



**HAL**  
open science

# Intérêt du rayonnement synchrotron dans la thérapie des tumeurs cérébrales : méthodologie et applications précliniques

Pierrick Regnard

## ► To cite this version:

Pierrick Regnard. Intérêt du rayonnement synchrotron dans la thérapie des tumeurs cérébrales : méthodologie et applications précliniques. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00323712

**HAL Id: tel-00323712**

**<https://theses.hal.science/tel-00323712>**

Submitted on 23 Sep 2008

**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.

EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY  
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

**THESE de DOCTORAT**

présentée et soutenue publiquement le 20 décembre 2007

par

Pierrick REGNARD

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

**Intérêt du rayonnement synchrotron dans la thérapie des tumeurs  
cérébrales : méthodologie et applications précliniques**

---

**Composition du jury**

Pr Jean-François LE BAS	Président du jury
Pr Jean LAISSUE	Rapporteur
Dr Marc BENDERITTER	Rapporteur
Dr Francesco SETTE	Examineur
Dr Avraham DILMANIAN	Examineur
Dr Géraldine LE DUC	Directeur de Thèse



EUROPEAN SYNCHROTRON RADIATION FACILITY  
UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

**THESE de DOCTORAT**

présentée et soutenue publiquement le 20 décembre 2007

par

Pierrick REGNARD

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

**Intérêt du rayonnement synchrotron dans la thérapie des tumeurs  
cérébrales : méthodologie et applications précliniques**

---

**Composition du jury**

Pr Jean-François LE BAS	Président du jury
Pr Jean LAISSUE	Rapporteur
Dr Marc BENDERITTER	Rapporteur
Dr Francesco SETTE	Examineur
Dr Avraham DILMANIAN	Examineur
Dr Géraldine LE DUC	Directeur de Thèse







C'est pas une vie d'être un chercheur  
Tout a déjà été trouvé  
Les capuches, les ordinateurs  
Les téléphones, les canoës  
C'est pas une vie d'être un chercheur  
Tout a déjà été trouvé  
Même si j'dégotais le bonheur  
On me dirait que ça existait

Extrait de « Pour faire la colle à cœur brisé » dans « Le soldat rose » - Louis Chedid



# Remerciements

*Et bien voilà, 4 ans après ma thèse d'exercice vétérinaire voici qu'apparaît dans toutes les bibliothèques universitaires ma thèse de sciences ! Voici donc la concrétisation de 3 ans de travail scientifique souvent très agréable, parfois plus dur mais toujours accompagné de gens dynamiques et sympathiques sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est.*

*Alors sans plus tarder, je laisse place aux personnes qui, à la lumière ou dans l'ombre m'ont aidées pour ce travail ou soutenu moralement, je laisse place aux remerciements.*

*BOM.....BOM.....BOM.....(ouverture de rideau).*

## ACTE PREMIER: Les membres du jury, dans un style traditionnel

*Tout d'abord et comme il se doit, mes remerciements vont à ceux qui ont acceptés de juger ce travail mais surtout qui m'ont permis d'accéder au titre de docteur es sciences !*

### ***Au Professeur Jean-François Le Bas***

*Pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse,  
Pour nous avoir permis d'imager nos tumeurs avant l'irradiation,  
Hommages respectueux,*

### ***Au Professeur Jean Laissue***

*Pour avoir accepté de rapporter ce travail,  
Pour ces nombreux conseils et corrections  
Et pour l'aide apportée en histologie  
Qu'il reçoive nos sincères remerciements.*

### ***Au Dr Marc Benderitter***

*Pour avoir accepté de rapporter ce travail,  
Et pour sa sympathie,  
Un grand merci.*

### ***Au Dr Francesco Sette***

*Pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse d'un biologiste,  
Pour avoir permis à un vétérinaire de rester 3 ans de plus dans ce temple de la physique,  
Tous mes remerciements.*

### ***To Dr Avraham Dilmanian***

*He accepted to read this french thesis,  
And came from the far far away America,  
Thanks a lot*

***Au Dr Géraldine Le Duc***  
*Qui m'a accompagnée durant ces 5 années à l'ESRF,*  
*Pour son soutien, ses conseils, ses enseignements et ses coups de gueule salvateurs,*  
*Pour avoir été une super chef et directrice de thèse,*  
*Pour beaucoup trop de choses pour être résumé en quelques lignes,*  
*Pour avoir corrigé cette thèse et s'être rendu compte que je ne pourrais jamais appartenir aux*  
*[immortels,*  
*Qu'elle reçoive nos plus chaleureux et nombreux remerciements,*  
*Et encore merci pour l'inaccessible étoile.*

*ACTE SECOND: Aux collègues et amis du travail, dans un style plus décontracté*

*Durant ces 5 années à l'ESRF, j'ai eu la chance de travailler et de sympathiser avec de nombreuses personnes, qui m'ont toutes apportées quelque chose personnellement ou professionnellement. A tous, merci !*

*Merci tout d'abord à **José Baruchel** pour m'avoir accueilli au sein du groupe imagerie de l'ESRF.*

*A **Alberto Bravin**, pour ses conseils et corrections en physique et pour son accessibilité en tant que beamline responsable. Tout le monde n'a pas fait les calanques en voile avec le chef de la ligne !*

*A **Elke Bräuer-Krisch**, pour ses conseils et ses explications attentives sur les principes physiques notamment en MRI, merci d'avoir su faire rentrer ces principes dans ma caboche de véto ! Et je crois que je serais marqué à jamais par l'histoire de la brosse à dent...*

*A **Raphaël Serduc**, pour être un biologiste à l'ESRF, les longues et intéressantes discussions sur la MRI, les manips, les apéros et le concert à l'Art-ti-cho. Pense à m'inviter quand y aura une nouvelle salle de badminton à Gre !*

*A **Michel Renier**, pour les discussions chaleureuses et sa sympathie. Et pour cette fameuse manip de juillet 05 qu'il a sauvé.*

*A **Thierry Brochard**, le super héros de la beamline, toujours là en cas de problème ! Bordel en 3 ans on n'a pas réussi à ramer ensemble !!!*

*A **Christian Némoz**, qui a su m'expliquer la différence entre un frelon et un géranium... (et qui y est presque arrivé ;). Et pour m'avoir écouté quand je débarquais dans ton bureau pour dire que j'avais fini telle ou telle partie !*

*A **Herwig Requardt**, pour les manips de SSRT, sa gentillesse et sa disponibilité.*

*A **Catherine Massart** pour ses conseils de voyage et le contact au Japon.*

*A **Hélène Elleaume**, pour sa gentillesse, ses réponses à mes « ptites questions » et pour m'avoir sauvé la vie le soir où le distributeur de Twix et de Coca voulait absolument l'appoint !*

*A **François Estève**, pour les discussions et les conseils avisés sur la rédaction ou le monde professionnel au coin de la photocopieuse.*

*A Paola Coan, pour les explications sur la « DEI » mais surtout pour la vraie recette des pâtes Carbo et toutes nos discussions sur de multiples sujets. Aller, pour toi je fais un effort, je le dirais pas deux fois (mais bon du coup ça restera écrit) : l'Italie c'est cool.*

*A Jani Kerylainen, pour l'imagerie en MRI, c'était vraiment sympa de bosser ensemble.*

*A Anne-Marie Charvet, pour les infos sur les éléments lourds et ses explications toujours claires.*

*A Nicolas Foray, pour ses explications en radiobio.*

*A Irène Troprès et Laurent Lamalle, pour leur disponibilité, leurs explications, les manips à l'IRM 3T avec parfois un resto quand on avait le temps. C'était toujours un plaisir de venir vous voir !*

*A Stéphanie Corde, pour les manips CAM, on ne fait pas d'omelettes sans casser d'œufs...*

*A Jérôme Gastaldo, pour sa bonne humeur, ses conseils et son amitié. Bon courage en Nouvelle-Zélande !*

*A Erik A. Siegbahn, pour les simulations Monte-Carlo et son calme en toute circonstance. Fais gaffe les rennes c'est quand même plus dangereux que les rats...*

*A Audrey Kusak et Max Dallery pour tous les bons moments à parler de Rupt et pour la mémorable évacuation en voiture.*

*A Muriel Viau, Zuzana Bencokova, Wendy Renier, Fatima, Lopes, Albéric Sollier, Manuel Fernandez et Jeff Adam ce fut un plaisir de vous connaître et d'échanger coup de gueule et fou rire avec vous.*

*A Stéphanie Bouvier pour l'accueil et les bons moments passé à manipuler ensemble, Charlotte Claire (ou chouette Claire) et Héléne Bernard pour leur aide en histologie et les voyages à St Etienne, Pauline Bonazza et Clément Devic pour les bons moments passés ensemble n'oubliez pas One Piece et les naufragés d'Ytaqh. A Charlene Caloud et Céline Le Clec'h pour leurs encouragements en fin de thèse.*

*A Meritxell Costa Torres, pour les bons moments passés à parler manga et Japon durant ses brefs séjours à Grenoble.*

*Aux nouveaux thésards de l'ESRF et de l'INSERM, bon courage messieurs dames !*

*Et en gardant le meilleur pour la fin un immense merci à Dominique Dallery et à sa femme Florence pour les conseils, les discussions, les infos au travail et les cinés, restos, soirées et Kébabes ensembles. Egalement pour le tour à moto, les diverses aide en bricolage et encore bien d'autres moments fort sympathiques, ma foi.*

*A tous, ce fut un réel plaisir de faire votre connaissance, ne croyez pas être débarrassés de moi je repasserais vous voir Nahhahahahahah !!!!!*



*A **Gaëlle et Kristell**, mes grand'sœurs bien aimées,  
Qui toujours à Paris, m'ont très bien accueilli.  
Elles ont su sans flancher, l'exemple me montrer,  
C'est aussi grâce à elles que j'ai bien réussi.*

*A **Sylvain** également, vont mes remerciements,  
Pour toutes les discussions, avis et bons moments.*

*A mes **cousins, oncles, tantes** et à mon cher **Grand Père**,  
De moi vous serez fier, en tout cas je l'espère...*

*Pour tous ici aussi, maintenant je conclus,  
A tous encore merci, à bientôt et voilù !!!*



# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>I. Bibliographie</b>	<b>5</b>
<b>I.1. Les gliomes</b>	<b>5</b>
I.1.1. Diagnostic	6
I.1.1.1. Généralités	6
I.1.1.2. Principe de l'IRM et caractérisation des tumeurs cérébrales	7
I.1.1.3. Principe de la Spectrographie par Résonance Magnétique (SRM) et caractérisation des tumeurs cérébrales	9
I.1.1.4. Principe de la Tomographie par Emission de Positons (TEP) et caractérisation des tumeurs cérébrales	10
I.1.1.5. Histopathologie et caractérisation moléculaire	11
I.1.2. Traitements	12
I.1.2.1. Traitement des gliomes de bas grade	12
I.1.2.2. Traitement des gliomes de haut grade	14
<b>I.2. Des techniques de radiothérapie innovantes utilisant les spécificités du rayonnement synchrotron</b>	<b>25</b>
I.2.1. le rayonnement synchrotron	25
I.2.1.1. Historique	25
I.2.1.2. Principe et production du rayonnement synchrotron	26
I.2.1.3. Devenir du rayonnement synchrotron	29
I.2.1.4. Caractéristiques et intérêts du rayonnement synchrotron	30
I.2.1.5. La ligne biomédicale ID17	31
I.2.1.6. La plateforme de biologie	32
I.2.2 Rappels physiques : interactions des radiations ionisantes avec la matière	33
I.2.2.1. La diffusion Rayleigh ou effet Thomson	34
I.2.2.2. L'effet photonucléaire	34
I.2.2.3. L'effet photoélectrique	34
I.2.2.4. L'effet Compton : la diffusion incohérente	36
I.2.2.5. La production de paires	37
I.2.2.6. Probabilité d'interaction des différents effets	37
I.2.2.7. Interaction des électrons avec la matière	38
I.2.3. Thérapie par MicroFaisceaux : la MRT (Microbeam Radiation Therapy)	39
I.2.3.1. Le concept de MRT	39
I.2.3.2. Etat de l'art	42
I.2.3.2.1. Expériences sur animaux sains	42
I.2.3.2.2. Les études sur animaux porteurs de tumeurs	49
I.2.3.2.3. Optimisation de la géométrie d'irradiation	58
I.2.3.3. Quelques notions de dosimétrie appliquée à la MRT	59
I.2.3.3.1. Calcul de la dose pic et compensation de l'équilibre électronique	60
I.2.3.3.2. Calcul théorique de la dose absorbée : simulation Monte-Carlo	61
I.2.3.3.3. Les détecteurs MOSFETs	61
I.2.3.3.4. Les films GAFchromiques	62
I.2.3.3.5. Les chambres d'ionisations	63
I.2.4. Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron : la SSRT (Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy)	65
I.2.4.1. Principe (d'après Biston et al. [Biston, 2004b])	65
I.2.4.2. Historique (d'après Corde [Corde, 2002a])	67
I.2.4.3. Etat de l'art à l'ESRF	70

<b>II. Matériel et Méthodes</b>	<b>77</b>
<b>II.1. Culture cellulaire</b>	<b>77</b>
II.1.1. Lignées cellulaires	77
II.1.2. Croissance cellulaire	77
<b>II.2. Animaux utilisés lors des expérimentations</b>	<b>78</b>
<b>II.3. Anesthésie des animaux</b>	<b>78</b>
<b>II.4. Implantation de la tumeur</b>	<b>79</b>
II.4.1. Préparation des cellules pour l'implantation	79
II.4.2. Chirurgie Stéréotaxique	79
<b>II.5. Imagerie par Résonance Magnétique</b>	<b>81</b>
II.5.1. Diagnostic de présence de la tumeur	81
II.5.2. Etude du modèle 9L sur aimant Bruker 2,35 Tesla [Serduc, 2006a]	82
<b>II.6. Injection des drogues</b>	<b>83</b>
<b>II.7. Irradiation par faisceau synchrotron</b>	<b>85</b>
II.7.1. Thérapie par MicroFaisceaux (MRT)	85
II.7.1.1. Caractéristiques du dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation	85
II.7.1.2. Les collimateurs multifentes	87
II.7.1.3. Irradiations sans les collimateurs multifentes	89
II.7.1.4. Dosimétrie	90
II.7.1.5. Protocole d'irradiation en MRT	90
II.7.2. Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (SSRT)	92
II.7.2.1. Le faisceau	92
II.7.2.2. Dosimétrie	94
II.7.2.3. Protocole d'irradiation en SSRT	95
II.7.2.4. Imagerie post irradiation	96
<b>II.8. Suivi des animaux</b>	<b>98</b>
<b>II.9. Histologie</b>	<b>100</b>
II.9.1. Prélèvement et préparation des cerveaux	100
II.9.2. Déshydratation	101
II.9.3. Inclusion, coupe et coloration	101
II.9.4. Analyse	102
<b>III. Importance des paramètres d'irradiation en MRT</b>	<b>105</b>
<b>III.1. Contexte de l'étude</b>	<b>105</b>
<b>III.2. Résultats</b>	<b>106</b>
III.2.1. La technique de base conçue pour le collimateur Archer	106
III.2.2. Irradiation à 150 µm d'espacement	135
III.2.3. Comparaison des 2 collimateurs utilisés : le collimateur Archer et le collimateur Tecomet	136
III.2.4. Variation des doses et augmentation de la taille des microfaisceaux en mode unidirectionnel	138
III.2.5. Irradiation en faisceaux croisés simultanés ou différés	140
III.2.6. Irradiation en faisceaux croisés utilisant une géométrie originale	144
<b>III.3. Discussion</b>	<b>155</b>
III.3.1. L'espacement	155
III.3.2. Les collimateurs multifentes	157
III.3.3. Optimisation des courbes de survie avec le collimateur Tecomet : variation des doses et des géométries d'irradiation	160
<b>IV. Utilisation de drogues en MRT</b>	<b>167</b>
<b>IV.1. Contexte de l'étude</b>	<b>167</b>
<b>IV.2. Résultats</b>	<b>171</b>
IV.2.1. Test de différentes drogues	171
IV.2.2. Cas particulier du gadolinium et irradiation en faisceaux croisés	174

IV.2.2.1. Détermination de la dose optimale en irradiation par faisceaux croisés couplée à l'injection de Gd-DTPA	174
IV.2.2.2. Injection de gadolinium à l'aide d'une pompe	180
IV.2.2.3. Expériences sujettes à débat	182
IV.2.3. Conclusion	184
<b>IV.3. Discussion</b>	<b>185</b>
IV.3.1. Cisplatine et témozolomide	185
IV.3.2. Gadolinium	186
<b><i>V. Deux approches thérapeutiques utilisant le rayonnement synchrotron : SSRT et MRT</i></b>	<b>193</b>
<b>V.1 Contexte de l'étude</b>	<b>193</b>
<b>V.2 Résultats</b>	<b>194</b>
V.2.1. Résultats de SSRT	194
V.2.1.1. Tomographie Quantitative par Rayonnement Synchrotron	194
V.2.1.2. Courbes de survie	196
V.2.1.3. Poids et signes cliniques	197
V.2.1.4. Analyse histologique	198
V.2.2. Résultats de MRT	201
V.2.2.1. Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire	201
V.2.2.2. Courbes de survie	202
V.2.2.3. Courbes de poids et signes cliniques	204
V.2.2.4. Analyse histologique	205
V.2.3. Comparaison MRT/SSRT	205
V.2.3.1. Avec les cellules F98	205
V.2.3.2. Avec les cellules 9L	206
<b>V.3. Discussion</b>	<b>208</b>
V.3.1. Comparaison des résultats de SSRT F98 avec la bibliographie	208
V.3.2. Analyses des résultats obtenus lors des expériences de MRT et de SSRT avec des protocoles identiques	210
V.3.3. Conclusion	212
<b><i>VI. Synthèse sur les caractéristiques des modèles tumoraux</i></b>	<b>215</b>
<b>VI.1. Contexte de l'étude</b>	<b>215</b>
<b>VI.2. Résultats</b>	<b>216</b>
VI.2.1. Stabilité dans le temps des modèles utilisés sur la ligne biomédicale de l'ESRF	216
VI.2.2. Imagerie fonctionnelle par IRM du modèle 9L	218
VI.2.3. Variation des modalités d'implantation	221
VI.2.3.1. Survie	221
VI.2.3.2. Analyse histologique	222
VI.2.4. Comparaison des modèles dans les conditions expérimentales	228
VI.2.4.1. Imagerie	228
VI.2.4.2. Histologie	231
VI.2.5. Réaction a des protocoles simples de radiothérapie et de chimiothérapie	233
VI.2.6. Influence de l'intervalle implantation/irradiation sur les résultats de MRT	235
VI.2.7. Variation intra-modèle : cas de nouvelles cellules 9L	236
<b>VI.3. Discussion</b>	<b>237</b>
VI.3.1. Validation des modèles tumoraux	237
VI.3.2. Principales caractéristiques des modèles tumoraux utilisés	239
VI.3.3. Variation intra-modèles, les différences entre les rats contrôle de différentes études publiées	241
<b><i>VII. Conclusions et Perspectives</i></b>	<b>245</b>
<b><i>VIII. Annexes</i></b>	<b>253</b>
<b><i>IX. Références bibliographiques</i></b>	<b>275</b>



## **Abréviations**

**BCNU** : carmustine  
**BHE** : Barrière Hémato Encéphalique  
**BMF** : Bio Medical Facility  
**BNCT** : Boron Neutron Capture Therapy  
**BRCA1** : BReast CAncer 1

**Cac** : Centre a centre  
**CCNU** : lomustine  
**CDA** : Coefficient de Diffusion Apparent  
**Cispt** : Cisplatine  
**Cross** : Crossfiring = faisceaux croisés (type d'irradiation)  
**CT** : Computed Tomographie  
**CTRL** : Contrôle

**DE<sub>50</sub>** : Dose Efficace pour 50% des sujets  
**DEF** : Dose Enhancement Factor  
**DL<sub>50</sub>** : Dose Létale pour 50% des sujets  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMSO** : DiMéthylSulfOxyde  
**DNA PK** : Deoxyribonucleic Acid Phospho Kinase  
**DSB** : Double Strand Breaks

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor  
**ESRF** : European Synchrotron Radiation Facility  
**eV** : électron Volt

**FLAIR** : Fluid-Attenuated Inversion Recovery  
**FOV** : Field Of View

**G** : Grossissement  
**Gado/Gd** : gadolinium  
**Gd-DTPA** : Gadopentate de Diméglumine  
**Gy** : Gray

**HE** : Hematoxyline – Eosine  
**HR** : Homologous Recombinaison

**IC** : IntraCérébral  
**ID** : Insertion Device  
**ILS** : Increased LifeSpan  
**ILSre** : Relative Increased LifeSpan  
**INSERM** : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique  
**ITV** : Index de Taille des Vaisseaux  
**IV** : IntraVeineux

**JX** : Jour X post implantation

**MGMT** : O6 Méthyl Guanine Transférase  
**MRT** : Microbeam Radiation Therapy

**N** : Nombre de rats  
**Na** : Non adapté  
**NAA** : N- Acétyl-L-Aspartate  
**NHEJ** : Non Homologous End Joining  
**NSLS** : National Synchrotron Light Source

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PAT-PLAT**: Photo Activation Therapy with Platine  
**PCV** : Procarbazine + CCNU + Vincristine  
**PDGF** : Platelet-Derived Growth Factor  
**PVDR** : Pic Valley Dose Ratio

**Reirr** : Reirradiation (type d'irradiation)  
**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**SC** : Sous Cutané  
**SEAM** : Seamless = faisceaux larges (type d'irradiation)  
**SEM** : Ecart Standard à la Moyenne  
**SLT** : Survivants à Long Terme  
**SRCT** : Synchrotron Radiation Computed Tomography  
**SRM** : Spectrographie par Résonance Magnétique  
**SSRT**: Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy  
**SVF** : Serum de Veau Fœtal

**TE** : Temps d'Echo  
**Temo** : Témazolomide  
**TEP** : Tomographie par Emission de Positron  
**TR** : Temps de Répétition

**Unidir** : Unidirectionnel (type d'irradiation)

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VS** : Volume Sanguin  
**VSC** : Volume Sanguin Cérébral





# Introduction

Il y a plus de 20 ans, Pierre Desproges disait « La recherche a besoin d'argent dans deux domaines prioritaires : le cancer et les missiles antimissiles. Pour les missiles antimissiles, il y a les impôts. Pour le cancer, on fait la quête ». Je ne sais pas ce qu'il en est pour les missiles antimissiles, mais la situation de la recherche contre le cancer a évolué. D'après un rapport publié en 2007 par l'Institut National du Cancer, l'argent consacré en France par an à la recherche contre le cancer, toutes sources confondues, peut être estimé à 1 318 910 k€ dont 669 710 k€ de financement public, 600 000 k€ en recherche et développement dans les industries privées et 49 200 k€ issus de la Ligue contre le cancer et de l'Association de Recherche contre le Cancer [Almaric, 2007]. Aux Etats-Unis, le budget du NIH (National Institutes of Health) atteint 5 milliards de dollars pour cette seule maladie (<http://www.whitehouse.gov/news/releases/2002/09/20020918-5.html>). La lutte contre le cancer est devenue prioritaire dans les pays industrialisés. En France, un plan cancer a été mis en place en 2003 notamment avec la création de l'INCa (Institut National du Cancer) et la mise en place des canceropôles.

Bien que la mortalité liée au cancer ait diminué de 5% entre 2000 et 2004, le cancer devient en 2004 la première cause de décès en France (152 708 décès<sup>▲</sup>) devant les maladies cardiovasculaires (147 323 décès) [Aouba, 2007] avec comme cause première le cancer de l'appareil respiratoire chez l'homme (21 398 décès en 2004) et le cancer du sein chez la femme (11 199 décès en 2004). En l'an 2000, 278 253 nouveaux cas de cancer étaient recensés en France dont 5 299 cancers du système nerveux central (d'après Le plan cancer 2003-2007). Ce type de tumeur, assez rare par rapport au cancer de la prostate (40 209 nouveaux cas en 2000) ou au cancer du sein (41 845 nouveaux cas en 2000), se distingue cependant comme le deuxième groupe de tumeurs le plus fréquent chez l'enfant après les tumeurs du sang. Malgré les nombreuses avancées scientifiques de ces dernières années concernant la thérapie des maladies tumorales, ce type de tumeurs, notamment les gliomes cérébraux, répond peu aux traitements et la médiane de survie des patients varie entre quelques mois (9-15 mois pour les glioblastomes) et quelques années (avec un maximum de 10 ans pour les oligodendrogliomes). C'est pourquoi de nombreuses études cliniques et précliniques sont menées pour trouver un traitement afin d'éliminer ou de stabiliser au maximum l'évolution de ces tumeurs. C'est dans ce cadre qu'un programme de recherche en

---

<sup>▲</sup> sur 509 408 décès.

thérapie préclinique des tumeurs cérébrales a débuté en 2000 sur la ligne biomédicale de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France). Deux protocoles de thérapie innovants ont ainsi été développés utilisant les caractéristiques très particulières du rayonnement synchrotron.

Ces deux techniques de radiothérapie sont la Thérapie par Microfaisceaux (Microbeam Radiation Therapy ou MRT) et la Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy ou SSRT). Chacune d'elle a été développée indépendamment de l'autre au NSLS (National Synchrotron Light Source, Brookhaven, USA) pour la MRT et à l'ESRF pour la SSRT par des équipes différentes utilisant des modèles de tumeurs cérébrales différents. Ces deux programmes de recherche ont été poursuivis à l'ESRF par des équipes scientifiques d'utilisateurs. Suite à un colloque traitant du sujet, il a semblé pertinent d'initier un programme permettant à la fois au personnel scientifique de l'ESRF d'acquérir l'expertise de ces deux techniques et d'effectuer des expériences permettant la comparaison de ces techniques. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse.

Le thème de recherche, le traitement des gliomes cérébraux, est développé dans la partie bibliographie avec les données actuelles sur la MRT et la SSRT. La seconde partie de ce travail est consacrée à l'instrumentation et aux méthodes. La MRT a été la première des deux techniques à être développée en recherche interne à l'ESRF et les parties III et IV sont consacrées au développement et à l'optimisation des paramètres de cette technique ainsi qu'aux effets de son association avec diverses drogues. Les expériences de SSRT et la comparaison des deux techniques sont développées dans la cinquième partie. Enfin, les différences entre les modèles tumoraux utilisés et leur influence sur les protocoles de thérapie seront abordées dans la dernière partie.

# **Bibliographie**



# I. Bibliographie

## I.1. Les gliomes

Gliome, terme issu du grec *glia* : glue. [Variété de tumeur issue du tissu nerveux, et plus spécifiquement de la substance servant de soutien aux neurones (cellules nerveuses) au niveau du système nerveux central (encéphale et moelle épinière)].

Les gliomes sont le type de tumeurs primaires cérébrales le plus fréquent avec 12 500 nouveaux cas diagnostiqués tous les ans aux Etats-Unis [Hoffman, 2006]. En France, une tumeur du système nerveux central a été diagnostiquée chez 5 299 personnes en l'an 2000<sup>♦</sup>. Les gliomes dériveraient de la dédifférenciation de cellules gliales comme les cellules astrocytaires ou oligodendrocytaires matures, ou comme le suggère une étude récente [Sanai, 2005] des cellules souches neurales. Le terme gliome réunit en fait des sous-catégories hétérogènes dont les astrocytomes, les oligodendrogliomes, les gliomes mixtes (combinaison d'éléments astrocytaires et oligodendrogliaux) et les épendymomes (qui se comportent et sont traités de manière différentes des autres gliomes).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les gliomes peuvent être classés en grades histopathologiques s'appuyant sur l'anaplasie ou sur leur degré de différenciation. Cette classification a d'importantes implications pour le pronostic (Tableau 1). Les gliomes de grade I sont typiquement des lésions localisées, non infiltrantes et qui touchent en majorité les enfants (pour revue : [Zacharoulis, 2004]). Chez les adultes, plus de la moitié des gliomes sont de haut grade (gliomes malins). Cela inclut les glioblastomes multiformes, les astrocytomes anaplasiques, les oligodendrogliomes anaplasiques et les oligoastrocytomes anaplasiques. Ces tumeurs touchent le plus souvent des individus âgés de 40 à 60 ans [Norden, 2006]. Malgré des progrès récents, la survie à 2 ans pour les glioblastomes multiformes récurrents avec une thérapie optimale atteint à peine les 26,5% [Stupp, 2005]. Le pronostic est bien meilleur pour les gliomes de bas grade, pour lesquels il est reporté 50% de survie à 10 ans [Leighton, 1997]. Néanmoins, avec peu d'exceptions, tous les patients succombent finalement à leur mal, quelque soit le traitement.

---

<sup>♦</sup> Le nombre total d'habitants recensés en France en 1999 était de 58 520 688.

Grades de l'OMS	Nom	Fréquence <sup>a</sup> (% de gliomes)	Survie à 5 ans <sup>a</sup> (%)	Médiane de survie (avec traitement)
II	astrocytome diffus	1,7	46,9	3-8 ans <sup>b</sup>
	oligodendrogliome	9,2	70,5	7 - 10 ans <sup>c</sup>
III	astrocytome anaplasique	7,9	29,4	2 - 3 ans <sup>d</sup>
	oligodendrogliome anaplasique	5,1	40,1	3 - 5 ans <sup>c</sup>
IV	glioblastome	50,7	3,3	9 - 15 mois <sup>d</sup>
	autres	20,5		

**Tableau 1: Classification des gliomes malins et implication diagnostique ; (a) d'après [CBTRUS, 2005] ; (b) d'après [Pignatti, 2002] ; (c) d'après [Jaeckle, 2006] ; (d) d'après [Wen, 2006a].**

### **I.1.1. Diagnostic**

Ce sont les symptômes cliniques qui vont pousser un patient à aller consulter : maux de têtes, troubles de la mémoire, diminution des facultés intellectuelles, crises d'épilepsies... Le neurologue vérifie grâce à des tests simples le fonctionnement de la mémoire et des organes sensoriels. Si la suspicion se confirme, il prescrira des examens d'imagerie. Ceux-ci permettent de confirmer ou non la présence d'une tumeur (diagnostic positif) et de la différencier d'autres lésions (diagnostic différentiel), mais dans la plupart des cas, une biopsie est nécessaire pour établir le diagnostic étiologique.

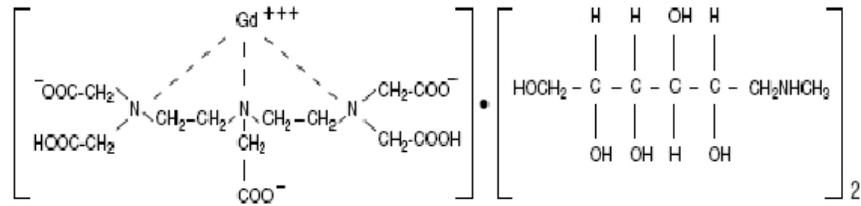
#### **I.1.1.1. Généralités**

L'examen de choix pour diagnostiquer une tumeur du cerveau est l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) cérébral. La tomographie assistée par ordinateur (Computed Tomographie = CT) peut passer à côté de lésions structurales, en particulier dans la fosse postérieure, ou de tumeurs ne prenant pas le contraste comme les gliomes de bas grade. C'est pourquoi, si une tumeur cérébrale fait partie des hypothèses diagnostiques, l'IRM avec injection d'un chélate de gadolinium est le test de choix. Cependant, l'IRM conventionnelle est parfois prise en défaut dans l'évaluation des gliomes [Henson, 2005] et plusieurs études soulignent l'apport complémentaire de l'imagerie métabolique, en particulier la spectrographie IRM (SRM) [Grand, 1996] et la tomographie par émission de positons (TEP). Cependant, la CT est encore largement utilisée car la répartition géographique des IRM ne permet pas à tous les patients d'y avoir accès.

### I.1.1.2. Principe de l'IRM et caractérisation des tumeurs cérébrales

L'IRM est une technique de diagnostic médical puissante qui fournit des images, tridimensionnelles et en coupe, de grande précision anatomique. L'IRM est non invasive et sans effet secondaire connu. Il s'agit d'observer la résonance magnétique nucléaire (RMN) des protons de l'eau contenus dans l'organisme, c'est à dire la réponse des noyaux soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique. L'intensité recueillie pour un élément de volume (voxel) dépend de la densité en proton (donc majoritairement les protons de l'eau) à l'endroit considéré et permet ainsi d'obtenir une image tridimensionnelle de la répartition de l'eau dans le corps du patient. Selon la méthode utilisée, le contraste entre deux voxels peut être augmenté si les temps de relaxation des spins nucléaires (décrivant le retour à l'équilibre des noyaux après l'excitation) diffèrent dans les deux zones. Il est donc possible d'observer des altérations des tissus (telles que des tumeurs) grâce aux différences de densité et de relaxation de l'eau. Le rôle des agents de contraste va être de diminuer ce temps de relaxation afin d'augmenter l'intensité des signaux (<http://perso.orange.fr/chimie.sup/IRM.html>).

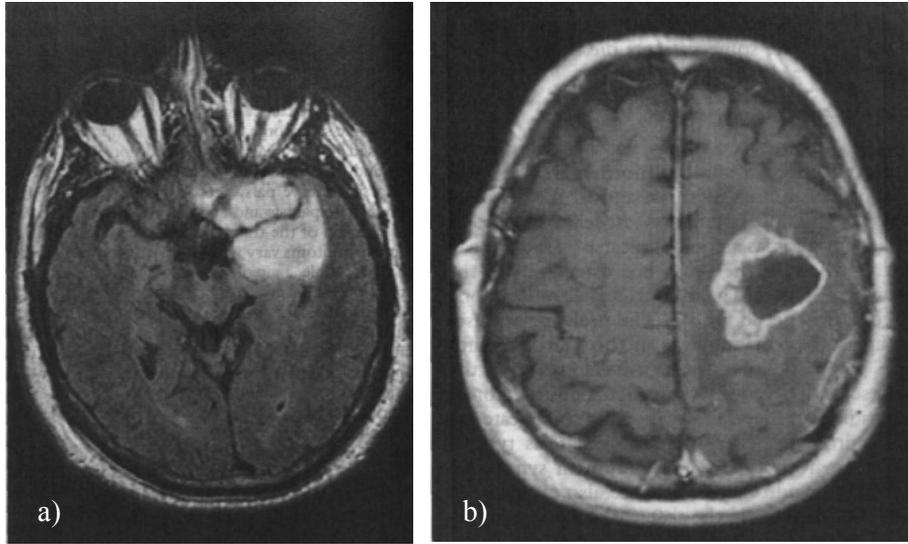
Le **gadopentate de diméglumine**, Gd-DTPA (Magnevist®, Schering, Berlin) est un agent de contraste couramment utilisé en clinique pour l'IRM. Le gadolinium est une terre rare, son ion ( $Gd^{+++}$ ) possède sept électrons dépareillés et, de fait, possède des propriétés paramagnétiques. Il a une forte action sur le temps de relaxation en  $T_1$  du proton de l'hydrogène. L'ion gadolinium libre n'est pas utilisable en clinique car très toxique. Par chélation avec l'acide diéthylentriamine pentaacetic (DTPA), le  $Gd^{+++}$  forme un complexe stable (sel de gadopentate de diméglumine), bien toléré (Figure 1). Le Gd-DTPA est un produit demi molaire (0,5 mmol/ml) et la masse molaire du gadolinium est 157,2g/mol, il contient donc 78,6 mg/ml de gadolinium. La dose d'administration recommandée est de 0,1 à 0,2 ml/kg en intra veineux chez l'homme. La dose efficace chez 50% des rats ( $DE_{50}$ ) a été comparée à la dose létale chez 50% des rats ( $DL_{50}$ ) en administration péricérébrale. Elles ont été évaluées respectivement à 97,1  $\mu$ mol/kg et 1227,3  $\mu$ mol/kg (soit 306  $\mu$ mol/250g).



**Figure 1: Formule chimique semi développée du Gd-DTPA**

Il est intéressant de noter que le gadolinium a également été utilisé chez le rat lors d'expérimentation d'imagerie en injection intra péritonéale [Wilkins, 1995] et lors d'expérience de thérapie chez le rat (Gd-DTPA et Gd-DOTA) [De Stasio, 2005] et chez la souris (GdTex) [Miller, 1999] en tant qu'agent permettant d'augmenter le dépôt de dose. La motexafin-gadolinium a même fait l'objet de tests cliniques chez l'homme en tant qu'élément radiosensibilisant pour les tumeurs du système central démontrant une survie, sans progression de la tumeur, plus importante pour les patients ayant reçu de la motexafin-gadolinium avant l'irradiation mais sans augmentation de survie générale [Mehta, 2004].

En IRM, la plupart des tumeurs cérébrales apparaissent hypointenses sur les images pondérées en  $T_1$  et hyperintenses sur celles pondérées en  $T_2$  ou en mode FLAIR (Fluid-Attenuated Inversion Recovery). L'administration d'un agent de contraste de petite taille (chélate de gadolinium) en association avec une séquence pondérée en  $T_1$  va permettre de rehausser le contraste dans les tissus tumoraux caractérisés par des lésions de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et par des néovascularisations, par l'intermédiaire d'une diminution du temps de relaxation des protons de l'eau des vaisseaux. Les informations obtenues peuvent parfois permettre d'accéder au diagnostic étiologique en différenciant le type tumoral. Ainsi les astrocytomes sont caractérisés à l'IRM par une masse diffuse, hypointense en mode pondéré en  $T_1$ , mais plus visibles en pondération en  $T_2$  sur des images obtenues en mode FLAIR sur lesquelles la masse est définie par un réhaussement positif (Figure 2-a). Les astrocytomes malins se caractérisent par une augmentation de contraste irrégulière souvent en forme d'anneau et entourée par de l'œdème (Figure 2-b).



**Figure 2 :** a) FLAIR IRM d'un astrocytome de bas grade; b) IRM d'un glioblastome multiforme obtenue après administration de gadolinium. La marge irrégulière hypercontrastée avec une nécrose centrale est caractéristique de cette tumeur ; d'après [DeAngelis, 2001].

L'IRM permet également la mesure de paramètres biologiques et fonctionnels, comme le volume sanguin et la perfusion [Le Bas, 2005], ou encore l'index de taille des vaisseaux, le coefficient de diffusion apparent [Tropres, 2001] qui sont des techniques émergentes. Ces informations sont précieuses lors de réalisation de biopsies en conditions stéréotaxiques ou d'exérèse.

### **I.1.1.3. Principe de la Spectrographie par Résonance Magnétique (SRM) et caractérisation des tumeurs cérébrales**

L'intérêt de la SRM dans le diagnostic différentiel des tumeurs est connu depuis plusieurs années et les études actuelles tendent à élargir ses indications. Comparativement à l'IRM standard qui mesure le signal des protons de l'eau, la SRM mesure le signal des métabolites neuronaux et gliaux après suppression de la résonance de l'eau. L'analyse de ces résultats qui se présentent sous forme de spectre ou de carte va permettre de différencier les physiologies cérébrales normales et pathologiques. La SRM a ouvert une approche neurobiologique et neuropharmacologique nouvelle, notamment dans la détermination des mécanismes physiopathologiques tumoraux : prolifération microcapillaire, rupture de la BHE, infiltration tumorale [Carpentier, 2004]. En pathologie tumorale, la SRM est principalement utilisée pour mesurer les variations de résonance du marqueur neuronal NAA (N-acétyl-L-aspartate), des marqueurs gliaux, et d'un marqueur direct du métabolisme : le lactate. La SRM rend ainsi

possible le diagnostic différentiel entre les tumeurs et les abcès (présence de lactate, d'alanine et de succinate sauf dans le cas de nécrose tuberculeuse ou d'abcès toxoplasmiques) [Grand, 1996], la radionécrose (diminution de tous les métabolites) ou encore l'ischémie (diminution du NAA et présence de lactate). Il permet aussi d'établir les profils spécifiques permettant de différencier les gliomes de haut grade (lactate augmenté, pic de choline augmenté, présence de lipides libres traduisant la nécrose) et les gliomes de bas grade (pic de choline augmenté, baisse du NAA).

L'intégration des données de la SRM à celle de l'IRM conventionnelle pourrait également aider à mieux délimiter le volume tumoral (et donc la cible thérapeutique). Certaines études montrent que le volume tumoral défini en SRM est plus étendu que celui indiqué par la prise de contraste après injection de Gd-DTPA en IRM (moins large mais réparti différemment de l'hypersignal T<sub>2</sub>) [Pirzkall, 2001 ; Pirzkall, 2002]. Les zones hypermétaboliques en SRM s'étendent au-delà de l'hypersignal T<sub>2</sub> et de la prise de contraste, et elles peuvent être des sites de rechute [Pirzkall, 2004]. De nouvelles indications de la SRM ne cessent d'apparaître, développant son intérêt diagnostique. Ainsi il existerait un lien entre l'importance des anomalies métaboliques en SRM et la survie. Il semble aussi possible de prévoir l'efficacité du témozolomide en fonction du rapport choline/eau [Benouaich-Amiel, 2006 ; Kuznetsov, 2003 ; Murphy, 2004 ; Oh, 2004].

#### **I.1.1.4. Principe de la Tomographie par Emission de Positons (TEP) et caractérisation des tumeurs cérébrales**

La TEP est une technique de neuro-imagerie métabolique lourde et onéreuse. Cette technique nécessite la proximité immédiate d'un accélérateur de particules (cyclotron) pour élaborer les marqueurs radioactifs dont les demi-vies sont courtes [Carpentier, 2004]. L'apport de la TEP utilisant la méthionine marquée au carbone (<sup>11</sup>C) est largement démontré dans les gliomes mais cette technique reste marginale car très peu de centres TEP peuvent synthétiser le <sup>11</sup>C. L'apparition de nouveaux traceurs fluorés relance actuellement le débat, permettant un ciblage des biopsies stéréotaxiques, un diagnostic différentiel des tumeurs de haut et bas grade ou encore permettant le diagnostic de récurrence.

L'intégration de l'imagerie métabolique (TEP et/ou SRM) dans le diagnostic et le suivi des gliomes semble donc une voie prometteuse.

### I.1.1.5. Histopathologie et caractérisation moléculaire

L'histologie reste la méthode de choix pour confirmer et parfois même établir le diagnostic après biopsie stéréotaxique ou exérèse, et ce malgré le caractère invasif du prélèvement (ce qui pourra limiter les indications). L'observation rigoureuse de lames colorées en HE (Hématoxyline et Éosine) permet d'établir le grade et le type de la tumeur selon la classification de l'OMS. Cette classification est basée sur la morphologie des cellules tumorales, l'hétérogénéité de la tumeur et sa vascularisation. Le diagnostic s'effectue de façon qualitative et non quantitative. Par exemple, la présence d'une seule mitose permet de réfuter le diagnostic de tumeur de bas grade (Tableau 2).

Grade	Atypies Nucléaires	Mitoses	Prolifération endothéliale	Nécrose
I	-	-	-	-
II	+	-	-	-
III	+	+	-	-
IV	+	+	+ et/ou	+

Tableau 2 : Grades histologiques selon la classification de l'OMS. D'après [Kleihues, 1993].

Le diagnostic histologique reste cependant dépendant du site de biopsie qui peut être source d'erreurs à cause de l'hétérogénéité tumorale (le diagnostic change dans 40% des cas si une résection chirurgicale est réalisée après une biopsie [Jackson, 2001]). Le résultat d'un diagnostic histologique reste de plus toujours difficile et subjectif car soumis à l'interprétation de l'observateur avec comme conséquence la faible reproductibilité des diagnostics entre observateurs différents et également pour le même observateur [Mittler, 1996].

En cas de doute sur le diagnostic, les pathologistes peuvent maintenant avoir recours à des tests complémentaires spécifiques de biologie cellulaire ou moléculaire. Ainsi la présence de GFAP (Glial Filament Acid Protein) révélé par immunohistochimie est caractéristique d'une tumeur astrocytaire, et l'hybridation de l'anticorps Ki67 permettra de déterminer l'indice de prolifération. La biologie moléculaire permettra de déterminer un sous type génétique ce qui pourra être d'une grande aide dans l'orientation du traitement en démontrant, par exemple, la perte d'hétérozygotie en 1p et 19q, signe d'une bonne chimiosensibilité. De même, l'inactivation du gène de la MGMT (O6 Méthyl Guanine Transférase : enzyme de réparation capable de transférer sur elle-même un résidu alkyl chimio-induit) sera accompagnée d'une meilleure efficacité des agents alkylants comme le témozolomide. De plus les recherches actuelles portant sur des cibles moléculaires spécifiques ne pourront être mises en œuvre chez

les patients que lorsque la présence de ces cibles aura été confirmée. La caractérisation moléculaire de chaque tumeur pourra apporter un traitement spécifiquement adapté aux « points faibles » de cette tumeur.

## **I.1.2. Traitements**

### **I.1.2.1. Traitement des gliomes de bas grade**

Cette section concerne le traitement des astrocytomes diffus, des oligodendrogliomes et des oligoastrocytomes, qui sont tous de grade II avec un potentiel malin. De part le caractère nonchalant de ces tumeurs, il est nécessaire d'établir un suivi clinique et IRM des patients tous les 3–6 mois. Malheureusement, tous les gliomes de bas grade évoluent finalement en tumeurs de haut grade. Les facteurs de mauvais pronostic incluent un âge supérieur à 40 ans, une taille de tumeur importante, une histologie révélant un astrocytome et la présence de déficits neurologiques avant la chirurgie [Norden, 2006]. La médiane de survie peut atteindre 9 ans pour les patients avec des facteurs pronostiques favorables, mais peut être de seulement 1 an pour les patients avec de mauvais facteurs pronostiques [Pignatti, 2002].

#### **Chirurgie**

Les gliomes de bas grade ne sont normalement pas soignables par chirurgie (ses effets sur la survie et sur les autres paramètres restent controversés). Cependant, de plus en plus d'études retrospectives se montrent favorables à une résection extensive de ces tumeurs par rapport à une biopsie [Keles, 2001]. Dans tous les cas, la plupart des spécialistes sont d'accord sur l'intérêt de réaliser soit la chirurgie soit la biopsie le plus tôt possible (au moment de la détection plutôt qu'au moment de la progression de la maladie). L'établissement du type histologique de la tumeur, de son grade pathologique et parfois de son génotype sont de plus en plus importants, tant pour le pronostic que pour les implications thérapeutiques. Parfois, il est approprié de garder le patient sous observation étroite et de reporter la biopsie ou la chirurgie jusqu'à ce qu'il y ait une évidence clinique ou radiographique de croissance tumorale.

## **Radiothérapie**

Malgré une survie finale identique, il est profitable de commencer la radiothérapie (54 Gy en 6 semaines) tout de suite après la chirurgie plutôt que d'attendre que la tumeur reprenne sa progression avant de recommencer un traitement. En effet, le taux de stagnation à 5 ans est augmenté dans le premier cas (44% contre 37%, respectivement,  $p = 0,02$ ) tout comme le temps de progression de la tumeur (4,8 ans contre 3,4 ans, respectivement,  $p = 0,02$ ) [Karim, 2002 ; van den Bent, 2005]. D'autres études démontrent l'augmentation de toxicité sans bénéfice clinique à des doses plus élevées, la dose standard de radiothérapie se situant entre 50 et 54 Gy, par fraction de 1,8 Gy [Karim, 1996 ; Shaw, 2002]. Il n'y a pourtant, pour l'instant, aucun consensus quant à l'utilisation de la radiothérapie. En cas de tumeur non opérable dans sa totalité, ou avec des lésions symptomatiques, une radiothérapie postopératoire est en générale proposée. Chez les jeunes patients à faible risque, une approche « attendre et voir » est une alternative raisonnable. Ce délai ne devrait pas compromettre la survie du patient et permettrait de retarder les séquelles neurocognitives dues à la radiothérapie [Taphoorn, 2003].

## **Chimiothérapie**

Historiquement, la chimiothérapie n'a jamais eu de rôle important dans le traitement des gliomes de bas grade. Pourtant, il semble de plus en plus sûr que les gliomes de bas grade, notamment les oligodendrogliomes, puissent être chimiosensibles. Une étude de phase III, comparant des patients dont la résection tumorale incomplète fut additionnée d'une radiothérapie, suivie ou non par un traitement à la lomustine (CCNU, nitrosurée), aboutit à l'obtention d'une médiane de survie de 4,5 ans pour les patients ayant eu uniquement de la radiothérapie contre 7,4 ans pour ceux ayant eu une chimiothérapie supplémentaire.

