation génique *66*
5- Fonctions biologiques de l'érythropoïétine dans le système hématopoïétique 67
5.1. Les cellules hématopoïétiques cibles *67*

5.2. Boucle de régulation de l'érythropoïèse *68*
6- Le récepteur à l'érythropoïétine 69
6.1. Structure du récepteur *69*
6.2. Activation et désactivation du récepteur *70*
B- Implication de l'érythropoïétine en dehors du système hématopoïétique **73**
1- Mise en évidence 73
1.1. Production d'EPO extra-rénale et extra-hépatique *73*
1.2. Localisation tissulaire du récepteur *74*
2- L'érythropoïétine au niveau du système nerveux central 74
2.1. Système autocrine / paracrine impliquant l'EPO dans le système nerveux central *74*
2.2. Effet neuroprotecteur de l'EPO *75*
3- Rôle de l'érythropoïétine au niveau vasculaire 75
4- L'érythropoïétine au niveau d'autres fonctions organiques 76
5- Rôle de l'érythropoïétine endogène dans le développement tumoral 76
5.1. Cancer rénal *76*
5.2. Cancer du sein *77*
5.3. Cancers pelviens *77*
5.4. Tumeurs pédiatriques *78*

II- L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE **79**
A- Anémies et cancers **79**
1- Définition de l'anémie 79
2- Incidence de l'anémie chez les patients cancéreux 79
3- Conséquences de l'anémie associée aux cancers 80
4- Anémie et résistance aux traitements anticancéreux 80
4.1. Impact de l'anémie sur l'efficacité de la radiothérapie *80*
4.2. Impact de l'anémie sur l'efficacité de la chimiothérapie et la chirurgie *81*
5- Anémie et hypoxie tumorale 82
B- Erythropoïétine recombinante humaine **83**
1- Découverte, production et structure 83
2- Usages thérapeutiques de l'érythropoïétine recombinante humaine 83
3- Erythropoïétine recombinante humaine et cancers 84
3.1. L'érythropoïétine recombinante humaine dans le traitement des anémies associées à la pathologie cancéreuse *84*

3.2. L'érythropoïétine recombinante humaine et le risque de prolifération tumorale *85*
3.3. L'érythropoïétine recombinante humaine, oxygénation tumorale et réponse thérapeutique *86*

PARTIE EXPERIMENTALE **88**

OBJECTIFS DE L'ETUDE **88**

MATERIEL ET METHODES **89**

I- MODELES D'ETUDE 89
A- Les lignées tumorales 89
1- La lignée U87 89
2- La lignée GBM Nan1 89
B- Entretien de la lignée U87 en culture cellulaire 89
C- La xénogreffe chez la souris *nude* 90
1- Les souris *nude* 91
2- Les greffons 91
2.1. Lignée U87 ..... *91*
2.2. Lignée GBM Nan1 ..... *91*

II- ETUDES *IN VITRO* SUR LES CELLULES U87 92
A - Courbes de croissance et temps de doublement 92
B - Analyse par le test MTT 93
C- Influence de l'rHuEPO sur la sensibilité des cellules U87 aux radiations ionisantes (^{60}Co) 94

III- ETUDES *IN VIVO* 95
A- Les traitements 95
1- Définition des bras thérapeutiques 95
2- Définition des repères temporels 95
3- Administration des traitements 97
3.1. L' érythropoïétine recombinante humaine *97*
3.2. La radiothérapie *97*
4- Evaluation de l'effet des traitements 98
4.1. Activité pharmacologique de l'rHuEPO *98*

4.2. Activité anti-tumorale de la radiothérapie seule ou associée à l'rHuEPO..... 99

B- Analyse de l'hypoxie tumorale 99

1- Mesure de la pression partielle en oxygène intratumorale..... 99

2- Analyse des cellules tumorales hypoxiques viables : technique de l'"EF5-binding"..... 101

2.1. Principe de la méthode..... 101

2.2. Métabolisation de l'EF5 par les cellules hypoxiques 102

2.3. Détection immunohistochimique des adduits d'EF5..... 102

2.4. L'analyse microscopique..... 103

C- Etude de la densité vasculaire par immunohistochimie 105

1- Préparation des échantillons 106

2- Technique immunohistochimique 107

3- Détermination de la densité vasculaire 108

D- Analyse de l'expression des transcrits du VEGF..... 109

1- Extraction des ARN totaux 109

2- Transcription inverse..... 110

3- Amplification en chaîne de l'ADN 111

4- Analyse des produits d'amplification..... 112

E- Analyse de l'expression du VEGF par Western-Blot..... 113

1- Extraction des protéines totales 113

1.1. Extraction des protéines totales..... 113

1.2. Dosage des protéines totales 114

2- Séparation des protéines sur gels de polyacrylamide 115

3- Transfert sur membranes..... 116

4- Immunomarquage 117

5- Révélation 117

III- ANALYSES STATISTIQUES..... 118

RESULTATS ET DISCUSSION 119

I- INFLUENCE DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR LA CROISSANCE TUMORALE..... 119

A- Etude de la croissance cellulaire *in vitro* 119

1- Courbe de croissance des cellules U87 119

2- Analyse de la prolifération et de la viabilité des cellules U87 par MTT 121
B- Etude *in vivo* 122
1- Effet sur la croissance tumorale 122
2- Effet sur la vascularisation tumorale 125