La différence n'est pourtant pas significative, mais cela est sûrement dû au faible échantillonnage [Eyre, 1993]. Quelques études de phase II suggèrent une activité potentielle du témozolomide contre les gliomes de bas grade [Brada, 2003b ; Pace, 2003 ; Quinn, 2003 ; Sanson, 2004]. Ces résultats sont cependant difficiles à interpréter vu l'hétérogénéité des tumeurs recrutées.

### **I.1.2.2. Traitement des gliomes de haut grade**

La procédure standard de soin pour les patients porteurs de gliomes malins est la résection maximale possible suivie par de la radiothérapie et de la chimiothérapie [Henson, 2006].

#### **Chirurgie**

Le clinicien dispose de peu de données sûres pour choisir de réséquer ou non la tumeur<sup>^</sup> [Metcalfe, 2001]. Les gliomes ont longtemps été considérés comme incurables chirurgicalement à cause de l'infiltration précoce par les cellules tumorales des régions apparemment saines du cerveau. Les données de la littérature de neurochirurgie établissent un bénéfice de survie potentiel lors d'une résection maximale [Lacroix, 2001]. Plusieurs données sont à prendre en considération avant de choisir entre une biopsie ou une résection de la tumeur : la proximité de la tumeur avec la zone du siège de la parole dans le cerveau, l'âge du patient, l'indice de performance, ou encore l'effet de la masse de la tumeur et le déplacement de la ligne médiane. La chirurgie permet de remédier à l'effet de masse et de réduire le volume tumoral pour les traitements ultérieurs en enlevant le noyau nécrotique radiorésistant et peu accessible à la chimiothérapie car éloigné des vaisseaux [Grossman, 2004]. De plus, une procédure chirurgicale permet d'établir un diagnostic tissulaire plus précis. Cependant la chirurgie est loin d'être anodine et s'accompagne de nombreux risques, dont l'aggravation des déficits neurologiques (à cause de lésions du tissu sain proche de la cavité de résection). Si la taille de la tumeur est trop importante pour qu'une chirurgie soit utile, ou si la tumeur est trop profonde pour être réséquée sans risque ou trop proche de la zone du siège de la parole, une biopsie stéréotaxique est mise en place. Ce type de biopsie est généralement sans risque et bien toléré [Hall, 1998 ; McGirt, 2005].

La chirurgie est parfois proposée aux patients souffrants de gliomes malins récurrents si la tumeur est accessible, symptomatique et éloignée de la zone du siège de la parole. Une chirurgie pourra améliorer le bien-être du patient, donner plus de temps pour les autres thérapies et dans certains cas améliorer l'effet de la chimiothérapie [Keles, 2004]. Cependant, tout comme pour les tumeurs primaires, le bénéfice de la chirurgie en ce qui concerne le gain de survie est toujours sujet à discussion.

Il est important de noter l'apparition de nouvelles techniques chirurgicales comme la chirurgie guidée par IRM [Nimsky, 2004], la craniotomie éveillée (lors de tumeurs dans la

---

<sup>^</sup> Si la chirurgie n'est pas pratiquée, une biopsie sera nécessaire pour typer la tumeur.

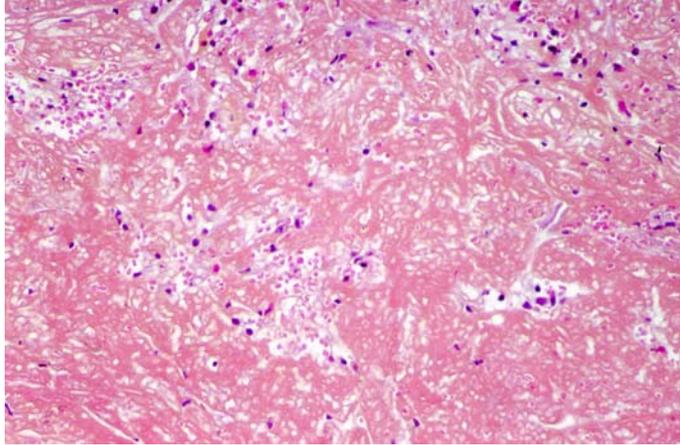
zone du siège de la parole) [Meyer, 2001] et la chirurgie guidée par fluorescence [Stummer, 2006].

### **Radiothérapie conventionnelle**

« Le glioblastome est une tumeur particulièrement radiorésistante qui siège au sein d'un organe radiosensible. Ce paradoxe explique en partie les résultats médiocres de la radiothérapie. » [Benouaich-Amiel, 2005]

C'est à la fin des années 70 qu'a été démontrée une augmentation de la survie des patients porteurs de gliomes malins en couplant une radiothérapie du cerveau entier et une chirurgie. La médiane de survie a ainsi augmenté de 17 semaines, pour les patients traités de manière conventionnelle, à 37,5 semaines pour ceux traités avec la radiothérapie cerveau entier suite à la chirurgie [Walker, 1978]. Les tumeurs récurrentes apparaissant généralement à proximité des marges de résection [Hochberg, 1980], la radiothérapie à champs limité est devenu le standard de traitement [Fiveash, 2003 ; Shapiro, 1989]. Ainsi, pour le faible nombre de patients bénéficiant d'une longue survie, cette approche permet d'éviter la toxicité différée des radiations (Figure 3).

Face au nombre de traitements disponibles, les neuro-oncologues classifient souvent les patients porteurs de gliomes malins en groupes pronostiques. Les patients appartenant au groupe pronostique favorable reçoivent presque toujours un traitement de radiothérapie. L'algorithme standard est une dose à la peau de 60 Gy délivrée en fraction de 1,8 à 2 Gy, à une fréquence de 5 fois par semaine. Des doses de radiothérapie supérieures à 60 Gy n'apportent pas de bénéfice supplémentaire [Chang, 1983]. Le volume de traitement varie mais il inclut généralement la zone d'hyperintensité révélée à l'IRM en mode T<sub>2</sub> ou FLAIR plus une marge de 1 ou 2 cm [Norden, 2006]. Pour les patients avec un pronostic vital faible, dont l'espérance de survie est parfois réduite à quelques mois, certains auteurs pensent qu'un traitement de radiothérapie sur 6 semaines est inapproprié [Brada, 2003a ; Chinot, 2003 ; Gupta, 2005]. De plus les patients âgés sont plus sensibles à la toxicité aiguë des rayonnements. Chez ces patients, l'hypofractionnement et le fractionnement accéléré sont des options qui peuvent être équivalentes, au niveau thérapeutique, au protocole conventionnel [Gupta, 2005]. Pour les patients âgés et les patients avec un statut clinique faible, un protocole de radiothérapie abrégé (40 Gy en 15 fractions) ou un traitement symptomatique sans radiothérapie peuvent être des alternatives raisonnables [Chinot, 2003 ; Roa, 2004].

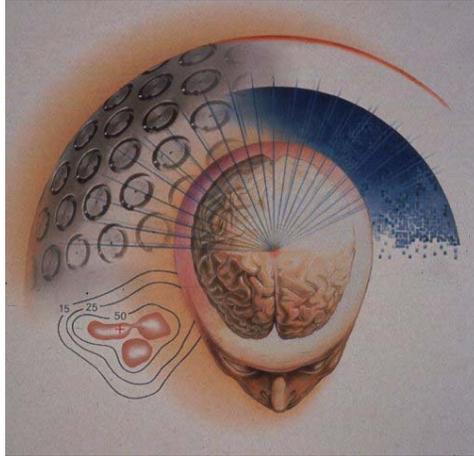


**Figure 3 : Coupe histologique d'une radionécrose 11 ans après irradiation (HES, x100)**

### **Nouvelles techniques de radiothérapie**

#### Radiochirurgie stéréotaxique

Comme la majorité des gliomes malins réapparaissent à proximité de la tumeur d'origine et qu'il est rare de voir une telle tumeur multifocale ou disséminée, il est intéressant de maximiser la dose dans le lit de la tumeur sans augmenter l'exposition en radiation du tissu cérébral environnant. La radiochirurgie stéréotaxique est une technique d'irradiation externe qui utilise de nombreux faisceaux convergents, délivrant une dose de radiations unique et élevée (15 – 20 Gy) à un volume de traitement réduit (< 4 cm). La radiochirurgie peut être effectuée à partir de rayons X de haute énergie (1,17 ou 1,33 MeV, source de cobalt 60) produit par un accélérateur linéaire, à partir de radiation  $\gamma$  ( $\gamma$  knife) (Figure 4). Moins fréquemment, elle est effectuée avec des particules chargées, comme des protons produits par des cyclotrons. Toutes les techniques de radiation stéréotaxique produisent une chute rapide de la dose au seuil du volume cible, entraînant une dose cliniquement insignifiante au niveau du tissu non ciblé [Norden, 2006]. Cependant, à l'heure actuelle, l'efficacité de la radiochirurgie stéréotaxique en complément d'une thérapie classique sur les gliomes malins nouvellement diagnostiqués reste controversée [Souhami, 2004 ; Tsao, 2005].



**Figure 4 : Principe du  $\gamma$  knife**

<http://www.ulb.ac.be/erasme/fr/services/medicaux/neurochir/gk/fr/radiocht.htm>

### Brachythérapie

Une autre technique de radiothérapie expérimentale conçue pour optimiser le contrôle local de la tumeur se nomme brachythérapie interstitielle. Une source radioactive est implantée dans le lit tumoral et délivre une faible dose de radiations continues qui va provoquer des dommages irréversibles aux cellules en division alors qu'elle permet au tissu sain de réparer les dommages non létaux [McDermott, 2004]. La technique la plus classique consiste en l'implantation d'iode-125 dans la cavité tumorale tout de suite après la résection chirurgicale. Malgré le grand intérêt porté à la brachythérapie, les essais cliniques de phase III n'ont pas démontré de bénéfice de survie pour les patients porteurs de gliomes malins nouvellement diagnostiqués [Laperriere, 1998 ; Selker, 2002]. Cependant les patients traités montrent un grand taux de nécroses radioinduites nécessitant parfois des craniotomies répétées [Laperriere, 1998]. Un nouveau système de brachythérapie permettant de délivrer une dose de radiation homogène aux tissus affectés et de diminuer la fréquence de ces nécroses radioinduites a fait son apparition (GliaSite, Proxima Therapeutics, Alpharetta, GA). Un cathéter muni d'un ballonnet gonflable est placé dans une cavité de résection (partielle ou totale) de tumeur cérébrale. Le ballon est rempli avec une solution aqueuse d'iode 125 qui délivre une dose faible et continue aux marges de la cavité de résection. Des résultats préliminaires suggèrent que les patients avec des gliomes malins récurrents pourraient être traités sans danger [Chan, 2005].

### Radioimmunothérapie

Une autre approche de radiothérapie en évaluation est l'administration ciblée de radiations aux cellules du gliome, grâce à l'assistance d'anticorps monoclonaux. Cette technique, connue sous le nom de radioimmunothérapie, nécessite la distribution d'un anticorps monoclonal contre la ténascine (par exemple) marqué à l'iode 125 ou 131 directement dans la cavité de résection chirurgicale. La ténascine est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui est hautement exprimée par le gliome et quelques autres cellules tumorales, mais pas par les cellules saines du cerveau. Il a été démontré qu'un anticorps radioinduit de souris contre la ténascine se localise spécifiquement au niveau du gliome. La survie obtenue lors d'étude de phase II est un peu meilleure que celle obtenue avec les contrôles historiques traités en brachythérapie ou en radiochirurgie stéréotaxique [Reardon, 2002 ; Reardon, 2006]. Ces résultats devront être confirmés par une étude de phase III.

### Techniques en cours de développement

Il reste encore de nombreuses techniques innovantes de radiothérapie en cours de développement à des stades plus ou moins avancés. La radiothérapie à intensité modulée permet un meilleur ciblage de la forme tumorale et donc une exposition moindre des tissus sains [Chan, 2003]. La Thérapie par capture boro-neutronique (BNCT = Boron Neutron Capture Therapy) permet après la distribution de bore près des cellules tumorales, de désintégrer ces molécules en particules ionisées grâce à des neutrons, particules ionisées qui vont détruire les cellules environnantes [Kageji, 2004 ; Kawabata, 2003 ; Kiger, 2004]. D'autres techniques, moins connues, en sont au stade préclinique. Parmi celles-ci la Thérapie par MicroFaisceau (MRT = Microbeam Radiation Therapy) et la Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (SSRT = Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy) feront l'objet de ce travail.

## **Chimiothérapie**

### Les agents classiques de chimiothérapie

Les premiers essais randomisés sur la chimiothérapie adjuvante des gliomes malins furent réalisés avec des nitroso-urées (carmustine : BCNU et lomustine : CCNU) en raison de leur solubilité lipidique et de leur faculté à traverser la BHE. Ces études ont montré une légère prolongation de la survie grâce à la chimiothérapie [Hildebrand, 1994 ; Walker, 1980]. Des problèmes méthodologiques limitaient cependant la portée scientifique de ces données. En

1994 et 2002, d'autres analyses ont confirmé que la chimiothérapie offrait une augmentation modeste de survie (6 à 10% de la survie à 1 an) chez les patients porteurs de gliome malin [Fine, 1993 ; Stewart, 2002]. C'est sur la base de ces données que les protocoles de soins standards donnés aux patients nouvellement atteints de gliome malin ont inclus aux Etats-Unis la chimiothérapie adjuvante. Les drogues les plus utilisées étaient le BCNU ou le PCV (Procarbazine + CCNU +Vincristine). Cependant, il a longtemps été impossible de démontrer un bénéfice de survie quelque soit la ou les drogues utilisées lors des essais prospectifs randomisés, exception faite du cas particulier des oligodendrogliomes anaplasiques. Les oligodendrogliomes anaplasiques sont un sous groupe de gliomes malins qui sont particulièrement chimiosensibles : 2/3 de ces tumeurs sont exceptionnellement sensibles au PCV [Cairncross, 1988 ; van den Bent, 1998]. Cette chimiosensibilité est directement liée à la perte allélique des chromosomes 1p et 19q. Une étude a ainsi montré que la perte de 1p/19q permettait une meilleure réponse au traitement (PCV) avec une médiane de survie supérieure à 123 mois, alors que lors de la perte de 1p seulement, la survie médiane passe à 71 mois, pour tomber encore plus bas chez les patients porteurs de tumeurs sans perte de 1p [Cairncross, 1998]. La perte de 1p/19q est donc un facteur pronostique favorable et les patients atteints d'oligoastrocytomes anaplasiques avec une perte combinée de 1p/19q pourraient se passer de radiothérapie post-opératoire puisqu'une réponse durable à la chimiothérapie a été établie.

Dans le cas des gliomes malins la chimiothérapie interstitielle (administration directe de drogue dans la cavité de résection de la tumeur) permet d'obtenir une grande concentration de l'agent de chimiothérapie au site de la tumeur avec une toxicité systémique minimale. De plus, l'administration interstitielle élimine le problème de la pénétration de la BHE [Norden, 2006]. L'implantation de cathéters et l'implantation de gaufrettes de polymère biodégradable imprégnées avec du BCNU (Gliadel wafers ; MGI Pharma, Bloomington, MN) comptent parmi les techniques utilisées. Ces gaufrettes ont été conçues pour relâcher du BCNU pendant plusieurs semaines après avoir été placées à la surface de la cavité de résection de la tumeur (Figure 5). Lors d'un essai clinique de phase III, cette technique a augmenté la médiane de survie par rapport au groupe placebo de 11,6 mois à 13,9 mois et le taux de survie à 1 an de 10%. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les effets indésirables des groupes actifs et du groupe placebo. L'implantation de ce système est maintenant approuvée pour les traitements des glioblastomes multiformes nouvellement diagnostiqués, aux Etats-Unis et en Europe [Lonardi, 2005].

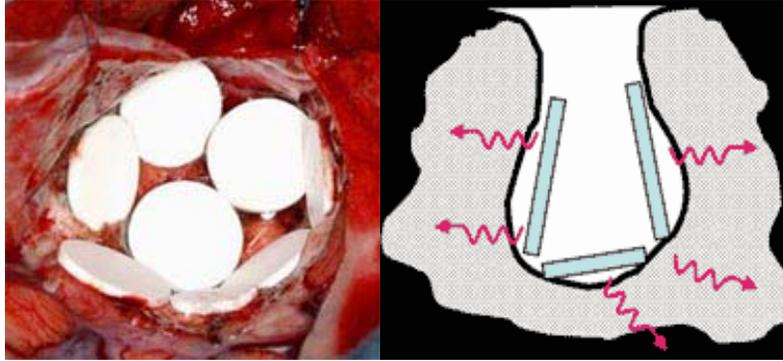
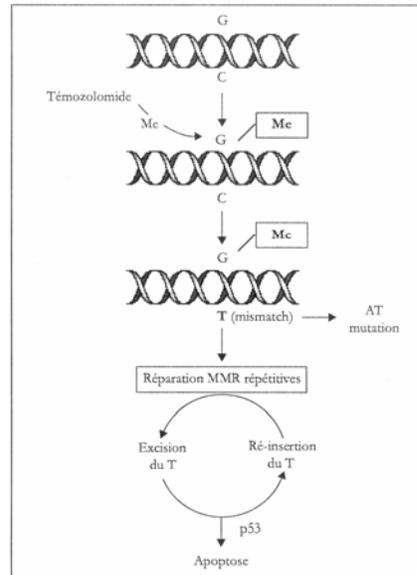
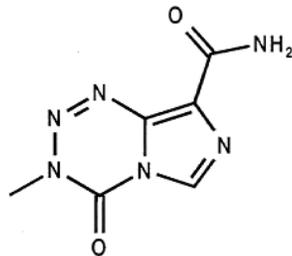


Figure 5: gaufrettes de Gliadel (polymère biodégradable conçu pour relâcher régulièrement du BCNU) placées à l'intérieur de la cavité de résection d'une tumeur et schéma du mode de diffusion. [http://www.med.uni-goettingen.de/presseinformationen/presseinformationen\\_4403.asp](http://www.med.uni-goettingen.de/presseinformationen/presseinformationen_4403.asp).

Concernant les gliomes malins récurrents, les agents de chimiothérapie classiques comme le BCNU, le carboplatine, l'étoposide, l'irinotecan et le PCV produisent un taux de réponse faible sans bénéfice de survie significatif. Les décisions d'utilisation seront donc prises au cas par cas.

#### L'émergence du témozolomide

Le témozolomide (Figure 6) est à l'heure actuelle l'agent le plus étudié pour le traitement des glioblastomes. Une de ces principales qualités est sa très grande biodisponibilité orale. C'est un agent alkylant (classe des imidazotrétazone) qui génère un adduit alkyl sur les bases guanine en position O6 ou N7 et entraîne la mort cellulaire par l'intermédiaire du système comprenant la réparation des mésappariements. Dans un premier temps, l'alkylation induit une erreur d'appariement. En conséquence, lors des réplifications suivantes, ce système de réparation est activé de manière répétitive, ce qui déclenche l'apoptose (Figure 6). Cette dernière étape est encore mal connue : le système de réparation serait à l'origine de cassures simple brin qui activeraient la voie de signalisation de l'apoptose. Par ailleurs, l'apoptose induite par le témozolomide fait suite à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M [Hirose, 2001], phase du cycle dans lequel les cellules sont les plus sensibles aux radiations ionisantes [Cadirola, 1984].

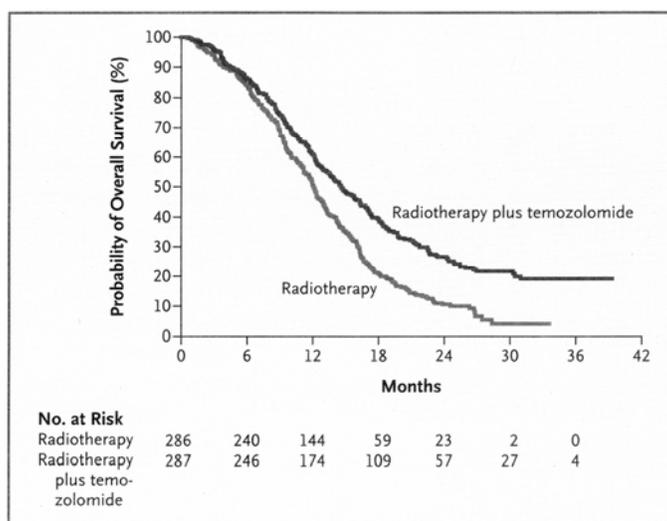


**Figure 6 :** A gauche : Structure chimique du témozolomide. A droite : mécanisme d'action du témozolomide d'après A. Benouaich-Amiel *et al.* [Benouaich-Amiel, 2005]. MMR = réparation par mésappariement.

Jusqu'en 2001, l'efficacité du témozolomide face aux gliomes de haut grade restait modeste et le véritable rôle de cette drogue dans le traitement des tumeurs du cerveau était encore incertain (pour revue [Stupp, 2001]). L'essai clinique de phase II mené sur des patients atteints de glioblastome par Stupp *et al.* en 2002 [Stupp, 2002] va entraîner l'essor que connaît actuellement le témozolomide. Cette drogue a été administrée quotidiennement durant la radiothérapie (60 Gy en 30 séances), à la dose de 75 mg/m<sup>2</sup> par jour puis, à l'issue de l'irradiation, comme traitement adjuvant à la dose de 200 mg/m<sup>2</sup> par jour sur 5 jours tous les 28 jours, durant 6 cycles. La toxicité à court terme de ce protocole s'est avérée acceptable : neutropénie chez 6% des patients, thrombopénie chez 6% des patients et lymphopénie chez 79% des patients ; 3 patients hospitalisés pour une pneumopathie. Ce protocole a permis d'obtenir une médiane de survie de 16 mois<sup>▲</sup>. Une autre étude de phase II évaluant le même schéma thérapeutique en primotraitement de glioblastome a corroboré ces premiers résultats avec une médiane de survie de 15,7 mois [Lanzetta, 2003]. Ces résultats encourageants ont motivé la réalisation d'un essai thérapeutique de phase III multicentrique randomisé qui va être à l'origine d'un nouveau standard de soin [Stupp, 2005]. Le protocole de référence comportait une irradiation de 2 Gy du lundi au vendredi pendant 6 semaines (60 Gy au total). Les patients inclus dans le protocole expérimental recevaient la même irradiation, associée à

<sup>▲</sup> La question du coût économique d'une telle approche thérapeutique a été évaluée à 8 fois plus que l'irradiation seule [Stupp, 2002 ; Wasserfallen, 2004].

du témozolomide 75 mg/m<sup>2</sup> par jour, 7 jours par semaine durant tout le temps de l'irradiation suivi d'un traitement adjuvant, après 4 semaines de repos, par 6 cures de témozolomide (dose de 150 à 200 mg/m<sup>2</sup> par jour, 5 j/28 j). La médiane de survie sans progression a été de 5 mois contre 6,9 mois respectivement sans et avec témozolomide. La médiane de survie est passée de 12,1 mois avec le protocole radiothérapie seule à 14,6 mois avec le protocole témozolomide-radiothérapie (Figure 7) avec une probabilité de survie globale à 2 ans respectivement de 10,4 et 26,5% (ce qui correspond à une réduction de décès de 37% avec  $p < 0,001$ ). La tolérance est restée acceptable.



**Figure 7 : Courbe de Kaplan-Meier comparant la survie dans le protocole radiothérapie seul au protocole radiothérapie-témzolomide par Stupp *et al.* [Stupp, 2005]**

Cet essai randomisé prospectif est le premier à avoir démontré une efficacité significative de la chimiothérapie chez les patients atteints de glioblastome avec un gain de 2,5 mois en médiane de survie et ce, sans toxicité majeure à court terme (suivi de 2 ans). Ce protocole est maintenant proposé en première intention chez les patients atteints de glioblastome. Cependant, quelques questions persistent comme l'efficacité de ce traitement pour les différents sous-groupes (biopsie/chirurgie, ou statut OMS) ou encore l'impact spécifique des différentes phases d'administration de la chimiothérapie [Benouaich-Amiel, 2005]. Un second essai thérapeutique randomisé, plus récent, renforce les résultats précédemment trouvés [Athanassiou, 2005].

## **Les cibles des agents moléculaires**

Une progression régulière des événements génétiques, impliquant la surexpression de proto-oncogènes et la perte des gènes de suppression tumoraux, marque le développement des gliomes malins [Hermanson, 1992 ; Kleihues, 1999 ; Maher, 2001 ; Okamoto, 2004] (pour revue [Louis, 2006 ; Tysnes, 2001]). Bien que ces événements moléculaires spécifiques soient complexes et nombreux, le résultat final est une augmentation de la survie et de la prolifération cellulaire [Louis, 2006]. La compréhension de ces changements moléculaires a désigné des cibles thérapeutiques [Kesari, 2005].

### EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) :

Le gène de l'EGFR est amplifié dans plus de 40% des glioblastomes multiformes primaires, d'où une surexpression d'EGFR. La suractivité de la voie de l'EGFR entraîne une prolifération cellulaire qui augmente l'invasivité de la tumeur, sa motilité, et son angiogénèse. Elle va également inhiber l'apoptose. Plusieurs molécules inhibitrices de l'EGFR ont été évaluées contre les gliomes malins. Ces agents sont généralement bien tolérés, mais les réponses ont tendance à être limitées (0 à 25%) et de courte durée [Rich, 2004].

### PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) :

La sur-régulation de la voie des PDGF est une autre figure classique des gliomes de haut grade qui peut être une cible thérapeutique potentielle. La première molécule cliniquement utile, inhibitrice de la tyrosine kinase, est l'imatinib mesylate (Gleevec, Novartis East Hanover, NJ), dont l'utilisation seule n'a pas eu grand effet [Reardon, 2005 ; Wen, 2006b]. Par contre, son association avec de l'hydroxyurée est relativement bien tolérée, et la réponse obtenue justifie des études plus approfondies [Reardon, 2005]. De nombreux autres inhibiteurs de l'EGFR et du PDGFR (récepteur) sont en cours de développement. La question principale étant leur faculté à traverser la BHE, les futures études viseront à vérifier si la cible est bien supprimée.

### Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) :

C'est un facteur stimulant critique dans l'angiogénèse des tumeurs et dans la production d'œdème péri-tumoral. De nombreux agents dirigés contre cette protéine et son récepteur sont évalués en essais cliniques [Stark-Vance, 2005].

En conclusion, excepté pour une minorité de patients, il semble peu probable qu'une drogue dirigée contre une seule molécule puisse être curative. Les agents conçus pour inhiber plusieurs cibles, ou la combinaison d'agents complémentaires pouvant inhiber plusieurs voies importantes, sont donc d'un grand intérêt pour ralentir la croissance tumorale. De plus, le

profil moléculaire des tumeurs devrait se développer encore plus, permettant d'augmenter la sélection des cibles moléculaires importantes [Stupp, 2006 ; Wen, 2006a].

### **Les thérapies expérimentales**

L'immunothérapie implique l'augmentation de la réponse immune de l'hôte en vue d'augmenter l'efficacité de l'activité antitumorale. L'intérêt de l'immunothérapie est d'être théoriquement capable de cibler spécifiquement les cellules tumorales. Une telle approche implique la vaccination du patient avec ces propres cellules dendritiques qui ont été récoltées et chargées *in vitro* avec des antigènes du gliome. Bien que certaines études aient été prometteuses, l'impact de cette approche reste à déterminer [Yamanaka, 2005] (pour revue [Prasad, 2004 ; Sikorski, 2005]).

Dernièrement, une nouvelle technique de thérapie génique basée sur les virus a été développée. Le vecteur viral peut être délivré par voie systémique ou directement dans la tumeur par le chirurgien. Les vecteurs peuvent être des virus qui ne se répliquent pas et qui servent à amener des gènes de sensibilisation à la chimiothérapie ou à remplacer les gènes mutés suppresseurs de tumeurs. Ils peuvent aussi être des virus se répliquant qui ciblent spécifiquement les cellules tumorales et entraînent leurs lyses (pour revue [Aghi, 2005]). Actuellement, la limitation majeure de ce type de thérapie génique est l'incapacité des vecteurs viraux à infecter suffisamment de cellules tumorales pour obtenir un effet tumoricide adéquat.

Outre ces deux techniques, de nombreuses autres thérapies expérimentales sont développées. D'autres exemples sont disponibles notamment sur le site :

[http://www.ninds.nih.gov/find\\_people/groups/brain\\_tumor\\_prg/TumorImmunology.htm](http://www.ninds.nih.gov/find_people/groups/brain_tumor_prg/TumorImmunology.htm).

### **Les survivants à long terme**

La médiane de survie sans traitement des glioblastomes multiformes est de 3 mois, un traitement standard permet de la prolonger jusqu'à 12-14 mois, et pourtant certaines exceptions, 2-5% des patients [Krex, 2007 ; Senger, 2003], survivent plus de 3 ans et semblent même parfois (rarement) « guéris ». Les facteurs cliniques ou moléculaires qui contribuent à cette survie à long terme ne sont pas encore connus, mais il semble que ces survies à long terme apparaissent chez des sujets avec des facteurs pronostics favorables (jeune et avec un bon score de performance initial) ainsi qu'avec l'hyperméthylation du promoteur MGMT [Krex, 2007]. Le Dr Ben Williams est l'un d'entre eux, ayant survécu plus

de 10 ans sans tumeur après une opération et un traitement par un cocktail de chimiothérapies diverses. Il a également réalisé une compilation bibliographique sur les traitements des tumeurs cérébrales. L'histoire de certains de ces survivants est disponible à l'adresse internet suivante : <http://www.virtualtrials.com/survive.cfm>.

## **I.2. Des techniques de radiothérapie innovantes utilisant les spécificités du rayonnement synchrotron**

Deux techniques de radiothérapie innovantes utilisant le synchrotron sont développées à l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) de Grenoble. Il s'agit de la Thérapie par Microfaisceaux (Microbeam Radiation Therapy ou MRT) et de la Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy ou SSRT).

### **I.2.1. le rayonnement synchrotron**

#### **I.2.1.1. Historique**

Le rayonnement synchrotron a été mis en évidence pour la première fois en 1947 au synchrotron de General Electrics aux Etats-Unis. Considéré initialement comme une émission secondaire parasite, ce rayonnement X aux caractéristiques particulières est aujourd'hui l'outil privilégié de recherches fondamentales et appliquées dans une cinquantaine d'installations dédiées et réparties mondialement. Parmi elles, sept mettent en œuvre des protocoles de recherche concernant les applications médicales du rayonnement synchrotron. L'ESRF a été le premier synchrotron de 3<sup>ème</sup> génération (c'est-à-dire une source qui produit un rayonnement d'une très grande brillance) à s'impliquer dans des protocoles de recherche préclinique couplant rayonnement synchrotron et études *in vivo* suivi par Spring 8 (Hyogo, Japon) et prochainement imité par le CLS (Canadian Light Source, Saskatoon, Canada) et le synchrotron australien (AS, Melbourne, Australie). L'ESRF est utilisé comme source de rayonnement photonique IR, UV et X. Sa construction a débuté en 1988 et la mise en fonctionnement des 15 premières lignes de lumière a eu lieu en 1994. L'ESRF est un institut de recherche international, associant 18 pays. Plus de 40 lignes de lumières fonctionnent 24h/24, 6 jours par semaine, pour des recherches multidisciplinaires dans les domaines de la

physique, la chimie, les matériaux, la microélectronique, la pétrochimie, les cosmétiques et les sciences de la vie.

### I.2.1.2. Principe et production du rayonnement synchrotron

D'après les équations de Maxwell, toute particule chargée soumise à une accélération émet un rayonnement électromagnétique. Or, une particule déviée par un champ magnétique est soumise à une accélération centripète. Par conséquent, des électrons de haute énergie (relativistes) déviés par un champ magnétique intense émettent des ondes électromagnétiques particulières, appelées « rayonnement synchrotron ». Le rayon de la trajectoire circulaire des électrons (il s'agit en fait d'un « polygone » à 64 côtés) conditionne la brillance et l'énergie du rayonnement synchrotron. Ce dernier dépend donc de l'énergie des électrons et son spectre couvre de manière continue le domaine des micro-ondes aux rayons X durs (Figure 8).

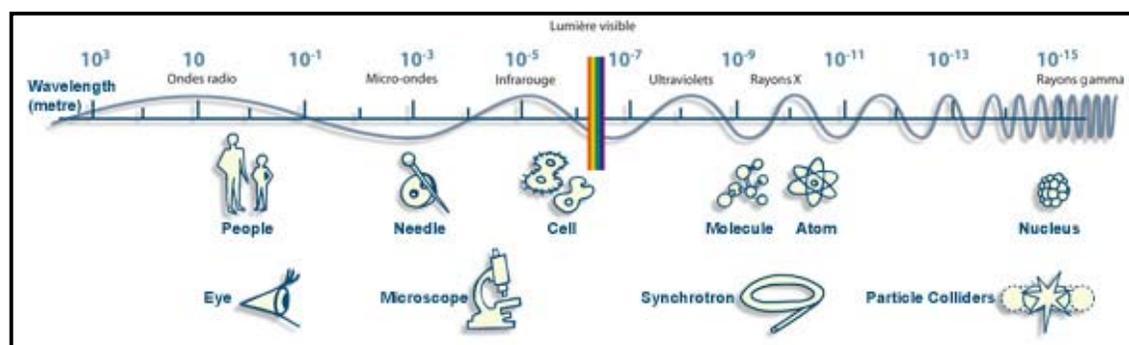
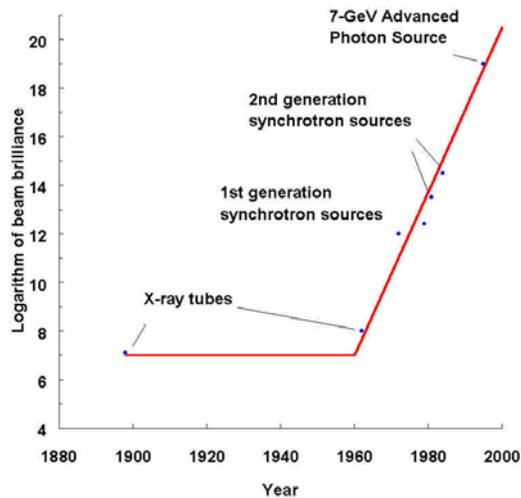


Figure 8: Diagramme représentant les longueurs d'onde (en m) et leurs utilisations.

La qualité optique de cette source de lumière est caractérisée par sa brillance qui est directement reliée au flux de photons émis, mais également à la dimension du faisceau et à sa divergence. Globalement, une source de rayonnement de 3<sup>ème</sup> génération, comme l'ESRF, peut être jusqu'à  $10^{12}$  fois plus brillante qu'un tube à rayons X classique (Figure 9).



**Figure 9: Evolution de la brillance des sources de rayons X au cours du siècle dernier.**

Les électrons, émis par un canon à électrons, sont d'abord soumis à un accélérateur linéaire (linac) de 16 mètres de long qui les amène à une énergie de 200 MeV, puis ils sont transférés dans un accélérateur circulaire (booster synchrotron). Cet anneau (300 m de circonférence), de circonférence plus réduite que l'anneau de stockage, sert à augmenter la vitesse des électrons faisant passer leur énergie de 200 MeV à 6 milliards d'électronvolts (6 GeV) soit à peu près la vitesse de la lumière (ces électrons sont alors nommés relativistes). Ils sont ensuite envoyés dans l'anneau de stockage (storage ring), de 844 mètres de circonférence, dans lequel ils tournent à énergie (et vitesse) pratiquement constante pendant des heures grâce à une cavité radiofréquence, qui restaure l'énergie perdue par l'électron en émettant le rayonnement synchrotron. Leur trajectoire est contrôlée par des électro-aimants situés tout autour de l'anneau de stockage (Figure 10). Tout cela est possible grâce au vide très poussé (de l'ordre de  $3 \cdot 10^{-8}$  mBar en moyenne, sur ID17 par exemple) maintenu en permanence dans les tuyaux de circulation des électrons.

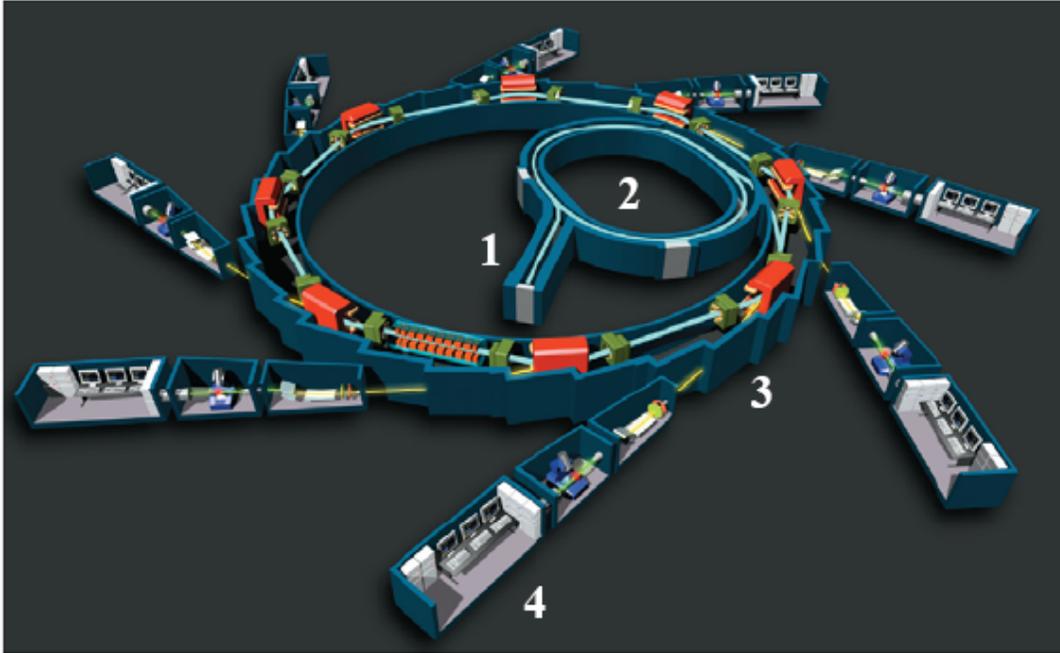


Figure 10 : Schéma d'un synchrotron : 1) linac – 2) booster synchrotron – 3) Passage du faisceau synchrotron de l'anneau de stockage à la ligne de lumière – 4) Cabines optique et expérimentale.

Plusieurs types d'aimants sont à distinguer :

- **Les aimants de courbure** : lorsqu'ils passent dans ces aimants, les électrons sont déviés de plusieurs degrés et décrivent ainsi une trajectoire circulaire grâce à la force de Lorentz. Cette déviation conduit les électrons à émettre de la lumière synchrotron en forme de cône d'ouverture angulaire verticale très faible (Figure 11).

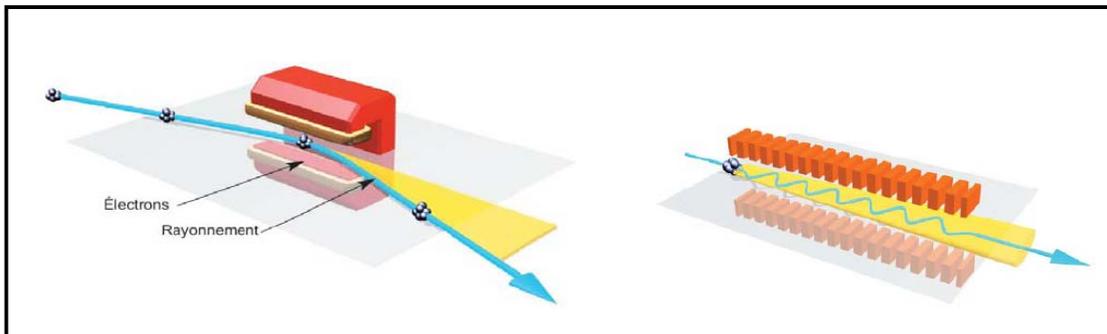


Figure 11 : A gauche : aimant de courbure et son effet sur la trajectoire des électrons. A droite : un élément d'insertion (wiggler ou ondulateur) et son effet sur la trajectoire des électrons.

- **Les éléments d'insertion** : source de la très grande brillance des synchrotrons de 3<sup>ème</sup> génération, ces structures magnétiques formées de petits aimants juxtaposés forcent les électrons à suivre une trajectoire ondulée, qui reste néanmoins globalement rectiligne (Figure 11). Les cônes de lumière émis à chaque courbure se superposent, constituant ainsi un faisceau de lumière beaucoup plus intense et concentré qu'à la sortie d'un aimant de courbure. Ces aimants permanents sont montés sur deux mâchoires mobiles pour pouvoir varier l'intensité du champ magnétique (donc le spectre des photons émis).

Deux types d'éléments d'insertion sont utilisés : les « wigglers », qui fournissent un spectre photonique continu dans la gamme choisie et les onduleurs (Figure 11) qui concentrent les photons sur certaines énergies particulières (harmoniques), créant ainsi une source de très grande intensité pour une énergie donnée (ajustable).

- **Les aimants de focalisation** : ces aimants (lentilles magnétiques), disposés sur les sections droites de l'anneau de stockage, sont utilisés pour concentrer le faisceau d'électrons afin de le rendre le plus fin possible. Un faisceau d'électrons d'une telle finesse permet de produire des rayons X extrêmement brillants.

Différents modes de remplissage de l'anneau sont possibles : du mode uniforme (plusieurs paquets d'électrons se répartissent sur la circonférence de l'anneau de stockage, courant maximal de 200 mA) au mode simple paquet (20 mA) en passant par le mode 16 paquets (90 mA).

### **I.2.1.3. Devenir du rayonnement synchrotron**

Les lignes de lumière, disposées tout autour de l'anneau dans le hall d'expériences (Figure 10), sont tangentes à l'anneau de stockage, là où passe le faisceau. Elles en sont séparées par des obturateurs qui permettent ou non au faisceau de rayons X d'arriver jusqu'à la cabine d'expérimentation. Chaque ligne de lumière est spécialisée, soit dans une technique, soit dans un domaine de recherche. Chaque ligne de lumière est composée de plusieurs cabines nommées familièrement « hutch » (littéralement clapier). Les murs de ces pièces sont chargés en plomb pour éviter que le personnel ne soit mis en présence des rayons émis par le faisceau. Un système de sécurité sophistiqué et redondant permet de verrouiller les portes des cabines lorsque le faisceau y pénètre.

La plupart des lignes de lumière sont composées de trois cabines (Figure 10):

- **Une cabine optique** : accolée à l'anneau de stockage, comportant des instruments d'optique (monochromateurs, miroirs, fentes, atténuateurs) qui permettent de donner à la lumière les caractéristiques désirées pour l'expérience.
- **Une cabine expérimentale** : contenant un dispositif motorisé sur lequel est monté l'échantillon à étudier. Un ou plusieurs détecteurs enregistrent les informations générées au moment de l'interaction de la lumière avec la matière.
- **Une cabine de contrôle** : permettant aux chercheurs de piloter les expériences, de recueillir et d'analyser les données.

#### **I.2.1.4. Caractéristiques et intérêts du rayonnement synchrotron**

Le rayonnement synchrotron est donc un rayonnement X aux propriétés particulières qui en font un outil unique dans l'étude de nombreux domaines allant de la cristallographie des virus à l'étude des atomes en passant par la médecine ou bien par l'étude des soies d'araignées. Sa très grande brillance (flux par unité d'angle solide et de surface transverse = photons/s/mm<sup>2</sup>/mrad<sup>2</sup>/0,1% de bande passante) dépend de la taille et de la divergence de la source. Elle permet de délivrer de grandes doses en faisceau blanc très rapidement. L'utilisation de monochromateurs permet de sélectionner des longueurs d'onde particulières avec un flux résiduel tout à fait suffisant pour l'étude expérimentale. Le faisceau monochromatique ainsi obtenu peut être modulé dans une large gamme d'énergie en fonction des conditions expérimentales. La très faible divergence de ce faisceau permet de le focaliser sur des échantillons de taille excessivement réduite (de l'ordre du μm<sup>3</sup>), faisant du synchrotron un supermicroscope extrêmement précis. Sa stabilité permet d'obtenir un très bon rapport signal sur bruit et une très bonne fiabilité. Le rayonnement pulsé, dû aux paquets d'électrons qui tournent dans l'anneau, permet l'étude de phénomènes dynamiques comme des réactions chimiques ou biochimiques, des changements de conformation de protéines suite à la fixation d'un substrat... grâce à un procédé capable d'accéder à des temps de réaction de l'ordre de la nanoseconde (10<sup>-9</sup>s) voire même de la picoseconde (10<sup>-12</sup>s). Enfin, la polarisation du rayonnement synchrotron permet des études structurales de molécules (chiralité...).

### I.2.1.5. La ligne biomédicale ID17

Cette ligne de lumière est dédiée à la recherche biomédicale. Les motivations premières de cette ligne sont les expériences biologiques *in vitro* et les études précliniques [Le Duc, 2007 ; Suortti, 2003 ; Thomlinson, 2000] avec parfois une finalité de recherche clinique (impliquant des patients volontaires), dans le contexte de l'imagerie et de la thérapie. Elle se décompose en deux sous-unités prévues pour fonctionner en alternance. La première, proche de l'anneau de stockage, permet d'utiliser le faisceau blanc et sa très grande brillance principalement pour les expériences de MRT (Microbeam Radiation Therapy : thérapie par microfaisceau). La seconde est éloignée de 150 m du wiggler et elle se situe dans un bâtiment satellite, afin d'obtenir une largeur de faisceau adéquate pour imager et irradier des échantillons de taille importante, comme c'est le cas en recherche médicale (thorax, crâne) (Figure 12). Elle fonctionne principalement après monochromatisation du faisceau. Toute l'instrumentation de cette ligne un peu particulière a donc été conçue pour satisfaire aux besoins très spécifiques qui en découlent [Elleaume, 1999].

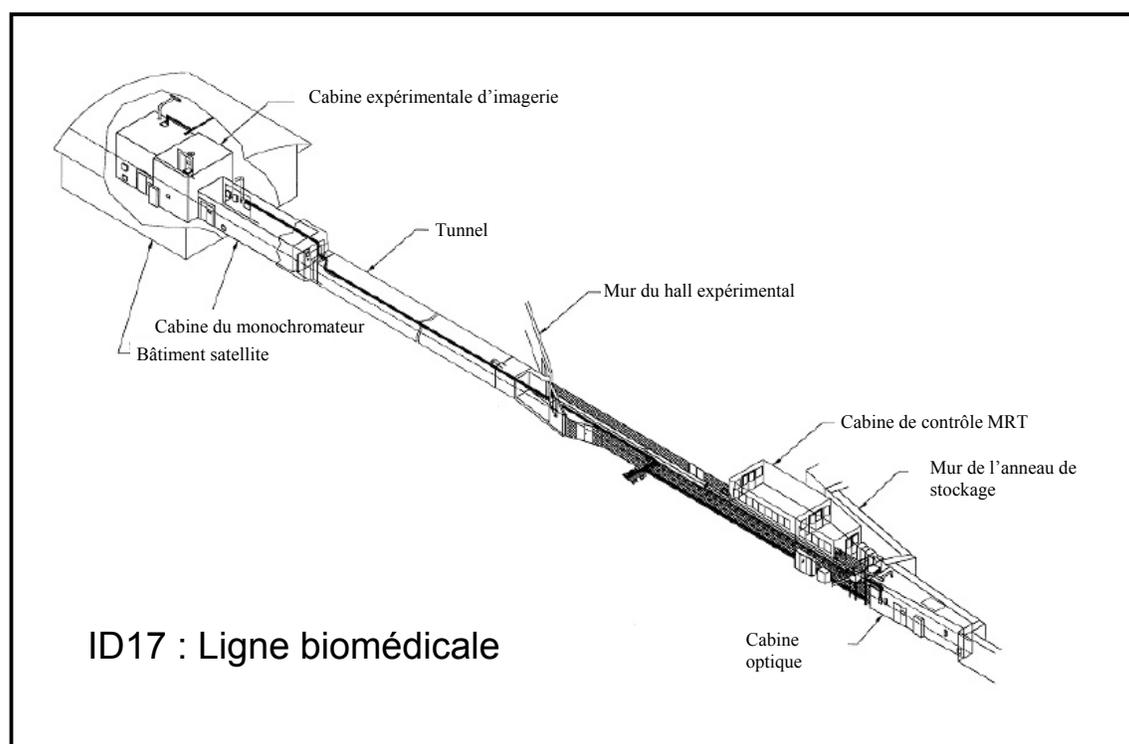


Figure 12 : Vue générale de la ligne médicale de l'ESRF (ID17).

### I.2.1.6. La plateforme de biologie

Des laboratoires périphériques, nécessaires à la recherche biomédicale sont regroupés au sein d'une même structure : la BMF (Bio Medical Facility) comprenant un laboratoire de biologie cellulaire de niveau L2, un laboratoire de biologie moléculaire de niveau L1, une animalerie, un laboratoire d'histologie et un laboratoire de préparation d'échantillons inertes. Ceci permet de prolonger les activités des utilisateurs aussi bien en amont qu'en aval des expériences menées principalement sur ID17 mais aussi sur d'autres lignes de lumière.

L'animalerie (Figure 13) accueille en permanence les animaux utilisés par les chercheurs locaux pour les études de survie et peut être aménagée selon les nécessités des protocoles en cours pour accueillir les animaux des utilisateurs lors de périodes plus ou moins longues. Elle héberge des rats, souris, souris immuno-déprimées, lapins, cobayes, et de façon plus ponctuelle des porcs et des brochets.

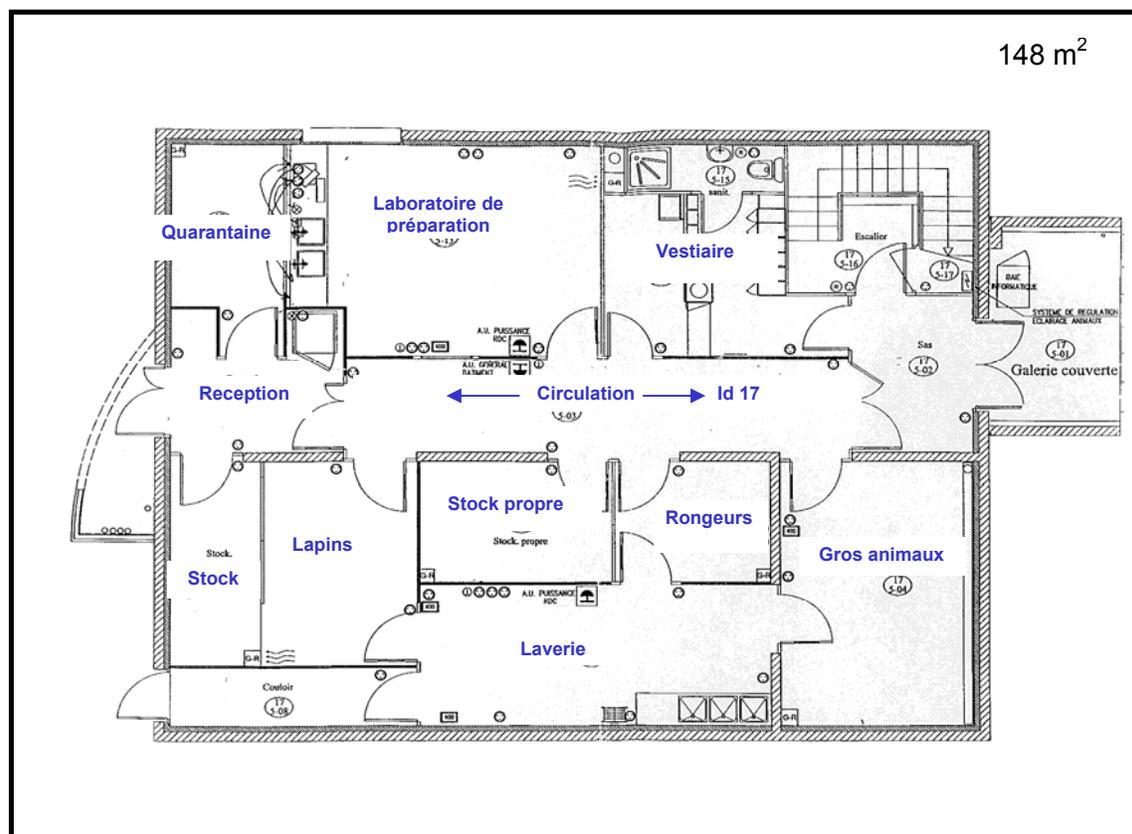


Figure 13: Plan de l'animalerie de la BMF avec la pression relative (par rapport à la pression atmosphérique) pour chaque pièce.

## I.2.2 Rappels physiques : interactions des radiations ionisantes avec la matière

Un rayonnement est dit ionisant lorsqu'il transporte une énergie suffisante pour arracher un électron à la matière. Le seuil minimal d'énergie nécessaire est environ 35 eV<sup>^</sup>, ce qui correspond à un rayonnement dont la longueur d'onde est inférieure à 35,4 nm. Dans ce chapitre, les interactions photons/matière seront développées puisque les photons sont les particules les plus employées en radiothérapie et que le rayonnement utilisé à l'ESRF est de type électromagnétique.

Un photon peut interagir de différentes façons avec la matière : avec les électrons atomiques, le noyau ou les champs électromagnétiques (Tableau 3). Les probabilités d'interaction dépendent de la composition du matériau, de sa densité ainsi que de l'énergie du photon incident.

Interactions avec	Energie perdue par un photon $E_0$		
	0	$0 < E < E_0$	$E_0$
Electrons	Rayleigh	Compton	Photoélectrique
Noyaux	-	-	Photonucléaire
Champ electromag.	-	-	Création de paires

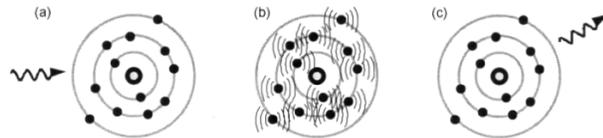
Tableau 3: Interaction des photons avec la matière. Les effets photoélectriques, Compton, et de création de paires sont les plus fréquents en physique médicale.

<sup>^</sup> A comparer aux énergies de liaison des atomes (C-C, 3,16 eV ; O-H, 5,16 eV), cette énergie est suffisante pour entraîner une dissociation moléculaire. L'énergie de liaison de l'électron de l'hydrogène au noyau est de 13 eV.

### I.2.2.1. La diffusion Rayleigh ou effet Thomson

Dans le cas de la diffusion Rayleigh, un photon de faible énergie (Figure 14.a) va interagir avec tous les électrons de l'atome cible qui oscillent alors en phase (Figure 14.b) et émettent un photon de même énergie que le photon incident (Figure 14.c). Ce type d'interaction n'implique pas de transfert d'énergie (la diffusion est alors dite cohérente) et induit seulement une déviation de la trajectoire du photon incident. Ce phénomène représente 20% des interactions quelle que soit l'énergie du photon incident et moins de 5% des interactions pour les éléments légers ( $Z < 20$ ) pour des énergies supérieures ou égales à 100 keV.

**Figure 14: Diffusion Rayleigh.** Le photon incident est absorbé par les électrons de l'atome, qui émettent un photon secondaire de même énergie diffusé dans une direction différente.



### I.2.2.2. L'effet photonucléaire

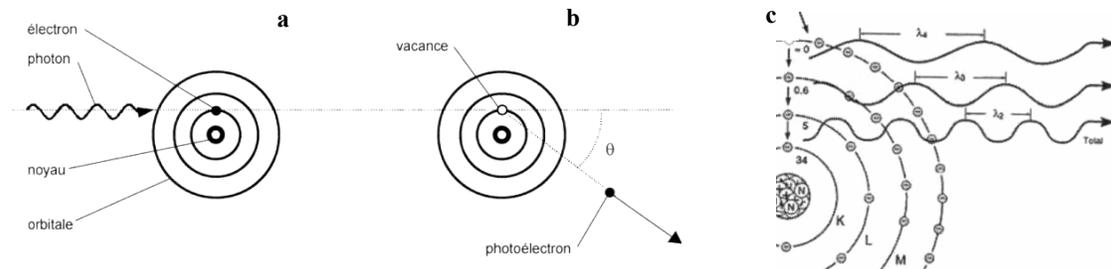
L'effet photonucléaire est à l'origine de la création d'atomes radioactifs par absorption de photons par le noyau, absorption qui induit l'émission d'un ou plusieurs nucléons. Le noyau est alors dans un état excité qu'il quitte immédiatement en émettant un rayonnement  $\gamma$ . Ce type d'interaction ne se produit que pour des photons incidents ayant une énergie élevée et certaines radiothérapies qui utilisent des photons de 25 MeV créent des atomes radioactifs.

### I.2.2.3. L'effet photoélectrique

Lors de ce phénomène (très similaire à l'effet photonucléaire), un photon d'énergie incidente  $E = h\nu_0$  cède toute son énergie à un électron d'un atome. Le photon est absorbé et l'atome ionisé. L'absorption du photon incident d'énergie  $E$  est responsable de l'arrachement d'un électron, appelé photoélectron, qui est éjecté hors de l'atome avec une énergie cinétique  $E_e$  (Figure 15-a et b) égale à l'énergie du photon incident moins celle de l'énergie de liaison de l'électron à l'atome  $E_l$ :  $E_e = h\nu_0 - E_l$ . La direction du photoélectron émis est liée à la direction et à l'énergie du photon incident.

L'effet photoélectrique ne peut se produire que si l'énergie du photon incident est supérieure ou égale à l'énergie de liaison de l'électron à l'atome. Ainsi, un photon de faible énergie ne pourra interagir qu'avec un électron des couches externes, faiblement lié, et plus l'énergie du

photon incident augmente, plus il pourra interagir avec des électrons proches du noyau. Cependant, les probabilités d'interactions des photons avec les électrons liés à l'atome ne sont pas linéaires et la probabilité d'interaction augmente lorsque le photon incident possède une énergie proche de celle de liaison de l'électron avec l'atome. Par exemple, 80% des photons incidents réagiront avec les électrons de la couche K si leur énergie est proche de l'énergie de liaison de l'électron K à l'atome.



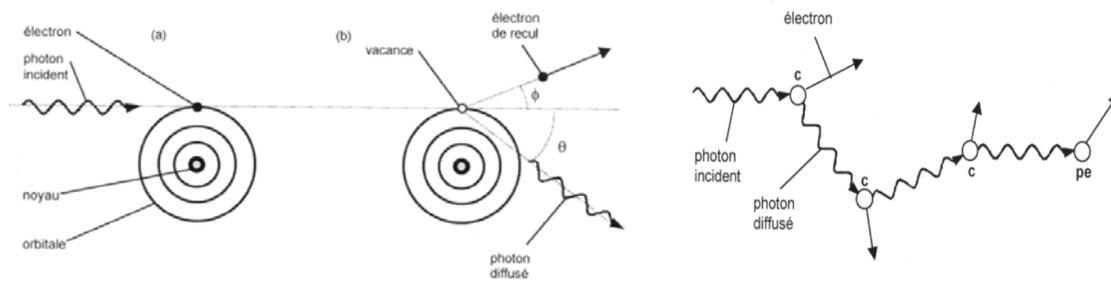
**Figure 15 : Effet photoélectrique. Le photon incident est absorbé par un électron d'une couche interne de l'atome (a). Un photoélectron est alors éjecté (b) et la vacance est remplie par des électrons des couches externes, induisant une production de rayonnement X caractéristique (c) à chaque saut d'énergie.**

La vacance créée par l'éjection de l'électron est alors remplie par un électron d'une couche plus externe dont le saut en énergie est à l'origine de l'émission d'un photon X de fluorescence (Figure 15-c). Les énergies des photons X émis dépendent directement des énergies de liaison des électrons à l'atome considéré (ou énergie des couches électroniques), c'est pourquoi ces photons émis constituent un rayonnement dit *caractéristique*. Cependant, lorsqu'une vacance est remplie par un électron d'une couche plus externe (donc plus énergétique que la couche d'arrivée), la dissipation d'énergie peut se faire, non pas par émission de rayonnement X (processus radiatif), mais par l'éjection d'un second électron d'une couche encore plus externe (processus non radiatif). Cet électron secondaire éjecté est appelé *électron Auger*. Les vacances ainsi créées pourront produire alors une cascade d'électrons Auger, laissant l'atome dans un état de multi-excitations.

L'effet photoélectrique est prédominant pour des énergies inférieures à 100 keV et dans des matériaux à numéro atomique élevé. L'effet Auger est quant à lui prédominant dans les matériaux légers ( $Z < 20$ ) ou pour des ionisations en couche L. Dans le cas de matériaux lourds ( $Z > 50$ ) et pour des lacunes en couche K c'est la fluorescence qui est le mode de désexcitation majoritaire.

#### I.2.2.4. L'effet Compton : la diffusion incohérente

Il est produit par l'interaction entre un photon incident et un électron d'une couche externe de l'atome cible. Une partie de l'énergie du photon incident est transmise à l'électron, dit de recul, qui est alors éjecté de l'atome. Le reste de l'énergie apparaît sous la forme d'un photon diffusé (Figure 16).



**Figure 16 : Effet Compton. Un électron des couches externes de l'atome est éjecté après interaction avec un photon incident. Un photon diffusé est également produit, ce dernier subira consécutivement plusieurs diffusions Compton (c), perdant progressivement son énergie avant d'être stoppé par effet photoélectrique (pe) lorsqu'il atteint une énergie d'environ 10 keV.**

Le photon diffusé peut être émis dans toutes les directions de l'espace tandis que l'électron de recul n'est éjecté que dans le demi-espace au delà du point d'impact. Ces directions d'émission dépendent de l'énergie du photon incident : plus celle-ci est grande plus les émissions du photon secondaire et de l'électron Compton se feront tangentiellement à la direction du photon incident. L'effet Compton est prépondérant pour les matériaux de Z faible, et des photons d'énergies comprises entre 0,2 et quelques MeV.

### I.2.2.5. La production de paires

La production de paires correspond à la formation de paires électron-positon lorsqu'un photon incident, d'énergie supérieure ou égale à 1,02 MeV, est absorbé au voisinage du noyau d'un atome. L'électron secondaire éjecté produit à son tour des ionisations dans le milieu alors que le positon réagit avec un électron du milieu. Après un très court temps à l'état de positronium, la paire électron-positon s'annihile en une paire de photons ayant chacun une énergie de 511 keV, photons émis à 180° l'un de l'autre (Figure 17).

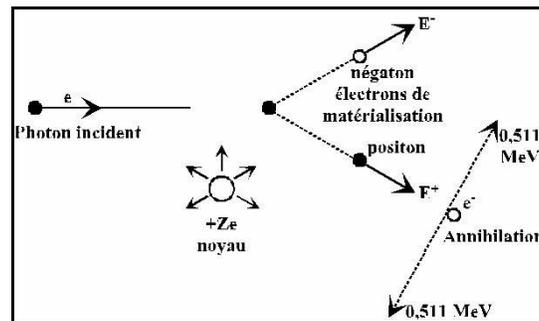


Figure 17 : Production de paires

### I.2.2.6. Probabilité d'interaction des différents effets

Selon le Z des éléments l'importance relative des trois principaux effets (photoélectrique, Compton et production de paires) dans la gamme d'énergie comprise entre 10 keV et 100 MeV est différente (Figure 18). Ainsi, l'effet Compton est le mode d'interaction prédominant pour les éléments légers à basse énergie (<100 keV), alors qu'aux mêmes énergies pour les éléments lourds, c'est l'effet photoélectrique qui prédomine.

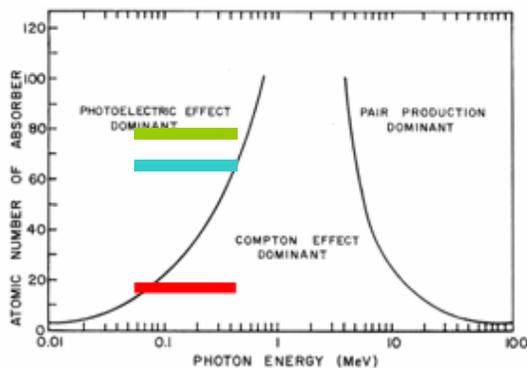


Figure 18 : Prédominance des interactions photon / matière en fonction de l'énergie du photon incident et du numéro atomique du milieu. Les barres rouge, bleue et verte situent les interactions provoquées par les rayons X produits sur la ligne médicale 17 de l'ESRF sur des molécules d'eau, de gadolinium et de platine, respectivement. Il est habituellement considéré que le tissu est équivalent à l'eau pour le calcul des interactions.

### **I.2.2.7. Interaction des électrons avec la matière**

Les électrons secondaires produits lors des interactions des photons avec la matière vont à leur tour interagir lorsqu'ils passent au voisinage d'un atome en lui conférant une partie de leur énergie cinétique. L'interaction peut avoir lieu soit avec le cortège électronique, soit avec le noyau.

**La diffusion élastique**, correspond à une déviation de l'électron incident par le noyau. La perte d'énergie est négligeable à cause de la grande différence de masse entre l'électron et le noyau. La probabilité d'interaction augmente en  $Z^2$  et l'angle de diffusion est d'autant plus grand que l'énergie de l'électron incident est grande.

**La perte d'énergie par collision** survient avec les électrons périphériques situés au voisinage de la trajectoire des électrons en mouvement. Elle entraîne soit l'excitation de l'atome soit son ionisation si le transfert d'énergie est suffisant. Dans les deux cas, un rayonnement X est émis lorsque l'atome retourne à son état stable.

**La perte d'énergie par voie radiative ou rayonnement de freinage (Bremsstrahlung)** provient de la déviation de trajectoire des électrons lorsqu'ils arrivent au voisinage des noyaux (ceci peut arriver lorsque leur énergie dépasse quelques dizaines de keV). La perte d'énergie qui en résulte se traduit par l'émission d'un rayonnement continu dit de freinage<sup>▲</sup>. La probabilité d'interaction augmente avec la vitesse de l'électron incident et avec la masse atomique du matériau traversé ( $Z^2$ ).

Le trajet des électrons dans la matière est en ligne brisée, les longueurs des segments diminuant à chaque interaction, pour se terminer dans une grappe d'ionisations. La longueur moyenne de la trajectoire est beaucoup plus courte que celle d'un photon et est égale, en centimètres, à environ la moitié de son énergie en MeV [Cordoliani, 2002].

---

<sup>▲</sup> Cette méthode est couramment utilisée pour la production de rayons X des générateurs conventionnels. C'est aussi l'effet physique à l'origine de la production du rayonnement synchrotron.

## I.2.3. Thérapie par MicroFaisceaux : la MRT (Microbeam Radiation Therapy)

### I.2.3.1. Le concept de MRT

C'est en 1961 que Wolfgang Zeman introduit la notion « d'effet dose volume » à l'échelle micrométrique dans son étude sur la radiosensibilité des tissus nerveux : plus le volume irradié est petit, plus la dose d'irradiation pourra être augmentée. Ainsi, dans le cerveau de la souris, la destruction totale du parenchyme peut être réalisée avec un faisceau de 1mm de diamètre de deutéron de 20 MeV et une dose d'entrée de 14 000 rad (soit 140 Gy) alors qu'un effet similaire dans un cylindre de tissu de 25  $\mu\text{m}$  nécessite une dose de 400 000 rad (4000 Gy) [Zeman, 1961a]. Une étude plus détaillée de cet effet sera publiée la même année [Zeman, 1961b], illustrant les effets différentiels d'un faisceau de particules de hautes énergies de diamètre de 1 mm, 250  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  et 25  $\mu\text{m}$  à des doses allant de 2400 rads (24 Gy) à 20 000 000 rads (200 000 Gy) sur le cortex des souris (Figure 19). A 25  $\mu\text{m}$ , le rayonnement détruit les corps cellulaires le long de son trajet mais épargne le parenchyme, et le tissu endothélial apparaît tout à fait normal 4 semaines après l'irradiation. Avec un rayonnement de 1 mm la surface irradiée devient progressivement nécrotique laissant place finalement à une cavité remplie de fluide.

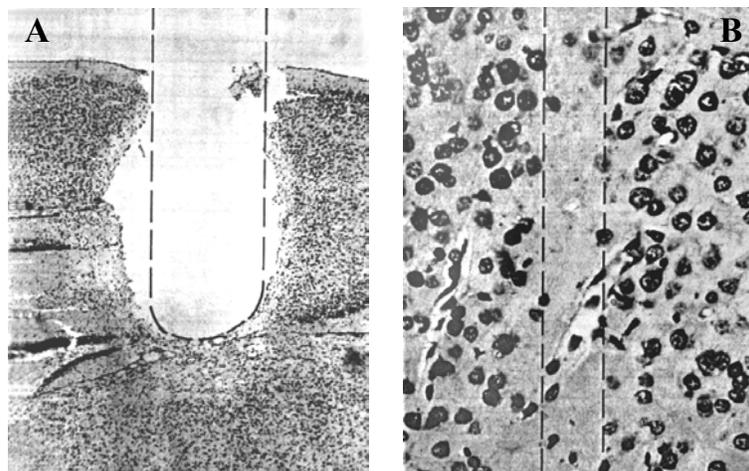


Figure 19 : irradiation à partir d'un faisceau de particules à haute énergie sur des cortex de souris avec un faisceau de A) 1 mm de diamètre et une dose de 280 Gy 120 jours après irradiation ; B) 25  $\mu\text{m}$  de diamètre et une dose de 4000 Gy 24 jours après irradiation [Zeman, 1961b].

L'effet différentiel s'illustre donc par une préservation de la structure tissulaire lors d'irradiation par des faisceaux de quelques micromètres entraînant une grande radiorésistance des tissus à de telles irradiations. L'hypothèse émise à cette époque était une plus grande atteinte du réseau vasculaire lors d'irradiation dépassant le millimètre. Avec une distance moyenne de 40  $\mu\text{m}$  entre les capillaires d'un cerveau de souris, les capillaires de souris ne seraient pas ou que partiellement touchés lors d'une irradiation avec un faisceau de 25  $\mu\text{m}$  de large permettant un maintien de la perfusion avec apport constant en oxygène et autres nutriments nécessaires à la survie cellulaire.

Ces résultats seront utilisés en premier lieu pour quantifier les risques des effets biologiques des radiations cosmiques pouvant atteindre les cosmonautes lors de voyages spatiaux [Curtis, 1967a ; Curtis, 1967b]. Il faudra attendre 1992 pour qu'une possibilité concrète d'utilisation du concept « dose/volume » en thérapie puisse être envisagée. Les ions lourds étant peu pénétrants (pic de Bragg situé à quelques millimètres dans le tissu pour les ions deutérium de 22 MeV) il fallait trouver un rayonnement réunissant les conditions nécessaires aux exigences de la médecine, c'est-à-dire avec un fort pouvoir pénétrant, une très faible divergence et un grand débit de dose. C'est donc en 1992 que Daniel Slatkin *et al.* publient leurs travaux sur l'application de ce principe à l'aide du rayonnement X synchrotron nouvellement disponible au NSLS (National Synchrotron Light Source, Brookhaven, USA) [Slatkin, 1992]. Le rayonnement synchrotron possède en effet toutes les qualités requises pour la mise en application d'une technique basée sur l'effet dose/volume :

- Une faible divergence du faisceau permettant la conservation de sa géométrie le long du trajet et donc de l'effet dose volume. Elle permettrait aussi de pénétrer le tissu en profondeur et de traiter des tumeurs qui ne sont pas en surface et plus particulièrement les tumeurs cérébrales.

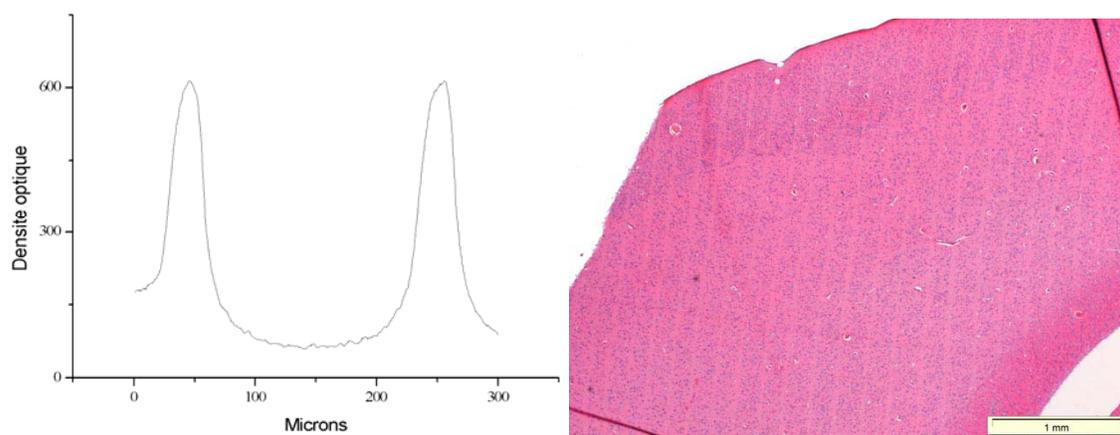
- Un grand débit de dose (100 Gy/s/mA par exemple sur ID17) est nécessaire car le temps d'exposition doit être assez court pour éviter que les limites de l'irradiation des tissus ne soient dépassées à cause d'un mouvement du corps ou d'organes : ceci aurait pour conséquence de diminuer, voire de faire disparaître, l'effet dose volume ce qui pourrait se révéler catastrophique.

Les conditions nécessaires étaient réunies pour évaluer la pertinence d'une nouvelle technique de thérapie basée sur le principe « dose/volume », appelée MRT, grâce à des simulations Monte-Carlo réalisées sur un fantôme de tête humaine. Les résultats positifs de cette étude ouvrirent des possibilités d'application de la MRT en radiothérapie des tumeurs infantiles

comme alternative de choix aux traitements classiques de radiothérapie induisant encore de nos jours de graves séquelles. Ces résultats furent suivis en 1994 par le dépôt d'un brevet pour la méthode de MRT [Slatkin, 1994] puis par de nombreuses études *in vivo* sur animaux sains et porteurs de tumeurs.

Ainsi, il est possible d'alterner des zones de taille réduite (microfaisceaux : typiquement 25 à 75  $\mu\text{m}$  de large) à très forte dose (150 à 4000 Gy) avec des zones plus larges (typiquement 100 à 400  $\mu\text{m}$  de large) dont la dose, théoriquement nulle, ne résultera que du diffusé des zones à dose élevée soit par effet Compton (avec le spectre de l'ESRF), soit par diffusion d'électrons secondaires. Ces zones (Figure 20) sont respectivement appelées zone « pic » (avec une dose « pic ») et zone « vallée » (avec une dose « vallée »). Les microfaisceaux peuvent être créés soit l'un après l'autre en utilisant un dispositif simple fente (single slit), soit tous en même temps à l'aide d'un appareillage, appelé collimateur multi-fentes (multislit), qui permet de fractionner le rayonnement principal en de nombreux microfaisceaux « identiques » et parallèles. Le rapport de la dose pic sur la dose vallée (PVDR : pic/valley dose ratio) illustre la qualité des microfaisceaux issus des collimateurs : en théorie, plus il est élevé, plus la qualité est bonne.

Ce schéma d'irradiation particulier détruit les cellules dans le passage des microfaisceaux tout en conservant la structure tissulaire générale. Il serait ainsi possible de préserver le tissu sain qui régénèrera les zones cellulaires détruites par migration depuis les zones vallée tout en ayant un effet tumoricide important par combinaison de la dose vallée et de la dose pic.



**Figure 20 :** A gauche, le profil dosimétrique de deux doses pic entourant une dose vallée. A droite, l'effet d'une irradiation par microfaisceaux sur le tissu cérébral d'un rat (HE, G x20), les zones de passage des microfaisceaux sont visibles à l'absence de noyaux.

L'efficacité de la MRT repose sur les paramètres suivants: (i) la dose (pic qui influencera la dose vallée en fonction de la qualité des microfaisceaux), (ii) l'espacement entre les microfaisceaux, (iii) la largeur des microfaisceaux, (iv) taille du champ d'irradiation et donc le nombre de microfaisceaux et (v) les géométries d'irradiations utilisées avec les microfaisceaux. Tout le problème est de trouver les réglages optimaux en fonction du type de tumeur et de l'effet désiré. Ces paramètres agissent en particulier sur la dose vallée dont la valeur est sans doute la valeur clef de la MRT. D'autres paramètres interagissent avec la dose vallée, qui sont eux peu ou pas modifiables tels que la composition de la cible, le spectre du faisceau ou encore la composition du collimateur. Enfin, le débit de dose est un paramètre dépendant à la fois du système de production des rayons X et du collimateur, et son effet reste encore inconnu (expériences en cours à l'ESRF).

## **I.2.3.2. Etat de l'art**

### I.2.3.2.1. Expériences sur animaux sains

La première série d'irradiation *in vivo*<sup>♦</sup> a été réalisée sur des cerveaux de rats adultes au NSLS sur la ligne X17 par Slatkin et al. en 1995 [Slatkin, 1995]. 36 rats ont été irradiés avec 3, 20 ou 21 microfaisceaux de 20 à 42  $\mu\text{m}$  de large espacés de 75 ou 200  $\mu\text{m}$  et des doses comprises entre 312 et 10 000 Gy. L'histologie est réalisée 15 jours ou un mois après l'irradiation. Ces premières études entérinent la grande innocuité de la MRT sur le tissu cérébral sain. En effet, entre 312 et 5000 Gy, aucune nécrose tissulaire n'est visible et seules les cellules situées sur le passage des microfaisceaux meurent suite à l'irradiation. Les cerveaux des rats irradiés à 312 et 625 Gy apparaissent normaux à l'histologie. A 10 000 Gy, les 2 rats irradiés avec 3 microfaisceaux sont semblables à l'histologie aux rats irradiés entre 1250 et 5000 Gy alors que ceux irradiés avec 20 microfaisceaux présentent une nécrose du tissu cérébral. Cependant les auteurs attribueront ce phénomène aux mouvements microscopiques du cerveau induits par les battements du cœur ou à un mouvement macroscopique de la tête de l'animal non décelé pendant l'irradiation.

---

<sup>♦</sup> Première série d'irradiation *in vivo* apparaissant sur pubmed, d'autres travaux ont été publiés auparavant en Suisse : Laissie J, Spanne PO, Dilmanian FA, Gebbers J-O, Slatkin DN : Zell- und Gewebeläsionen nach räumlich fraktionierter Mikro-Bestrahlung des ZNS mit Synchrotron-Photonen. Schweiz Med Wochenschr 1992 ; 122 : 1627.

### Effet des irradiations MRT sur le tissu cérébral sain immature

Compte tenu de l'extrême résistance du tissu cérébral aux hautes doses de MRT, il semblerait pertinent d'utiliser cette technique comme traitement des tumeurs cérébrales chez les enfants et les jeunes adultes, supportant très mal les radiothérapies classiques de par leurs tissus nerveux en croissance. La tolérance à la MRT du tissu cérébral sain immature a été testée sur 3 modèles différents et avec des protocoles différents.

- En 1999 Laissue *et al.* publient leur étude sur l'irradiation cérébrale de rats nouveaux nés (dont la couche granuleuse externe du cervelet correspond à celle d'un enfant humain de 4 mois) [Laissue, 1999]. Cette étude est la première réalisée à l'ESRF. Deux différences majeures avec les études précédentes sont : (i) l'emploi d'un collimateur multifente, le collimateur Archer [Archer, 1998] (à la place du collimateur simple fente utilisé au NSLS) et (ii) le spectre de l'ESRF différent de celui de celui du NSLS. Des rats non sevrés ont été irradiés sur une zone comprenant le cervelet entier et une part de la *medulla oblongata* selon 4 protocoles : 150/105/28<sup>^</sup> ; 150/210/28 ; 50/105/28 et 50/210/28. Aucun des rats traités n'est mort ou n'a dû être euthanasié dans les 15 mois qui ont suivi l'irradiation. Cependant l'apparition de signes cliniques tels qu'une ataxie moteur, une désinhibition de l'activité d'exploration ou une perte de poids par rapport aux témoins non irradiés, a été associée avec la dose la plus haute et l'espacement le plus faible (Figure 21).

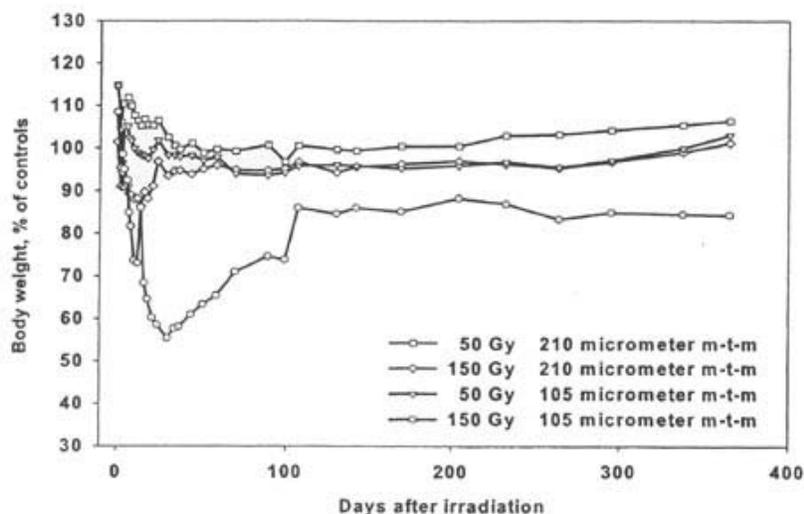
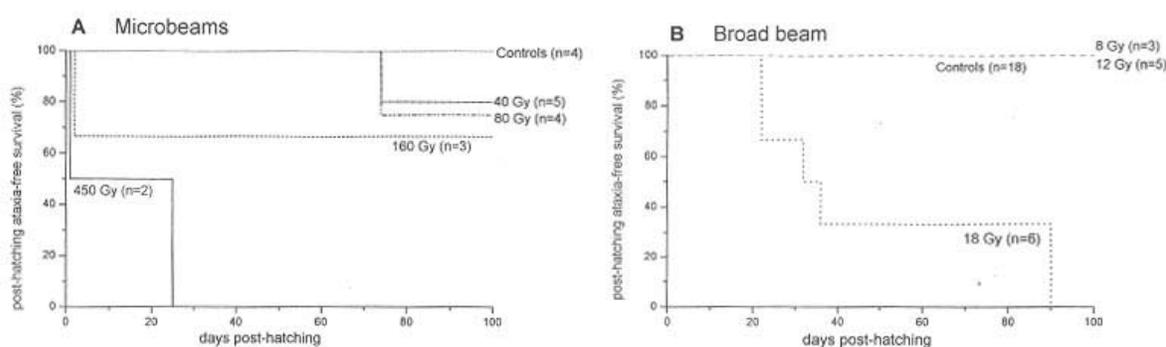


Figure 21 : Courbes de poids des différents groupes de rats non sevrés irradiés par rapport aux rats non irradiés d'après Laissue *et al.* 1999 [Laissue, 1999]

<sup>^</sup> Par convention, les principaux paramètres de MRT seront présentés comme suit : Dose (Gy) / espacement entre les microfaisceaux ( $\mu\text{m}$ ) / largeur des microfaisceaux ( $\mu\text{m}$ ).

Cette étude montre la résistance exceptionnelle des tissus en développement des rats nouveaux nés aux dommages causés par les microfaisceaux de rayons X. Les doses utilisées sont cependant bien plus basses que celles utilisées lors du protocole de thérapie de 1998 (cf I.2.3.2.2.).

- En parallèle, l'équipe américaine du NSLS teste l'effet de la MRT sur le cerveau d'embryons de canards en les irradiant dans l'œuf 3 à 4 jours avant l'éclosion en utilisant un collimateur simple fente [Dilmanian, 2001]. Les protocoles utilisés sont 40/100/27, 80/100/27, 160/100/27 et 450/100/27 (pour 110 microfaisceaux) pour les irradiations MRT. En comparaison, des irradiations en faisceaux larges ont été réalisées sur une zone de 11 mm de haut x 11 mm de large à 6, 12 et 18 Gy. Pour les œufs irradiés en MRT, la dose vallée a été calculée à 9% de la dose pic. Pour approximativement 5 œufs par série, 5, 4, 3 et 2 œufs ont éclos pour les séries à 40, 80, 120 et 450 Gy respectivement, sachant que 79% des œufs non irradiés ont éclos. Suite à l'éclosion 2/2 canards ont été atteints d'ataxie dans le groupe 450/100/27 dans les 30 premiers jours et 1/3 dans le groupe 160/100/27. Dans les groupes 80/100/27 et 40/100/27 1/4 et 1/5 canards ont été touchés, respectivement, mais après 70 jours d'irradiation (Figure 22). Pour les œufs irradiés en faisceau large 3, 5 et 6 d'entre eux ont éclos dans les séries à 8, 12 et 18 Gy, respectivement. Seuls les canards irradiés à 18 Gy développeront des symptômes d'ataxie. Aucun canard contrôle ne montrera de signes d'ataxie.



**Figure 22 : Proportion de canards survivants sans ataxie après irradiation des œufs par MRT (à gauche) ou faisceau large (à droite), d'après Dilmanian *et al.* 2001 [Dilmanian, 2001].**

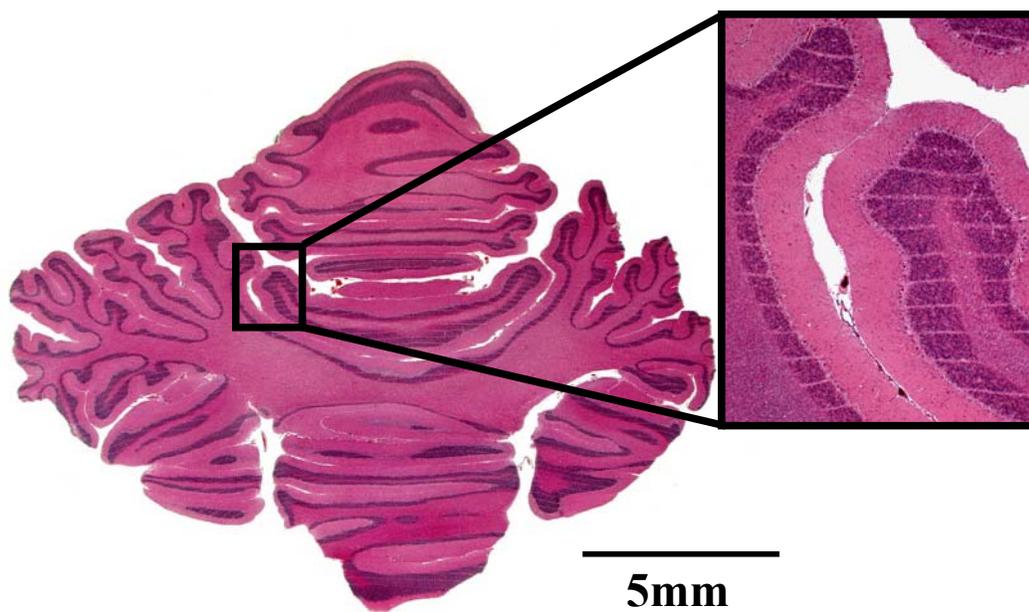
Tous les canards ayant survécu aux 75 premiers jours sans ataxie sont restés en bonne santé jusqu'à la fin (exceptés 2 dont un contrôle, morts de cause inconnue). Les seules anomalies histopathologiques ont été observées dans les groupes 460/100/27 et 18 Gy faisceau large.

Les auteurs mettent en avant la grande tolérance des tissus nerveux en développement face aux hautes doses des microfaisceaux. La comparaison des résultats obtenus entre les faisceaux larges et les microfaisceaux leur permet de conclure que seule la valeur de la dose vallée semble contribuer à l'apparition des dommages cérébraux. Le potentiel de la MRT face aux néoplasmes du système nerveux central chez l'enfant reste donc d'actualité.

- La conclusion de cette trilogie d'expériences a lieu sur un modèle animal plus gros : des porcelets sevrés dont la taille du cerveau se rapproche de celle d'un enfant [Laissue, 2001]. En effet si les études précédentes étaient pertinentes quand à l'impact sur le tissu nerveux en développement, elles n'étaient pas extrapolables à des cerveaux humains car la valeur du PVDR évolue avec la profondeur de pénétration dans les tissus. Pour les rats nouveaux nés (diamètre total de la tête ~ 2 cm), la dose vallée déposée au centre du cervelet était d'environ 95% de la dose d'entrée, le PVDR environ 20% inférieur à celui mesuré à l'entrée de peau. En revanche, pour des animaux plus gros et des profondeurs d'irradiation plus grandes, un PVDR correct doit être conservé afin que le principal avantage de la MRT soit toujours présent. Une section coronale en IRM de la tête au niveau du cervelet d'un porcelet de 5 semaines donne une mesure du diamètre transverse de 10 cm et permet d'évaluer le diamètre du cervelet à 4 cm.

L'étude a été menée en 2 temps sur 5 et 8 porcelets. Leurs cerveaux ont été irradiés selon un carré de 1,5 cm x 1,5 cm (sur le crâne, de gauche à droite, au niveau du cervelet) avec des microfaisceaux verticaux de 20-30  $\mu\text{m}$  de large, espacés de 210  $\mu\text{m}$ . Les porcelets ont été positionnés pour l'irradiation grâce à une caméra CCD Frelon. Ils ont ensuite été irradiés par MRT à des doses de 150, 300, 425 ou 600 Gy avant d'être transférés dans une ferme où leur état a été régulièrement analysé et filmé (suivi de poids, faculté à sauter des barrières, IRM). La dose pic absorbée au niveau du cervelet correspond à 44% de la dose pic à la peau et le PVDR dans le cervelet est de 21. Lors de la publication de l'article, la première portée de porcelets avait été euthanasiée pour analyse après 465 jours alors que la seconde était toujours en observation. Peu de différences sont apparues entre les poids des porcelets contrôle et des porcelets irradiés : le groupe à 425 Gy a un poids moyen plus important, celui des groupes à 300 et 600 Gy est plus bas jusqu'au 12-15<sup>ème</sup> mois et celui du groupe à 150 Gy est équivalent. Aucune différence ni à l'IRM, ni pendant les études comportementales n'est apparue entre les sujets contrôle et les sujets irradiés. Il apparaît que le risque de nécrose du cervelet de porcelet immature dû à une dose surface de 600 Gy (en microfaisceaux) est équivalent à celui d'une dose en faisceau large de 13 Gy pour un adolescent ou un adulte humain. A l'analyse

nécropsique, le poids des cerveaux était normal, leur analyse macroscopique aussi. L'analyse microscopique a révélé que les cellules et les noyaux étaient détruits sur le chemin direct des microfaisceaux sans lésion de l'architecture du tissu cérébral. Les sections horizontales permettent de voir le passage des microfaisceaux (Figure 23).



**Figure 23 : Section horizontale de cervelet de porclet 15 mois après une irradiation avec une dose surface de 300 Gy, d'après Laissue et al. [Laissue, 2001]**

Cette étude confirme les principes fondamentaux de la MRT à savoir : 1) des dommages minimaux aux tissus sains malgré l'utilisation de doses bien plus fortes qu'en radiothérapie conventionnelle<sup>^</sup> ; 2) une réparation rapide des lésions microscopiques par les tissus les moins irradiés adjacents ; 3) l'utilisation d'une seule exposition de très courte durée (< 1 s).

Les cerveaux humains et porcins peuvent être considérés comme comparables du point de vue de leur diamètre et de leur développement pré- et post-natal (enfant de moins de 2 ans). Cependant, il faut rester prudent car certaines zones du cervelet humain, affectant la réflexion, la parole, ou les états affectifs, n'ont pas de correspondance chez les porcs. Ces conclusions renforcent l'idée que l'utilisation de la MRT pourrait être pertinente quand les tumeurs cérébrales se situent dans des structures neurologiques vitales comme la *medulla oblongata* ou le *pons cerebri* ou quand les traitements sont trop invasifs.

---

<sup>^</sup> Notons que les doses utilisées lors de cette étude sur tissu sain (150 – 600 Gy) sont plus proches de celles utilisées lors des expériences (de MRT) menées sur les animaux porteurs de tumeur (312 – 625 Gy) par rapport aux autres études sur tissu sain.

A)

Référence	Modèle	Collimateur	Zone d'irradiation	Protocoles MRT	N =	Résultats
[Laissue, 1999]	Rats nouveaux nés	Multifentes Archer	Cervelet entier + une partie de <i>medulla oblongata</i>	150/105/28 150/210/28 50/105/28 50/210/28	? ? ? ?	Aucune euthanasie nécessaire dans les 15 mois suivants. Apparition de signes cliniques (ataxie moteur, désinhibition activité exploration, perte de poids par rapport aux témoins) chez les sujets irradiés à la dose la plus haute et l'espacement le plus faible.
[Dilmanian, 2001]	Embryons de canards	Simple fente	Cerveau	40/100/27 80/100/27 160/100/27 450/100/27	≈ 5 ≈ 5 ≈ 5 ≈ 5	5 œufs éclos, 1 avec ataxie après 70 jours 4 œufs éclos, 1 avec ataxie après 70 jours 3 œufs éclos, 1 avec une ataxie immédiate 2 œufs éclos, tous avec une ataxie immédiate
[Laissue, 2001]	Porcelets sevrés	Multifentes Archer	Cervelet : 1,5 cm x 1,5 cm	150/200/25 300/200/25 425/200/25 600/200/25	13 en tout	Poids = CTRL, IRM et comportement normal Poids < CTRL, IRM et comportement normal Poids > CTRL, IRM et comportement normal Poids < CTRL, IRM et comportement normal

B)

Référence	Modèle	Protocole MRT	N =	Techniques utilisées	Résultats
[Dilmanian, 2005]	rats	800/200/27 = sur 10 x 10 mm 750/na/270 1 seul microfaisceau	2/temps ?	HE et immunofluorescence (oligodendrocytes et astrocytes)	Elimination sélective de certains types cellulaires selon la dose sans nécrose tissulaire. Démyélination temporaire.
[Serduc, 2006b]	Souris « nues »	312/200/25 (18 microfaisceaux) 1000/200/25 (18 microfaisceaux)	55 en tout	Microscopie bi-photonique, immunohistologie (HE, Collagen IV et PECAM-I), Immunofluorescence (idem + DAPI)	Pas de lésion de la BHE (seules les petites molécules diffusent après irradiation à 1000 Gy), pas de différence dans les paramètres morphométriques

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des expériences menées sur le tissu sain A) premières expériences généralistes. B) expériences plus fondamentales.

### **Nature des dommages créés aux tissus par les microfaisceaux**

En 2005 et 2006, deux articles relatent des expériences visant à comprendre la nature des dommages créés aux tissus irradiés, à une échelle cellulaire et subcellulaire.

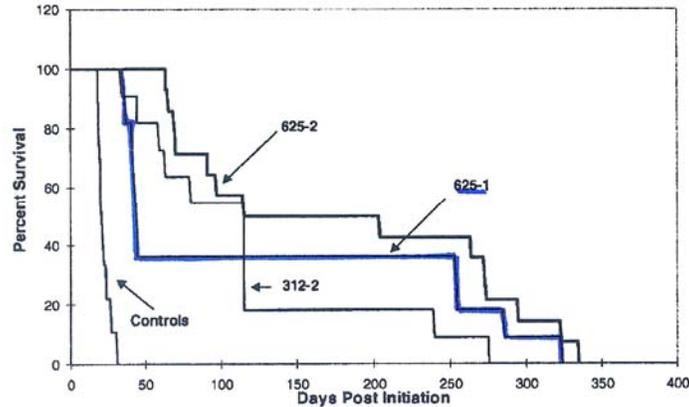
- La première étude analyse l'impact de la MRT sur le système nerveux central en corrélant les données obtenues à partir (i) de rats irradiés à 800/200/27 sur 10 x 10 mm en tir unidirectionnel et sacrifiés à 3 h, 2, 4 et 6 jours après irradiation puis analysés en HE ; (ii) de rats irradiés avec un microfaisceau unique de 270  $\mu\text{m}$  par 11 mm à 750 Gy, sacrifiés une semaine, trois semaines et 3 mois après irradiation et dont le tissu sera étudié par marquages immunofluorescents ; auxquels s'ajoutent (iii) les résultats obtenus lors d'une expérience antérieure sur l'irradiation de la colonne vertébrale [Dilmanian, 2005]. Les auteurs démontrent ainsi que les microfaisceaux peuvent sélectivement éliminer des tranches de neurones, d'oligodendrocytes et d'astrocytes dans le SNC grâce à la sensibilité différentielle des différents types cellulaires à la dose, sans causer de nécrose tissulaire. En d'autres termes, en ajustant la dose, il est possible d'éliminer différents types cellulaires. De plus, la MRT peut induire une démyélination temporaire en deux 2 semaines, sans dommages axonaux ou vasculaires, avec une remyélination qui suivra dans les 3 mois post-irradiation. Une restauration de la vascularisation est également visible. Tout ceci fait de la MRT un outil unique pour l'étude de l'effet de la disparition sélective des cellules mitotiques et non mitotiques dans le SNC et d'autres tissus.