II- INFLUENCE DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR L'HYPOXIE TUMORALE 128
A- Présentation et discussion du protocole expérimental 128
B- Influence de l'rHuEPO sur le taux d'hémoglobine 131
1- Avant radiothérapie 131
2- En fonction du volume tumoral 132
3- En cours d'irradiation 133
C- Influence de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale avant irradiation 135
1-Mesure de la pression partielle en oxygène à l'aide du pO_2-Histograph 135
1.1. Variabilité intra- et inter-tumorale 135
1.2. Effet de l'rHuEPO sur la pO_2 intra-tumorale 138
1.3. Validation de l'effet avec un autre protocole 141
2- Relation entre taux d'hémoglobine et pression partielle en oxygène.. 142
3- Evaluation des cellules hypoxiques viables à l'aide de marqueurs exogènes dérivés des nitro-imidazolés 144
3.1. Images de la liaison de l'EF5 145
3.2. Histogramme de distribution 148
4- Action de l'rHuEPO sur l'hypoxie chronique 149
D- Influence de l'rHuEPO sur l'hypoxie tumorale en cours d'irradiation . 150

III- CONSEQUENCES SUR L'EXPRESSION DU VEGF 155
A- Expression des transcrits 155
1- Avant radiothérapie 155
2- En cours d'irradiation 157
B- Expression protéique du VEGF 159

III- EFFET DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR LA REPONSE A LA RADIOTHERAPIE 163
A- Etude *in* vitro 163
B- Etude *in* vivo 165

1- Suivi du volume tumoral 166
2- Courbes de Kaplan-Meier 167

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 173

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 176

ANNEXES

Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures
Publication, communications écrites et orales

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

BIBLIOTHÈQUE
PHARMACIE
ODONTOLOGIE
NANCY

Prénom, Nom : **Sophie PINEL**

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie - Santé - Environnement

VU, APPROUVE et PERMIS D'IMPRIMER N°941

Nancy, le 21 juin 2004

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1 ★
LE PRÉSIDENT

Jean-Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ · NANCY 1

24-30, rue Lionnois B.P. 3069 54013 Nancy cedex · Tél. 03 83 85 48 00 · Fax 03 83 85 48 48

Adresse électronique : _____ @uhp-nancy.fr

DOCTORAT DE LUNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY I (Pharmacie)

Ecole Doctorale "Biologie Santé Environnement"

Mention : SCIENCES DU MEDICAMENT

Titre : CONSEQUENCES DE L'ERYTHROPOIETINE RECOMBINANTE HUMAINE SUR L'HYPOXIE TUMORALE ET L'EFFICACITE DE LA RADIOTHERAPIE SUR DEUX GLIOMES MALINS HUMAINS XENOGREFFES.

RESUME

Les gliomes malins sont caractérisés par la présence de zones d'hypoxie, qui contribuent à augmenter la résistance de ces tumeurs vis-à-vis de la radiothérapie. Plusieurs stratégies sont envisagées pour tenter de réduire l'hypoxie tumorale et augmenter parallèlement l'effet antitumoral des radiations ionisantes.

L'objectif de notre étude était de déterminer si l'administration d'rHuEPO pouvait constituer un moyen de lutter contre l'hypoxie tumorale, en vue d'améliorer la radiosensibilité de gliomes malins humains (GBM Nan1 et U87) xénogreffés chez des souris *nude* non anémiques.

Après nous être assuré *in vitro* et *in vivo* que l'rHuEPO ne favorisait pas la prolifération des gliomes malins xénogreffés, nous avons montré que l'injection d'rHuEPO (300 UI/kg/j, 5j/7) permettait de stimuler l'érythropoïèse chez des souris *nude* non anémiées, et d'augmenter la capacité du sang à transporter l'oxygène, aboutissant à une augmentation de la pression partielle en oxygène dans les xénogreffes tumorales, et à une réduction de la proportion de cellules tumorales hypoxiques viables, directement impliquées dans la radiorésistance et l'agressivité des tumeurs. Les effets bénéfiques de l'rHuEPO sur le transport de l'oxygène et sur l'hypoxie tumorale ont non seulement été observés avant irradiation mais ont également été maintenus après 5 fractions d'irradiation.

Le VEGF étant connu comme le facteur pro-angiogénique le plus puissant, et l'hypoxie étant un inducteur majeur de son expression, nous avons évalué l'impact de l'rHuEPO sur l'expression du VEGF. Parallèlement à l'amélioration de l'oxygénation tumorale, l'administration d'rHuEPO provoque, avant l'initiation de la radiothérapie et après 5 fractions d'irradiation, une diminution de l'expression des transcrits codant pour le $VEGF_{121}$ et pour le $VEGF_{165}$, deux variants qui correspondent au VEGF capable de diffuser librement dans la matrice extracellulaire.

Alors que l'rHuEPO ne modifiait pas la radiosensibilité des cellules U87 *in vitro*, *in vivo*, l'rHuEPO, en augmentant la disponibilité en oxygène pour les tumeurs, a permis d'améliorer de façon significative la réponse des xénogreffes GBM Nan1 et U87 à la radiothérapie fractionnée (40 Gy à raison d'une fraction de 2 Gy/j, 5j/7 pendant 4 semaines). Le facteur de potentialisation atteignait 1,21 pour la lignée GBM Nan1 et 1,49 pour la lignée U87.

MOTS CLES

Erythropoïétine recombinante humaine, Hypoxie tumorale, Radiothérapie fractionnée, Gliomes malins, VEGF.