- La seconde étude réalisée par Raphaël Serduc et ses collaborateurs s'attache plus particulièrement à la réaction de la vascularisation du tissu sain *in vivo* après irradiation par MRT [Serduc, 2006b]. Des souris Swiss nude ont été irradiées à l'ESRF à l'aide du collimateur Archer dans le sens antéropostérieur. L'hémisphère gauche des souris a été irradié par 18 microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  de large espacés entre eux de 211  $\mu\text{m}$ , à des doses de 312 et 1000 Gy, sur un champ de 4 x 4 mm. La microvascularisation cérébrale a ensuite été étudiée *via* plusieurs techniques. Des images *in vivo* ont été réalisées 2 h, 12 h, 24 h, 48 h, 4, 7, 12 jours et 1 mois après irradiation à l'aide d'un microscope biphotonique. Des analyses histologiques (HE) et immunohistologiques (collagène type IV, PECAM-I) ont été effectuées à 2 h, 12 h, 24 h, 2, 4, 7 et 12 jours après irradiation pour un premier groupe et 12 jours, 1 et 3 mois après irradiation pour un second groupe. Enfin des images réalisées à 12 h, 12 jours, 1 et 3 mois après l'exposition au faisceau ont été analysées quantitativement. Toutes les souris ont survécu durant la période d'analyse de 3 mois sans différence de poids avec les références fournies par l'éleveur, mais une hyperactivité importante a été observée pour les animaux

irradiés à 1000 Gy dans les 4 heures qui ont suivi l'irradiation. Les observations au microscope biphotonique montrent une extravasation de sulforhodamine B (0,58 kD) dans les microfaisceaux à 1000 Gy entre 12 h et 12 jours. Cependant aucune diffusion de FITC-dextran (70 KD) n'est visible pour aucune souris quelque soit la dose, reflétant un maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). De plus, aucune différence dans les paramètres morphométriques (volume sanguin, densité des vaisseaux, diamètre moyen) du réseau capillaire n'a été détectée durant les 3 premiers mois après l'irradiation et cela quelque soit la dose. En comparaison, une augmentation de la diffusion de FITC-dextran (4,4 à 70 kD) hors des vaisseaux cérébraux est observée à une dose de 20 Gy sur un cerveau de rat sain [Yuan, 2003]. Les auteurs notent l'intérêt de la MRT en tant que technique pouvant préserver la BHE. Pour expliquer cela, les auteurs évoquent l'hypothèse formulée par Reidy et Schwartz [Reidy, 1981] : des extensions du cytosquelette et du cytoplasme des cellules endothéliales peuvent réparer une lésion microscopique rapidement, et la dose va influencer sur la vitesse de réparation des cellules endothéliales. Cependant, malgré la conservation du volume sanguin et de la densité vasculaire quelque soit la dose, la rupture de la BHE pour les petites molécules après une irradiation à 1000 Gy laisse présager une moins bonne conservation du tissu sain qu'après une irradiation à 312 Gy.

#### 1.2.3.2.2. Les études sur animaux porteurs de tumeurs

- L'équipe suisse américaine décide de tester l'efficacité thérapeutique de la MRT sur des rats porteurs de gliosarcomes cérébraux [Laissue, 1998]. 36 rats Fischer 344 porteurs du gliosarcome 9L ( $10^4$  cellules dans  $1 \mu\text{l}$  ; temps de survie des 9 rats contrôle : 18 à 31 jours, médiane : 20 jours) sont traités par MRT 14 jours après l'implantation de la tumeur : 101 microfaisceaux parallèles de  $25 \mu\text{m}$  de large et espacés de  $100 \mu\text{m}$  sont délivrés en tirs unidirectionnels ou croisés orthogonalement, le champ d'irradiation étant fixé à  $1,2 \times 1 \text{ cm}^2$  (NSLS, collimateur simple fente). Les 3 protocoles de traitement testés sont : (i) irradiation unidirectionnelle antéropostérieure à 625/100/25, (ii) irradiation en faisceaux croisés orthogonaux antéropostérieure et latérale à 625/100/25, (iii) irradiation en faisceaux croisés orthogonaux antéropostérieure et latérale à 312/100/25. La médiane de survie des rats contrôle a été doublée à septuplée grâce à l'irradiation et 115 jours après l'irradiation 7/14, 2/11 et 4/11 rats étaient toujours vivants dans les séries 625/100/25 croisés, 312/100/25 croisés et 625/100/25 unidirectionnels, respectivement (Figure 24).



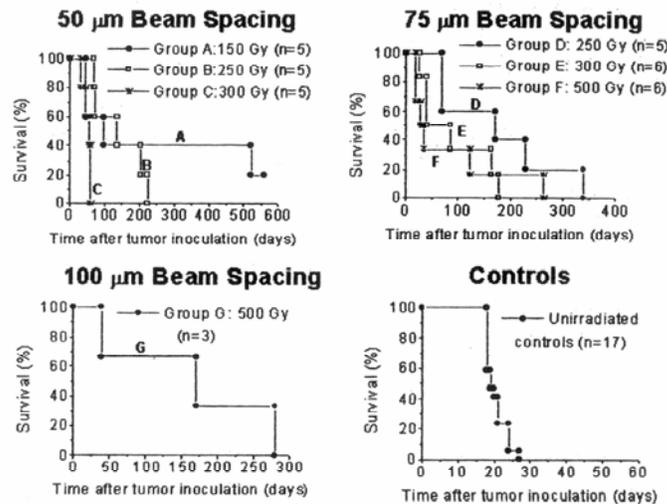
**Figure 24 :** Courbe de survie des rats porteurs de tumeur 9L et traités par MRT à 625/100/25 unidirectionnel (625-1), 625/100/25 croisés (625-2) et 312/100/25 croisés (312-2) d'après Laissue *et al.* 1998 [Laissue, 1998].

Outre cette capacité à retarder la croissance tumorale, la MRT montre lors de cette expérience sa capacité à éradiquer les tumeurs cérébrales : 22/36 rats irradiés n'ont plus de tumeur cérébrale lors de l'analyse histologique (dont 4 dans la série unidirectionnelle). Il faut noter cependant que tous les rats sont décédés dans l'année suivant l'irradiation. L'analyse histologique menée durant cette étude révèle un fort endommagement du tissu sain présent dans la région de croisement des microfaisceaux (région dans laquelle se situait la tumeur) alors que le tissu sain situé dans les zones d'irradiation unidirectionnelles ne subit que des dommages mineurs. La série 625/100/25 irradiée avec des microfaisceaux unidirectionnels présente donc un très bon compromis entre l'éradication des tumeurs (4/11) et la préservation du tissu sain.

Cette incroyable résistance du tissu sain à de multiples microfaisceaux de très hautes doses serait possible, selon les auteurs, grâce à la régénération rapide du réseau vasculaire par les cellules endothéliales (moins irradiées) situées dans les zones vallées, hypothèse déjà évoquée précédemment.

- En 2002, 35 rats porteurs de tumeur 9L (15 jours après implantation de  $10^4$  cellules dans l'hémisphère gauche ; médiane de survie des 17 rats contrôle : 19 jours, temps de survie pour 11 d'entre eux : 17 à 23 jours) sont irradiés latéralement sur la ligne X17 du NSLS avec un collimateur simple fente [Dilmanian, 2002]. 7 séries de 3 à 5 rats sont constituées : 150/50/27, 250/50/27, 300/50/27, 250/75/27, 300/75/27, 500/75/27 et 500/100/27. Cette étude vise à comprendre le rôle de l'espacement entre les faisceaux en fonction de la dose. Le nombre d'individus par série étant trop faible, les séries ont été groupées en fonction de la

dose vallée pour pouvoir analyser les données : groupe « dose tolérable » (série 250/75/27 et 500/100/27) et groupe « haute dose » (toutes les autres séries) (Figure 25).



**Figure 25 : Courbes de survie des rats porteurs de tumeur 9L et irradiés à J15. En haut à gauche : A) 150/50/27 ; B) 250/50/27 ; C) 300/50/27. En haut à droite : D) 250/75/27 ; E) 300/75/27 ; F) 500/75/27. En bas à gauche : G) 500/100/27. En bas à droite : Rats contrôle. D'après [Dilmanian, 2002].**

L'histologie a été réalisée sur 9 rats dont 2 de la série dose tolérable. Les cerveaux montrent peu de dommages, cependant des microcalcifications sont présentes sur toutes les lames. Les rats du groupe haute dose montrent des dommages plus importants dont le signe le plus récurrent est une nécrose de la matière blanche. Le caractère peu invasif de la MRT est mis en évidence pour un espacement ne représentant que le double de la largeur du faisceau. Les auteurs émettent diverses hypothèses quand au décès prématuré de certains animaux (150 - 350 jours au lieu de 600 jours) : un volume général irradié trop important en proportion de la taille globale du cerveau (ce qui ne serait pas le cas avec des humains) ou bien des lésions au cerveau non détectables à l'histologie. Cela ne remet cependant pas en cause l'efficacité thérapeutique de la MRT qui cause moins de dommages qu'une irradiation par faisceau large [Coderre, 1994a ; Joel, 1990]. Enfin les auteurs soulignent l'intervention d'un phénomène autre que la mort des cellules tumorales lors d'irradiation MRT puisque selon une étude non publiée, 2% de celles-ci survivraient. Ce phénomène pourrait être une différence de régénération de la microvasculature qui serait compromise dans la tumeur.

Trois publications récentes (non publiées au début de ce travail de thèse) vont maintenant être décrites.

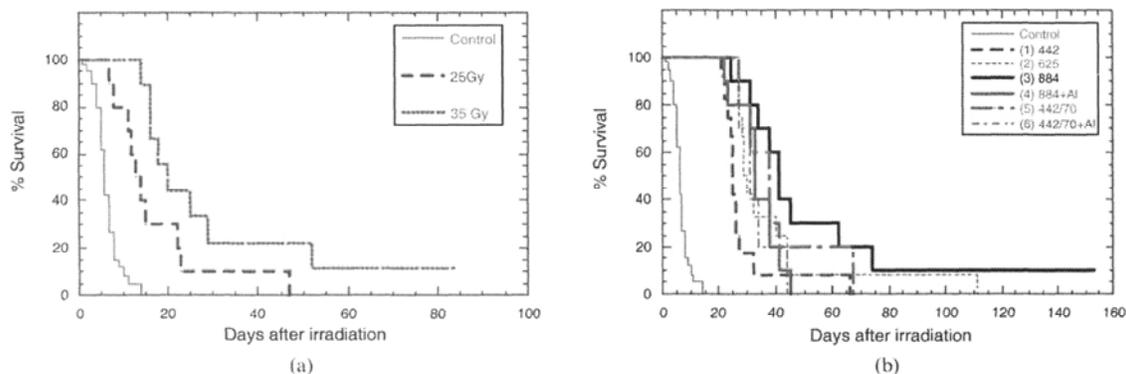
- En 2003, Avraham Dilmanian et ses collaborateurs appliquent au NSLS la technique de MRT à un nouveau type tumoral : un carcinome mammaire [Dilmanian, 2003]. 23 jours avant l'irradiation,  $2,5 \times 10^5$  cellules EMT-6 ont été injectées en sous cutané (SC) dans le flanc de souris « porteuses » puis transplantées ( $1 \text{ mm}^3$ ) en SC dans la cuisse de souris BALB/c femelle, 9 jours avant le traitement via MRT (à l'aide de 2 collimateurs différents pour produire des faisceaux horizontaux ou verticaux) ou par faisceau large. Avec un espacement de  $300 \mu\text{m}$  entre les microfaisceaux (de  $90 \mu\text{m}$ ), les animaux ont été irradiés avec des doses de 800, 890, 970, 1740, 1820 ou 1900 Gy en mode unidirectionnel ou 410, 520, 650 Gy avec des faisceaux croisés perpendiculaires les uns aux autres. Les doses appliquées en faisceaux larges ont été de 23, 30, 38 ou 45 Gy. Les animaux non irradiés ont du être euthanasiés dans les 27 jours à cause de la taille de la tumeur. Pour les souris irradiées en MRT unidirectionnelle aux doses les plus faibles (800-970 Gy) le pourcentage de contrôle des tumeurs a été de 25% et il n'y a pas eu de morbidité dû au traitement alors que pour les hautes doses (1740-1900) le pourcentage de contrôle des tumeurs atteint 88 à 100% mais des dommages significatifs apparaissent. Les animaux irradiés en faisceaux croisés se trouvent entre les deux avec un bon taux de contrôle (61%) et quelques dommages au tissu sain. Pour les irradiations en faisceaux larges, le contrôle des tumeurs va de pair avec les dommages cliniques (Tableau 5).

Irradiation geometry	In-beam tumor dose (in each microbeam radiation array) (Gy)	Tumor ablation <sup>a</sup>	Acute normal tissue toxicity		Delayed normal tissue toxicity for mice with tumor ablation	
			Moist desquamation <sup>b</sup>	Complete epilation <sup>c</sup>	Euthanasia for severe leg dysfunction <sup>d</sup>	Failure to nearly fully regrow hair within 7 months <sup>e</sup>
Co-planar microbeams	800	2/8	0/8	0/8	0/2	0/2
	890	2/8	0/8	0/8	0/2	0/2
	970	2/8	0/8	0/8	0/2	0/2
	1740	7/10	0/10	7/10	2/7	4/5
	1820	7/8	0/8	8/8	4/7	3/3
Cross-planar microbeams	1900	8/8	0/8	8/8	2/8	6/6
	410	4/8	0/8	1/8	1/4	1/3
	520	4/8	0/8	2/8	0/4	1/4
Broad beams	650	6/7	0/7	2/7	0/6	3/6
	23	1/8	0/8	0/8	0/1	0/1
	30	3/8	0/8	2/8	0/3	2/3
	38	3/7	0/8	5/8	0/3	3/3
	45	6/8	7/8	6/8	2/6	4/4

**Tableau 5: Nombres d'ablations de tumeurs et signes cliniques observés sur les souris porteuses de tumeur EMT6 à la cuisse suite aux irradiations en géométrie unidirectionnelle, croisée ou large en fonction de la dose délivrée. D'après [Dilmanian, 2003].**

Les auteurs montrent que pour un même taux d'ablation de tumeur (6/7 et 6/8) les dommages résultant de l'irradiation en faisceau large sont bien plus importants que ceux dus à l'irradiation croisée en MRT. Il est également intéressant de comparer d'une part le groupe d'irradiation en MRT à 1900 Gy avec le groupe faisceau large à 38 Gy et d'autre part le groupe MRT en faisceaux croisés à 650 Gy avec le groupe faisceau large à 23 Gy. En effet ces deux groupes MRT ont des doses vallée égales à 38 et 26 Gy respectivement. Ainsi les animaux irradiés en MRT ont pu bénéficier de taux d'ablation de tumeur supérieur, mais les dommages cliniques étaient également plus importants, démontrant que la dose vallée n'est pas le seul facteur intervenant dans l'apparition des lésions en MRT. Enfin, en comparant cette étude à une étude réalisée précédemment avec une technique différente (BNCT), les auteurs démontrent l'efficacité de la MRT sur un nouveau modèle tumoral (EMT-6) avec une toxicité moindre.

- En 2006, Michiko Miura et ses collaborateurs testent l'efficacité de la MRT sur un modèle de carcinome épidermoïde : le SCCVII [Miura, 2006] dont l'étude du délai de croissance est généralement plus informatif que le taux d'ablation [Katori, 2002 ; Ning, 1999]. Les souris C3H ont été irradiées 10 jours après l'implantation des tumeurs en SC dans la cuisse soit directement ( $2 \times 10^5$  cellules) soit indirectement ( $1 \text{ mm}^3$ ) après passage sur le dos de souris « porteuses ». Les souris traitées par MRT ont subi une irradiation croisée orthogonalement selon les protocoles suivants : 442/200/35, 625/200/35, 884/200/35 (avec ou sans filtre de 16 mm d'aluminium supplémentaire), 442/200/70 (avec ou sans filtre de 16 mm d'aluminium supplémentaire). Deux séries ont été irradiées en faisceau large à 25 et 35 Gy. Les courbes de survie sont présentées Figure 26.



**Figure 26: Courbes de survie des souris CH3 porteuses du carcinome SCCVII à la patte et irradiées avec des modalités différentes. A gauche : Courbes de survie des souris irradiées en faisceau large à 25 et 35 Gy en comparaison avec les contrôles non irradiés. A droite : courbes de survie des souris irradiées en MRT à 442/200/35, 625/200/35, 884/200/35 et 442/200/70. Al signifie la présence d'un filtre d'aluminium de 16 mm d'épaisseur. D'après [Miura, 2006].**

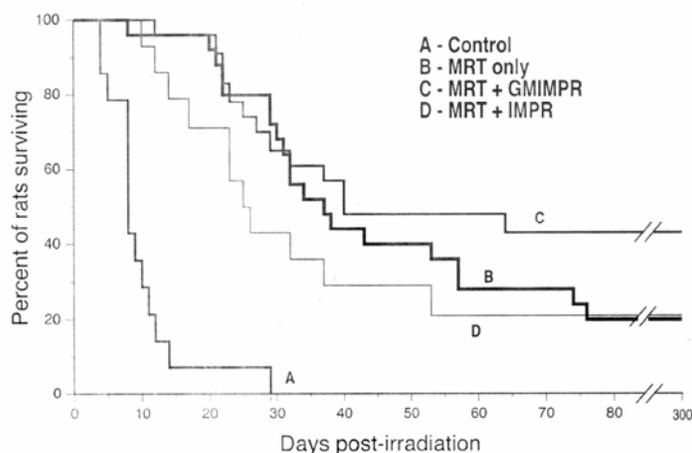
Les souris des groupes 442/200/35, 625/200/35 ont généralement été euthanasiées à cause de la taille de la tumeur, alors que pour les autres séries de MRT, la cause était plutôt liée aux dommages causés par les radiations à la patte (dont certaines ne présentaient plus de tumeur). Les auteurs relatent la supériorité de la MRT par rapport aux irradiations en faisceaux larges pour ralentir la croissance tumorale des SCCVII, effet dose dépendant.

Il faut noter que la médiane de survie obtenue avec 35 Gy en faisceau large est de 20 jours, à cause de la tumeur et non des dommages aux tissus sains de la patte. Pour le protocole 442/200/35, les dommages aux tissus sains sont minimaux mais la médiane n'est que de 25 jours. La meilleure survie est obtenue pour le protocole 884/200/35 en faisceaux croisés (41 jours) mais 8/10 souris sont euthanasiées suite aux lésions causées par l'irradiation. Enfin, le nombre d'animaux euthanasiés à cause des dommages trop importants à la patte irradiée est de 37/64 en MRT toutes séries confondues, alors qu'aucune souris irradiée en faisceau large n'a présenté ces symptômes. Les auteurs expliquent que ces dommages seraient dus à l'irradiation de structures tissulaires qui ne devraient normalement pas être touchées lors des traitements classiques de ces tumeurs. Pourtant ces structures sont également touchées lors de l'irradiation en faisceau large et de tels dommages n'apparaissent pas<sup>▲</sup>. Les auteurs concluent cependant que la MRT est plus efficace dans le traitement du modèle radiorésistant SCCVII que l'irradiation en faisceau large à 35 Gy sans risque supplémentaire pour le tissu sain du champ d'irradiation puisque ses structures ne sont normalement pas irradiées. Il serait

<sup>▲</sup> Les animaux irradiés par faisceau large ont été euthanasiés à cause de leur tumeur, avant que les lésions des tissus normaux ne puissent se développer comme chez les animaux traités en mode MRT (communication personnelle d'un des auteurs : J. Laissue).

intéressant d'avoir une évaluation de la dose vallée délivrée lors de ce protocole afin de pouvoir comparer plus efficacement les résultats obtenus en MRT et en faisceau large.

- En parallèle, Henri Smilowitz et ses collaborateurs publient une étude de MRT sur les tumeurs cérébrales en combinaison avec un traitement immunoprophylaxique [Smilowitz, 2006]. Le traitement par MRT de 62 rats Fischer implantés avec des cellules 9L ( $10^4$  cellules dans  $1 \mu\text{l}$  ; temps de survie des 14 rats contrôle : 17 à 43 jours, médiane : 21 jours) se déroule sur la ligne ID17 de l'ESRF (dont le faisceau a été filtré avec  $100 \mu\text{m}$  d'uranium appauvri) à l'aide du collimateur multifentes Archer. Les paramètres d'irradiation (décrits comme sub-optimaux) de 625/200/27 sont les mêmes pour tous les rats. Certains recevront régulièrement après l'irradiation des injections sous-cutanées de cellules 9L stérilisées par radiation, non transfectées ou transfectées avec le gène GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor). Les résultats (Figure 27) montrent que l'efficacité de la MRT (20% de survie à long terme) est doublée lors de l'utilisation de l'immunoprophylaxie (44% de survie à long terme). Il est intéressant d'observer les différences entre cette expérience (625/200/25, ESRF, médiane 46-51 jours<sup>♠</sup>, 20% de survivants) et l'expérience de Brookhaven (625/100/25, NSLS, médiane 44 jours, 36% de survivants mais n'atteignant pas les 365 jours).



**Figure 27 : Coubes de survie des rats porteur de tumeur 9L IC, contrôles et irradié en MRT (625/200/25) avec ou sans traitement immunoprophylaxique. D'après [Smilowitz, 2006].**

<sup>♠</sup> Il faut également prendre en compte la courbe de survie particulière des rats contrôle pour ce résultat.

Les données de cette publication doivent être prises en considération avec précaution. La médiane de survie des rats irradiés par MRT seulement varie dans le texte entre 25 et 32 jours (notés en post irradiation soit 39 à 46 jours post implantation) or aucun de ces deux chiffres ne correspond à ce qui peut être lu sur la courbe de survie où la médiane de cette série se situe entre 35 et 40 jours vraisemblablement à 37 jours post irradiation soit 51 jours post implantation. De plus, bien que le nombre de survivants à long terme soit assez élevé (5/25 dans le groupe MRT), aucune mention n'est faite dans l'article de la forme de la courbe des rats contrôle. Dans le résumé de l'article, la médiane (21 jours) et la survie du dernier rat contrôle décédé (29 jours) sont données côte à côte, sans faire mention du référentiel de temps qui pourtant est différent (en regardant la courbe de survie) puisque la médiane est donnée en jours post implantation et la survie du dernier rat décédé en jours post irradiation, soit un écart de 14 jours. Le dernier rat contrôle serait donc décédé 43 jours après l'implantation, laissant envisager la possibilité d'une évolution plus lente de certaines tumeurs irradiées et donc une probabilité plus importante de guérison.

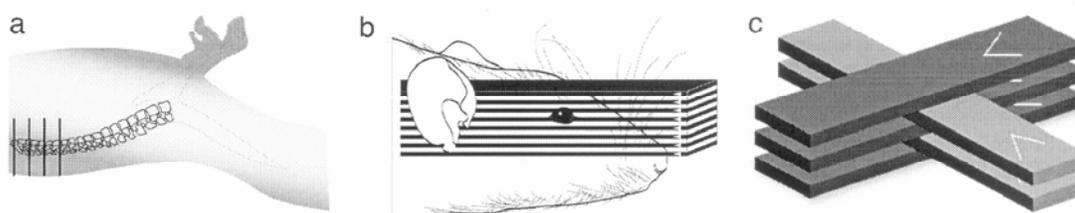
Références	Espèce	Modèle	Collimateur	Protocoles MRT	N =	Résultats : médiane et survivants à long terme		CTRL	N =
						Médiane (jours)	Survivants à long terme		
[Laissue, 1998]	Rats	10 <sup>4</sup> 9L en IC à J14	Simple fente NSLS	625/100/25 = 625/100/25 # 312/100/25 #	11 11 14	44 159 116	36% à J115 50% à J115 18% à J115	20 jours (18 à 31)	9
[Dilmanian, 2002]	Rats	10 <sup>4</sup> 9L en IC à J15	Simple fente NSLS	150/50/27 = 250/50/27 = 300/50/27 = 250/75/27 = 300/75/27 = 500/75/27 = 500/100/27 =	5 5 5 5 6 6 3	98 136 55 171 62.5 31 170	40% à J100 60% à J100 0% à J100 60% à J100 33% à J100 33% à J100 67% à J100	19 jours (17 à 23 pour 11 d'entre eux)	17
[Dilmanian, 2003]	Souris Balb/c	1 mm <sup>3</sup> de EMT-6 SC dans la cuisse à J23	Multifentes Tecomet NSLS x2	800/300/90 = 890/300/90 = 970/300/90 = 1740/300/90 = 1820/300/90 = 1900/300/90 = 410/300/90 # 520/300/90 # 650/300/90 #	8 8 8 10 8 8 8 8 7	Na	25% et sans signes cliniques 25% et sans signes cliniques 25% et sans signes cliniques 70% et forts signes cliniques 88% et forts signes cliniques 100% et forts signes cliniques 50% et forts signes cliniques 50% et peu signes cliniques 85% et peu signes cliniques	Jusqu'à 27 jours	34
[Miura, 2006]	Souris C3H	2.10 <sup>5</sup> ou 1mm <sup>3</sup> SC dans la cuisse de SCCVII à J10	Multifentes Tecomet ESRF	442/200/35 # 625/200/35 # 884/200/35 # 884/200/35 #Al 442/200/70 # 442/200/70 #Al	12 12 10 10 10 10	25 29 41 33 38 31	0% à J153 0% à J153 10% à J153 0% à J153 0% à J153 0% à J153	16 jours	40
[Smilowitz, 2006]	Rats	10 <sup>4</sup> 9L en IC à J14	Multifentes Archer ESRF	625/200/27 = 625/200/27 = avec cellules non transfectées en SC 625/200/27 = avec cellules transfectées en SC	25 14 23	51* 39* 54*	20% à J365 20% à J365 40% à J365	21 jours (17 à 43)	14

Tableau 6 : Synthèse des différents résultats obtenus en MRT avec des animaux porteurs de tumeurs. Les signes signifient : = faisceaux unidirectionnel, # faisceaux croisés, Al avec 16 mm d'aluminium supplémentaires, \* d'après le graphique. Le double trait qui sépare le tableau marque le début de cette thèse.

### I.2.3.2.3. Optimisation de la géométrie d'irradiation

En 2004, Daniel Slatkin publie une note sur 2 protocoles d'irradiation, aux géométries différentes, qui pourraient être utilisés lors du passage de la MRT aux essais cliniques [Slatkin, 2004]. Il y ajoutera 2 ans plus tard une troisième géométrie d'irradiation plus complexe, à schéma tétraédrique, mais plus confortable pour les patients [Slatkin, 2006]. Ces considérations restent cependant très théoriques et mériteraient d'être validées par des protocoles expérimentaux.

Avraham Dilmanian teste une configuration qui entrelace deux séries de microfaisceaux orthogonaux, la largeur des microfaisceaux étant égale à la moitié de la distance interfaisceaux (de centre à centre : 650  $\mu\text{m}$ ) [Dilmanian, 2006] (Figure 28). Ainsi dans le tissu cible, la dose déposée sera équivalente à la dose pic de chaque série de microfaisceaux. Les animaux ont été irradiés à des doses de 90, 120 et 150 Gy (2 rats par groupe) et un rat par groupe sera imagé en IRM, 3 semaines et 6 mois après irradiation. À 150 Gy des dommages extensifs sont notés à l'IRM dont un œdème cérébral important, une nécrose dans le volume cible (à court terme) et une atrophie du cortex à long terme. À 120 Gy, une microlésion apparaît limitée au volume cible avec un œdème cérébral restreint alors qu'une dose de 90 Gy ne semble induire aucun effet secondaire 6 mois après irradiation. Dans ce même article, la colonne vertébrale est irradiée avec 4 microfaisceaux de 270  $\mu\text{m}$  à 680  $\mu\text{m}$  de larges espacés de 4 mm à une dose de 400 Gy au niveau des vertèbres thoraciques.



**Figure 28 : Schéma des différents types d'irradiation MRT réalisée par Dilmanian *et al.* [Dilmanian, 2006]. a) irradiation de la colonne vertébrale avec 4 microfaisceaux. b) irradiation du cerveau de rat avec une surface d'irradiation de 8 x 10,2 mm. c) Microfaisceaux croisés.**

La tolérance du tissu sain à de telles doses est assez exceptionnelle puisque seul 1/4 rat a dû être euthanasié, à cause d'une paralysie sévère, dans la série à 680  $\mu\text{m}$ . Les autres rats de cette série, après avoir montré des signes de faiblesse au niveau des pattes arrières, ont peu à peu rattrapé les performances des rats contrôle. Pour les autres largeurs d'irradiation, peu ou pas de différences sont apparues avec les rats contrôle. Les auteurs comparent leurs résultats avec

ceux obtenus avec une expérience similaire utilisant un faisceau large de 7 mm au niveau des vertèbres cervicales<sup>▲</sup> à des doses de 25, 50 et 75 Gy. 3 rats sur 6 ont dû être euthanasiés à 75 Gy et les survivants ont des performances réduites par rapport aux rats contrôle. 1/4 rat du groupe à 50 Gy est mort 10 mois après l'irradiation et tous les rats de ce groupe et de celui à 25 Gy avaient des performances réduites par rapport aux rats contrôle. La comparaison avec les séries de MRT, dont la dose intégrée (rapport dose pic/dose vallée en fonction du volume irradié) est proche de 76 Gy, démontre la tolérance supérieure pour ce type d'irradiation. Cependant la taille des microfaisceaux se rapproche plutôt de « minifaisceaux » ce qui fait de cette étude un cas particulier difficile à comparer aux autres expériences de MRT, même si cette configuration d'irradiation, en permettant de s'affranchir de très hautes doses, pourrait rendre la technique transférable en clinique.

### **I.2.3.3. Quelques notions de dosimétrie appliquée à la MRT**

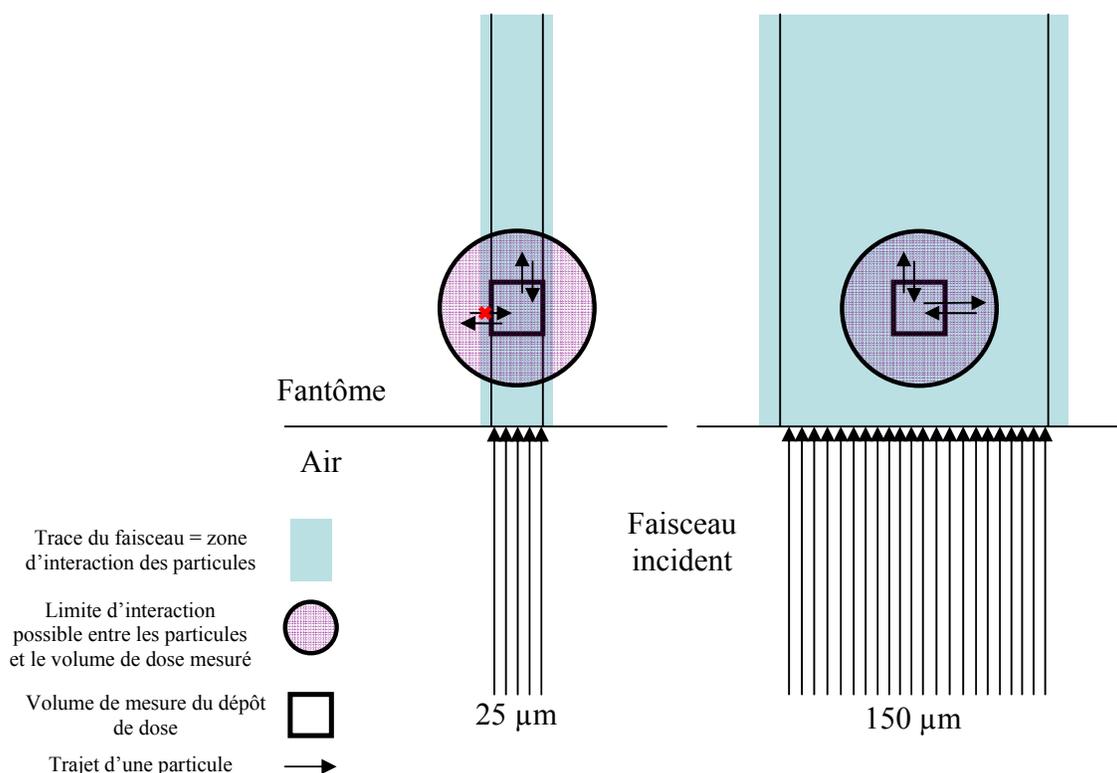
Pour assurer un suivi qualitatif des données expérimentales et pour pouvoir dans le futur garantir un dépôt de dose conforme à un planning de traitement pour des patients lors d'essais cliniques, il est essentiel que la dose délivrée soit précisément connue et vérifiée avant l'irradiation. Le principe même de la MRT est un défi pour des mesures dosimétriques à cause de son schéma très particulier d'irradiation. L'alternance d'une dose pic de l'ordre de plusieurs centaines de Gy sur une largeur très réduite avec une dose vallée de quelques dizaines de Gy sur une largeur 4 à 8 fois supérieure impose des contraintes importantes à la dosimétrie. Les énergies des rayonnements X étant relativement faibles, le choix du matériel du détecteur est également important. Le faisceau extrêmement intense utilisé en MRT risque de saturer le détecteur. Les dosimètres utilisés devront avoir une bonne résolution spatiale (de l'ordre du  $\mu\text{m}$ ), une grande plage d'utilisation en terme de dose (du Gy jusqu'à plusieurs milliers de Gy) et aussi être suffisamment précis pour pouvoir mesurer la dose vallée avec une erreur de quelques pourcents.

---

<sup>▲</sup> Notons que la différence de localisation de l'irradiation risque tout de même d'apporter un biais conséquent et que les doses utilisées lors de cette étude sont particulièrement élevées en comparaison de la dose vallée obtenue lors de l'irradiation MRT (2% de la dose pic soit 8 Gy)

### I.2.3.3.1. Calcul de la dose pic et compensation de l'équilibre électronique

En MRT, le flux de photons initial mesuré par une chambre d'ionisation sert de base au calcul de la dose pour l'irradiation après l'alignement. La vitesse de translation de l'échantillon est donc calculée à partir du flux pour obtenir la dose déposée désirée. Cependant, vu l'étroitesse des microfaisceaux ( $\approx 25 \mu\text{m}$ ), le nombre de particules (photons ou électrons) qui sort latéralement du microfaisceau n'est pas compensé par un nombre égal de particules rentrant comme ce serait le cas en faisceau large (Figure 29). Le calcul de dose doit donc prendre en compte cette perte d'équilibre électronique pour compenser cette perte en dose pic (compensation calculée de 20% [Siegbahn, 2006]). Les expériences de MRT réalisées au NSLS de Brookhaven ne prennent pas en compte cette correction<sup>▲</sup>. La dose déposée ne serait donc pas, par exemple, 625 Gy mais 500 Gy lors de l'expérience de 1998 par Laissue *et al.*



**Figure 29 : Equilibre électronique en MRT : alors qu'à droite lors d'irradiation en tissu large, l'équilibre électronique est respecté (échange équivalent entre les particules entrante et sortante d'un volume), ce n'est pas le cas à gauche dans un microfaisceau où le nombre de particules sortantes est supérieure à celles entrante. Pour un même flux d'origine, la dose déposée sera supérieure en faisceau large.**

<sup>▲</sup> Communication personnelle de Avraham Dilmanian, lors de la journée MRT du 20 avril 2005, ESRF, Grenoble.

#### I.2.3.3.2. Calcul théorique de la dose absorbée : simulation Monte-Carlo

Le calcul Monte-Carlo est reconnu aujourd'hui comme l'algorithme pouvant modéliser au plus près les phénomènes physiques liés aux dépôts d'énergie dans un milieu. Le transport de radiation est calculé en suivant chaque particule du faisceau, à travers chaque collision et chaque déflexion, jusqu'à ce qu'elle soit absorbée. Aux points de collision, des particules dites secondaires, normalement des électrons mais parfois des photons, peuvent être créées. Les trajectoires des particules secondaires peuvent être simulées après l'absorption des particules primaires. Cette approche peut être utilisée dans les matériaux amorphes (non cristallins) dans lesquels les effets des interférences des ondes de diffractions des particules des différents atomes sont négligeables. Le principal avantage de la méthode Monte-Carlo est que la déflexion des angles et les pertes d'énergie sont prises en compte en utilisant la probabilité de distribution calculée avec les modèles d'interactions les plus précis. Par contre la nature statistique des simulations Monte-Carlo pour la dosimétrie implique que l'historique d'un large nombre de photons primaires doit être simulé avant, pour que la distribution de dose calculée n'entraîne pas d'erreurs supérieures à 1% [Siegbahn, 2007]. Dans le cas de la MRT, les doses pic et vallée sont calculées en simulant un seul microfaisceau qui sera reproduit le nombre de fois nécessaire. Ce système ne prend donc en compte ni les variations de largeur à mi hauteur des microfaisceaux, ni l'intensité réelle des microfaisceaux pour lesquels il existe pourtant de grandes différences. Les simulations Monte-Carlo sont donc très intéressantes pour avoir une idée de la dose déposée dans les tissus selon les configurations utilisées mais ne permettront pas de connaître la dose exacte déposée lors d'une irradiation précise.

#### I.2.3.3.3. Les détecteurs MOSFETs

Les détecteurs MOSFETs (Metal-Oxyde Semi-conducting Field Effect Transistors) ont été utilisés pour mesurer la dose des microfaisceaux. La meilleure résolution est obtenue quand la partie contenant le volume sensible est parallèle à la propagation du faisceau ; cette orientation est appelée « edge-on », et la faisabilité de telles mesures a été démontrée [Brauer-Krisch, 2003 ; Orion, 2000]. Les mesures réalisées avec ce détecteur ont permis d'obtenir pour quelques mesures uniquement des valeurs du PVDR du même ordre que celles obtenues par simulation Monte-Carlo. Ce dosimètre n'a pourtant pas été retenu pour les expériences *in vivo* à cause de sa durée de vie limitée (50 irradiations) et du temps nécessaire (très long) à sa mise en place pour être aligné correctement avec le faisceau. De plus, le dosimètre Mosfet est

rapidement saturé à une dose relativement basse. Malgré sa petite taille qui permet une mesure réelle de la dose déposée dans un fantôme, ce genre de détecteur ne sera donc pas utilisable pour vérifier les doses pendant des essais précliniques et cliniques. Un autre détecteur (type « strip detector ») a été fabriqué spécialement pour la MRT et il est en train d'être testé. Ce type de détecteur permettra, grâce à sa résolution spatiale, des mesures qualitatives des doses pic et vallée juste avant des essais cliniques.

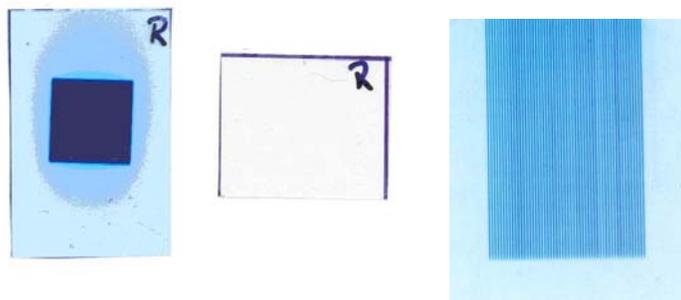
#### I.2.3.3.4. Les films GAFchromiques

Les films GAFchromic sont des films qui n'ont pas besoin de développement. Ils réagissent à la dose de rayonnement ionisant qu'ils reçoivent. Le bleuissement du film (la densité optique) est relié à la dose reçue par le film. Ils sont constitués d'une fine couche de protection (0,75  $\mu\text{m}$ ), d'une couche de réactif (environ 7  $\mu\text{m}$ , variable jusqu'à 20 % d'une boîte de film à l'autre) et d'un support (environ 100  $\mu\text{m}$ ) (Figure 30).

Surface-0.75 $\mu\text{m}$
Couche active-6.5 $\mu\text{m}$
Polyester 97 $\mu\text{m}$

**Figure 30 : composition d'un film GAFchromic HD810.**

Même s'ils sont surtout sensibles aux rayons  $\gamma$ , aux rayons X et aux électrons, ils obéissent aux mêmes règles de conservation que des films classiques (abris de la lumière visible, humidité, température...) [Sollier, 2006].



**Figure 31 : A gauche : film GAFchromic exposé à 1000 Gy sur un champ de 10x10 mm. Au centre : film non exposé. A droite : film GAFchromic exposé à une irradiation de type MRT.**

Les propriétés des films GAFchromics en font un outil pertinent pour la dosimétrie en MRT (Figure 31). Ces films ont en effet une résolution spatiale excellente (1200 lignes/mm). Ils sont adaptés à différentes plages de dose (de 1 – 100 Gy, 15 – 500 Gy...). Leur densité optique est stable après 24 heures, elle dépend de la dose mais à priori pas du débit de dose utilisé. Ils ont une faible dépendance en énergie et sont presque équivalents-tissu sur la gamme d'énergie utilisée en MRT [Butson, 2002 ; Mclaughlin, 1991]. Les mesures obtenues grâce à ces films procurent d'importantes informations sur le gradient de dose (dont son homogénéité suite au passage par le collimateur) et donnent une image en 2 dimensions de la géométrie d'irradiation permettant une vérification rapide au microscope de la taille des microfaisceaux et de leur espacement. L'utilisation de ces films présente néanmoins quelques inconvénients non négligeables. Tout d'abord l'orientation des films influence l'intensité de son marquage. Il est aussi nécessaire de répéter la lecture du film 3 jours après l'irradiation avant d'être sûr de la dose, et donc une vérification de la dose immédiatement après irradiation lors des réglages du faisceau est impossible [Kusak, 2005]. Le dernier inconvénient, mais non le moindre, est l'intervalle d'erreur induit par la composition, la manipulation et la chaîne de lecture de ces films (micro-densitomètre J.L. automation, modèle 3CS, Sunderland, UK) qui peut aller jusqu'à 40% du résultat. De ce fait, ils sont utilisables pour une dosimétrie relative mais non absolue. A ce jour, c'est ce type de dosimètre qui est utilisé lors des expérimentations *in vivo* afin de simplement vérifier que l'animal a été correctement irradié.

#### 1.2.3.3.5. Les chambres d'ionisations

Les chambres d'ionisations sont d'excellents dosimètres absolus et sont utilisées en routine clinique. Le principe de base est le comptage d'ions créés par le passage de particules ionisantes entre deux électrodes constituant un milieu fermé. Le courant mesuré correspondra à la dose au point où était placée la chambre d'ionisation après correction adéquate en fonction du volume irradié, de l'énergie, de l'environnement de mesure (température, pression) et de la chambre elle-même. Il existe un grand nombre de chambres d'ionisation différentes (plate, crayon, étanche,...) qui permettent d'adapter le détecteur aux conditions d'irradiations. Les chambres d'ionisations mesurent le Kerma dans l'air.

L'utilisation d'une chambre d'ionisation a été testée dans le cadre des expériences de MRT à l'ESRF [Sollier, 2006 ; Zeitoumy, 2007]. En effet, sa mise en place et son alignement rapide (moins d'une demi-heure) ainsi que la lecture immédiate des mesures, lui donne l'avantage

par rapport aux détecteurs MOSFETs et aux films GAFchromics (bien que la dose soit uniquement mesurée avant le collimateur).

Les particularités des microfaisceaux rendent cependant difficile son application. Il faudrait en effet effectuer des mesures dosimétriques de faisceau très intense pouvant faire 25  $\mu\text{m}$  de large et se situant dans les basses et moyennes énergies avec un détecteur adéquat, ce qui n'est pas le cas pour une chambre d'ionisation 200 fois plus grande que le faisceau à mesurer. Néanmoins, la chambre d'ionisation permet, grâce à la reproductibilité de ses résultats et à la précision de ses mesures, une vérification qualitative et fiable de la dose, en amont du collimateur, avant l'irradiation en mode MRT. Pour obtenir la dose absolue, les corrections nécessaires peuvent être évaluées avec une grande précision. Les corrections (dues à la température, à la pression et à l'énergie utilisée) sont parfaitement maîtrisées. La correction nécessaire due à la brillance du faisceau synchrotron peut être estimée avec une erreur inférieure à 1%. Cependant, les mesures effectuées avec la chambre d'ionisation ne peuvent pas être réalisées avec la même ouverture de fente que lors des expériences de MRT (500  $\mu\text{m}$ ). Cette ouverture doit être réduite à 50  $\mu\text{m}$  pour éviter de saturer la chambre. Depuis le début de l'année 2007, l'utilisation de la chambre d'ionisation permet de vérifier la constance du flux entre les expériences.

Toutes ces techniques de dosimétrie permettent donc d'estimer la dose déposée lors des irradiations sans jamais pouvoir la mesurer en temps réel à cause des très lourdes contraintes imposées par la technique d'irradiation. Suite aux mesures dosimétriques réalisées en 2006, 2 sources majeures d'erreurs ont pu être détectées. Premièrement, l'incertitude liée à la position relative des fentes horizontales a été résolue par un système de fentes fixes. Deuxièmement, un graissage optimal du goniomètre a permis d'obtenir une meilleure reproductibilité pour les valeurs de vitesse les plus extrêmes. Les doses délivrées restent cependant entachées de 15% d'erreur, dues à l'instrumentation.

## I.2.4. Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron : la SSRT (Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy)

### I.2.4.1. Principe (d'après Biston et al. [Biston, 2004b])

Théoriquement, l'irradiation d'éléments à numéro atomique ( $Z$ ) élevé à leur seuil d'absorption d'énergie K entraîne l'émission d'électrons Auger et de photoélectrons, émettant une grande charge d'énergie dans leur environnement proche. Ce phénomène est appelé photoactivation [Fairchild, 1984 ; Hofer, 2000 ; Jonsson, 1996 ; Larson, 1989 ; Laster, 1993 ; O'Donoghue, 1996 ; Shinohara, 1985 ; Tisljar-Lentulis, 1978 ; Tisljar-Lentulis, 1973]. L'idéal, pour créer des dommages irréversibles à l'ADN des cellules tumorales, consisterait en une chimio-radiothérapie combinant une irradiation monochromatique synchrotron avec un composant à  $Z$  élevé photoactivable pouvant se fixer sur l'ADN [Jonsson, 1996 ; Larson, 1989 ; Laster, 1993 ; Shinohara, 1985]. Parmi les drogues intéressantes, les molécules contenant des atomes de platine ( $Z = 78$ ), comme le *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatine) sont utilisées couramment [Kelland, 2002 ; Screnci, 1999]. De plus, les molécules de cisplatine réagissent avec les sites nucléophiles de l'ADN pour former des adduits. Ces deux arguments font donc du cisplatine une drogue de choix pour cette technique. L'efficacité du cisplatine (Figure 32) a été établie sur des patients atteints de cancer dans les années 70 et il est utilisé en clinique depuis 1978.

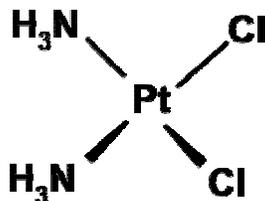
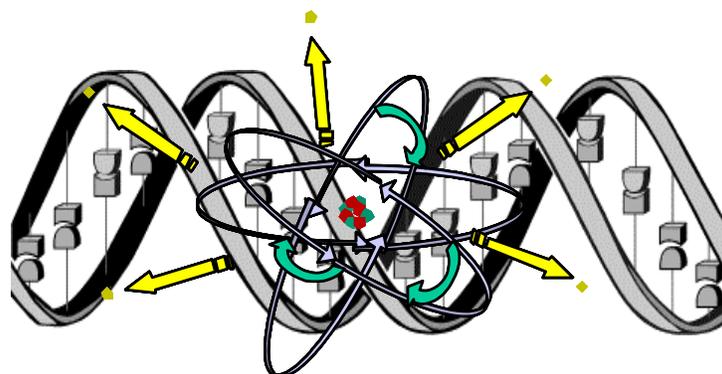


Figure 32: structure du cisplatine

La charge neutre du cisplatine est indispensable à sa pénétration intracellulaire, qui se fait par diffusion passive. Dans le milieu intracellulaire, il subit une réaction d'hydrolyse dont il résulte une molécule chargée positivement, hautement réactive avec de nombreux composants cellulaires, le diaquo-diamine-platine. Cette réaction produit des adduits de platine avec l'ADN, responsable de la toxicité du produit. L'efficacité des agents platinés peut être corrélée à une inhibition de la synthèse de l'ADN et à une saturation des voies de réparation par les adduits.

Le cisplatine est usuellement utilisé par voie intraveineuse stricte (avec des schémas thérapeutiques variés dont 5 à 6 mg/m<sup>2</sup>/jour par exemple) ou par voie intrapéritonéale (200 mg/m<sup>2</sup> dilués dans 2 litres de dialysat). Ces principales indications sont les cancers des testicules, des ovaires, de l'utérus, de la vessie, des poumons, de l'œsophage et ORL [Desoize, 2002]. Dans certaines de ces applications, le carboplatine tend à remplacer le cisplatine, mais l'activité du cisplatine reste supérieure pour le traitement des cancers des testicules, de la vessie et de la tête et du cou. La toxicité du cisplatine est essentiellement rénale, digestive et neurologique. L'utilisation de cette drogue pour le traitement de tumeurs cérébrales est limitée par la BHE. L'ouverture de la BHE, possible mais risquant d'entraîner des dommages cérébraux, n'est pas la solution idéale. Une injection intracérébrale de drogue va par contre permettre d'optimiser les concentrations d'agents de chimiothérapie dans la tumeur sans léser la BHE, permettant d'atteindre des concentrations de drogue jusqu'à 1200 fois plus élevées dans la tumeur par rapport à une injection intraveineuse [Gutman, 2000], et de réduire l'exposition systémique et donc la toxicité de ces mêmes drogues.

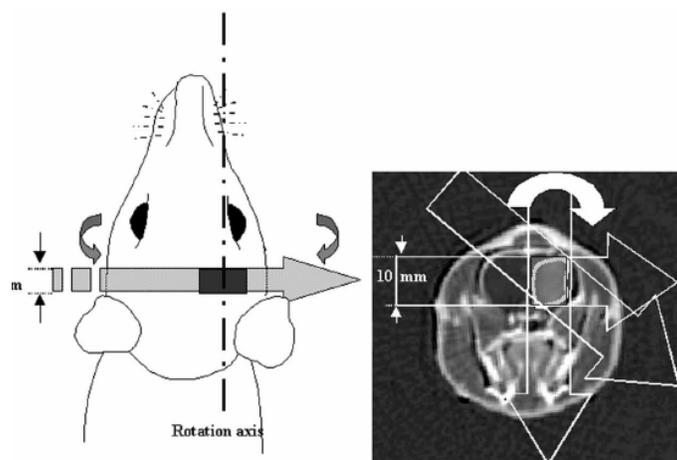
En injectant du cisplatine en intracérébral directement dans la tumeur, en lui laissant 24 h pour pénétrer dans la cellule et se fixer sur l'ADN puis en irradiant à l'aide du faisceau monochromatique synchrotron à une énergie tout juste supérieure au seuil K du platine, il est possible d'obtenir un accroissement de dose substantiel dans la zone tumorale (Figure 33).



**Figure 33 : Schématisation de l'effet d'émission d'électrons Auger par une molécule à Z élevé sur l'ADN.**

L'effet thérapeutique sera de plus accru par (i) l'effet chimiothérapeutique « classique » du cisplatine, (ii) une irradiation en mode tomothérapie : le rat est placé perpendiculairement au faisceau synchrotron et tourne sur lui-même durant l'irradiation, le centre de rotation étant réglé sur le centre théorique de la tumeur (Figure 34). Il faut cependant réussir à obtenir une

quantité de platine suffisante dans le noyau pour être efficace et avoir une probabilité d'apparition d'un effet photoélectrique non nul, tout en restant sous le seuil de cytotoxicité de ces agents.



**Figure 34 : Irradiation en mode tomothérapie : le rat est placé dans le cadre stéréotaxique tête vers le haut. Le faisceau arrive latéralement et le cadre tourne sur lui-même, le centre de rotation correspondant au centre théorique de la tumeur.**

#### **I.2.4.2. Historique (d'après Corde [Corde, 2002a])**

Même s'ils ne parlaient au début des années 1970 que de *Photon Capture Therapy*, Tisljar et Feinendegen ont été les précurseurs de ce qui a été communément appelé « thérapie par activation photonique » [Tisljar-Lentulis, 1978 ; Tisljar-Lentulis, 1973]. Leur idée est originale : il s'agit d'induire par irradiation externe un effet Auger au niveau d'éléments lourds incorporés dans l'ADN de cellules tumorales. A l'instar de Pierre Auger, qui provoquait un demi-siècle plus tôt des cascades électroniques par stimulation photonique basse énergie, ils choisissent donc d'utiliser des éléments stables et de rechercher l'énergie optimale de l'irradiation externe pour provoquer le plus de dégâts biologiques possibles. L'utilisation de composés stables permettrait d'éviter les problèmes liés à la circulation des isotopes radioactifs dans l'ensemble du système sanguin. Il apparaît clairement que la probabilité de provoquer des cascades Auger est maximale lorsque l'irradiation externe possède une énergie juste supérieure au seuil d'absorption K de l'élément lourd utilisé. Cette constatation se heurte à des difficultés techniques, liées aux caractéristiques des générateurs de rayons X conventionnels : ces derniers, émetteurs de spectres continus de rayons X de

freinage grâce à l'interposition d'une cible de numéro atomique élevé dans un flux d'électrons arrachés à un filament chauffé, ne disposent plus d'une intensité suffisante pour produire des effets biologiques notables si des cristaux sont interposés dans le faisceau pour le rendre monochromatique.

Néanmoins, des faisceaux polychromatiques ont tout de même été utilisés comme source d'irradiation externe [Miller, 1987a ; Miller, 1987b ; Nath, 1987] montrant une contribution positive probable de l'effet photoélectrique. Cependant les processus de dépôt d'énergie mis en jeu dans des faisceaux polychromatiques étant difficilement discernables et la probabilité des cascades Auger étant faible, les phénomènes observés sont peut être plus le résultats des photoélectrons émis suite à l'interaction primaire des photons incidents avec le composé de numéro atomique élevé que celui d'une éventuelle cascade Auger [Karnas, 1999].

Les travaux de l'équipe de Norman lèvent une partie de cette confusion en étudiant l'effet de l'incorporation d'un agent de contraste sur l'augmentation du dépôt d'énergie par des rayons X issus d'un scanner conventionnel, légèrement modifié pour pouvoir collimater le faisceau sur le volume à irradier [Iwamoto, 1990]. Ces travaux ont débuté en 1978 par la constatation que la prise de contraste des tumeurs en scanner conventionnel était le siège d'une plus grande atténuation du rayonnement X, donc d'une plus grande absorption de son énergie [Norman, 1978 ; Santos Mello, 1983]. Par la suite ces recherches ont progressivement évolué vers le traitement de patients [Rose, 1999]. Leur technique nommée CTRx (Computed Tomography Radiotherapy) présente de plus l'avantage d'imager en temps réel la tumeur, ce qui est actuellement un atout majeur. Cette technique n'a malgré tout que très peu diffusé, car l'approche réalisée par cette équipe, même si elle est indéniablement efficace, semble reposer sur un double manque d'optimisation :

- d'abord **biologique**, puisque les agents de contraste, en raison de leur localisation extracellulaire, sont bien moins efficaces à concentration égale que les agents pénétrant dans l'ADN. Les électrons Auger ne peuvent donc pas contribuer à une augmentation de létalité. Ce point est néanmoins discutable puisqu'à l'opposé cette approche permet de s'affranchir des nombreux problèmes de vectorisation des émetteurs Auger dans l'ADN puisqu'il est a priori biologiquement plus aisé de parvenir à charger une tumeur cérébrale par des quantités non négligeables d'agent de contraste que par des quantités mêmes infimes d'éléments lourds dans son ADN ;

- **physique** ensuite, car le rayonnement X polychromatique, bien qu'efficace pour générer des interactions de type photoélectrique, n'est pas optimal et de nombreux photons

irradient le patient sans apporter un quelconque gain à l'énergie déposée, du fait de la diffusion et de l'absorption des plus faibles énergies du spectre. L'intérêt d'utiliser un rayonnement monochromatique pour optimiser la quantité d'énergie délivrée après interaction photoélectrique a été pressenti par plusieurs équipes [Elleaume, 2001 ; Solberg, 2001 ; Solberg, 1992b].

De même, l'utilisation de rayons gamma par exemple [Halpern, 1978 ; Halpern, 1974 ; Nath, 1990] ouvre le champ à de nouvelles approches comme en curiethérapie.

Le rayonnement synchrotron est donc apparu comme outil de recherche idéal dans ce type d'approche, puisque son flux photonique demeure exceptionnellement élevé même après interposition dans le faisceau de cristaux permettant le choix d'une longueur d'onde particulière. Dans les diverses installations mondiales de rayonnement synchrotron, des études préliminaires de thérapie par activation photonique ont tout naturellement été menées [Maezawa, 1988 ; Shinohara, 1984 ; Usami, 1991]. Les résultats obtenus par Brenda Laster et ses collaborateurs sur culture cellulaire après incorporation de iodo-désoxyuridine dans l'ADN des cellules, irradiées à 33,4 keV, juste en dessus du seuil d'absorption K de l'iode, ont montré une augmentation de la cytotoxicité d'un facteur 3 par rapport aux cellules contrôle [Laster, 1993] ce qui est dans un sens encourageant mais décevant par rapport aux estimations théoriques de l'effet attendu [Fairchild, 1984 ; Miller, 1987b]. D'autre part, les analogues de thymidines halogénées (iodés ou bromés) ne sont plus les seuls agents pharmacologiques étudiés : des recherches diverses ont été menées avec d'autres éléments cibles, tels que l'indium [Jonsson, 1996], le brome [Laster, 1992], le platine [Le Sech, 2001] ou encore le phosphore et le calcium intracellulaires [Le Sech, 1996], potentiellement très intéressants car l'effet Auger est le mode de désexcitation prédominant des éléments légers. Cette dernière approche sera cependant forcément limitée à la fois par son manque de sélectivité (les éléments naturels ciblés sont présents dans toutes les cellules saines et cancéreuses sans restriction) et par les énergies des rayonnements employés, trop peu pénétrants pour une éventuelle application clinique ( $< 10$  keV). Bien qu'à l'époque, l'induction photonique externe de cascades d'électron Auger n'avait pas clairement montré son efficacité *in vitro* et que les résultats escomptés différaient de ceux trouvés [Humm, 1988a ; Humm, 1988b ; Miller, 1987b], de nouveaux travaux ouvrant des perspectives fondamentales et appliquées ont été réalisés à l'ESRF.

### **I.2.4.3. Etat de l'art à l'ESRF**

Les premiers résultats sont pourtant peu concluants : des essais clonogéniques sur des cellules SQ20B (carcinome épidermoïde humain de la tête et du cou) ont été effectués après incubation des cellules dans du milieu contenant du cisplatine [Corde, 2002b]. Les cellules ont soit incubé 48 h dans un milieu contenant 0,1  $\mu\text{M}$  de cisplatine avant d'être irradiées dans un tampon HBSS sans cisplatine, soit incubé 12 h dans du HBSS contenant 1  $\mu\text{M}$  de cisplatine, l'irradiation ayant lieu au bout des 3 premières heures d'incubation (sur la ligne ID17 à l'ESRF). Après irradiation, les cellules sont laissées dans du milieu sans cisplatine pendant 12 à 24 h afin de laisser s'opérer les réparations lentes de l'ADN avant réalisation d'un test clonogénique. Après 15 jours de croissance, les colonies qui se sont développées sont fixées à l'aide d'oxalate de cristal violet. Les résultats obtenus à partir des cellules irradiées, qui ont été normalisées à partir des résultats obtenus sur des cellules incubées avec du cisplatine mais pas irradiées, sont ensuite comparés à ceux des cellules témoins (non irradiées, sans cisplatine).

Sans irradiation, le cisplatine réduit la survie cellulaire à 66% pour les cellules ayant incubé pendant 48 h avec 0,1  $\mu\text{M}$  de cisplatine et à 17% pour celles ayant incubé pendant 12 h avec 1  $\mu\text{M}$  de cisplatine (survie des cellules témoins : 100%). Quand les résultats sont normalisés selon la toxicité du cisplatine seul, aucune augmentation de la létalité n'apparaît lors d'irradiation des cellules au dessus du seuil K du platine par rapport aux irradiations des cellules sous ce seuil. Outre le fait que la lignée cellulaire n'est peut être pas la plus adaptée à cette étude par sa radiorésistance inhabituelle et son statut génétique particulier, les auteurs émettent deux hypothèses pouvant expliquer ces résultats. La plus probable est que les atomes de platine n'étaient pas concentrés en quantité suffisante près de l'ADN pour augmenter significativement la proportion de photons interagissant avec eux plutôt qu'avec les autres atomes présents dans la cellule. Il est aussi possible que le cisplatine masque les effets de l'interaction entre les atomes de platine et le rayonnement synchrotron : le cisplatine entre dans les cellules en quantité suffisante et des adduits sont formés avec l'ADN. Une augmentation des dommages létaux peut alors résulter de l'interaction entre le platine et les photons, cependant, cette cellule est déjà potentiellement morte à cause de la toxicité du platine en tant que drogue de chimiothérapie. Cette expérience souligne ainsi les difficultés d'interprétation causées par l'utilisation du cisplatine à la fois drogue de chimiothérapie et molécule comprenant un élément à Z élevé pour l'augmentation de dose par photoactivation.

La biologie moléculaire apporte des réponses à ces questions et le projet de SSRT voit le jour. Stéphanie Corde et ses collaborateurs vont étudier les effets de la combinaison cisplatine et irradiation (toujours sur ID17) au dessus et au dessous de son seuil K sur la lignée cellulaire SQ20B (BRCA1<sup>♦</sup> positive) et les différences apparaissant avec la lignée HCC1937 (BRCA1 négative) [Corde, 2003]. Les cellules sont incubées pendant 6h avec 3 ou 30  $\mu\text{M}$ <sup>♥</sup> de cisplatine avant d'être irradiées à des doses comprises entre 0 et 20 Gy. Ces expériences vont montrer plusieurs différences entre les cellules irradiées au dessus et en dessous du seuil K du platine. Ainsi, après incubation dans du milieu contenant 30  $\mu\text{M}$  de cisplatine, une irradiation au dessus du seuil K va induire 3 fois plus de cassures double brin (ce qui équivaut à une dose supplémentaire de 8 Gy) et 4 fois plus de cassures simple brin (ce qui équivaut à une dose supplémentaire de 10 Gy). Les auteurs observent que la voie de réparation des cassures double brin par recombinaison non-homologue pourrait être totalement inhibée par 30  $\mu\text{M}$  de cisplatine. De plus, toujours après une incubation, dans du milieu contenant 30  $\mu\text{M}$  de cisplatine, une irradiation à 10 Gy au dessus du seuil K du platine va induire une très forte relocalisation de la protéine Rad 51<sup>♦</sup> dans le noyau des cellules. Ce phénomène est beaucoup moins prononcé lors d'une irradiation en dessous du seuil K du platine. A cela s'ajoute une hyperphosphorylation de la protéine BRCA1, dans les mêmes conditions, mais sans différence que l'irradiation ait lieu au dessus ou au dessous de seuil K du platine. Enfin, en comparant la réponse de l'activité de la kinase c-Abl<sup>\*</sup> après irradiation au dessus et en dessous du seuil K du platine sur les cellules SQ20B et HCC193 ayant été incubées avec 30  $\mu\text{M}$  de cisplatine, des différences prouvent que l'activité de la kinase c-Abl est surstimulée lors d'irradiation au dessus du seuil K du platine mais uniquement dans les cellules BRCA1 positives. Ces trois derniers points montrent l'intervention prédominante lors de ce traitement de la voie de réparation par recombinaison homologue, dépendante de BRCA1. De plus, il a été noté que la voie de réparation des cassures double brin par recombinaison non-homologue est fortement inhibée par le cisplatine (Figure 35). Les auteurs concluent, tout en prenant en compte la cytotoxicité du cisplatine, sur le grand potentiel thérapeutique de cette technique

---

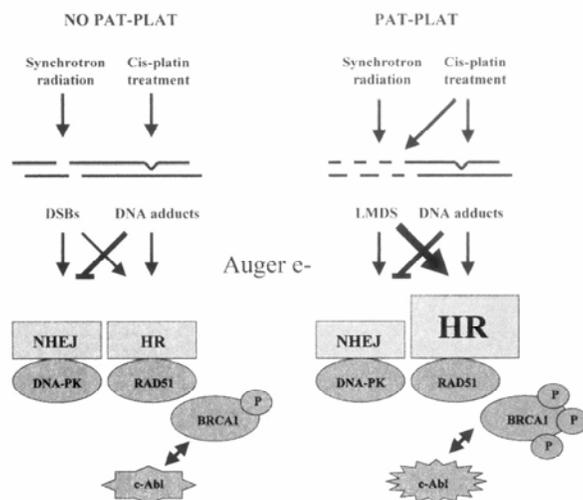
♦ BRCA1 = BReast CAncer 1 gène appartenant à la classe des gènes suppresseurs de tumeurs, maintenant l'intégrité génomique pour prévenir la prolifération incontrôlée.

♥ Soit 3 à 30 fois plus que la plus haute dose de l'expérience précédente.

♦ Rad51 est une ATPase qui se lie à l'ADN simple-brin, généré dans le processus de réparation des cassures double-brin. Le filament nucléoprotéique ainsi formé force l'échange avec le brin homologue intact qui servira de modèle pour réparer le brin lésé.

\* La tyrosine kinase non-récepteur c-Abl est une protéine qui agit dans le noyau en stimulant la réponse apoptotique en cas de stress génotoxique ou oxydatif.

pour les tumeurs déficientes en BRCA1 qui seront alors privées de leurs deux voies de réparation de l'ADN.

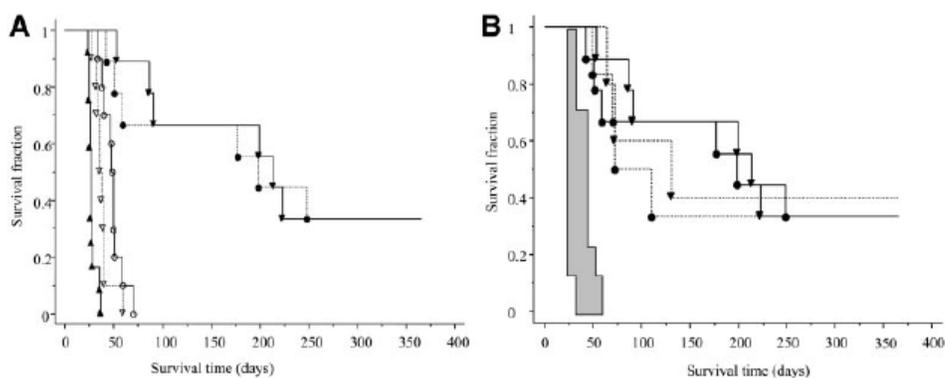


**Figure 35 : Modèle pour la photoactivation du platine (PAT-PLAT) avec rayonnement synchrotron. La combinaison des radiations synchrotron et du traitement au cisplatine entraîne l'induction de cassures double brin, et d'adduits d'ADN qui stimule préférentiellement les voies de réparation dépendantes de DNA-PK et RAD51, respectivement. La présence d'adduits d'ADN conduit à l'inhibition de la recombinaison non homologue en bloquant la translocation de protéine Ku sur l'ADN. La photoactivation du platine induit une augmentation du nombre de cassures simple brin et à de graves cassures double brin qui sont formées sur des sites de dommages multiples, très proche des molécules de cisplatine. La protéine RAD51 est fortement relocalisée sur le site des dommages ; BRCA1 est hyper-phosphorylé ; et la kinase c-Abl, relâchée par BRCA1, est suractivée. D'après [Corde, 2003]. DSB = Double Strand Break ; NHEJ = Non Homologous End Joining ; HR: Homologous Recombination; PK = Phospho Kinase.**

La même équipe va donc poursuivre ses investigations dans ce sens sur la ligne biomédicale (ID17) de l'ESRF et va entreprendre des expériences précliniques sur des rats porteurs de gliome F98 intracérébral [Biston, 2004b]. Les mêmes tests visant à estimer le nombre de cassure double brin sont mis en œuvres sur les cellules F98 après irradiation à 30 Gy avec des énergies de 30, 40, 78, 78,8 et 85 keV avec ou sans incubation préalable pendant 6 h avec 30  $\mu$ M de cisplatine. Les irradiations par rayonnement synchrotron seul induisent le même taux de cassure double brin quelle que soit l'énergie utilisée. Ce taux est tout juste inférieur à ceux obtenus avec cisplatine après irradiation à des énergies de 30, 40 ou 85 keV (bien que cette différence soit bien plus prononcée quand seuls les fragments mesurant 10 à 100 kb sont pris en compte). Toujours avec incubation au cisplatine, le taux de cassure double brin est 2 et 3 fois plus élevé lors d'irradiations à 78 et 78,8 keV, respectivement, que lors des irradiations aux autres énergies<sup>^</sup>. De plus, les cassures double-brin induites à 78,8 keV se réparent plus lentement que dans les autres configurations. La différence est donc moins grande entre une

<sup>^</sup> Bien que ces résultats ne soient pas en adéquation avec la courbe de section efficace d'interaction photoélectrique totale du platine.

irradiation au dessous ou au dessus du seuil K avec les cellules F98 qu'avec les cellules SQ20B, mais elle est tout de même bien présente. Des tests précliniques sont donc réalisés sur des rats Fisher 344 implantés avec  $10^3$  cellules dans 5  $\mu$ l de DMEM dans le parenchyme cérébral (temps de survie des 12 rats contrôle : 24 à 37 jours, médiane : 26 jours). Au 13<sup>ème</sup> jour après implantation, les rats reçoivent 3 ou 5  $\mu$ g de cisplatine dans 5  $\mu$ l de NaCl par voie intratumorale au point d'injection de la tumeur. L'irradiation a lieu 1 jour plus tard, les rats étant positionnés sur un cadre stéréotaxique rotatif dont le centre de rotation est réglé sur le point d'injection des cellules tumorales. La répartition du cisplatine après injection est vérifiée par fluorescence aux rayons X sur la ligne de lumière ID22 de l'ESRF : les molécules de cisplatine apparaissent en quantité très abondante dans la région d'intérêt et diffusent très lentement après l'injection. Les meilleurs résultats de survie sont obtenus à 15 Gy après injection de 3  $\mu$ g de cisplatine, que se soit à 78 ou 78,8 keV : la médiane de survie des rats atteint alors 214 et 194 jours respectivement (la médiane est de 48 jours pour les rats irradiés seuls et 37 jours pour les rats avec drogue seule). Les courbes de survie de ces expériences sont reportées Figure 36. Ces résultats de survie laissent envisager un grand avenir pour cette technique puisqu'ils sont les meilleurs rapportés avec le modèle F98. Etrangement, aucune différence de survie n'apparaît entre les rats irradiés au dessus ou en dessous du seuil K du platine. Les auteurs annoncent leur intérêt de poursuivre leurs investigations dans ce sens en expérimentant entre autre l'effet d'autres chimies comportant du platine comme le carboplatine, beaucoup moins toxique que le cisplatine, et dont les résultats apparaissent dans la thèse de doctorat du premier auteur de cette publication [Biston, 2004a].



**Figure 36:** Courbes de survie de rats porteurs de gliomes F98 soumis aux traitements suivants. A : ▲, contrôles non irradiés ; ▽, injection de 3  $\mu$ g de cisplatine seul ; ○, irradiation à 15 Gy ; ▼, injection de 3  $\mu$ g de cisplatine combinée avec une irradiation à 78,0 keV ; ●, injection de 3  $\mu$ g de cisplatine combinée avec une irradiation à 78,8 keV. B : intercomparaison entre les survies obtenues lors de deux séries d'expériences indépendantes avec une injection de 3  $\mu$ g de cisplatine combinée à une irradiation de 15 Gy à 78,0 (▼) ou 78,8 (●) keV. Les données des expériences 1 et 2 sont représentées par des lignes pleines ou pointillées, respectivement. La zone de confiance en gris sous les courbes combine les survies des rats non traités, traités avec 3  $\mu$ g de cisplatine ou à 15 Gy. D'après [Biston, 2004b].



# **Matériel et Méthodes**



## II. Matériel et Méthodes

### II.1. Culture cellulaire

#### II.1.1. Lignées cellulaires

Le gliosarcome 9L<sup>▲</sup> a été produit par Benda et Schmidek au Massachusetts General Hospital (Boston, USA) par injection intra-veineuse de N-methylnitrosurée (5 mg/kg par semaine pendant 26 semaines) à des rats Fischer CD [Benda, 1971 ; Schmidek, 1971]. Les cellules sont cultivées dans des flasques contenant 7 ml de milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen-France, Cergy-Pontoise, France) sans sodium pyruvate (avec 4500 mg/l de glucose et avec pyridoxine HCL) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), et 1 % d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). Ce mélange est appelé milieu complet. Les flasques sont placées dans des incubateurs à 37°C avec une atmosphère comprenant 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>.

Le gliome F98 a été produit par Wechsler dans le laboratoire de Koester à l'Ohio State University par injection intraveineuse d'une dose unique de N-éthyl-N-nitrosurée (50 mg/kg) à une rate femelle Fischer CD au 20<sup>ème</sup> jour de gestation dans l'espoir d'obtenir un puissant outil pour étudier les aspects variés de l'étiologie et de la pathogénie des tumeurs cérébrales spontanées chez l'homme et l'animal [Koestner, 1971]. Les cellules sont cultivées comme précédemment décrit pour les cellules 9L mais avec du DMEM avec sodium pyruvate.

#### II.1.2. Croissance cellulaire

Les cellules sont congelées dans un milieu contenant 70% de DMEM, 20% de SVF et 10% de DiMéthylSulfOxyde (DMSO). Les cryotubes contenant les cellules sont placés dans un cryo-container de congélation cryo 1°C Nalgene™. L'isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) contenu à l'intérieur entraîne une vitesse de refroidissement de -1°C/min.

Avant la culture, les cellules sont rapidement décongelées puis mélangées avec du DMEM avant d'être centrifugées à 1500 tours par minute durant 5 min pour les séparer du milieu de

---

<sup>▲</sup> Les cellules 9L utilisées à l'ESRF sont originaires de Brookhaven (J. Coderre) et ont été ramenées en France en 1997 par G. Le Duc.

congélation contenant du DMSO. Le milieu est retiré et le culot cellulaire est repris dans 7 ml de milieu complet puis transféré dans des flasques de 50 ml.

Quand les cellules sont à confluences, elles sont repiquées à l'aide de trypsine-EDTA. Après avoir retiré le milieu, les flasques contenant les cellules + 2 ml de trypsine-EDTA sont mises dans l'incubateur pendant 5 minutes. 3 ml de milieu complet sont ajoutés aux cellules et à la trypsine à la sortie de l'incubateur, le SVF contenu dans le milieu complet neutralisant la trypsine. Après centrifugation les cellules sont reprises dans du milieu complet puis divisées entre les différentes flasques.

## **II.2. Animaux utilisés lors des expérimentations**

Les animaux utilisés sont des rats mâles de la souche Fischer 344 (Domaine des Oncins, Charles River, L'Arbresle, France). Le poids des rats à leur arrivée est compris entre 180 g et 276 g en fonction des possibilités de l'élevage. Ils sont hébergés dans une pièce en dépression (différentiel par rapport à la pression atmosphérique de -15 Pa), à une température moyenne de 22,5°C, une ventilation de 15 volumes/heure, une hygrométrie de 50%-65% et un éclairage en alternance par tranche de 12h. Ils sont nourris à l'aliment maintenance rongeur (SAFE, Villemoisson sur Orge, France) et stabulés sur copeaux de bois Litalabo (SPPS, Vénissieux, France).

## **II.3. Anesthésie des animaux**

De janvier 2003 à août 2005, les animaux ont été anesthésiés de manière identique pour chaque étape du protocole (i.e. implantation des tumeurs, examen IRM, irradiation). Les rats sont tout d'abord pré-anesthésiés par inhalation d'isoflurane à 4 % puis une injection intra péritonéale de 400 mg/kg de chloral hydrate assure une anesthésie de 2 à 3 heures.

Depuis août 2005, les animaux sont toujours anesthésiés au chloral hydrate pour l'IRM (nécessité d'une longue anesthésie et très peu de manipulation), mais l'implantation et l'irradiation sont réalisées sous anesthésie avec un mélange kétamine/xylazine (kétamine 40% : 64,5 mg/kg ; xylazine 25% : 5,4 mg/kg ; eau ppi 35%) en intrapéritonéal, dans les mêmes conditions que pour le chloral hydrate, à une dose de 0.2 ml/100g.

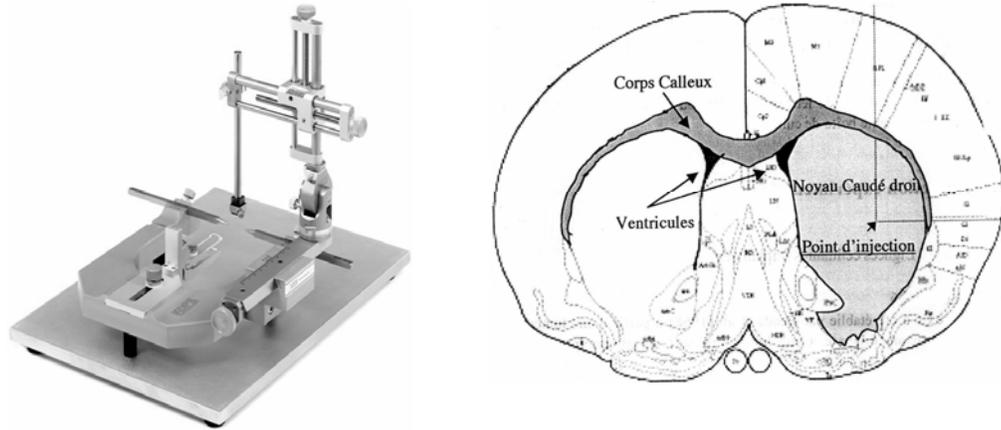
## **II.4. Implantation de la tumeur**

### **II.4.1. Préparation des cellules pour l'implantation**

Les cellules sont séparées des flasques comme décrit ci-dessus avec 2 ml de trypsine-EDTA. Les cellules et la trypsine sont mélangées avec 28 ml (volume permettant de compter le grand nombre de cellules) de milieu + 200 µl de SVF. Après avoir homogénéisé le mélange, entre autre avec l'aide d'un vortex, les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Neubauer. Après centrifugation, le surnageant est retiré et le culot cellulaire est remis en solution avec la quantité exacte de DMEM + antibiotiques (1,5 %) nécessaire pour obtenir la concentration désirée de cellules par microlitre i.e.  $10^4$  cellules par microlitre [Dilmanian, 2002 ; Laissue, 1998] ou  $10^3$  cellules par 5 microlitres [Adam, 2006 ; Barth, 2000 ; Biston, 2004b]. C'est cette solution qui sera injectée aux rats lors de l'implantation.

### **II.4.2. Chirurgie Stéréotaxique**

La chirurgie stéréotaxique se fait sous anesthésie générale. Le crâne du rat est rasé, puis l'animal est placé sur un cadre stéréotaxique KOPF (modèle 900) (Figure 37) dans lequel la tête est immobilisée afin d'obtenir la précision requise. Le cadre stéréotaxique est composé de deux barres transversales qui sont introduites dans les conduits auditifs de l'animal. Pour vérifier si les « barres d'oreilles » ont bien été positionnées, il faut faire pivoter la tête du rat de gauche à droite (elle ne doit pas bouger), et de haut en bas (le crâne doit alors pivoter suivant l'axe des deux barres). Une fois les barres mises en place, le museau du rat est maintenu légèrement en avant à l'aide d'une pièce métallique permettant la fixation des incisives supérieures du rat. L'immobilité du crâne du rat est, dès lors, totale et l'acte chirurgical peut avoir lieu.



**Figure 37 : A gauche : Cadre stéréotaxique utilisé pour l'implantation des tumeurs cérébrales chez le rat. A droite : site d'injection des cellules tumorales dans le cerveau de rat.**

A l'aide d'un scalpel, une incision est pratiquée sur le scalp de l'animal, puis la peau est écartée. Deux écarteurs (réalisés spécialement dans ce but) sont placés de chaque côté de la plaie. La boîte crânienne du rat est dégagée en utilisant un coton-tige, pour nettoyer l'os en déchirant les tissus sous cutanés et éviter ainsi d'être gêné lors des opérations ultérieures (notamment lors du forage de la boîte crânienne).

Les cellules sont implantées dans le noyau caudé droit c'est-à-dire à 10 mm en avant des barres d'oreilles, 3,5 mm à droite de la ligne de suture sagittale et à 5,5 mm de profondeur depuis la partie extérieur du crâne [Paxinos, 1986]. Les repères sont pris à partir du bregma situé à 10 mm en avant des barres d'oreilles. L'os est ensuite percé jusqu'aux méninges sans pénétrer dans le cerveau à l'aide d'une perceuse munie d'un foret de diamètre de 0,8 mm ou d'une broche à os. La seringue Hamilton (Bonaduz, Suisse) contenant les cellules en suspension (cellules 9L : seringue de 1  $\mu$ l contenant  $10^4$  cellules en suspension ; cellules F98 : seringue de 10  $\mu$ l contenant  $10^3$  cellules en suspension dans 5  $\mu$ l) est placé sur le cadre. L'aiguille positionnée au niveau de la partie extérieure du crâne est descendue à 6 mm de profondeur dans le noyau caudé, puis remontée de 0,5 mm afin de ménager un espace pour les cellules et d'éviter qu'elles ne remontent le long du trajet de l'aiguille. Les cellules sont alors injectées en 10 secondes pour les 5  $\mu$ l ou très rapidement pour les 1  $\mu$ l. La seringue est laissée en place 1 min, puis elle est remontée doucement. Le trou percé dans la boîte crânienne du rat est ensuite obstrué avec de la cire de Horsley (B/BRAUN), et la plaie recousue à l'aide de fil monté Crinercé®.

Le rat est mis dans une couveuse à 27°C le temps du réveil puis réinstallé à l'animalerie. Après implantation, un suivi des rats est assuré de façon régulière, avec un contrôle quotidien de leur état de santé et de leur comportement.

## II.5. Imagerie par Résonance Magnétique

### II.5.1. Diagnostic de présence de la tumeur

Afin de confirmer la présence des tumeurs avant l'irradiation, tous les rats ont été imagés par IRM (Unité IRM, CHU A. Michallon) entre 9 et 13 jours après l'implantation selon le protocole et la disponibilité de l'aimant.

Les images ont été réalisées sur un aimant Bruker 3 Tesla à partir d'une séquence d'écho de spin TurboRARE pondérée en  $T_2$  en utilisant un mode 3D (TR= 2265 ms, TE effectif= 117,2 ms, 1 répétition, 48 coupes jointives de 1,33 mm d'épaisseur, matrice 256 x 240, FOV=21,6 cm). Il n'a pas été réalisé de séquence pondérée en  $T_1$  afin de s'affranchir de l'injection d'agent de contraste et d'éviter un biais lors de l'irradiation avec la présence potentielle de résidus de produits à Z élevé. Une antenne de type cage d'oiseau à 12 barreaux (Rapid Biomedical, Würzburg, Allemagne) de diamètre 24,5 cm et de longueur 24 cm a été utilisée lors de cette expérience. Comme présenté Figure 38, sept bouteilles d'eau minérale vides ont été assemblées à l'aide de ruban adhésif puis introduites et fixées dans l'antenne afin de pouvoir acquérir des images de 7 animaux à la fois. Ceci permet d'imager tous les rats peu avant l'irradiation (1 à 3 jours selon les expériences) en respectant le temps d'aimant imparti. Un tube d'eau contenant un peu de chélate de gadolinium a été positionné dans l'antenne afin de servir de référence.



Figure 38 : Antenne radiofréquence adaptée à l'imagerie du rat

Les 3 dimensions de la tumeur (plus exactement de l'œdème péritumoral) ont été mesurées sur l'image où la tumeur apparaissait la plus grande et en utilisant le nombre de coupes sur lesquelles apparaît la tumeur. Ensuite, le volume tumoral a été calculé en assimilant la tumeur à une ellipsoïde (volume :  $\pi/6 \times X \times Y \times Z$  et surface :  $\pi/4 \times X \times Y$ ).

Les rats implantés avec des cellules 9L dont la tumeur n'a pas été vu à l'IRM (sauf à stade précoce *i.e.* J9) sont sortis de l'étude afin d'écarter les animaux dont les tumeurs ont un schéma de croissance plus long. Les rats non porteurs de tumeur sont rares et l'absence de tumeurs est le plus souvent due à des erreurs de manipulation, relevées sur le cahier d'implantation. Concernant les rats F98, les tumeurs étant peu visibles à l'IRM, tous les animaux sont gardés dans l'étude quelque soit le diagnostic IRM.

## **II.5.2. Etude du modèle 9L sur aimant Bruker 2,35 Tesla** ***[Serduc, 2006a]***

Un protocole IRM plus précis a été utilisé pour caractériser le modèle tumoral 9L utilisé lors de cette étude en imageant des rats à différents stades post implantation. Les mesures du volume tumoral, du volume sanguin cérébral et la détermination de l'index de taille des vaisseaux sont effectuées à 100 MHz dans un aimant Bruker de 2,35 T de l'unité INSERM U836 – équipe 5 sur une console de type SMIS. L'anesthésie des animaux est induite par un mélange air/oxygène/isoflurane 5% et maintenue pendant toute la durée de l'expérience en réduisant le taux d'isoflurane à 1,8%. Un cathéter 27 Gauge est placé dans une des veines de la queue de l'animal pour permettre l'injection des agents de contraste. Les animaux sont alors placés sur un support de sonde, maintenus grâce à des barres transversales. Une antenne de volume est installée pour la transmission des impulsions radiofréquences et une antenne de surface est fixée au dessus du crâne pour la réception du signal. Le rat est introduit au centre de l'aimant dont le diamètre utile est de 20 cm. Après les réglages d'accord et d'adaptation, l'homogénéité du champ magnétique est corrigée sur un voxel de  $50 \times 50 \times 12 \text{ mm}^3$  dans le volume sensible de la bobine. L'acquisition rapide d'images permet de vérifier la bonne position de l'animal dans l'aimant et de positionner 7 coupes coronales de  $800 \mu\text{m}$  d'épaisseur chacune. Pour chaque expérience une matrice  $64 \times 64$  est acquise dans un champ de vue de  $15 \text{ mm}^2$  conduisant à un voxel de  $234 \times 234 \times 800 \mu\text{m}^3$ .

La mesure du coefficient de diffusion est réalisée en utilisant une séquence en écho de spin pondérée en diffusion selon les trois axes x, y et z. Le temps d'écho est fixé à 55 ms, le temps

de répétition à 3 s. Le facteur b est de  $700 \text{ s}\cdot\text{mm}^{-2}$  et  $t_{\text{Diff}}$  30 ms. Deux moyennages sont effectués pour un temps d'acquisition d'environ 27 minutes. Les cartes de CDA sont alors calculées et affichées sur un logiciel Matlab développé au laboratoire de l'unité INSERM U836 – équipe 5 qui permet la sélection de régions d'intérêt.

Les mesures du volume sanguin cérébral et de l'index de taille des vaisseaux reposent sur l'utilisation et l'injection intraveineuse d'un traceur intravasculaire, le Sinerem® (Guerbet, Roissy, France). C'est un agent de contraste superparamagnétique de 20 à 30 nm de diamètre. Le noyau (de 94 à 6 nm) est composé d'oxyde de fer et est recouvert d'une pellicule de dextran. Contenu dans l'espace vasculaire, le Sinerem® peut affecter les temps de relaxation  $T_2$  et  $T_2^*$  des molécules d'eau des espaces extravasculaires. L'espace occupé par le sang dans le cerveau étant de quelques pourcents, le signal RMN provient dans sa très grande majorité des molécules d'eau du parenchyme cérébral situé à proximité des vaisseaux. Par conséquent, les modifications des temps de relaxation mesurées après injection du produit de contraste reflètent indirectement les paramètres vasculaires dans le voxel de mesure. Les images sont acquises avec une séquence multi échos de gradient écho de spin utilisant un temps de répétition de 6000 ms, un temps d'écho de spin fixé à 102 ms. 5 échos de gradient sont acquis entre 6 et 42 ms avant une impulsion radiofréquence de  $180^\circ$ . Deux moyennages sont réalisés pour un temps d'acquisition d'environ 12 minutes. La séquence est appliquée deux fois : une première fois avant injection du produit de contraste, une seconde fois après l'injection de Sinerem® ( $200 \mu\text{mol}_{\text{Fe}}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Les données sont traitées à l'aide du logiciel Matlab. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre VI.2.2.

## II.6. Injection des drogues

Certains protocoles comprennent l'injection de drogue avant l'irradiation. L'injection est réalisée par voie intratumorale au même point d'injection que les cellules. La cire est enlevée à l'aide d'une aiguille et le même trou d'injection est réutilisé pour administrer la drogue. Trois drogues différentes ont été utilisées (Tableau 7) :

- Le cisplatine (Cisplatyl®, Aventis, Paris, France, en 2005 et 2006 ou Cisplatine Merck®, Merck, Lyon, France, en 2007), drogue de chimiothérapie et un élément à Z élevé, est injecté 24 heures avant l'irradiation pour permettre la pénétration du platine dans les noyaux cellulaires [Biston, 2004b].

- Le Gd-DTPA (Magnevist®, Bayer-Schering, Berlin, Allemagne), élément à Z élevé, est injecté 10 à 30 minutes ou 24 h avant l'irradiation. L'injection est réalisée soit manuellement (temps d'injection  $\approx$  1 min) soit à l'aide d'une pompe micrométrique (KdScientific modèle 310 Plus Series, GENEQ inc., Montréal, Canada) connectée au poussoir d'une seringue Hamilton de 25  $\mu$ l (model 1702 RN). Le débit de l'injection est alors de 0,5  $\mu$ l/min. L'effet du gadolinium a également été testé après injection par voie intraveineuse de 1,5 ml de Magnevist® dans la veine saphène après dissection superficielle de cette veine 10 à 30 minutes avant l'irradiation.
- Le témozolomide (Temodal®, Schering-Plough, Bruxelles, Belgique), drogue de chimiothérapie utilisée lors des traitements des gliomes cérébraux chez l'homme, injecté 10 à 30 minutes avant l'irradiation. Le témozolomide étant présenté sous forme de capsule, il a été mis en solution dans de l'Elliot'S KSL à une concentration de 3,1 mg/ml (opération réalisée à l'hôpital cantonal de Lucerne).

Produits	Mode d'injection	Quantité de produit injecté	Masse molaire de l'élément (g/mol)	Quantité d'élément injectée
<b>Cisplatine (300 g/mol)</b>	IC	3 $\mu$ g dans 5 $\mu$ l	195	1,95 $\mu$ g
<b>Gd-DTPA (0,5 mmol/ml)</b>	IC	5 $\mu$ l	157,2	393 $\mu$ g
		10 $\mu$ l		786 $\mu$ g
		15 $\mu$ l		1,18 mg
	IV	1,5 ml		117 mg
<b>Témozolomide</b>	IC	10 $\mu$ l		31 $\mu$ g
		15 $\mu$ l		46,5 $\mu$ g

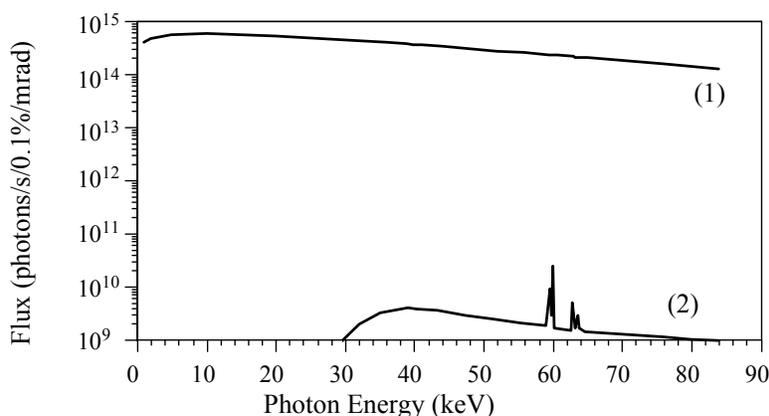
**Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes drogues injectées avec leur mode d'injection et la quantité d'élément injectée. IC = intracérébral, IV = intraveineux.**

## II.7. Irradiation par faisceau synchrotron

### II.7.1. Thérapie par MicroFaisceaux (MRT)

#### II.7.1.1. Caractéristiques du dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation

A l'heure actuelle, la thérapie par microfaisceaux ne peut s'affranchir de l'utilisation du rayonnement synchrotron, caractérisé par une grande brillance, un flux élevé et une bonne collimation (cf I.2.1.2.). La brillance du faisceau synchrotron disponible à la sortie du « wiggler » de ID17 est  $10^5$  fois supérieure (Figure 39) à celle d'un tube à rayons X. En pratique l'intensité et donc le débit de dose dépend du remplissage des électrons dans l'anneau de stockage (sans modification du spectre) et peut être un peu modifié avec l'ouverture du « wiggler gap » et grâce à l'interposition d'atténuateurs (filtres en carbone, aluminium, plexiglas). Dans les deux derniers cas, il y aura une modification du spectre.

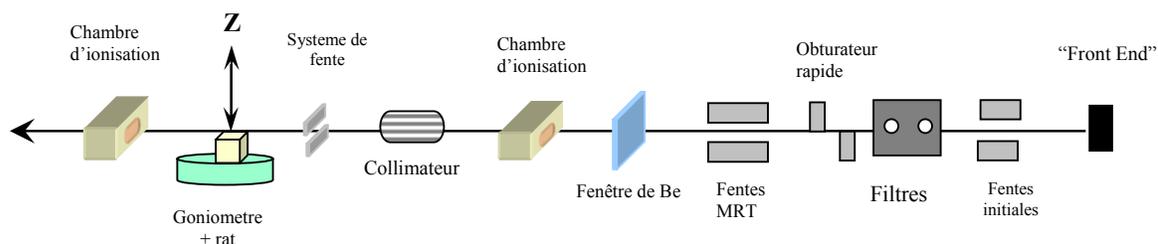


**Figure 39 : Comparaison entre le spectre disponible (1) sur la ligne médicale de l'ESRF, (2) sur une source conventionnelle de rayons X (110 KV, 2.5 mm Al).**

Le « wiggler » d'ID17 a une énergie critique de 38,1 keV, pour un « gap » de 24,8 mm. Il est constitué de 21 pôles de 1,5 Tesla.

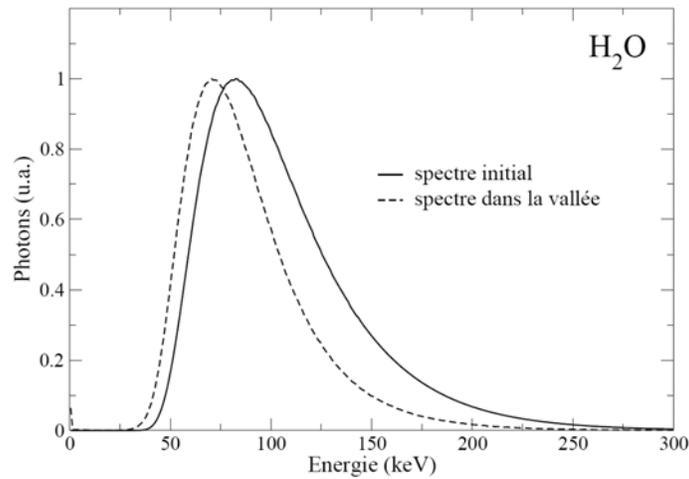
Les expériences de MRT présentées dans ce travail de thèse ont été effectuées avec différents mode de remplissage de l'anneau de stockage : en mode « 16 bunch », c'est à dire que 16 paquets d'électrons tournent dans l'anneau ; en mode hybride (1/3 de l'anneau rempli avec des paquets d'électrons homogènes et 2/3 rempli avec 1 seul paquet d'électrons) ou en mode 2/3 (intensité maximale de 250 mA). Pour la MRT, il est favorable de choisir un mode de remplissage avec un courant élevé (200 mA), mais même en mode « 16 bunch » (90 mA) le

temps d'irradiation reste minimal : de l'ordre d'une fraction de seconde par tranche de tissu irradié.



**Figure 40 : Montage expérimental schématisé de la cabine expérimentale de MRT sur la ligne de lumière ID17.**

Le faisceau à la sortie du wiggler est collimaté par des fentes initiales qui sont réglées afin de sélectionner un faisceau homogène. La fente verticale mesure  $800 \mu\text{m}$  et la fente horizontale  $15$  à  $20 \text{ mm}$  (Figure 40). Pour les irradiations de MRT, le spectre du faisceau blanc du wiggler est ensuite filtré. Avant l'année 2005, ces filtres sont constitués de  $1,5 \text{ mm}$  de carbone,  $1,5 \text{ mm}$  d'aluminium et  $1,0 \text{ mm}$  de cuivre. A partir de l'année 2005, les anciens filtres ont été remplacés et les nouveaux filtres sont constitués de  $1,42 \text{ mm}$  de carbone,  $1,52 \text{ mm}$  d'aluminium et  $1,04 \text{ mm}$  de cuivre. Cette filtration permet d'éviter la présence de rayons X non pénétrants responsables de lésions de la peau mais sans bénéfice thérapeutique. Il en résulte un spectre étendu de  $50$  à  $250 \text{ keV}$  environ avec un maximum à  $83 \text{ keV}$  (Figure 41). Le nombre total de photons après les filtres est de  $2,7 \cdot 10^9 \text{ photons} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{mA}^{-1}$  dans le centre du cône de variation du « wiggler » [Brauer-Krisch, 2003].



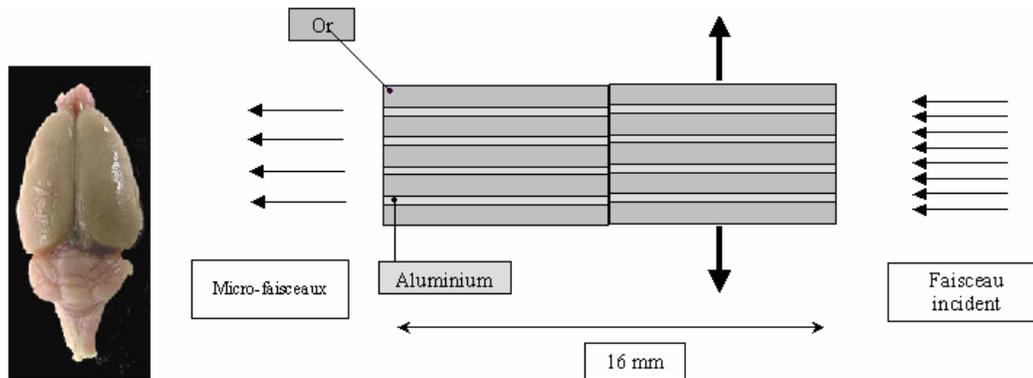
**Figure 41 : Calcul Monte-Carlo du spectre initial après filtration (1,5 mm de C ; 1,5 mm d'Al ; 1 mm de Cu) en comparaison avec le spectre dans la vallée.**

Dans cette configuration, le débit de dose mesuré est environ de 100 Gy/s/mA (après les filtres mais avant le collimateur). Les fentes sont refermées gardant une ouverture verticale de 500  $\mu\text{m}$  et une ouverture horizontale de 10 mm. Avec le mouvement vertical du goniomètre de 10 ou 12 mm, un champ d'irradiation de 10 x 10  $\text{mm}^2$  couvre normalement, avec une certaine marge, toute la tumeur dont le diamètre typique est de 4 à 6 mm. Après le passage à travers une fenêtre de béryllium, le faisceau synchrotron se propage dans l'air et passe par une chambre d'ionisation avant d'arriver au collimateur multifentes, qui est placé à 33 m de la source.

### **II.7.1.2. Les collimateurs multifentes**

Durant cette thèse, deux collimateurs multi-fentes ont été utilisés. Le collimateur représente l'élément central de la technique de MRT, en permettant la définition des microfaisceaux.

Le **collimateur Archer** porte le nom de son inventeur et à été le premier collimateur réglable pour différentes tailles de microfaisceaux inventé pour la MRT [Archer, 1998]. Il permet la création de microfaisceaux ayant une largeur à mi-hauteur de 10 à 50  $\mu\text{m}$  et dont l'espacement est fixé à 200  $\mu\text{m}$  au niveau du collimateur (210  $\mu\text{m}$  au niveau du goniomètre).



**Figure 42 : Schéma illustrant le principe du collimateur multi-fentes Archer**

Comme le montre la figure ci-dessus (Figure 42), ce collimateur est composé de deux parties pouvant se déplacer l'une par rapport à l'autre. Chaque partie est faite d'une succession de lames d'or (de  $150\ \mu\text{m}$  d'épaisseur) séparées par des tranches d'aluminium (de  $50\ \mu\text{m}$  d'épaisseur). Longitudinalement, le faisceau peut traverser les  $16\ \text{mm}$  d'aluminium mais est totalement absorbé par l'or.

En changeant la position des deux éléments, il est possible de faire varier l'épaisseur des microfaisceaux. La taille maximale des microfaisceaux est de  $50\ \mu\text{m}$  lorsque les deux éléments sont en face l'un de l'autre. Le nombre de microfaisceaux est choisi grâce à l'utilisation de deux jeux de fentes situés en amont du collimateur (fentes primaires et fentes MRT). Ces fentes permettent de déterminer la taille du champ de faisceau qui va traverser le collimateur. Elles sont placées verticalement et sont espacées typiquement de  $1\ \text{cm}$  ce qui permet la production de 51 microfaisceaux de  $25\ \mu\text{m}$  séparés par  $210\ \mu\text{m}$ . Certains rats ont été irradiés avec un espacement de  $105\ \mu\text{m}$  entre les microfaisceaux, ce qui nécessite une première irradiation, une translation horizontale de l'échantillon de  $105\ \mu\text{m}$  puis une seconde irradiation. L'immobilité de l'animal est alors encore plus importante. Le débit de dose, dans le pic, après le collimateur Archer, pour une largeur de microfaisceaux de  $25\ \mu\text{m}$ , a été calculé par simulation Monte-Carlo comme étant de  $38\ \text{Gy/s/mA}$ , ceci étant dû à la compensation de l'équilibre électronique et au  $16\ \text{mm}$  d'aluminium.

Le **collimateur Tecomet** est basé sur le même principe remplaçant l'or par du tungstène et l'aluminium par de l'air : ce sont deux blocs de tungstène identiques de  $\sim 8\ \text{mm}$  de profondeur, placés l'un devant l'autre, qui vont produire les microfaisceaux. Ces blocs présentent 125 fentes, de  $5\ \text{mm}$  de haut et  $100\ \mu\text{m}$  de large, équidistantes. Ces fentes sont espacées de  $400\ \mu\text{m}$  de centre à centre. Le positionnement des 2 blocs et la translation de l'un

par rapport à l'autre permettrait idéalement le façonnement de 125 microfaisceaux espacés de 400  $\mu\text{m}$  et dont la largeur peut varier de 5 à 100  $\mu\text{m}$ . Cependant, la réalisation d'un tel outil de précision n'étant pas parfaite, il apparaît que : i) un des blocs présente de notables imperfections au niveau des fentes, entraînant une largeur maximale de 80  $\mu\text{m}$  en moyenne ; ii) une fluctuation au niveau de l'homogénéité des microfaisceaux est notée, cependant celle-ci est réduite par rapport à celle présente avec le collimateur Archer.

L'espacement entre les microfaisceaux étant deux fois plus important avec ce collimateur, une irradiation avec un espacement à 200  $\mu\text{m}$  nécessitera 2 irradiations consécutives avec une translation latérale de 200  $\mu\text{m}$ . De même, une irradiation avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  nécessitera 4 irradiations consécutives avec une translation latérale de 100  $\mu\text{m}$  à chaque fois.

Le débit de dose, dans le pic, après le collimateur Tecomet, pour une largeur de microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$ , a été calculé par simulation Monte-Carlo comme étant de 80 Gy/s/mA, car ici seul la compensation de l'équilibre électronique est à prendre en compte.

### **II.7.1.3. Irradiations sans les collimateurs multifentes**

Certaines séries d'animaux ont été irradiées sans utiliser de collimateurs multifentes. Il s'agit soit des animaux irradiés avec un espacement entre les microfaisceaux impossible à obtenir avec ces collimateurs et qui nécessite donc l'irradiation en mode simple fente, soit des animaux irradiés en faisceau large (appelés par la suite seamless = « seam ») à des doses standards afin d'établir une comparaison avec les résultats de MRT.

Lors d'irradiation en mode simple fente, le montage expérimental reste le même (sans le collimateur bien entendu), et c'est l'ajout d'une fente supplémentaire verticale de 25  $\mu\text{m}$  qui permettra la formation d'un seul microfaisceau. Lors de l'irradiation d'un animal avec un espacement de 150  $\mu\text{m}$  dans une zone d'irradiation de 9,8 mm, l'animal sera donc irradié 65 fois avec un microfaisceau de 25  $\mu\text{m}$ , chaque irradiation étant suivie par une translation de 150  $\mu\text{m}$  de l'animal.

Lors des irradiations en faisceau large, les filtres restent les mêmes et seule l'ouverture verticale de la fente définissant la largeur du faisceau située avant la fenêtre de béryllium est réglée à 50  $\mu\text{m}$  au lieu de 500  $\mu\text{m}$  afin d'obtenir une vitesse d'irradiation compatible avec le goniomètre.

### II.7.1.4. Dosimétrie

Actuellement, il n'est pas possible de mesurer les doses vallée avec une grande précision, il faut donc s'appuyer sur la dose vallée calculée par la méthode Monte-Carlo (Figure 43). La dosimétrie théorique par simulation Monte-Carlo a été réalisée, pour nos expériences, par Erik Siegbahn afin d'obtenir les valeurs présumées de la dose dans les zones pic et vallée à la peau et au niveau de la tumeur [Siegbahn, 2007]. Ces calculs ont été faits pour 200  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$  d'espacement et pour des largeurs de microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  (Tableau 8).

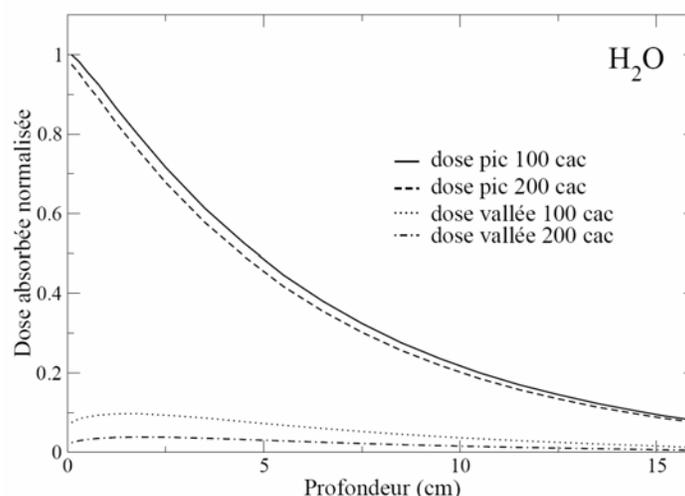


Figure 43 : Courbes représentant les variations des doses pic et vallée en fonction de la profondeur de pénétration à des espacements de 200  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$  à partir du spectre du faisceau de l'ESRF (taille de champs 3 x 3  $\text{cm}^2$  ; largeur des microfaisceaux : 25  $\mu\text{m}$ , cac = espacement centre à centre) [Siegbahn, 2007].

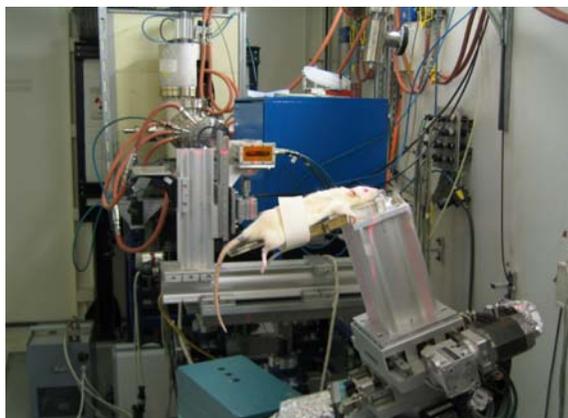
Espacement	Dose pic (Gy)		Dose vallée (Gy)		PVDR	
	200 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$	200 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$	200 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$
<b>Dose à la peau</b>	625	636	8.8	31.3	71	20
<b>Dose à la tumeur (implantée à droite)</b>	491	504	12.1	36.0	40,5	14
<b>Dose à la tumeur (implantée à gauche)</b>	533	545	12.6	38.5	42	14

Tableau 8 : Résultats de simulations Monte-Carlo permettant d'établir les doses à la peau et à la tumeur dans les zones pic et vallée après irradiation MRT à 625 Gy avec des microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  en fonction de leur espacement avec un champ d'irradiation de 10 x 10  $\text{mm}^2$ .

### II.7.1.5. Protocole d'irradiation en MRT

L'irradiation à lieu 14 jours après l'implantation, les points de suture encore présents sont retirés. Le rat anesthésié est positionné sur une plaque en plexiglas inclinée de 16°, réalisée à l'ESRF, où il est maintenu par les deux incisives supérieures. La tête du rat se trouve alors au

sommet d'un cercle de 90° monté sur un goniomètre à 3 axes de type Kappa (Huber, Germany) qui permet de conserver le centre de rotation une fois que celui-ci a été défini (Figure 44).



**Figure 44 : Position du rat sur la plaque de Plexiglas inclinée de 16° sur le goniomètre 3 axes de type kappa.**

Le rat est positionné perpendiculairement au faisceau. Sa position par rapport à la zone exacte d'irradiation est définie grâce à 3 lasers qui sont alignés d'une part avec le centre de rotation du goniomètre et d'autre part avec le faisceau synchrotron dans le plan horizontal et le plan vertical (Figure 45). Après l'alignement du rat, il est déplacé à l'aide des moteurs supérieurs afin que les lasers soient alignés avec le centre théorique de la tumeur (3, 5 mm à droite de la ligne sagittale et 10 mm en arrière des yeux). L'irradiation en elle-même est très courte et ne dure au total, pour le balayage vertical, que quelques secondes<sup>▲</sup>. L'irradiation latérale est généralement effectuée de la droite à la gauche du rat (sauf lors des deux premières sessions d'irradiation avec le collimateur Archer au cours desquels ce paramètre a été testé). Lors d'irradiation en faisceaux croisés, le support du rat pivote de 90° autour du centre de rotation (qui est également le centre théorique de la tumeur) et une seconde irradiation orthogonale à la première (sens antéro-postérieur) est réalisée. Le champ d'irradiation, que l'irradiation soit latérale ou antéro-postérieure, est large de 10 mm et haut de 11 à 12 mm dont 10 mm au niveau des tissus et 1 à 2 mm dans l'air.

---

<sup>▲</sup> Il est à noter que pendant le balayage, le tissu n'est exposé aux rayons que pour une fraction de seconde du fait de la hauteur du faisceau (0,5 mm).

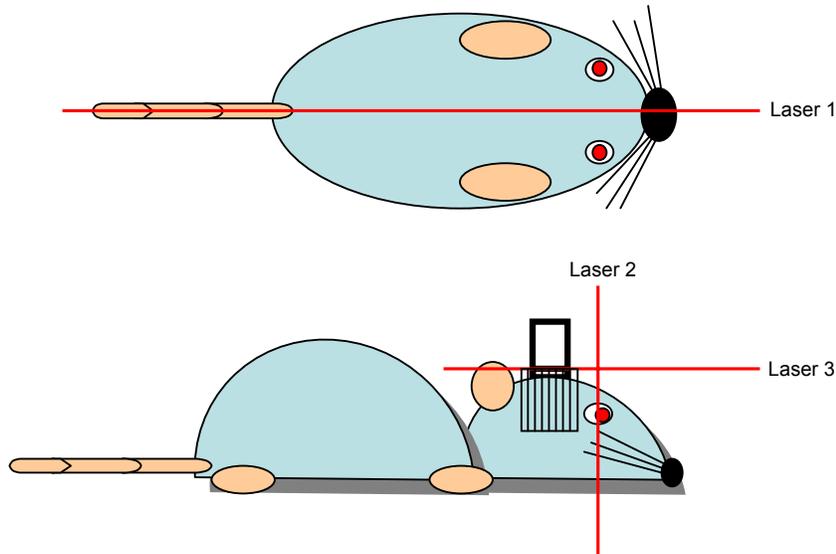


Figure 45 : positionnement du rat par rapport au faisceau. Le rat est positionné à l'aide des trois lasers : le premier laser allant d'avant en arrière sur le rat est centré au milieu du nez. Le second laser, vertical, est centré sur l'œil. Le troisième laser, horizontal, est aligné avec le centre du faisceau et définit le haut du champ d'irradiation qui commence 1 mm au dessus de la tête du rat. Le champ d'irradiation de MRT est représenté sur la figure de profil.

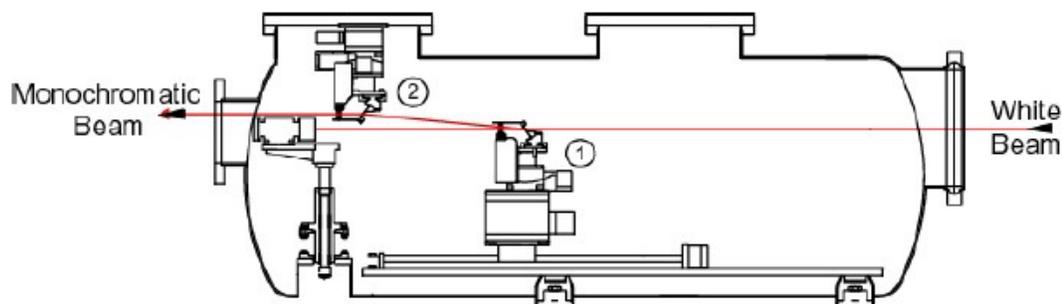
## II.7.2. Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (SSRT)

Pour les expériences de SSRT, les rats sont implantés soit avec  $10^3$  cellules F98 dans 5  $\mu\text{l}$  soit avec  $10^4$  cellules 9L dans 1  $\mu\text{l}$  à J0. A J13, les rats sont à nouveau anesthésiés et reçoivent 3  $\mu\text{g}$  de cisplatine dans 5  $\mu\text{l}$  de solution isotonique de NaCl injectés manuellement en intratumoral. A J14, les animaux sont irradiés au seuil K du platine puis imagés au seuil K de l'iode après injection intraveineuse de produit iodé. L'imagerie a lieu après la thérapie pour éviter que l'iode interagisse lors de l'irradiation. Toutes les anesthésies sont réalisées avec le protocole kétamine/xylazine.

### II.7.2.1. Le faisceau

Contrairement à la MRT qui utilise le faisceau directement issu du wiggler c'est-à-dire le faisceau blanc, la SSRT nécessite l'utilisation de longueurs d'onde précisément adaptées à l'élément lourd utilisé. Le réglage de l'ouverture du wiggler permet de faire une présélection de gammes d'énergie : plus il est ouvert, plus les énergies pourront être basses. Le faisceau

est alors filtré pour préserver les éléments optiques qui suivent. La sélection des longueurs d'onde est réalisée par le monochromateur de tomographie représenté ci-dessous (Figure 46).



**Figure 46 : Monochromateur de tomographie. Les deux cristaux sont en position 1 et 2.**

Ce monochromateur [Suortti, 2000] est constitué de deux cristaux de silicium Si (1 1 1), parallèles. Les cristaux sont montés en géométrie de Laue, c'est-à-dire en transmission. Le faisceau, après avoir été dévié d'un angle égal à  $2\theta$  par le premier cristal, est ramené dans le plan horizontal par le deuxième cristal. Les deux cristaux sont inclinés du même angle  $\theta(E)$  par rapport au faisceau incident. Le faisceau réfléchi par le premier cristal a un spectre centré sur la longueur d'onde  $\lambda_0(E_0)$  et de bande passante étroite (100 eV). Le second cristal conserve la même bande passante et renvoie le faisceau quasi monochromatique de longueur d'onde  $\lambda_0(E_0)$ , parallèle au faisceau blanc incident. En jouant sur la distance qui sépare les deux cristaux, le monochromateur devient réglable en énergie mais à sortie fixe : le faisceau sortant est horizontal avec un offset vertical quasi-constant de  $40 \pm 3$  mm par rapport au faisceau blanc quelle que soit l'énergie du faisceau. Le faisceau monochromatique est alors ajusté à la taille désirée à l'aide de fentes (soit pour ces expériences avec une largeur de 10 mm et une hauteur de 1 mm). Une translation de 1 mm entre chaque rotation permet d'ajuster la hauteur du champ d'irradiation. La dose d'irradiation dépend donc de la vitesse de rotation et de la hauteur d'irradiation. La dernière étape de l'alignement du faisceau est donc la définition du centre de rotation du faisceau au niveau duquel sera placé le centre théorique de la tumeur.

Deux campagnes d'irradiation de 2 jours ont été menées en SSRT avec des paramètres de faisceau différents. La première campagne a concerné les rats implantés avec des cellules F98, et la seconde campagne a concerné ceux implantés avec les cellules 9L (Tableau 9).

	Mode de remplissage	Ouverture du wiggler (mm)	Filtres	Énergie d'irradiation (keV)	Débit de dose (mGy/s/mA)	Zone d'irradiation (1 x h en mm <sup>2</sup> )
Session 1	16 paquets	40	2 mm de C 1 mm d'Al 1 mm de Cu	80,67	1,2	10 x 10
Session 2	200 mA	45	4 mm de C 3 mm d'Al	79,2 à 80,3	0,62 ou 0,83	10 x 10 ou 10 x 11

**Tableau 9 : Différents réglages des paramètres du faisceau lors des irradiations de SSRT. Avec un mode de remplissage de 16 bunchs, le courant varie de 90 mA à 50 mA en 6 heures (anneau rempli toutes les 6 h). Avec une mode de remplissage de 200 mA, le courant varie de 200 mA à 160 mA en 12 heures (anneau rempli toutes les 12 h).**

### II.7.2.2. Dosimétrie

L'homogénéité latérale de l'intensité du faisceau est tout d'abord vérifiée à l'aide du détecteur germanium utilisé pour l'imagerie (cf II.7.2.4.). La dosimétrie est ensuite réalisée au début de chaque journée d'expérience : une chambre d'ionisation (semiflex tube chamber 1,125 cm<sup>3</sup>, type TW 31002-1134, PTW, Freiburg) est fixée sur le support à l'endroit de l'irradiation (prenant ainsi en compte le diffusé dû à l'environnement) et elle est irradiée de nombreuses fois (entre 20 et 50) à travers le faisceau afin d'éviter toute erreur statistique. Le débit de dose (Gy.s<sup>-1</sup>.mA<sup>-1</sup>) dans l'air est ainsi mesuré (avec courant = courant de l'anneau de stockage) :

$$\text{Débit de dose dans l'air [Gy/s/mA]} = \frac{\text{dose mesurée}}{\text{nombre de passages} \times \text{temps de passage} \times \text{courant}}$$

Pour obtenir le débit de dose au niveau de la tumeur, il faut tout d'abord calculer le débit de dose à l'entrée des tissus en multipliant le débit de dose dans l'air, qui vient d'être mesuré, par le rapport des coefficients d'absorption en énergie des tissus et de l'air (= 1,078). Cette valeur est ensuite multipliée par le coefficient d'atténuation dans l'eau pour 1,5 cm (= 0,76) car la tumeur est considérée comme étant au centre d'une sphère, à 1,5 cm de profondeur. Ce résultat permet d'approcher la valeur du débit de dose au niveau de la tumeur. Le pourcentage d'erreur résultant de cette méthode de dosimétrie est estimé à 10%. Le temps nécessaire à l'irradiation pour une dose donnée à la tumeur pourra alors être calculé en fonction de l'intensité du courant présent dans l'anneau au moment de l'irradiation.

### II.7.2.3. Protocole d'irradiation en SSRT

Les irradiations ont été réalisées avec un rayonnement monochromatique ajusté un peu au dessus du seuil K du platine (Tableau 9). Les rats anesthésiés sont positionnés sur un cadre stéréotaxique en plexiglas dédié à l'irradiation et l'imagerie en rayonnement synchrotron. Le cadre est alors lui-même fixé en position verticale à l'intérieur de la cabine d'irradiation, selon un axe perpendiculaire au faisceau (Figure 47) sur un support de rotation initialement conçu pour l'irradiation des patients humains lors du protocole d'angiographie. Ce système permet un positionnement précis et un déplacement devant le faisceau durant l'irradiation ou l'acquisition d'images. Il est constitué d'un ensemble électromagnétique sophistiqué, à sept degrés de liberté et présente une excellente rigidité lors des mouvements de translation ou de rotation. L'axe de rotation est maintenu dans un cylindre de confusion de  $400 \mu\text{m}$  et la vitesse de rotation peut atteindre  $180^\circ \cdot \text{s}^{-1}$ . La vitesse maximale de translation verticale est de  $500 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$  avec une précision de 0,5%, sur une hauteur de 200 mm.

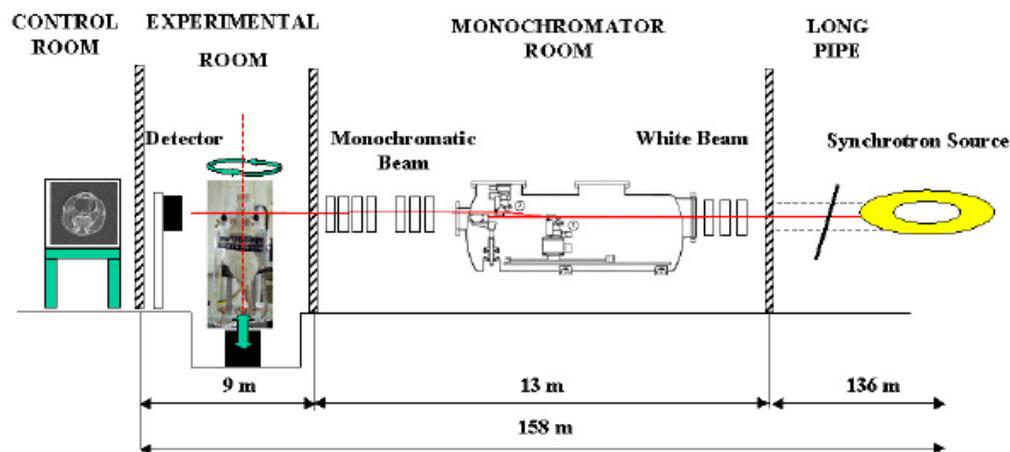
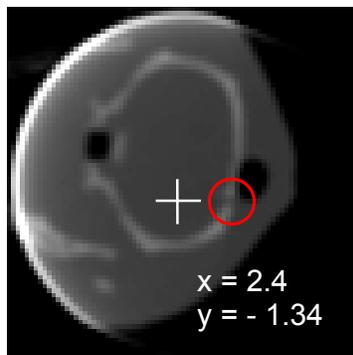


Figure 47 : Description du dispositif expérimental. Le faisceau blanc est acheminé grâce à un tube à vide de 136 m dans la salle des monochromateurs. Après la traversée des 2 cristaux, le faisceau monochromatique est amené à la salle d'expérience. Le rat se trouve à 6 m du détecteur germanium.

Une fois le support et le rat positionné, une première série de 10 images est réalisée sans agent de contraste en mode tomographique (CT) au niveau du crâne entre les barres d'oreilles et les yeux. Le trou d'implantation repéré dans l'os (Figure 48) est utilisé comme repère d'alignement : l'irradiation commencera 5 mm sous le trou d'implantation et finira 5 mm au dessus. La coupe sur laquelle se trouve le trou d'implantation servira à obtenir les coordonnées du centre de rotation qui seront obtenues en plaçant le curseur de la console au centre théorique de la tumeur sur l'image (Figure 48). En entrant ces coordonnées et la

hauteur de la coupe désirée, le centre de la tumeur sera déplacé au niveau du centre de rotation du faisceau et l'irradiation pourra commencer. Le rat est irradié sur 10 à 11 mm de hauteur par palier de 1 mm jointifs et sur 10 mm de large (hémisphère droit). La dose totale déposée au cours d'une rotation est de 15 Gy. Chaque rotation correspond à un palier et la vitesse de rotation est proportionnelle au débit de dose.



**Figure 48 : Image sans agent de contraste obtenue avant l'irradiation. Le trou d'implantation est visible dans le cercle rouge, et le curseur situé au centre théorique de la tumeur en indique les coordonnées en mm par rapport au centre de rotation.**

Une fois l'irradiation terminée le rat est retiré du cadre et il est mis en couveuse à 26-27°C jusqu'à son réveil.

#### **II.7.2.4. Imagerie post irradiation**

Lorsque les irradiations prévues dans la journée sont terminées, les paramètres de réglage du faisceau sont modifiés afin de pouvoir imager la tumeur. L'ouverture du wiggler est ajustée à 50 - 55 mm afin de pouvoir sélectionner une énergie légèrement supérieure au seuil K de l'iode : entre 33,3 et 33,9 keV, lors de ces expériences, afin d'obtenir un contraste maximal entre l'iode et les tissus. Le faisceau est filtré par 0,8 mm de C et 1 mm d'Al, et son homogénéité horizontale est à nouveau vérifiée.

Les animaux sont à nouveau anesthésiés afin de confirmer la présence de la tumeur par imagerie SRCT (Synchrotron Radiation Computed Tomography). Après avoir reçu une injection de 2 ml d'Ioméron 350 (Bracco S.P.A., Milan, Italie) dans une des veines caudales, les rats sont placés sur le support et verticalisés. Les images sont acquises 10 à 20 minutes après l'injection de l'agent de contraste. 20 à 30 coupes jointives de 0,5 mm de hauteur sont

alors réalisées après avoir défini la zone d'intérêt à l'aide d'une radiographie. La dose alors déposée n'excède pas les 200 mGy ce qui entre dans la marge d'erreur de 10% de la dose déposée lors de l'irradiation.

Le système de détection et d'acquisition des données utilisé est constitué d'un détecteur au germanium de haute pureté (Eurisys Mesures<sup>®</sup>, Lingolsheim, France) fonctionnant à température de l'azote liquide et d'une électronique de mesure (Novelec<sup>®</sup>, Meylan, France) de 16 bits permettant une mesure de signal sur 4 ordres de grandeurs [Elleaume, 1999]. Ce détecteur est conçu à partir d'un cristal monolithique de germanium de type P de 160 mm de long segmenté électriquement en deux lignes parallèles de 10 mm de haut, composées chacune de 432 pixels, et espacées de 0,5 mm. La taille de chaque pixel est de 0,35 mm de large et 10 mm de haut (Figure 49). L'épaisseur du cristal est de 2 mm ce qui lui confère une très bonne efficacité de détection ( $\approx 100\%$  à 33 keV et 45% à 99 keV). Il est caractérisé par une grande dynamique de mesure ainsi qu'une conversion photon-courant directe. De plus, l'effet prédominant dans le germanium est l'effet photoélectrique, le libre parcours des photoélectrons est donc très petit, ce qui évite la contamination du signal acquis sur une ligne par le signal acquis sur l'autre ligne, et également, la diaphonie entre pixels.

L'image sera reconstruite sur les consoles de la salle de contrôle à partir des données récoltées par ce détecteur et la présence de tumeur pourra être confirmée ou non. La résolution latérale est donc assujettie au détecteur (0,35 mm) alors que la résolution verticale dépend, elle, de la hauteur du faisceau (0,5 mm) puisque les pixels du détecteur ont une hauteur de 10 mm.

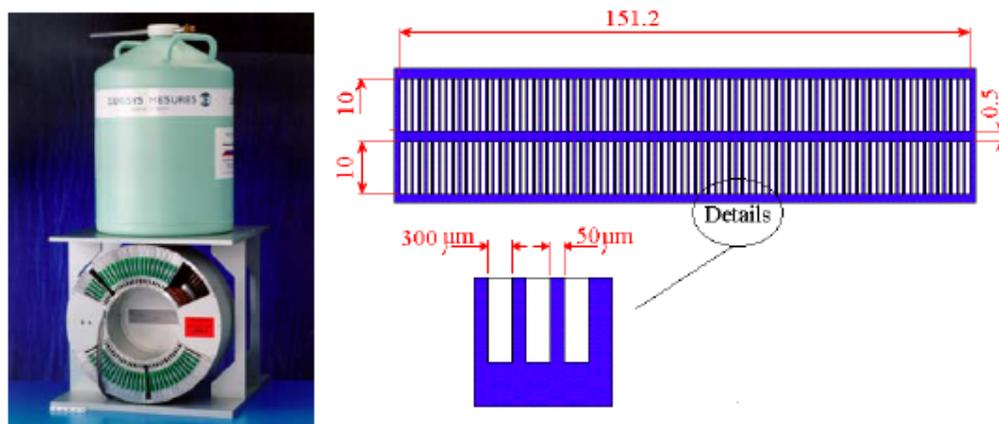
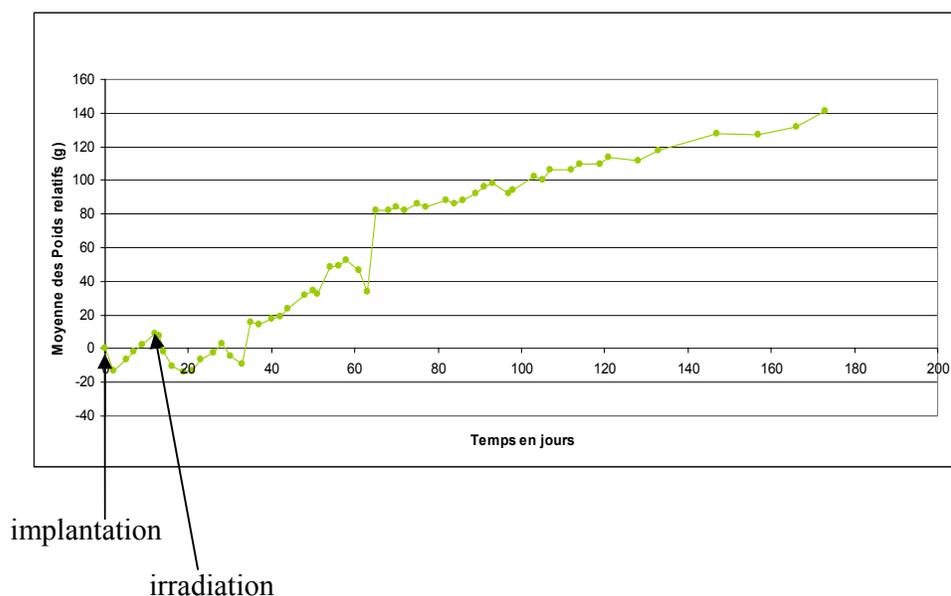


Figure 49: A gauche : photographie du détecteur germanium avec sa bonbonne d'azote liquide. A droite : représentation schématique du cristal avec ses deux lignes de détections. Les mesures en rouge de la figure en haut à droite sont en millimètre.

## II.8. Suivi des animaux

Après l'expérience, quelle qu'elle soit, les rats sont pesés trois fois par semaine. Lors de ces pesées et de passages réguliers, l'état clinique général est contrôlé et tous les signes cliniques anormaux sont relevés dont : la nervosité, l'inclinaison de la tête, la présence de spasmes, de crises épileptiformes, des parésies ou paralysies ou encore le fait de tourner lors de contention par la queue.

De la nourriture humidifiée est mise à disposition des animaux dont le poids baisse rapidement afin de faciliter la prise d'aliment. Les rats moribonds ou dont l'état clinique se détériore rapidement avec des signes cliniques irréversibles sont euthanasiés. Dans la majorité des cas ils sont retrouvés morts dans leur cage. Des courbes de poids relatifs moyens et des courbes de survie pour chaque série sont réalisées. Les courbes de poids relatifs moyens sont obtenues en calculant pour chaque rat la différence entre son poids au jour X et son poids à l'implantation puis en réalisant la moyenne des poids de chaque jour par série. L'analyse d'une courbe de poids typique montre une chute de poids après l'implantation due à l'anesthésie et une seconde chute de poids après l'irradiation due à l'anesthésie et l'irradiation (Figure 50).



**Figure 50: Courbe typique des moyennes de poids relatif présentant les deux chutes habituelles de poids après l'implantation et l'irradiation. Les autres cassures de la courbe correspondent à des décès de rat, durant la période de survie après irradiation. Cette courbe a été réalisée avec 6 rats.**

Une recherche bibliographique a été entreprise afin d'essayer d'établir un point limite acceptable pour cette expérience. E. Redgate *et al.* rapportent que si un rat perd du poids durant plus de 6 jours consécutifs, il entre dans une phase terminale de perte de poids irréversible [Redgate, 1991]. Cependant lors d'une des première session de MRT, un des rats après avoir perdu du poids durant 11 jours consécutifs et avoir atteint un poids de 186 g a regagné du poids et survécu 104 jours supplémentaires. Bien que l'observation de Redgate soit vérifiée dans la plupart des cas, il devient difficile de se fier à ce critère qui risquerait d'induire un biais négatif aux résultats expérimentaux. L'euthanasie a donc été pratiquée lorsque l'expérimentateur jugeait l'état clinique du rat irréversible. Afin de soulager les animaux dont l'état est mitigé, un protocole d'analgésie a été mis en place à l'aide d'une étudiante vétérinaire stagiaire et il est disponible à l'animalerie. Une mixture de 0,05 mg de buprénorphine (Temgesic® sublingual, Schering-Plough, Levallois-Perret, France) mélangé à de la confiture est distribuée aux rats en fin de survie une fois par jour. L'utilisation de buprénorphine ayant déjà été évaluée dans d'autres études [Flecknell, 1999], le choix de cette molécule semble approprié. Sur le panel de rats étudiés (test sur des rats contrôle), l'utilisation de buprénorphine n'augmente pas la survie des rats traités mais permet une meilleure stabilité du poids permettant de soulager l'animal en fin de survie (Annexe 1). Pour les courbes de survie, le jour de décès retenu est soit le jour effectif de leur mort, soit un jour après euthanasie. La médiane et la moyenne de survie (avec l'écart standard à la moyenne : SEM<sup>▲</sup>) sont calculées ainsi que le pourcentage d'augmentation de durée de vie ILS (Increased LifeSpan) et le pourcentage d'augmentation de durée de vie relative ILS<sub>re</sub> (Figure 51). Les courbes de survie sont comparées entre elles à l'aide du test statistique log-rank.

$$ILS = 100 \times \frac{(MeST)_s - (MeST)_c}{(MeST)_c} \qquad ILS_{re} = 100 \times \frac{(MST)_s - (MST)_c}{(MST)_c}$$

**Figure 51 : Définition de l'ILS et de l'ILS<sub>re</sub>, formule dans laquelle : MeST est la médiane, MST la moyenne, les animaux contrôles sont désigné par « c » et les animaux des séries analysées par « s ».**

---

<sup>▲</sup> SEM = Ecart type/ $\sqrt{N}$ , avec N= le nombre de rats dans la série.

## II.9. Histologie

Le laboratoire d'histologie a été mis en place pendant ce travail de thèse en collaboration avec des étudiantes en BTS anabiotech et en license. Les protocoles détaillés de toutes les opérations d'histologie sont présentés en annexe 2.

### II.9.1. Prélèvement et préparation des cerveaux

Après le décès des rats, les cerveaux sont prélevés en émiettant le crâne à l'aide d'une pince gouge introduite par le foramen occipital. Ils sont ensuite conservés minimum 10 jours dans du formol salé à 10%. Pour les rats ayant été irradiés par MRT, les cerveaux ainsi fixés sont ensuite trempés 24 h dans du PBS, enrobés dans un bloc d'agarose puis découpés en tranches horizontales de 2 mm d'épaisseur [Geiser, 1990] à l'aide d'un système fabriqué sur mesure, nommé « coupe-tranche »<sup>♦</sup>. Ce système est constitué 17 plaques en forme de U. La base de chaque plaque mesure 2 mm d'épaisseur et les côtés sont plus minces sur un bord, permettant de glisser une lame entre chaque plaque. Des tranches égales de ce qui est contenu au centre du bloc d'agarose sont ainsi obtenues (Figure 52). Chaque tranche est ensuite mise en cassette dans du formol jusqu'à l'étape de déshydratation. Ceci permet d'avoir accès à plusieurs niveaux du cerveau rapidement, entre autre pour contrôler la présence des microfaisceaux.

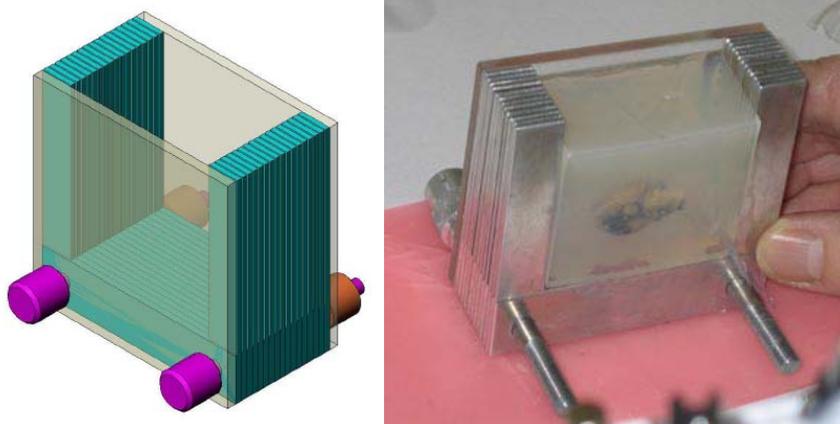


Figure 52 : A droite: plan du « coupe-tranche » pour sa fabrication. A gauche : un cerveau dans son bloc d'agarose positionné dans le « coupe-tranche », le bloc d'agarose est maintenu en place par les deux plaques de plexiglas et les 4 vis positionnés de part et d'autre des plaques. La présence de toutes les plaques est nécessaire, mais certaines peuvent être positionnées entre le plexiglas et les vis selon la taille du bloc d'agarose. Il ne faut pas que les vis soient serrées au maximum pour obtenir de belles tranches.

<sup>♦</sup> Plans originaux gracieusement fournis par l'Institut d'Anatomie de l'Université de Berne.

Les autres cerveaux de rats (contrôles ou irradiés en mode Seam ou SSRT) sont simplement coupés en deux longitudinalement et chaque moitié est placée dans une cassette.

## **II.9.2. Déshydratation**

Les cassettes sont ensuite placées dans le premier bac d'un processeur à tissu STP 121 (Microm, France) afin de déshydrater<sup>▲</sup> les tissus contenus à l'intérieur. Le protocole de déshydratation mis en place est le suivant : premier bain de 1h30 dans du formol à 4%, puis deux bains d'Ottix shaper (éthanol + bleu de méthylène : Diapath, Martinengo, Italie) de 1 heure et 30 minutes, respectivement. Les tissus passent ensuite dans 7 bains d'Ottix (substituant du xylène et du toluène, sans hydrocarbure : Diapath, Martinengo, Italie) de 1h30 chacun et le processus s'achève par 2 bains de paraffine de 1h30. Ce protocole à l'avantage d'utiliser très peu de produits différents (au lieu des nombreux bains d'alcool dégressifs). Cependant à cause de la haute teneur en lipide des cerveaux, les produits saturent très rapidement. Il n'est donc pas possible de déshydrater plus de 8 cerveaux à la fois et un protocole de rotation des bains d'Ottix shaper et d'Ottix a dû être mis en place pour éviter la détérioration des tissus : le premier bain d'Ottix shaper est jeté et le second bain prend sa place, il est lui-même remplacé par un nouveau bain ; de même, les deux premiers bains d'Ottix sont jetés et tous les bains suivant décalés de deux places vers l'avant, les deux derniers bains sont remplacés par du produit neuf.

## **II.9.3. Inclusion, coupe et coloration**

Les échantillons sont ensuite inclus en paraffine à l'aide d'un centre d'inclusion EC-350 (Microm, France) comprenant une fontaine à paraffine et une plaque de refroidissement. Les cassettes de paraffine sont ensuite coupées avec un microtome HM340 E (Microm, France) à une épaisseur de 7 µm. Les coupes de cerveaux ainsi obtenues sont placées 1h à 1h30 dans une étuve à 60°C avant d'être colorées. La coloration Hématoxyline Eosine (HE) classique a été utilisée pour cette étude afin de visualiser les cytoplasmes et les noyaux cellulaires. Brièvement, les coupes sont déparaffinées à l'aide de 2 bains d'Ottix puis plongées dans

---

<sup>▲</sup> Les cerveaux des rats des premières expériences (collimateur Archer) ont été déshydratés, inclus et parfois colorés et monté au service d'anatomie- pathologie du CHU de St Etienne.

l'alcool afin de rendre les coupes miscibles aux solutions aqueuses de coloration. Après un rinçage à l'eau, un bain d'eau et carbonate de lithium (40 ml) et un nouveau rinçage à l'eau, les lames sont plongées pendant 2 minutes dans l'hémalum (Diapath, Martinengo, Italie) puis rincées trois fois à l'eau avant un nouveau bain dans de l'eau additionnée de carbonate de lithium (4 ml) pour le bleuissement de l'hémalum. Suite à un nouveau rinçage à l'eau, les lames sont ensuite plongées dans l'éosine à 1% (Diapath, Martinengo, Italie) puis rincées 3 fois à l'eau et passent ensuite successivement dans 2 bains d'alcool absolu puis 2 bains d'Ottix. Après la coloration, des lamelles sont collées à l'aide de Pertex (Histolab, Groslay, France) pour protéger les échantillons.

#### **II.9.4. Analyse**

Une à deux lames par rat, situées là où la section théorique de la tumeur est la plus grande sont analysées sur un microscope optique U-D03 (Olympus, Lyon, France). Les principaux critères d'étude microscopique sont : la présence de la tumeur, sa taille, l'état du tissu sain (présence ou non d'altérations spongiformes, télangiectasie, radionécrose ou microcalcifications<sup>▲</sup>) et la présence ou non des microfaisceaux pour les rats MRT. Seul un nombre limité de rats sera analysé par série en histologie, sauf dans le cas des expériences effectuées avec le collimateur Archer (III.2.1.) où tous les rats sont analysés.

---

<sup>▲</sup> Altérations spongiformes : tissu cérébral sain d'aspect spongieux.

Télangiectasie : dilatation de la lumière des vaisseaux sanguins.

Radionécrose : perte de substances d'un tissu due à l'emploi des rayons x ou des corps radioactifs.

Microcalcifications : formations calciques < 1 mm.

# **Résultats et Discussion**



# III. Importance des paramètres d'irradiation en MRT

## III.1. Contexte de l'étude

Les deux premières expériences de MRT traitant des rats porteurs de tumeur cérébrale 9L, publiées en 1998 [*Laissue, 1998*] et en 2002 [*Dilmanian, 2002*], ont prouvé l'efficacité de la MRT en rapportant des pourcentages de survie à long terme de l'ordre de 40% avec des protocoles d'irradiation unidirectionnelle. Ces travaux ont été réalisés au NSLS de Brookhaven avec un collimateur simple fente. En 2003, début de ce travail de thèse, la ligne médicale de l'ESRF disposait du 1<sup>er</sup> collimateur multifentes utilisable pour la MRT (collimateur Archer : [*Archer, 1998*]), et des expériences sur animaux sains avaient été réalisées [*Laissue, 2001 ; Laissue, 1999 ; Schweizer, 2000*] par des utilisateurs. Devant un nombre croissant de demandes de temps de faisceau, il a semblé important d'acquiescer en interne à l'ESRF une expertise en MRT préclinique, l'équipe locale étant déjà formée en instrumentation et dosimétrie.

La MRT est une technique de thérapie combinant deux modalités non utilisées en radiothérapie conventionnelle : un fractionnement micrométrique et l'emploi de doses à la peau très élevées, en une seule irradiation. De plus, c'est une technique dépendant de très nombreux paramètres. Pour toutes ces raisons, il a semblé judicieux de commencer par des protocoles simples permettant de mettre en évidence l'influence de certains paramètres, en vue d'optimiser ensuite les protocoles. L'influence des paramètres suivants a été testée : espacement des microfaisceaux, collimateur, dose pic, taille des microfaisceaux, géométrie d'irradiation et fractionnement temporel.

## III.2. Résultats

### III.2.1. La technique de base conçue pour le collimateur Archer

L'espace des microfaisceaux a été testé, afin de définir la taille la plus adaptée pour permettre à la fois une efficacité thérapeutique sur la tumeur et une préservation du tissu sain. Des irradiations unidirectionnelles ont été réalisées 14 jours après implantation de tumeurs 9L dans le cerveau de rats Fischer, en utilisant le collimateur Archer. Les microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  étaient espacés soit de 200  $\mu\text{m}$  soit de 100  $\mu\text{m}$  et la dose utilisée était de 625 Gy. Les résultats sont soumis dans la revue scientifique « Physics in Medicine and Biology ».

En résumé, 5 séries de rats ont été irradiées en 2 sessions. 3/5 séries ont été irradiées selon les paramètres 625/200/25<sup>▲</sup> soit de la gauche vers la droite (2 séries, une à chaque session appelées 200LR1 et 2), soit de la droite vers la gauche (200RL). Une série a été irradiée à 625/100/25 de la droite vers la gauche (100RL) et une série de rats a été irradiée en mode faisceau large, c'est-à-dire sans collimateur multifente, à une dose de 20 Gy (SEAM).

La série de rats irradiés avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  présente une médiane et une moyenne de survie fortement augmentées par rapport à celles des rats contrôle ( $ILS_{re} = 272,8\%$  et  $ILS = 235\%$  ; différence significative avec  $p < 0,0001$ ) et par rapport à celles des rats irradiés en faisceau large (SEAM : moyenne = 41,1 jours et médiane = 37,5 jours ; 100RL : moyenne = 72,7 jours et médiane = 67 jours ; différence significative avec  $p = 0,0015$ ). Cependant, la courbe de poids moyen de ces rats n'augmente jamais véritablement, oscillant autour de sa valeur originelle, et nombre d'entre eux (8/11) présentent des désordres neurologiques (principalement une hyperexcitation). Au contraire, les rats irradiés avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  ne bénéficient pas d'une augmentation de survie par rapport aux rats SEAM mais 2 d'entre eux (1 dans la série 200LR1 et 1 dans la série 200RL) seront guéris de leur tumeur et bénéficieront de la survie normale d'un rat Fischer (soit  $\approx 2$  ans) alors qu'aucun rat SEAM ne bénéficie de cette survie exceptionnelle. Ces deux survivants à long terme ne présenteront aucun trouble clinique particulier et leur poids augmentera régulièrement. De plus, si les 3 séries irradiées avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  sont regroupées, seuls 3/32 rats présentent des signes cliniques neurologiques.

Pour l'analyse histologique, une méthode de mesure des dommages a été mise au point en utilisant 3 critères principaux évalués par un indice de lésion allant de 0 (absence, pas de

---

<sup>▲</sup> Rappelons que par convention, les principaux paramètres de MRT seront présentés comme suit : **Dose (Gy) / espacement entre les microfaisceaux ( $\mu\text{m}$ ) / largeur des microfaisceaux ( $\mu\text{m}$ ).**

dégâts) à 4 (très forte présence, dégâts très élevés). Ces trois critères : les altérations spongiformes, la téléangiectasie et les microcalcifications, ont été évalués entre 1,54 et 2,45 pour les rats irradiés avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$ . Cet indice de lésion élevé confirme les éléments apportés par la courbe de poids et les signes cliniques qui montrent une irradiation trop délétère pour le tissu sain. A 200  $\mu\text{m}$ , les indices de lésion, compris entre 0,21 et 1,28 restent inférieur à l'indice le plus bas de la série irradiée avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$ . L'indice de lésion histologique peu élevé, la courbe de poids des rats survivants à long terme et le faible nombre de rats présentant des signes cliniques démontrent l'innocuité d'une irradiation en MRT avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$ , permettant de guérir un faible nombre d'individus.

La dose vallée joue ici un rôle primordial dans la compréhension des différentes médianes de survie. Lors de l'irradiation avec un espacement à 100  $\mu\text{m}$ , la dose vallée est beaucoup plus élevée que la dose délivrée en faisceau large (SEAM) (38,5 Gy et 20 Gy à la tumeur, respectivement). Au contraire, la dose vallée lors d'irradiation avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  est inférieure à la dose en faisceau large (12,6 Gy et 20 Gy à la tumeur, respectivement). Pourtant les rats irradiés avec l'espacement de 200  $\mu\text{m}$  ont une médiane de survie équivalente à celle des rats SEAM et certains d'entre eux deviennent des survivants à long terme.

En conclusion, pour un espacement de 100  $\mu\text{m}$ , malgré une médiane de survie 3 fois plus élevée que la médiane de survie des rats contrôle et 2 fois plus élevée que celle des rats SEAM, les dommages causés aux tissus sains sont importants (mauvaise courbe de poids, nombreux signes cliniques et lésions des tissus sains à l'analyse histologique). Par contre, bien que la médiane de survie obtenue avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  ne soit pas supérieure à celle obtenue avec chez les rats SEAM, elle correspond aux résultats publiés [Smilowitz, 2006] et ne cause pas de dommages importants aux tissus sains. En résumé, la série à 100  $\mu\text{m}$  d'espacement peut être considérée comme une sorte de limite thérapeutique supérieure alors que la série à 200  $\mu\text{m}$  peut correspondre à une limite inférieure.

Cette étude illustre l'équilibre entre la conservation du tissu sain et le contrôle de l'évolution de la tumeur en faisant varier un seul paramètre (l'espace entre les microfaisceaux). Ces données sont fondamentales afin d'orienter les futurs protocoles. Dans la suite du travail, l'espacement de 200  $\mu\text{m}$  a été retenu et de nouvelles géométries d'irradiation ont été testées afin d'optimiser les effets géométriques du faisceau, propre à la MRT. Des études ont été également menées sur l'ajout de différents types de drogues aux protocoles d'irradiation de MRT afin d'obtenir des effets supra- additifs.



# **Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar X-ray beams from a synchrotron: balance between curing and sparing**

**Short title: Synchrotron microbeams radiotherapy of 9L tumors**

Pierrick Regnard<sup>1</sup>, Géraldine Le Duc<sup>1</sup>, Elke Bräuer-Krisch<sup>2</sup>, Irène Troprès<sup>3</sup>, Erik A. Siegbahn<sup>2</sup>, Audrey Kusak<sup>2</sup>, Charlotte Clair<sup>1</sup>, Hélène Bernard<sup>1</sup>, Dominique Dallery<sup>1</sup>, Jean A. Laissue<sup>4</sup> and Alberto Bravin<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Biomedical Facility, <sup>2</sup>Biomedical Beamline, ESRF, BP220, F 38043 Grenoble

<sup>3</sup>MRI Unit, CHU A Michallon, BP217, F 38043 Grenoble

<sup>4</sup>Institute of Pathology, University of Bern, Murtenstrasse 31, Postfach 62, CH-3010 Bern

Corresponding author:

Géraldine Le Duc

E.S.R.F. - BP220

38043 Grenoble - France

Tel: 33(4)76882783

Fax: 33(4)76882542

E-mail: leduc@esrf.fr

<http://www.esrf.fr/>

**Abstract :**

The purpose of this work was the understanding of Microbeam Radiation Therapy at the ESRF in order to find the best compromise between curing of tumors and sparing of normal tissues, to obtain a better understanding of survival curves and to report its efficiency. This method uses synchrotron-generated X-ray microbeams. Rats were implanted with 9L gliosarcoma and the tumor was diagnosed by MRI. They were irradiated 14 days after implantation by arrays of 25  $\mu\text{m}$ -wide microbeams in unidirectional mode, with a skin entrance dose of 625 Gy. The effect of using 200 or 100  $\mu\text{m}$  center-to-center spacing between the microbeams was compared. The median survival time (post-implantation) was 40 and 67 days at 200 and 100  $\mu\text{m}$  spacing, respectively. However, 72% of rats irradiated at 100  $\mu\text{m}$  spacing showed abnormal clinical signs and weight pattern, whereas only 12% of rats were affected at 200  $\mu\text{m}$  spacing. In parallel, histological lesions of the normal brain were found in the 100  $\mu\text{m}$  series only. Although the increase in lifespan was equal to 273% and 102% for the 100 and 200  $\mu\text{m}$  series, respectively, the 200  $\mu\text{m}$  spacing protocol provides a better sparing of healthy tissue and may prove useful in combination with other radiation modalities or additional drugs.

**key words:** 9L gliosarcoma; synchrotron; microbeam radiation therapy; histology; survival curves.

## INTRODUCTION

Gliomas are among the most frequent primary brain tumors in adults, with an incidence of approximately 5-11/100,000 among the general population per year in industrial countries (Legler *et al.*, 1999). The advent of imaging techniques has made an early diagnosis possible. However, the treatment of high-grade gliomas is palliative rather than curative, despite a combination of surgery, chemotherapy and radiotherapy. Gliomas are extremely radioresistant, while surrounding normal tissues remain radiosensitive especially in children. The median survival for patients with glioblastoma multiforme is less than 1 year, and generally no patients survive 5 years after treatment (Behin *et al.*, 2003).

Synchrotron facilities, in particular the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) emerged as complementary tools for research in radiotherapy by proposing 2 new experimental techniques. First, Microbeam Radiation Therapy (MRT) differs from other techniques by employing microscopic beams (typically few micrometers wide) than the smallest radiation beam used in hospitals (typically from several millimeters to centimeters wide). This concept is technically feasible thanks to the use of highly intense synchrotron X-ray beams, with a sufficient high energy (allowing a deep penetration in tissue and a high skin entry dose typically equal to 600 Gy), a negligible divergence (allowing the production of sharply defined beam edges in tissues) and high flux (allowing a fast irradiation process in order to prevent motion artifacts of the subject). Second, thanks to the high fluence of synchrotron beams ( $10^5$  times higher than conventional sources) (Suortti and Thomlinson, 2003) a sufficient residual monochromatic beam tuned over tens of keV allows Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy (SSRT) in rats. This property was applied to rats bearing gliomas by combination of computed tomotherapy and (i) intravenous injection of iodine (to produce a dose enhancement) (Adam *et al.*, 2006) (ii) intracerebral injection of cisplatin (to produce both a dose enhancement and a chemotherapy) (Biston *et al.*, 2004).

The MRT technique was invented and applied in the nineties at the National Synchrotron Light Source (NSLS, Brookhaven National Laboratories, New York) (Slatkin *et al.*, 1992; Slatkin *et al.*, 1994; Slatkin *et al.*, 1995). Its principle had been discovered in the fifties (Curtis, 1967). A microscopically narrow beam (25 - 40  $\mu\text{m}$ ) of ionizing radiation (22 MeV deuteron) that delivered around 3000 Gy caused cell death along the beam path in the mouse cortex while a larger beam (1 mm) that delivered about 150-300 Gy destroyed the tissue in its path. This dose-volume effect relationship was attributed to the narrowness of the beams.

It has been hypothesized that the tumoricidal effect of unidirectional microbeams was due to the inhibition of the vascular regeneration within the tumor. At the opposite, non irradiated endothelial cells between the irradiated zones could be able to repair rapidly the microvasculature of the irradiated

normal tissue (Slatkin *et al.*, 1995; Laissue *et al.*, 1998; Dilmanian *et al.*, 2002). Moreover, no change in blood volume and vascular density were detected in the irradiated microbeam slice of normal brain tissue after a 312 Gy and 1000 Gy exposure (Serduc *et al.*, 2006).

Previous experiments performed on the brain of adult rats (Slatkin *et al.*, 1995) suckling rats (Laissue *et al.*, 1999), duck embryos (Dilmanian *et al.*, 2001) and piglets (Laissue *et al.*, 2001) highlighted a sparing effect on normal tissues when using microbeams. In parallel, it was shown that MRT protocols can preferentially ablate 9L brain tumors (Laissue *et al.*, 1998; Dilmanian *et al.*, 2002), EMT-6 carcinoma (Dilmanian *et al.*, 2003) and SCCVII carcinoma (Miura *et al.*, 2006). Most of these studies concerning the cure of brain tumors were performed by multiple translations of a single slit. An adjustable multislit collimator, the Archer collimator (Archer, 1998), allowing simultaneous irradiation of many microbeams, was used for experiments at ESRF focused on normal brain tolerance (Laissue *et al.*, 1999; Laissue *et al.*, 2001). Recently, results were obtained with that multislit collimator on 9L gliosarcoma (Smilowitz *et al.*, 2006).

The purpose of this work was to optimize ESRF preclinical protocol and to compare it to protocols used at NSLS (Laissue *et al.*, 1998) in order to find the best compromise between tumor cure and sparing of normal tissues. This was assessed by a fine correlation between survival curves, follow up of animals and histological analysis.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Intracerebral models in rat brain*

The 9L gliosarcoma cell line (Coderre *et al.*, 1994b) was established by Benda *et al.* (Benda *et al.*, 1971). Cells were grown with complete medium at 37°C. The male Fisher 344 rats (180-280 g, Charles River, L'Arbresle, France) were anesthetized with 4% isoflurane inhalation followed by an intraperitoneal injection of 400 mg/kg of chloral hydrate. They were placed on a stereotactic head holder (model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, USA). At D0,  $10^4$  cells were suspended into 1  $\mu$ l DMEM with antibiotics (1%) then injected using a 1  $\mu$ l Hamilton syringe through a burr hole in the right caudate nucleus (9 mm anterior to the ear-bars i.e. at *bregma* site, 3.5 mm lateral to the midline, 5.5 mm depth from the skull) (Kobayashi *et al.*, 1980; Paxinos and Watson, 1986). All delays expressed in the manuscript are post-implantation. All operative procedures related to animal care strictly conformed to the Guidelines of the French Government with licenses 380324/380456 and A3818510002 and were reviewed by the Comité d'Éthique Régional Rhône-Alpes.

### *MRI*

The rats underwent an MRI examination between D9 and D12. Images were acquired without contrast agent injection (in order to avoid any possible interaction between contrast agent and MRT) using a 3 Tesla Bruker imaging system coupled with a bird cage radiofrequency coil by applying a T<sub>2</sub> weighted

Turbo RARE SE sequence (TE = 117.2 ms, TR = 2265 ms, Field Of View = 21.6 cm, matrix: 256 x 240, pixel size: 0.8 mm, Slice Thickness=1.3 mm). The diagnosis of the tumor was performed by measuring the size of edema surrounding the tumor. The height and width of tumors were measured on the image where the tumor had the largest section. The deepness of the tumor was estimated by using the number of slices clearly showing tumor presence. The tumors were considered as ellipsoids.

#### *Synchrotron based MRT*

At the ESRF, one beamline has been dedicated to biomedical research and is described elsewhere (Ellemaume *et al.*, 1999). The X-ray flux delivered by the ESRF storage ring exceeds the flux of a tungsten-anode x-ray tube by 5 orders of magnitude.

The present MRT study uses a white beam spectrum with its maximum intensity at 83 keV (mean energy = 100 keV, critical energy = 33 keV) filtered by Be: 0.5 mm, Cv (vitrous carbon): 1.5 mm, Al: 1.5 mm, Cu: 1.0 mm. Thus, the dose rate is equal to 86 Gy/s/mA. The Archer multislit collimator (Archer, 1998) was placed at 33 m from the source. This collimator is described elsewhere (Brauer-Krisch *et al.*, 2003). For this experiment, the collimator was set to produce an array of 51 vertical microbeams of 25  $\mu\text{m}$  wide (figure 1a). A 500  $\mu\text{m}$  vertical opening slit was positioned before the rat, in order to remove scattering and to define the height of the microbeams.

At D14, the rats were positioned on a home made holder and fixed by the teeth on top of a 90 degree circle mounted on a 3-axis, Kappa-type goniometer (Huber, Germany). Rats were placed perpendicularly to the beam, and 3 lasers allowed a reproducible positioning (figure 1b). The irradiation was performed by a vertical translation through the beam. A fast shutter system (Renier *et al.*, 2002), positioned upstream the multislit collimator is synchronized with the vertical translation of the goniometer. The delivered dose is specified thanks to the preselection of the vertical translation speed (figure 1a). The duration of the entire irradiation was around 1 second and it was adjusted as a function of the ring current decrease.

#### *Dosimetry*

The high dose in the microbeam area is called peak dose, while the dose between 2 microbeams is called valley dose. For each rat, a radiochromic film (Gafchromic, HD-810) was positioned between the multislit collimator and the rat head (Butson *et al.*, 2002). The inspection and readout of the films ensures the quality of the irradiation. Moreover, a quantitative analysis was performed by evaluating the optical densities in the peaks and valleys, using a microdensitometer (JL Automation). This technique is known to be problematic for such small spot sizes. Dosimetry of the spatially non-fractionated beam is done with the help of ion chambers providing correct information for the peak dose, but the valley dose is still purely based on Monte Carlo calculations (Brauer-Krisch *et al.*, 2005; Brauer-Krisch *et al.*, 2003).

### *Experimental groups*

All rats treated by MRT received a skin entrance dose of ~625 Gy in each single exposure. They were irradiated laterally in an inclined position with a pitch of 16 degrees. Fifty-one microbeams with an average width of 25  $\mu\text{m}$  were produced. As described in Table 1, 32 rats were irradiated by using a 200  $\mu\text{m}$  center-to-center spacing either from left to right (200LR1/200LR2 series) or right to left, in order to irradiate the tumor first (200RL series). 11 rats were irradiated from right to left with a 100  $\mu\text{m}$  center-to-center spacing (100RL series) by performing 2 subsequent irradiations (i.e. 102 microbeams) with a lateral translation of the rat holder of 100  $\mu\text{m}$  between the irradiations. For all rats, the field of irradiation was 11 mm high and 10 mm wide, centered on the tumor, with a 1 mm overlap with air at the top of the skull. For the group with a spacing of 200  $\mu\text{m}$ , the valley dose at the tumor was 12.1 Gy while for the 100  $\mu\text{m}$  group, the valley dose at the tumor is about 36 Gy. This correspond to a factor of 3, while the total averaged dose from the 200  $\mu\text{m}$  group were only half, if compared with the 100  $\mu\text{m}$  group. In the Broad Beam group, rats were irradiated with a homogeneous synchrotron beam (11 x 10 mm<sup>2</sup>) with a skin entry dose of ~20 Gy. Control rats (CTRL series) were not irradiated while bearing a tumor. 200LR1, Broad Beam and CTRL were performed during the first set of experiments. Treatment of 200LR2, 200RL and 100RL series was performed during a different experimental session. The series HISTO14 includes rats that were not irradiated but sacrificed at D14 for histology.

### *Survival analysis*

The clinical status of the rats was checked 3 times/week. For each rat, the weight at day D minus the weight at day D0 was calculated. Then, the relative average body weight was calculated for each series. Signs such as weakness, inability to feed, excitability and physical hyperactivity, ataxia, hemiparesis, balance disorders, convulsions, chromodacryorrhea were recorded. At a later tumor stage, rats were euthanized by intra-cardiac injection of pentobarbital sodium less than 1 day before their anticipated death as judged by clinical signs (Laissue *et al.*, 1998). Some of them were found dead. The time between implantation and death was recorded as survival time (one day was added for euthanized rats). The mean  $\pm$  Standard Error of the Mean (SEM) and the median survival time post implantation were calculated and Kaplan Meier survival data were plotted versus time after tumor implantation. The increase in lifespan in percent (%ILS) characterizes the difference between median survival time for treated and untreated rats divided by the median survival time for untreated rats. The relative increase in life span (%ILSre) can be calculated accordingly by replacing the “median” by the “mean” survival time. The survival curves were compared using the log-rank test.

### *Histopathology*

The irradiated brains were sampled, fixed in 10% formalin and prepared as described elsewhere (Geiser *et al.*, 1990). Subserial coronal sections around 5  $\mu\text{m}$  thick were cut and stained by hemalum and eosin. The brains from the CTRL and Broad Beam series were manually sliced in 2 coronal slabs and embedded in paraffin. The long and short axes of the tumors were measured on the section where the tumor appeared to be the largest. The index of the various histological features (figure 2) was recorded according to the frequency of their occurrence (absent: 0, frequency low: 1, medium: 2, high: 3, very high: 4) and averaged for each experimental group.

## **RESULTS**

### *MRI*

Tumors were diagnosed in 100 % of the rats. As expected, the volume of the tumor increased as a function of time (table 1). The average tumor volume was around 12  $\text{mm}^3$  (n=12) at D9 and it reached 94  $\text{mm}^3$  at D12 (n=20).

### *Survival curves*

As shown in figure 3, CTRL rats exhibited a mean survival time equal to 19.5 ( $\pm$  0.34) days and a median survival time equal to 20 days. The difference between survival curves for irradiated series versus CTRL series was significant ( $p < 0.0001$ ). The Broad Beam rats survived 41.1 ( $\pm$  3.32) days (ILSre = 110.8 %, ILS = 87.5%). All the 200  $\mu\text{m}$  spacing series displayed survival curves and median survival times close to those of the Broad Beam series (median survival time = 37.5 days for the Broad Beam and 40, 42 and 38.5 days for the 200LR1, 200LR2 and 200RL, respectively). The difference appears at the end of the survival curves: the presence of long-term survivors (survival>D100) in series 200LR1 and 200RL (n=1 for each series, >D600) is responsible for a high ILSre value (379% and 446.6%, respectively). In Broad Beam and 200LR2 series, no rats survived beyond D60. The 100RL series was different from the others: the difference between this series and the Broad Beam ones was significant ( $p=0.0015$ ). As 60% of rats were still alive at day 60, this series displays a median survival time of 67 days and an ILS of 235%. That is twice the ones of the other irradiated series (87.5 days for Broad Beam and 100, 110, 92.5 days for 200LR1, 200LR2 and 200RL, respectively). It has to be noted that the difference between 100RL series and 200LR2 was significant ( $p=0.0028$ ) while it was not for 200LR1/200RL, probably due to the presence of long-term survivors. Altogether, three long-term survivors were observed: C3 (200LR1), C54 (200RL) and C95 (100RL); they died at D678, 731, 158 respectively.

### *Follow-up of animals*

A few days before euthanasia, CTRL rats exhibited clinical signs typical for the presence of a brain tumor: chromodacryorrhea, tarnished hairs, prostration, weakness. For the 200LR1/200LR2/200RL series, 3/32 rats exhibited neurological disorders. All other rats behaved normally. Moreover, they exhibited typical signs of tumor presence a few days before their death. However, in the case of 100RL, the clinical status was always worse than that of irradiated rats from 200LR1/200LR2/200RL; the number of rats with an impaired status was higher. In particular, 8/11 rats had neurological disorders. In the Broad Beam series, rats were apathetic, contrary to other series (6/12). Generally speaking, 10-14% of the 32 rats irradiated with 200  $\mu\text{m}$  spacing (200LR1, 200LR2 and 200RL) were affected by neurological signs versus 72% of the 11 rats in the 100  $\mu\text{m}$  spacing group (100RL).

### *Weight study*

The evolution of the relative average body weight can be divided in several phases (figure 4A). All rats exhibited a comparable pattern between implantation and irradiation. All series showed a decrease of the relative average body weight between D14 and D20, i.e. after irradiation. Thereafter, all rats gained some weight except rats of 100RL, showing an oscillating pattern, although no death occurred during that period. After a transient weight loss up to day 40, the animals in 200LR1/200LR2/200RL exhibited a spurious enhancement of the relative average body weight curve slopes as many cachectic rats died between D30 and D60. For 100RL, the oscillating pattern was related to the death of rats as well as to individual behaviours (figure 4B). It has to be stressed that the relative average body weight of rats from 100RL oscillated around a zero relative value while rats of others series have constant or linear progression. Note that around D60, the 200LR1 and the 200RL series concerned only one single individual (C03 for 200LR1 and C54 for 200RL) while a single long-term survivor, C95, emerged in the 100RL series at D95.

### *Histopathologic analysis (figure 2)*

*Histological features of the 9L model at late stage and at day 14.* At late stages (CTRL, n=3/6) the tumors invaded the hemisphere with an average cut surface area of 35.3  $\text{mm}^2$ . They were well defined with some microscopic extensions invading normal tissue. Some of the tumors were organized as a few connected islands. Three areas can be depicted: (i) an irregular central necrotic area with digitations directed towards the periphery (ii) a viable area with high cellular density, many mitotic figures and a loose interstitium (iii) a highly vascularized external part. Blood vessel distribution was inhomogeneous and the vascular lumen was wide. Some pseudo-palisading patterns could be observed around necrotic digitations. Also, the normal tissue close to the tumor exhibited teleangiectases and hemorrhages of grade 1. The smallest tumors were seen in the HISTO14 series with typical cut surfaces of 11  $\text{mm}^2$ . Few and small necrotic area were observed in CTRL but none were observed in

the HISTO14 series (figure 2C). Very rare spongy tissue rarefaction, microcalcifications, teleangiectasia were observed in both hemispheres in the CTRL/HISTO14 series.

*Normal tissue changes after irradiation.* Microcalcifications were observed after MRT (but not in Broad Beam rats) with the same index range in both hemispheres. Notably, the highest index was found in the 100RL group (figure 5A) when compared to rats irradiated at 200  $\mu\text{m}$  spacing (figure 2A and B). The same tendency was apparent for other histological features such as spongy tissue rarefaction and teleangiectasia (figure 5A and B), with respective average values equal to 0.4 and 0.36 (200  $\mu\text{m}$  spacing). Similar values were noted in the Broad Beam group, versus 2.18 and 1.72 in the 100RL group. Teleangiectasia was often observed around tumors, especially in the 100RL series. Spongy tissue rarefaction displayed a similar pattern although absolute values were higher in the normal tissue zones for the tumor-bearing hemisphere than in the contralateral hemisphere (figure 2A and B).

*Tumor tissue changes after irradiation.* In 100RL, although no tumors were found in 5/11 rats, all five died. The highest score for spongy rarefaction, teleangiectasia, microcalcifications was observed for these 5 rats issued from 100RL. In remaining tumors, the index of necrosis was higher (equal to 2) than for 200  $\mu\text{m}$  spacing (figure 5D) (equal to 1.62) and for Broad Beam (equal to 1.22). Similarly, spotty hemorrhages were rarely observed at D14, while they were typical for all other series especially for the 100  $\mu\text{m}$  series (figure 2C) (with the highest index: 1.8). Infiltrative patterns of the tumors can be observed at the end of rats' life after both types of MRT irradiation (figure 5C and B).

*Microbeam radiation paths.* Loss of nuclei in cells revealed parallel and equidistant transverse microbeam radiation paths which were visible in all rats irradiated in MRT mode reflecting the array of beams issued from the collimator (figure 5E and F). They were visible in different sites (external part, apex and junction of both hemispheres) at 200  $\mu\text{m}$  spacing while they appeared mostly continuous through the hemispheres while using the 100  $\mu\text{m}$  spacing.

#### *Radiochromic film readings*

No irradiation failures were noted. The measured ratio between peak and valley dose, for both 100 and 200  $\mu\text{m}$  spacing irradiation corresponded to our expectations (figure 6). A high precision quantitative analysis for dose assessment at the  $\mu\text{m}$  scale is not possible, but it can be observed that the peak dose lies in the range of 625 Gy and the valley dose for the 200  $\mu\text{m}$  spacing is well below 30 Gy, while the 100  $\mu\text{m}$  irradiation geometries results in a valley dose of at least 30 Gy.

## **DISCUSSION:**

### *Validation of the 9L model*

The median survival time of CTRL rats of 20 days is in agreement with similar protocols (Laisue *et al.*, 1998; Dilmanian *et al.*, 2002) and with ongoing studies in our lab, exhibiting a low S.E.M. (mean survival time =  $19.7 \pm 0.27$  days, n=54). Histological features were consistent with the classification of the 9L tumor as a gliosarcoma (Henderson *et al.*, 1981). Other reports mentioned like us mean diameter ranged between 3-8 mm for tumors examined by MRI at D13-16, under the same experimental conditions (Ostrowitzki *et al.*, 1998).

### *Comparison between 200 and 100 $\mu\text{m}$ spacing*

All rats irradiated in MRT mode exhibited higher median survival times than those of control rats (20 days) but only the rats irradiated at 100  $\mu\text{m}$  spacing exhibited survival values significantly higher than rats of the Broad Beam series (37.5 days) with a median survival time twice higher than for the Broad Beam series (table 1). Also, the median survival time at 100  $\mu\text{m}$  spacing was 3 times higher than for CTRL series while it was twice as high as CTRL series for the 200  $\mu\text{m}$  spacing. However, the weight pattern, the clinical signs and the results of semi-quantitative histology confirms the hypothesis that normal CNS tissue damage is potentially responsible for the death of cured rats. On the contrary, the long-term survivors of the 200LR1 and 200RL series had a normal life without major clinical signs and a typical growth evolution. These observations suggest that the irradiation performed at 100  $\mu\text{m}$  spacing was too aggressive, causing excessive damage to normal tissues while irradiation performed at 200  $\mu\text{m}$  spacing spared normal tissues more adequately. Additional Monte-Carlo simulations were performed (table 2) for calculating local dose deposition in tissues. They demonstrate a valley dose equal to 12.6 Gy and 38.5 Gy at 200  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  spacing, respectively, at a depth of 5 mm. This fact confirms the hypothesis of a more destructive pattern at 100  $\mu\text{m}$  undoubtedly increasing the median survival time but prohibiting long-term survivors. Although the curing potential of the 100  $\mu\text{m}$  spacing is high, it provokes for the given entrance dose of 625 Gy significant damage to normal tissues. Contrarily, despite a lower tumor control using the 200  $\mu\text{m}$  spacing protocol, the sparing effect of normal tissue of this protocol allows more possibilities of improvement. As an example, it could be enhanced by synergy between drugs and/or irradiation geometries (Brauer-Krisch *et al.*, 2005; Dilmanian *et al.*, 2006).

In any case, coagulative tissue necrosis of normal CNS tissues with characteristic vascular changes, typical for late delayed reactions to conventional radiotherapy in humans was not seen in any of the rats irradiated in the MRT mode. Even at 100  $\mu\text{m}$  spacing, and due to the dose-volume effect, the pattern of radiation injury to normal CNS tissues after MRT is less destructive than observed in conventional radiotherapy, as already described (Curtis, 1967; Coderre *et al.*, 1994a).

*Comparison with other MRT experiments on 9L cells model (table 3).*

Excluding the study of Dilmanian et al. (2002) (which refers to a series of 3 rats for these parameters: microbeams of 25  $\mu\text{m}$  wide and spacing of 100  $\mu\text{m}$ , median survival time = 170 days), the present study (when using a 100  $\mu\text{m}$  spacing) displays the highest median survival time (67 days) if compared to other MRT basic protocols (Laissue: 44 days, Smilowitz: 46 days, this study at 200  $\mu\text{m}$  spacing: 40 days). To be more precise, at 100  $\mu\text{m}$  spacing, the ILS of the present study was two times higher (235% versus 120%) than those of Laissue *et al.* (1998) while the number of cured rats was the same (5/11 versus 4/11). However, these rats survived until D350 in Laissue's study and died before D160 in this one. In our case, although the general life span of rats increased, the normal tissue was damaged (as shown by clinical signs and histology), leading to death of cured rats. It has to be stressed that the ESRF dose rate and spectrum are different than NSLS one (Régnerd, 2004). Moreover, at the ESRF, the lacking contribution of the lateral dose (due to the use of microbeams instead of broad beam) was taken into account by a correcting factor. Consequently, the absolute peak dose given at BNL is around 20% less than ours *i.e.* 500 Gy. This lower dose could compensate the destructive pattern observed at 100  $\mu\text{m}$  observed in our study. Another reason to explain the discrepancy between the two studies could be the standard deviation of the values of microbeams width (table 1) due to the use of a collimator instead of a single slit.

At 200  $\mu\text{m}$  spacing, Smilowitz *et al.* (2006) obtained at the ESRF (same spectrum but filtered with depleted uranium and same collimator) a median survival time close to ours (46 days against 40 days, respectively) but more long-term survivors (5/25 and 2/32, respectively). However, it has to be stressed that the CTRL series of Smilowitz *et al.* exhibited an unusual survival range (17 to 29 days, plus one outlier at 43 days post-implantation). The difference between their CTRL survival curves and ours was tested as significant from the one of this study (log rank test,  $p=0.0089$ ) and from all 9L CTRL done in our lab (log rank test,  $p=0.0055$ ). A slower tumor growth (compared to the present study) of the cells is highly suspected, which can explain the difference of long-term survivors. The experiment did not use MRI before irradiations.

#### *Broad beam irradiation*

The median survival time for Broad Beam (skin dose entrance 20 Gy) was 37.5 days, which is undoubtedly close to the 200  $\mu\text{m}$  series (40 days). However, the median does not reflect the whole experiment and the expression of the mean describe the results by taking into account the presence of long-term survivors in the 200  $\mu\text{m}$  series, against none in the Broad Beam series. The means for the 200  $\mu\text{m}$  series are equal to 93.4, 43, 106.6 versus 41.1 for the Broad Beam irradiation (table 1). A similar median survival time has been reported after irradiation at 22.5 Gy (implantation of  $10^4$  9L cells in 1  $\mu\text{l}$ ; irradiation at day 14 with a 250 kVp X-rays source through a 14 mm diameter aperture)

(Coderre *et al.*, 1992; Coderre *et al.*, 1994b). Contrary to our study, more than 20% of the rats (n=55) survived more than 250 days after a broad beam irradiation but severe brain damages were discovered at the histology: “longterm survivors showed extensive cortical atrophy, loss of neurons, and widespread leakage of the blood-brain barrier” (Coderre *et al.*, 1994b). Again, survival curves of CTRL rats are significantly different than ours, with a faster tumor growth in the case of the present study. The experiment did not use MRI before irradiations. Although we used some frozen cells issued from Coderre’s lab, the tumors obtained in our case are more aggressive. Any genetic shift of the cells cannot be excluded.

#### *Comparison with other tumor models*

The experiments were carried out by using the 9L model in order to perform comparisons with results achieved at ESRF or NSLS. Moreover, this model was chosen for its high radioresistance compared to other models (Bencokova *et al.*, 2007) and its syngeneic characteristics when implanted in F344 rats (Barth *et al.*, 2003; Parsa *et al.*, 2000). Also, our histological analysis revealed groups of infiltrating cells that originate from the tumor mass, following vessel tracks at D14 and after irradiation. This has been observed by other groups (Smilowitz *et al.*, 2006; Coderre *et al.*, 1994a). From that point of view, the 9L approaches human brain tumor more closely than other rodent tumor models that are more encapsulated (C6) (Le Duc *et al.*, 1999), less radioresistant but more chemosensitive (F98). Contrarily to 9L cells, the F98 exhibit a truncated form of BRCA1 and a very marked G2 arrest in response to X-rays and cisplatin (Bencokova *et al.*, 2007). Infiltrative growth and radioresistance are major determinants for the cure of human tumors (Kruse *et al.*, 1994) and the ability to respond to any chemotherapy cannot be neglected. In the present study, the number of cells implanted was above the minimum threshold known to induce 100% mortality ( $10^3$  cells) (Morantz *et al.*, 1979) and this was demonstrated by MRI. Furthermore, 9L tumors at D14 are larger and more advanced than other tumors (as an example, F98 volume at D14 is equal to  $6.2 \text{ mm}^3$ , with  $10^3$  cells, results not shown). This induces the use of a larger field of irradiation at the expense of tissue sparing.

#### *Necessity of imaging prior to irradiation*

Many preclinical radiotherapy experiments are performed without prior diagnosis, due to the lack of availability of imaging tools. However, establishing the success rate of the implantation (lack of cell growth, experimental mistakes) and characterizing models is essential. In this study, MRI images were obtained to diagnose the presence of the tumor by highlighting the edema, which led to an overestimation of the tumor dimensions. The irradiation field was set-up at  $10 \times 10 \text{ mm}^2$ . Therefore, the brain volume covered by the array of microbeams paths was around  $1500 \text{ mm}^3$  while the tumor volume was around  $75 \text{ mm}^3$ . Thus, the tumor volume was about 5-10% of the total irradiated volume

while the cerebrum was irradiated at a level of 75% (with 10% and 20% of the cerebrum affected by the peak dose, at 200  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$  spacing, respectively). This large irradiation field should be decreased and adapted to each tumor, taking into account the infiltrative pattern at the periphery of the tumor. To achieve this, a monochromator and a detector were commissioned; tomographic images can thus be obtained with the animal already positioned, ensuring appropriate targeting for irradiation.

## **Conclusion**

On one hand, the median survival time obtained by using the 100  $\mu\text{m}$  spacing is 3 times higher than the median survival time obtained for CTRL rats and twice higher than the one of Broad Beam rats. However, the death of 5 rats which do not present tumor at the histology analysis, in parallel with neurological signs and weight evolution, demonstrate damages on healthy tissue. On the other hand, the median survival time obtained with 200  $\mu\text{m}$  spacing is not a real improvement compared to the Broad Beam series but it fits with results published by others (Smilowitz *et al.*, 2006). To summarize, the 100  $\mu\text{m}$  series can be considered as the upper limit achievable, while the 200  $\mu\text{m}$  series could be the lower limit. This paper illustrates the balance between sparing normal tissues and controlling the tumor by tuning a single parameter (i.e. the spacing between the microbeams). Altogether, these data are instrumental for the orientation of future protocols. We have retained the 200  $\mu\text{m}$  spacing protocol and new irradiation geometries are tested in order to increase spatial geometric beam effects (Brauer-Krisch *et al.*, 2005). Emphasis is also put on supra-additive effects by combining MRT irradiation with the use of anti-angiogenic drugs, anti-mitotic drugs and dose enhancers such as gadolinium labelled compounds (Le Duc *et al.*, 2006).

## **Acknowledgments**

We kindly thank Jean-François Le Bas from the Grenoble University Hospital, Michel Péoc'h from St Etienne Hospital and Josette Jean-Petit-Matile from the Bern Institute of Pathology as well as Stéphanie Bouvier and Jérôme Gastaldo. We thank Katrine Wong for her attentive reading of the manuscript.

## References

- Adam J F, Joubert A, Biston M C, Charvet A M, Peoc'h M, Le Bas J F, Balosso J, Esteve F and Elleaume H 2006 Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64** 603-11
- Archer D W, inventors; assignee. Collimator for producing an array of microbeams. United States patent 5771270. 1998 June 23.
- Barth R F, Yang W and Coderre J A 2003 Rat brain tumor models to assess the efficacy of boron neutron capture therapy: a critical evaluation *J Neurooncol* **62** 61-74
- Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier A F and Delattre J Y 2003 Primary brain tumours in adults *Lancet* **361** 323-31
- Bencokova Z, Pauron L, Devic C, Joubert A, Gastaldo J, Massart C, Balosso J and Foray N 2007 Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin *Journal of neuro-oncology* (**Accepted**)
- Benda P, Someda K, Messer J and Sweet W H 1971 Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture *Neurosurg.* **34** 310-23
- Biston M C, Joubert A, Adam J F, Elleaume H, Bohic S, Charvet A M, Esteve F, Foray N and Balosso J 2004 Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays *Cancer Res* **64** 2317-23
- Brauer-Krisch E, Bravin A, Lerch M, Rosenfeld A, Stepanek J, Di Michiel M and Laissue J A 2003 MOSFET dosimetry for microbeam radiation therapy at the European Synchrotron Radiation Facility *Med Phys* **30** 583-9
- Brauer-Krisch E, Requardt H, Regnard P, Corde S, Siegbahn E, Leduc G, Brochard T, Blattmann H, Laissue J and Bravin A 2005 New irradiation geometry for microbeam radiation therapy *Phys Med Biol* **50** 3103-11
- Butson M J, Cheung T and Yu P K 2002 Corresponding dose response of radiographic film with layered gafchromic film *Phys Med Biol* **47** N285-9
- Coderre J, Rubin P, Freedman A, Hansen J, Wooding T S, Jr., Joel D and Gash D 1994a Selective ablation of rat brain tumors by boron neutron capture therapy *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **28** 1067-77
- Coderre J A, Button T M, Micca P L, Fisher C D, Nawrocky M M and Liu H B 1994b Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **30** 643-52
- Coderre J A, Joel D D, Micca P L, Nawrocky M M and Slatkin D N 1992 Control of intracerebral gliosarcomas in rats by boron neutron capture therapy with p-boronophenylalanine *Radiat Res* **129** 290-6
- Curtis H J 1967 The use of deuteron microbeam for simulating the biological effects of heavy cosmic-ray particles *Radiat Res Suppl* **7** 250-7
- Dilmanian F A, Button T M, Le Duc G, Zhong N, Pena L A, Smith J A, Martinez S R, Bacarian T, Tammam J, Ren B, Farmer P M, Kalef-Ezra J, Micca P L, Nawrocky M M, Niederer J A, Recksiek F P, Fuchs A and Rosen E M 2002 Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy *Neuro-oncol* **4** 26-38
- Dilmanian F A, Morris G M, Le Duc G, Huang X, Ren B, Bacarian T, Allen J C, Kalef-Ezra J, Orion I, Rosen E M, Sandhu T, Sathe P, Wu X Y, Zhong Z and Shivaprasad H L 2001 Response of avian embryonic brain to spatially segmented x-ray microbeams *Cell Mol Biol* **47** 485-93
- Dilmanian F A, Morris G M, Zhong N, Bacarian T, Hainfeld J F, Kalef-Ezra J, Brewington L J, Tammam J and Rosen E M 2003 Murine EMT-6 carcinoma: high therapeutic efficacy of microbeam radiation therapy *Radiat Res* **159** 632-41
- Dilmanian F A, Zhong Z, Bacarian T, Benveniste H, Romanelli P, Wang R, Welwart J, Yuasa T, Rosen E M and Anshel D J 2006 Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** 9709-14
- Elleaume H, Charvet A-M, Berkvens P, Berruyer G, Brochard T, Dabin Y, Dominguez M-C, Draperi A, Fiedler S, Goujon G, Le Duc G, Mattenet M, Nemoz C, Perez M, Rénier M, Schulze C, Spanne P, O, Suortti P, Thomlinson William C, Estève F, Bertrand B and Le Bas J-F 1999

- Intrumentation of the ESRF medical imaging facility *Nuclear Instrum Methods Phys Res, sect. A* **428** 513-27
- Geiser M, Cruz-Orive L M, Im Hof V and Gehr P 1990 Assessment of particle retention and clearance in the intrapulmonary conducting airways of hamster lungs with the fractionator *J Microsc* **160** 75-88
- Henderson S D, Kimler B F and Morantz R A 1981 Radiation therapy of 9L rat brain tumors *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **7** 497-502
- Kobayashi N, Allen N, Clendenon N R and Ko L-W 1980 An improved rat brain-tumor model *Journal of Neurosurgery* **53** 808-15
- Kruse C A, Molleston M C, Parks E P, Schiltz P M, Kleinschmidt-DeMasters B K and Hickey W F 1994 A rat glioma model, CNS-1, with invasive characteristics similar to those of human gliomas: a comparison to 9L gliosarcoma *J Neurooncol* **22** 191-200
- Laissue J A, Blattmann H, Di Michiel M, Slatkin D N, Lyubimova N, Guzman R, Werner Zimmermann W, Jaggy A, Smilowitz H M, Stettler R, Kircher P, Bley T, Brauer E, Stepanek J, Bravin A, Renier R, Le Duc G, Nemoz C, Thomlinson W C and Wagner H P 2001 The weanling piglet cerebellum: a surrogate for tolerance to MRT (Microbeam Radiation Therapy) in pediatric neuro-oncology. In: *SPIE's 46th annual meeting*, ed Barber HB, et al. (San Diego, California, USA) pp 65-73
- Laissue J A, Geiser G, Spanne P O, Dilmanian F A, Gebbers J O, Geiser M, Wu X Y, Makar M S, Micca P L, Nawrocky M M, Joel D D and Slatkin D N 1998 Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays *Int J Cancer* **78** 654-60
- Laissue J A, Lyubimova N, Wagner H P, Archer W, Slatkin D N, Di Michiel M, Nemoz C, Renier M, Brauer E, Spanne P O, Gebber J O, Dixon K and Blattmann H 1999 Microbeam radiation therapy. In: *Part of the SPIE Conference on Medical Applications of Penetrating Radiation*, (Denver, Colorado, USA) pp 38-45
- Le Duc G, Peoc'h M, Remy C, Charpy O, Muller R N, Le Bas J F and Decorps M 1999 Use of T(2)-weighted susceptibility contrast MRI for mapping the blood volume in the glioma-bearing rat brain *Magn Reson Med* **42** 754-61
- Le Duc G, Régnard P, Brauer E, Troprès I, Dallery D, Laissue J and Bravin A 2006 Use of Gd Chelate as a Dose-Enhancement Agent for Synchrotron Microbeam Radiation Therapy Applied to Rodent Brain Tumors. In: *New Developments in Contrast Agent Research. 10th Bi-Annual Conference on MR and Intermodality Contrast Agent Research*, ed Aimé S and Muller RN (Vilnius, Lithuania: John Wiley & Sons)
- Legler J M, Ries L A, Smith M A, Warren J L, Heineman E F, Kaplan R S and Linet M S 1999 Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality *J Natl Cancer Inst* **91** 1382-90
- Miura M, Blattmann H, Brauer-Krisch E, Bravin A, Hanson A L, Nawrocky M M, Micca P L, Slatkin D N and Laissue J A 2006 Radiosurgical palliation of aggressive murine SCCVII squamous cell carcinomas using synchrotron-generated X-ray microbeams *Br J Radiol* **79** 71-5
- Morantz R A, Wood G W, Foster M, Clark M and Gollahon K 1979 Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 1: Studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity *J Neurosurg* **50** 298-304
- Ostrowitzki S, Fick J, Roberts T P, Wendland M F, Aldape K D, Mann J S, Israel M A and Brasch R C 1998 Comparison of gadopentetate dimeglumine and albumin-(Gd-DTPA)<sub>30</sub> for microvessel characterization in an intracranial glioma model *J Magn Reson Imaging* **8** 799-806
- Parsa A T, Chakrabarti I, Hurley P T, Chi J H, Hall J S, Kaiser M G and Bruce J N 2000 Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy *Neurosurgery* **47** 993-9; discussion 9-1000
- Paxinos G and Watson C eds 1986 *The rat brain in stereotaxic coordinates* (New York: Academic Press)
- Régnard P 2004 Thérapie par micro-faisceaux appliquée à la pathologie tumorale cérébrale chez le rat. In: *Ecole Nationale Vétérinaire*, (Lyon: Université Claude Bernard)

- Renier M, Brochard T, Nemoz C and Thomlinson W 2002 A white-beam fast-shutter for microbeam radiation therapy at the ESRF *Nucl. Inst. and Meth. A* **479** 656-60
- Serduc R, Verant P, Vial J C, Farion R, Rocas L, Remy C, Fadlallah T, Brauer E, Bravin A, Laissue J, Blattmann H and van der Sanden B 2006 In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64** 1519-27
- Slatkin D N, Dilmanian F A and Spanne P O, inventors; The United States of America represented by the United States Department of the Energy, Washington, D.C., assignee. Method for microbeam radiation therapy. United States patent US 005339347. 1994 Aug 16.
- Slatkin D N, Spanne P, Dilmanian F A, Gebbers J O and Laissue J A 1995 Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** 8783-7
- Slatkin D N, Spanne P, Dilmanian F A and Sandborg M 1992 Microbeam radiation therapy *Med Phys* **19** 1395-400
- Smilowitz H M, Blattmann H, Brauer-Krisch E, Bravin A, Di Michiel M, Gebbers J O, Hanson A L, Lyubimova N, Slatkin D N, Stepanek J and Laissue J A 2006 Synergy of gene-mediated immunoprophylaxis and microbeam radiation therapy for advanced intracerebral rat 9L gliosarcomas *J Neurooncol* **78** 135-43
- Suortti P and Thomlinson W 2003 Medical applications of synchrotron radiation *Phys Med Biol* **48** R1-35

## Tables

**Table 1.** Results of MRI examination and survival as a function of irradiation protocol (SD: standard deviation; SEM: standard error to the mean)

Series	n	Irradiation protocol			MRI examination			Survival				
		Peak-Valley dose (Gy)	Microbeams Width ( $\pm$ SD) /spacing ( $\mu$ m)	entrance/exit for Microbeams	MRI stage	Mean tumor volume $\text{mm}^3$ ie x (SD) x y (SD) x z (SD) mm	Mean survival time (SEM) days	Median survival time days	ILS relative %	ILS %	Ablated tumors	Long Term Survivor
200LR1	12	625-8.8	25.4 ( $\pm$ 4.8)/200	left to right	D11	58 ie 5 (1.5) x 5.5 (1) x 4 (1)	93.4 (53.1)	40	379	100	1	1
200LR2	10	625-8.8	24.6 ( $\pm$ 5.7)/200	left to right	D12	86 ie 5.5 (1) x 6 (1) x 5 (0.5)	43 (2.53)	42	120.5	110	0	0
200RL	10	625-8.8	24.6 ( $\pm$ 5.7)/200	right to left	D12	82 ie 6(1) x 6.5 (1.5) x 4 (0.5)	106.6 (68.7)	38.5	446.6	92.5	1	1
100RL	11	625-31.3	24.6 ( $\pm$ 5.7)/100	right to left	D11	47 ie 4.5 (1.5) x 5 (1.5) x 4 (1)	72.7 (10.4)	67	272.8	235	5	1
Broad Beam	12	n/a - 20	Broad beam	left to right	D09	12 ie 3 (2) x 3 (2) x 2.5 (1.5)	41.1 (3.32)	37.5	110.8	87.5	0	0
CTRL	6	0-0	no irradiation	n/a	D11	58 ie 4.5 (2) x 5.5 (1.5) x 4.5 (1)	19.5 (0.34)	20	n/a	n/a	0	0
HISTO14	6	0-0	sacrifice at D14	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	0	0

**Table 2.** Monte Carlo simulation of the dose at skin entrance for 2 different depths: 5 mm (irradiation from Right to Left) and 10 mm (irradiation from Left to Right).

<b>Position</b>	<b>Peak dose (Gy)</b>		<b>Valley dose (Gy)</b>	
	200 $\mu\text{m}$ spacing	100 $\mu\text{m}$ spacing	200 $\mu\text{m}$ spacing	100 $\mu\text{m}$ spacing
<b>Skin entrance</b>	625	636	8.8	31.3
<b>Tumor site at 10 mm</b>	491	504	12.1	36.0
<b>Tumor site at 5 mm</b>	533	545	12.6	38.5

**Table 3.** Comparison between our results and others reported in literature.

	<b>MRI</b>	<b>Spectrum</b>	<b>Collimator</b>	<b>Irradiation dose/spacing/width <i>Gy/μm/μm</i></b>	<b>Tumor stage</b>	<b>Median survival time</b>	<b>Long term survivors</b>	<b>N=</b>	<b>Median survival time of CTRL (survival range)</b>
<b>This study at 200</b>	yes	ESRF	Archer	625 /200 /25	D14	40 (3 series)	2	32	19 (18-20)
<b>This study a 100</b>	yes	ESRF	Archer	625/100/25	D14	67	1 (5 cured)	11	19 (18-20)
<b>Dilmanian, 2002</b>	no	BNL	Single slit	500/100/ 27	D15	170	2	3	19 (17-23 for n=11)
<b>Laissue, 1998</b>	no	BNL	Single slit	625/100/25 <i>Antero-posterior</i>	D14	44	4	11	20 (18-31)
<b>Smilowitz, 2006</b>	no	ESRF Filtered with depleted U	Archer	625/200/25 <i>Antero-posterior</i>	D14	46	5	25	21* (17-43)

\* difference is significant (log rank test, p=0.0089) with the present study

## Figures

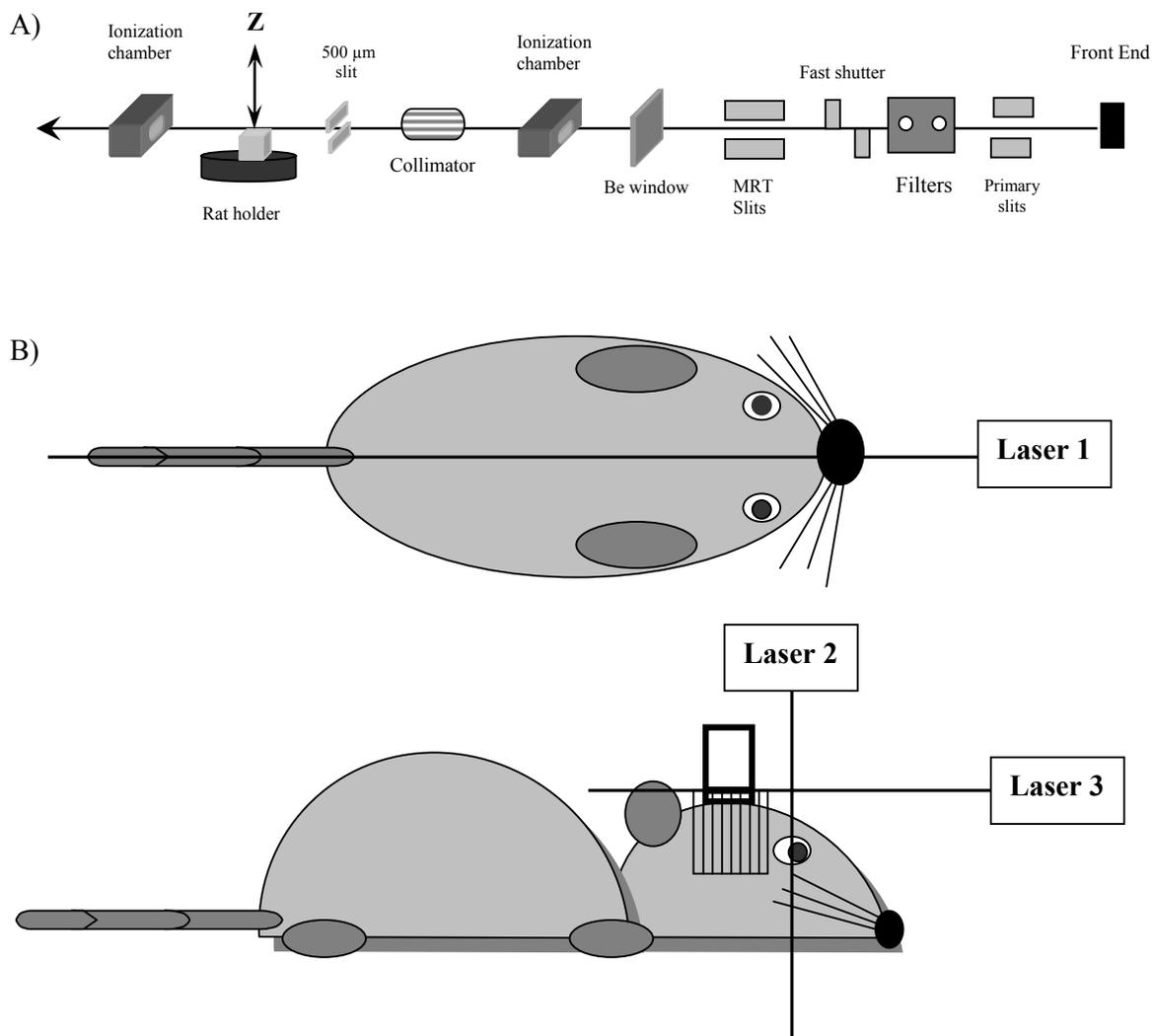


Figure 1: A) Schematic set-up of the MRT hutch of the ESRF-ID17 beamline; B) Positioning of the lasers on the rats before irradiation. The first sagittal and horizontal laser was centered on the middle of the nose. The second laser, vertical, was centered on the eye. The horizontal laser is aligned with the center of the beam and the irradiation field starts 1 mm above the skull of the rat head. The MRT irradiation field is represented on the profile figure.

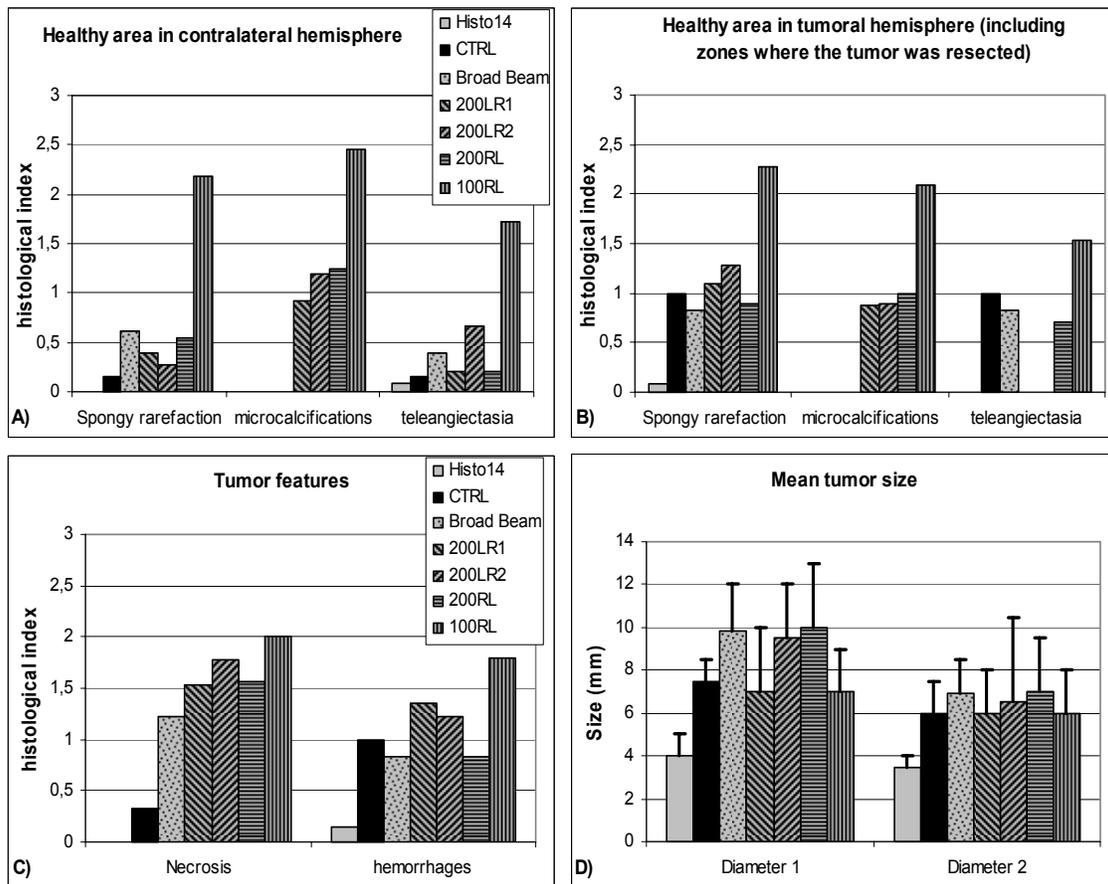


Figure 2: Summary of the histopathologic analysis performed on all series of rats. Panels A, B and C describe features observed on different part of the brains. Features observed were ranked according their density (0: no sign; 1: exceptional; 2; low; 3: medium; 4: high). The total score for each series was divided by the number of rats in that series. In panel B, telangiectasia is not ranked for series 200LR1 and 200LR2 because it appears only near the tumor. Panel D describes the mean size of tumor (+ standard deviation) in mm; diameter 1 corresponds to the long axis and diameter 2 to the short axis, assuming an ellipsoid shape.

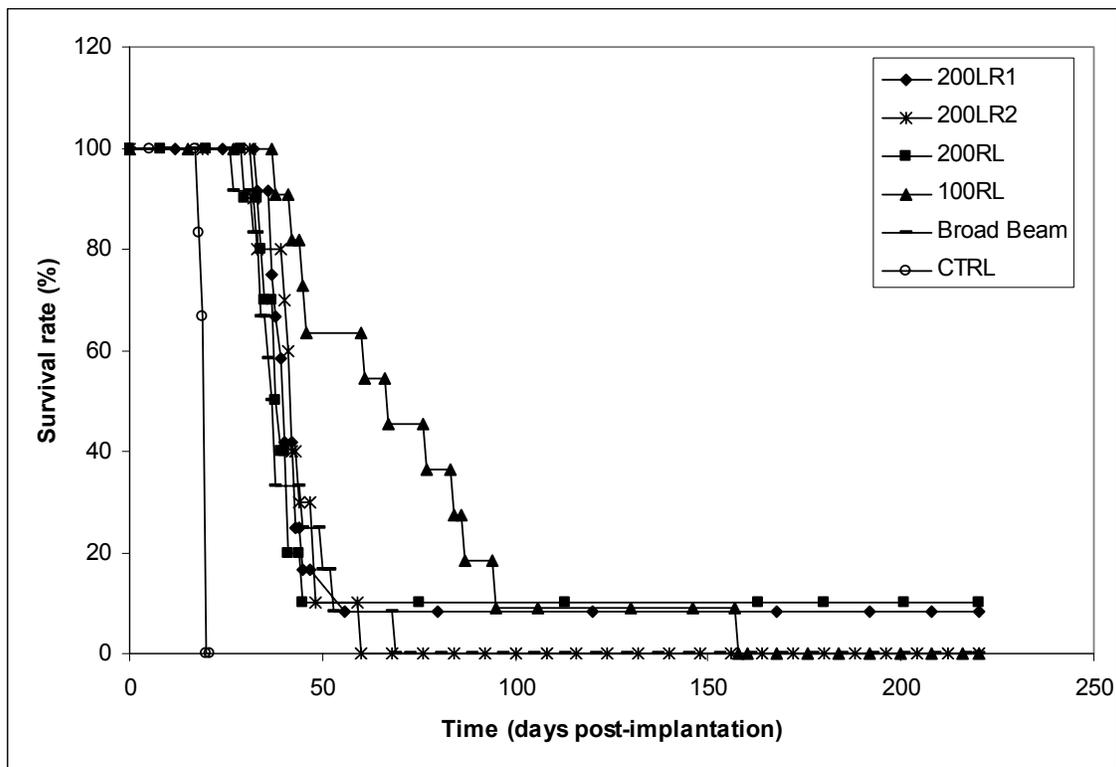


Figure 3: Survival curves (as a function of time) of 9L gliosarcoma bearing rats a) irradiated with a spacing of 200  $\mu\text{m}$  and from left to right (200LR1); b) irradiated with a spacing of 200  $\mu\text{m}$  and from left to right (200LR2); c) irradiated with a spacing of 200  $\mu\text{m}$  and from right to left (200RL); d) irradiated with a spacing of 100  $\mu\text{m}$  and from right to left (100RL); e) irradiated with a broad beam and a skin entry dose equal to 20 Gy (Broad Beam); f) non irradiated i.e. control rats (CTRL).

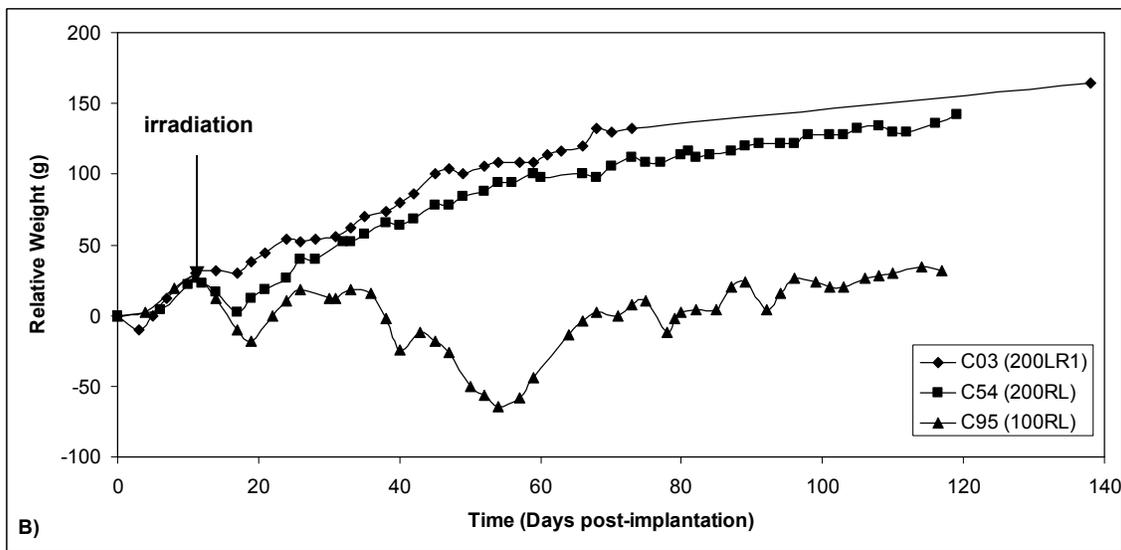
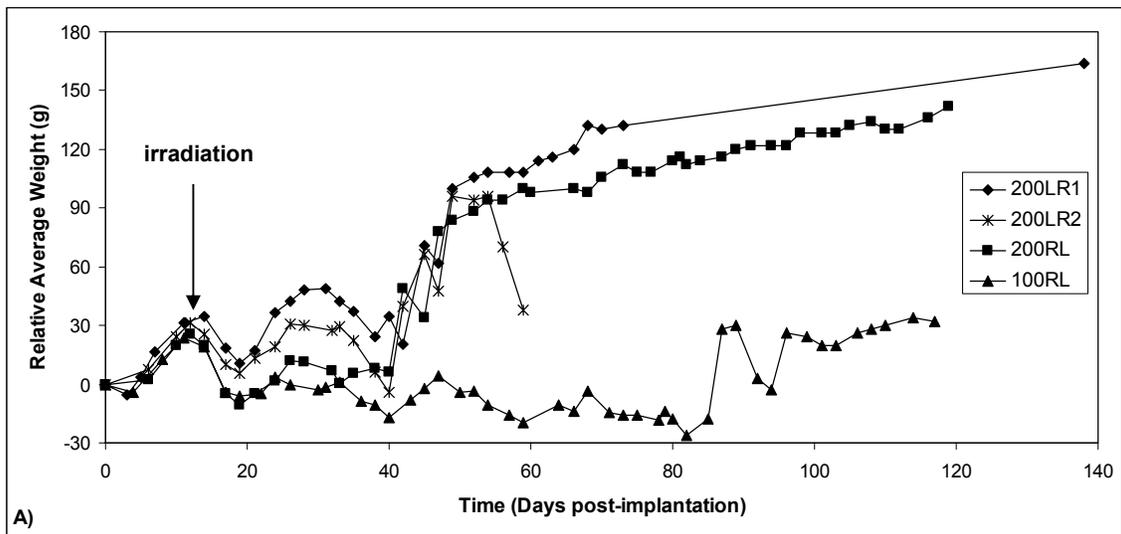
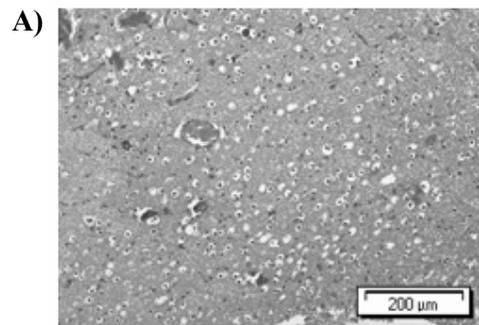
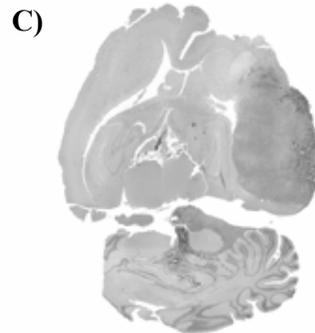


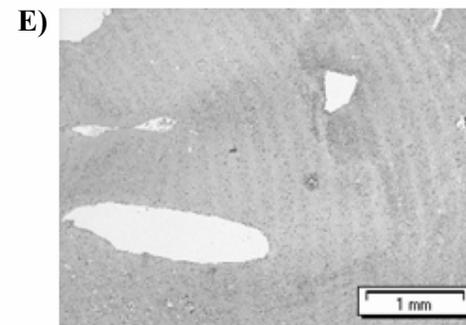
Figure 4:A) Relative average weight progression (i.e. for each rats the weight at day D minus the weight at day D0 was calculated and then the average was made for each series) for rats irradiated with a spacing of 200  $\mu\text{m}$  from left to right (200LR1;  $\blacklozenge$ ); a spacing of 200  $\mu\text{m}$  from left to right (200LR2;  $*$ ); a spacing of 200  $\mu\text{m}$  from right to left (200RL;  $\blacksquare$ ); a spacing of 100  $\mu\text{m}$  from right to left (100RL;  $\blacktriangle$ ); B) Relative weight progression (i.e. weight at a given day minus weight at the day of implantation D0) of long-term survivors: C03 (surviving until D678, from series 200LR1;  $\blacklozenge$ ); C54 (surviving until D731, from series 200RL, i.e. 200  $\mu\text{m}$  spacing from right to left;  $\blacksquare$ ); C95 (surviving until D158, from series 100RL, i.e. 100  $\mu\text{m}$  spacing from right to left;  $\blacktriangle$ ). In 200LR1 series there was no weighing between D73 and D138.



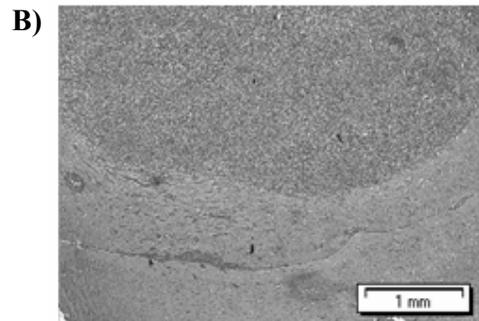
Normal tissue at 100  $\mu\text{m}$  spacing with teleangiectasy, microcalcification and spongy tissue rarefaction



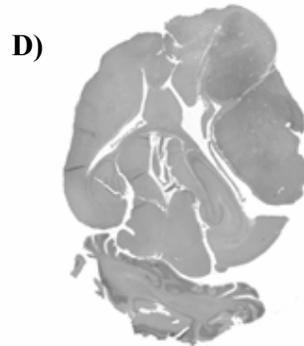
Brain of a non cured rat at 100  $\mu\text{m}$  spacing. Large tumor in the right hemisphere; tumor infiltrating the cerebellum



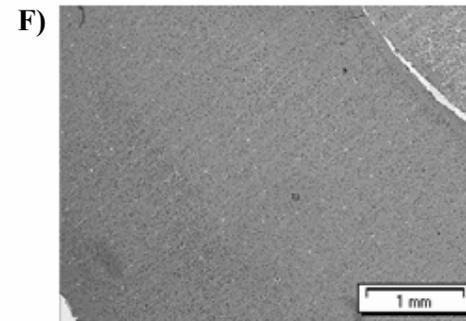
Microbeams at 100  $\mu\text{m}$  spacing



Infiltration at 200  $\mu\text{m}$  spacing



Brain of a non cured rat at 200  $\mu\text{m}$  spacing



Microbeams at 200  $\mu\text{m}$  spacing

Figure 5: Typical histologic appearance of microbeams in the contralateral brain hemisphere brain of a 9L gliosarcoma bearing rat irradiated with microbeams spaced at 200  $\mu\text{m}$  and 100  $\mu\text{m}$ .

The non cured tumors invade most of the right hemisphere of the brain at the end of rat's life (D). Infiltrative pattern of the late stage tumor can be observed macroscopically (C) and microscopically (B) both at 200 and 100  $\mu\text{m}$  spacing. The healthy tissue is better preserved at 200  $\mu\text{m}$  spacing (B, F) than at 100  $\mu\text{m}$  spacing (A, E). Microbeams tracks (loss of nuclei) at 200  $\mu\text{m}$  spacing appear thin and well spaced (F), while microbeams at 100  $\mu\text{m}$  spacing appear wider (E). (A: 100 RL, D84; B: 200LR2, D40; C: 100RL, D42; D: 200LR1, D40; E: 100RL, D67; F: 200LR1, D33)

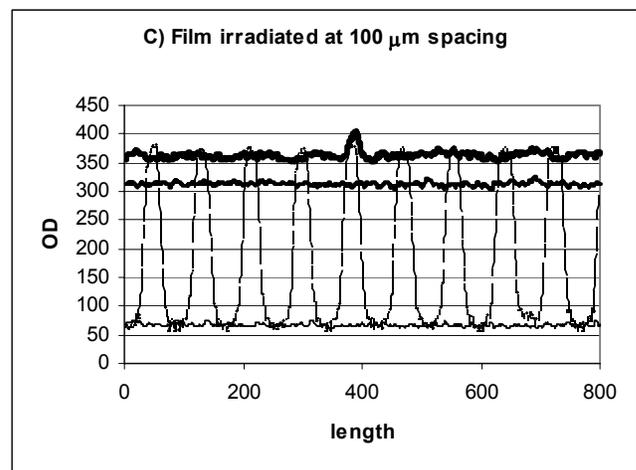
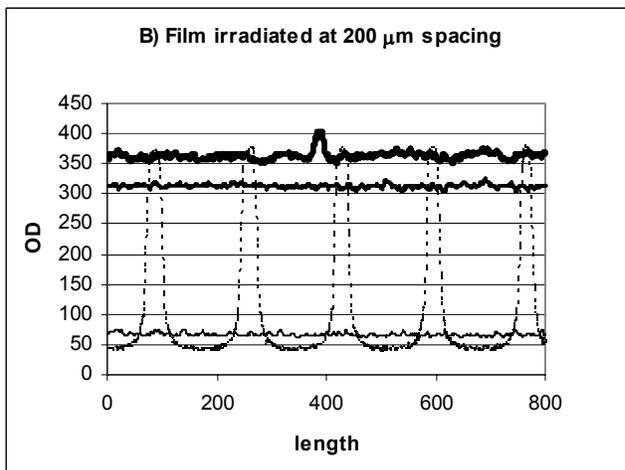
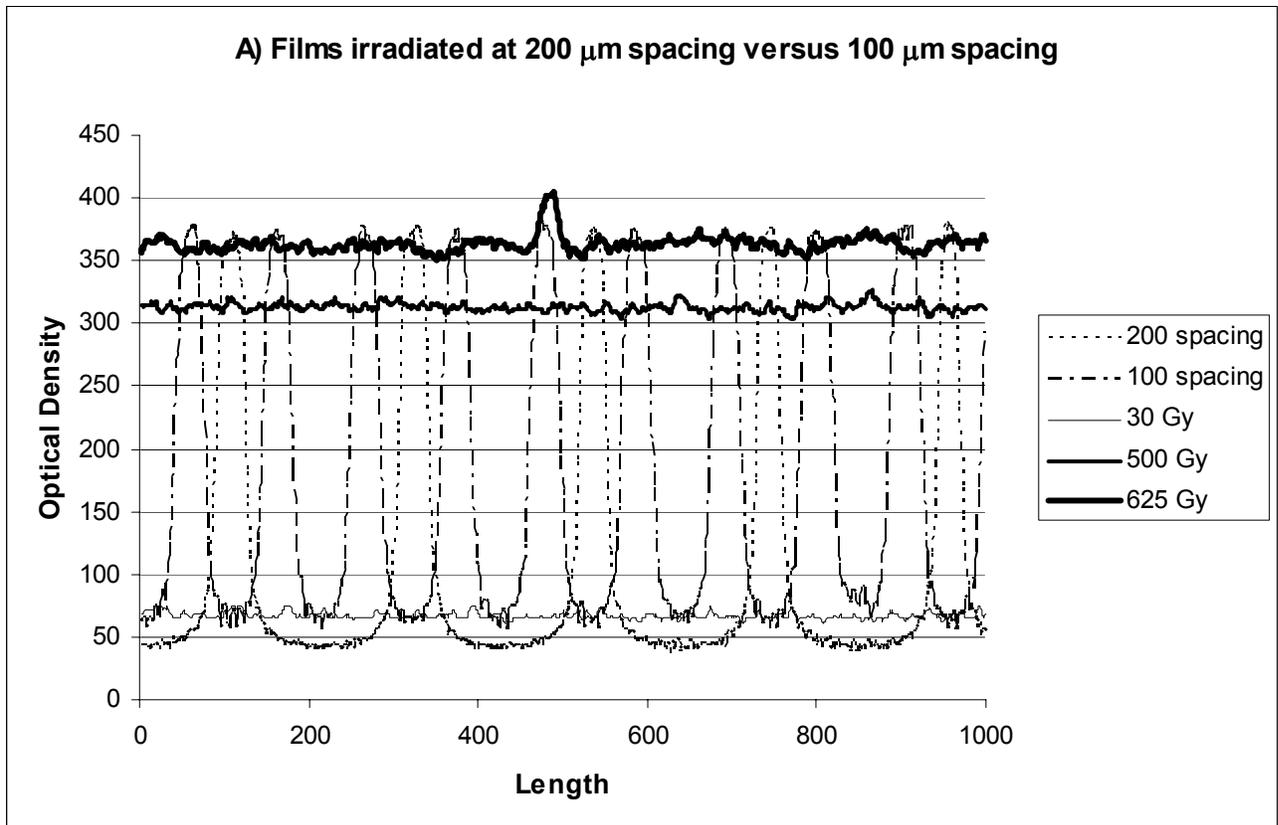


Figure 6: Optical density read after irradiation of Gafchromic films, placed between the multislit collimator and the rat head. Films irradiated in MRT mode at 200 and 100  $\mu\text{m}$  spacing are grouped in A) and alone in B) and C), respectively. These measures are compared with broad beam measures at 30, 500 and 625 Gy. The peak appearing in the 625 Gy curve is an artifact.

### III.2.2. Irradiation à 150 µm d'espacement

Suite aux résultats obtenus avec des espacements entre les microfaisceaux de 100 et 200 µm, une expérience avec un espacement de 150 µm a été réalisée sur des rats porteurs de tumeur 9L, 14 jours après l'implantation. Le collimateur Archer ne permettant pas d'obtenir un tel espacement entre les microfaisceaux<sup>♦</sup>, les animaux ont été irradiés plusieurs fois avec un seul microfaisceau, déplacé de 150 µm à chaque irradiation (irradiation dite « simple fente »)<sup>♦</sup>. Après vérification de la présence d'une tumeur par IRM, 10 rats porteurs de tumeur 9L ont été irradiés sur 11 x 10 mm<sup>2</sup>, par des microfaisceaux de 25 µm espacés de 150 µm à une dose de 625 Gy (6 rats ont été sortis de l'étude suite à des problèmes lors de l'irradiation : champs d'irradiation trop bas pour le premier puis problème au niveau des moteurs). Les courbes de poids des rats restants (n = 4) ont été établies et comparées avec celles des rats irradiés à 100 et 200 µm d'espacement (Figure 53).

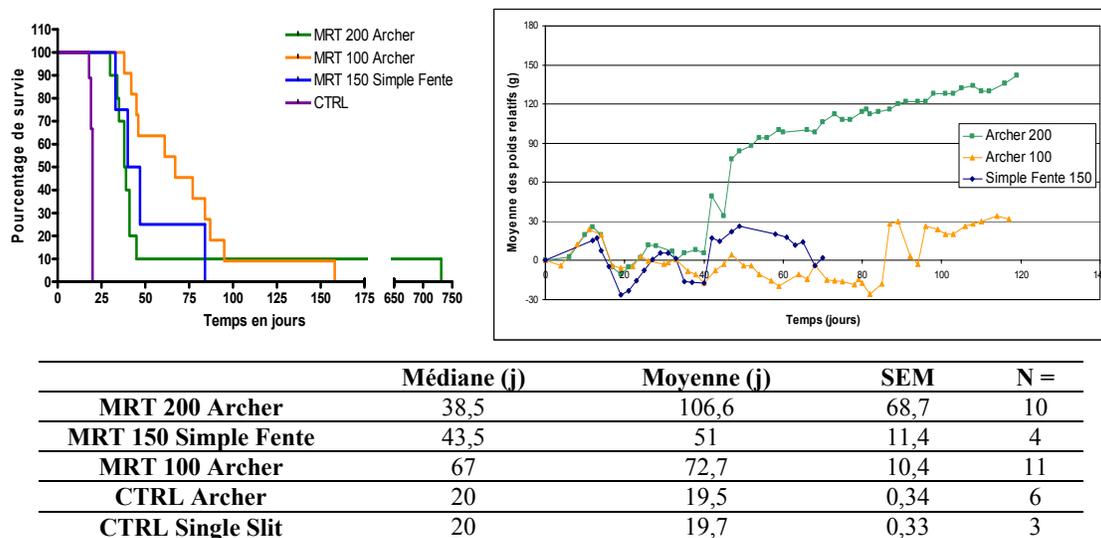


Figure 53 : En haut à gauche : courbes de survie des rats irradiés avec un espacement de 100, 150 et 200 µm. En haut à droite : courbes des poids relatifs moyens des rats irradiés avec un espacement de 100, 150 et 200 µm ; les rats contrôle des différentes expériences ont été groupés. En bas : informations statistiques sur la survie des rats irradiés avec un espacement de 100, 150 et 200 µm.

La courbe de survie des rats irradiés avec un espacement de 150 µm ne présente pas de différence significative avec les courbes à 200 et 100 µm (NB : n = 4). Elle ne présente aucun

<sup>♦</sup> L'espacement du collimateur Archer est fixe : 200 µm. Des irradiations successives peuvent donc permettre d'irradier avec un espacement de 100 µm voire 50 µm mais pas 150 µm.

<sup>♦</sup> Lors de l'irradiation simple fente, il n'a pas été ajouté de bloc d'aluminium de 16 mm d'épaisseur ce qui entraîne une différence de spectres avec les irradiations réalisées avec le collimateur Archer.

survivant à long terme. Il faut noter cependant que la médiane à 150  $\mu\text{m}$  d'espacement (43,5 jours) est comprise entre les médianes obtenues à 200  $\mu\text{m}$  (38,5 jours) et 100  $\mu\text{m}$  d'espacement (67 jours). L'absence de survivant à long terme se traduit par une moyenne plus basse à 150  $\mu\text{m}$  que pour les autres séries. En revanche, les courbes de poids obtenues à 150  $\mu\text{m}$  et à 100  $\mu\text{m}$  sont proches. Tout comme les rats à 100  $\mu\text{m}$ , le rat survivant après J60 ne présente pas de prise substantielle de poids. Les 4 rats irradiés en simple fente ont présenté les mêmes signes cliniques : des brûlures et des croûtes sont apparues sur la peau dans la zone d'irradiation et 3/4 rats tournaient anormalement sur eux même lors de la contention par la queue. Aucun signe d'hyperexcitation n'a été relevé (signes très présents lors des irradiations à 100  $\mu\text{m}$ ). En conclusion, la médiane de survie décroît lorsque l'espacement entre les faisceaux augmente. Il est remarquable que du point de vue des paramètres étudiés, l'irradiation simple fente puisse être comparée à l'irradiation utilisant le collimateur Archer.

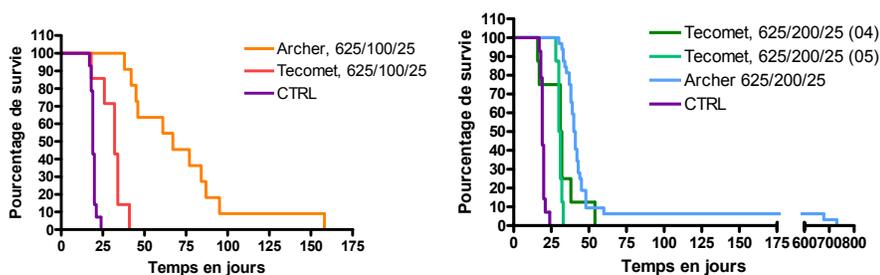
### **III.2.3. Comparaison des 2 collimateurs utilisés : le collimateur Archer et le collimateur Tecomet**

Durant cette thèse, deux collimateurs différents ont été utilisés. Une première partie des expériences (février et juin 2003) a été réalisée avec le collimateur Archer pour lequel certaines défaillances ont été mises en évidence lors des expériences suivantes (juin et décembre 2004 et avril 2005). En parallèle, un nouveau collimateur, le collimateur Tecomet était en cours d'étude sur ID17 [*Bräuer-Krisch, 2005*], permettant la poursuite des travaux. Les différences inhérentes à la structure de ces 2 collimateurs (le collimateur Archer avait été conçu à la base pour des expériences sur petits animaux, alors que le Tecomet était lui plutôt destiné aux essais cliniques sur grands animaux/hommes) sont à l'origine d'une efficacité différente de la MRT sur la survie des animaux qu'il convient de commenter.

Les résultats obtenus avec le collimateur Tecomet lors de l'irradiation de rats porteurs de tumeur 9L, 14 jours après implantation, à 625/100/25 et 625/200/25 sont comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec le collimateur Archer. La présence des tumeurs a été vérifiée au préalable par IRM.

A 100  $\mu\text{m}$  d'espacement, la médiane et la moyenne de survie des rats irradiés avec le collimateur Archer sont deux fois plus élevées que celles des rats irradiés avec le collimateur Tecomet (Archer : 67 jours et 72,7 jours ; Tecomet 32 jours et 31 jours pour la médiane et la moyenne respectivement, différence entre les courbes de survie significative  $p < 0,0001$ ). Par

ailleurs, la médiane et la moyenne de survie des rats contrôle étaient équivalentes lors des deux séances d'expériences. Ainsi, l'Augmentation de l'Espérance de Survie (ILS : Increase Life Span) obtenue avec le collimateur Archer (235%) est 4,5 fois supérieure à celle obtenue avec le Tecomet (52,4%) (Figure 54).



Séries	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	SLT	N=	ILS	ILSre
Archer 625/200/25	40,5	81,96	29	2	32	102	320,3
Tecomet 625/200/25 (2004)	31,5	31,4	4,2	0	8	50	51,7
Tecomet 625/200/25 (2005)	30,5	30,6	0,53	0	8	60,5	62,7
Archer 625/100/25	67	72,7	10,4	1	11	235	272,8
Tecomet 625/100/25	32	31	2,7	0	7	52,4	49,7
CTRL "Archer"	20	19,5	0,34	0	6	na	na
CTRL "Tecomet" 2004	21	20,7	2	0	3	na	na
CTRL "Tecomet" 2005	19	18,8	0,2	0	5	na	na

Figure 54 : En haut à gauche : Courbes de survie des rats irradiés avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$ , des microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  et une dose de 25  $\mu\text{m}$  avec les deux collimateurs Archer et Tecomet. En haut à droite : Courbes de survie des rats irradiés avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$ , des microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  et une dose de 25  $\mu\text{m}$  avec les deux collimateurs Archer et Tecomet. Sur ces deux graphiques, les contrôles des différentes expériences ont été groupés. En bas : tableau regroupant les données statistiques de ces différentes séries. SLT = Survivants à Long Terme ; na = non adapté.

De plus, le collimateur Tecomet est responsable de lésions cutanées beaucoup plus importantes qui ne sont pas présentes lors de l'utilisation du collimateur Archer dans les mêmes conditions (625/100/25). En effet, la dépilation sur la zone d'irradiation est remplacée par une croûte, signant une lésion plus importante. Par contre, il n'y a pas de différence entre les symptômes cliniques nerveux qui sont présents chez 4/7 rats (57%) irradiés avec le collimateur Tecomet et 7/11 rats (63%) dans le cas d'irradiation avec le collimateur Archer.

A 200  $\mu\text{m}$  d'espacement, les courbes de survie illustrent aussi une diminution globale de la survie lors de l'utilisation du collimateur Tecomet, avec un décalage des courbes vers la gauche. Aucun survivant à long terme n'est apparu avec le collimateur Tecomet lors d'irradiation en faisceau unidirectionnel avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  à une dose de 625 Gy, contrairement aux expériences réalisées avec le collimateur Archer.

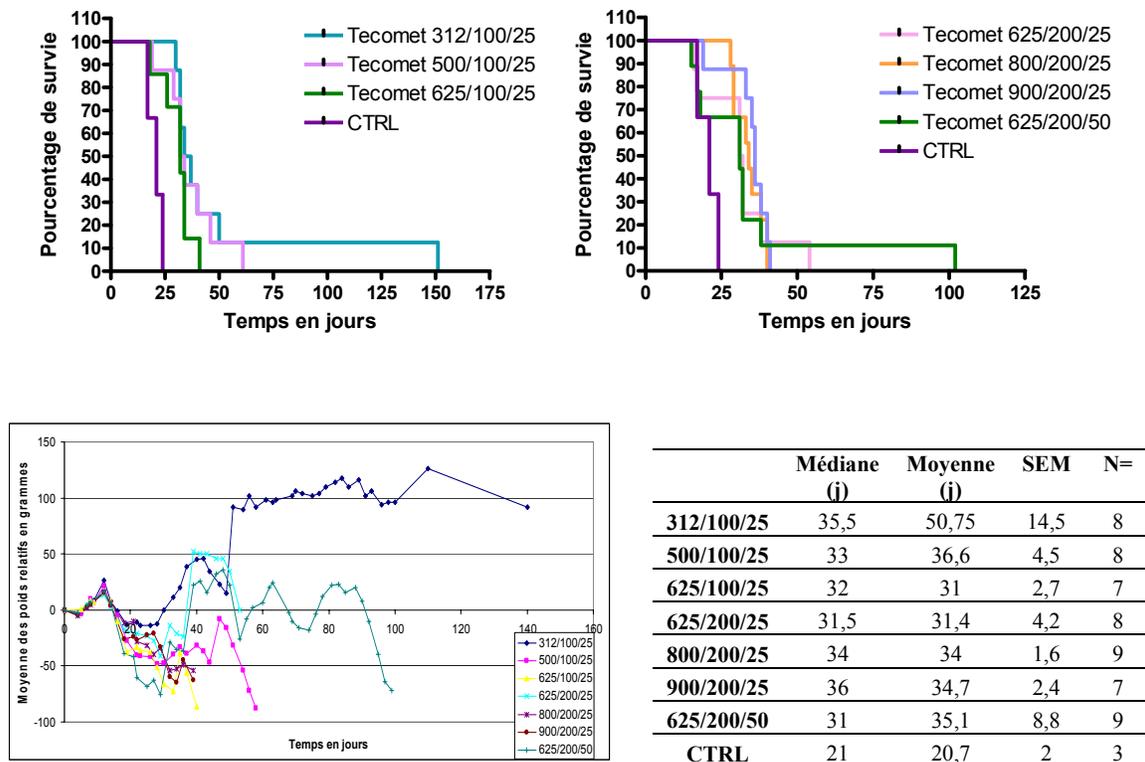
Le logrank test révèle que la courbe de survie de la série Archer 625/200/25 est significativement différente des courbes de survie des séries Tecomet avec  $p = 0,0108$  en comparaison de celle établie en 2004 et  $p < 0.0001$  en comparaison de la courbe établie en 2005. Il n'y a pas de différence significative entre les deux courbes de survie établies à l'aide du collimateur Tecomet ( $p = 0,2546$ ).

Quel que soit le collimateur, à 200  $\mu\text{m}$  d'espacement, aucune lésion particulière n'est notée (hormis la dépilation caractéristique). L'irradiation à 625 Gy avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  entre les microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  entraîne moins de signes cliniques nerveux avec le collimateur Archer (4/32 soit 1,25 %) qu'avec le collimateur Tecomet (3/16 soit 18,75 %), différence plus importante que dans le cas précédent (100  $\mu\text{m}$  d'espacement).

### **III.2.4. Variation des doses et augmentation de la taille des microfaisceaux en mode unidirectionnel**

Cette série d'expérience a été la première à être réalisée à l'aide du collimateur Tecomet, moins performant que le collimateur Archer lorsqu'il était encore fonctionnel (cf III.2.1.). Elle fait suite aux résultats obtenus lors des irradiations avec des espacements de 200  $\mu\text{m}$  et de 100  $\mu\text{m}$ . Le but est de faire varier la dose pic afin d'améliorer le contrôle de la MRT sur la tumeur (à 200  $\mu\text{m}$ ) ou de diminuer les dommages causés au tissu sain (à 100  $\mu\text{m}$ ).

A l'IRM, 70/71 rats ont présenté une tumeur à J13, le rat dont la tumeur n'a pas été vue a été sorti de l'étude. A partir de la dose de référence de 625 Gy, 3 doses différentes ont été testées, décroissantes pour un espacement de 100  $\mu\text{m}$  et croissantes pour un espacement de 200  $\mu\text{m}$ . Une largeur de microfaisceaux de 50  $\mu\text{m}$  avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  à 625 Gy a également été testée (Figure 55). Aucune différence significative de survie n'apparaît en faisant varier la dose en mode unidirectionnel. L'augmentation de la moyenne de survie de la série 312/100/25 est due à l'apparition d'un survivant à long terme dont la vie prendra fin 151 jours après irradiation. Un survivant à long terme apparaît aussi dans la série 625/200/50 (Figure 55). Les courbes de survie analysées par le Logrank test ne montrent aucune différence significative entre elles que ce soit les courbes (i) des différentes doses à 100  $\mu\text{m}$  d'espacement, (ii) des différentes doses à 200  $\mu\text{m}$  d'espacement, (iii) des épaisseurs de microfaisceaux de 25 ou 50  $\mu\text{m}$  à 200  $\mu\text{m}$  d'espacement et à une dose de 625 Gy.



**Figure 55 :** En haut à gauche : courbes de survie des rats irradiés de 312 à 625 Gy à un espacement de 100 μm. En haut à droite : courbes de survie des rats irradiés de 625 à 900 Gy à un espacement de 200 μm et avec des microfaisceaux de 25 à 50 μm. En bas à gauche : courbes de poids relative moyennes de ces rats. En bas à droite : Données statistiques de ces mêmes séries.

De même, les courbes des moyennes de poids relatifs traduisent un mauvais état général de la plupart des rats, quelle que soit la série. Des signes cliniques étaient présents dans toutes les séries, cependant certaines différences notables ont été relevées. De nombreux rats irradiés à 100 μm ont présentés des croûtes brunâtres au niveau de la zone d’irradiation sans distinction de dose, là où d’habitude n’apparaît qu’une dépilation. Les deux séries aux plus fortes doses (625/100/25 et 900/200/25) sont celles dont le plus de rats sont touchés par des signes cliniques : 5/8 et 4/8 rats présentent des signes cliniques après irradiation avec un espacement de 100 μm à 312 et 500 Gy, alors qu’avec une dose de 625 Gy, 6/7 rats sont touchés. De même à 200 μm d’espacement, 5/8 et 6/9 rats présentent des signes cliniques à 625 et 800 Gy alors qu’il y en a 6/7 pour la dose de 900 Gy. Cependant, le nombre de signes cliniques nerveux préoccupants (hyperactivité, crise épileptiformes...) ne dépend pas de la dose mais uniquement de l’espacement (nombreux à 100 μm et faible à 200 μm). Les rats irradiés avec une largeur de microfaisceaux de 50 μm semblent présenter moins de signes cliniques que ceux irradiés dans les mêmes conditions avec une largeur de 25 μm (3/9 contre 5/8, respectivement).

En conclusion, dans ces conditions, la survie des rats n'est pas influencée de façon significative par les doses et les largeurs de microfaisceaux testés, bien que 2 survivants à long terme apparaissent, un dans la série 312/100/25 et l'autre dans la série 625/200/50.

### **III.2.5. Irradiation en faisceaux croisés simultanés ou différés**

Une observation attentive des courbes de poids des rats irradiés en mode unidirectionnel à 625/200/25 (Tableau 10), a permis de mettre en évidence un changement majeur 7 jours après l'irradiation (J21), date à laquelle la plupart des rats recommencent à prendre du poids, après avoir été affaiblis par l'irradiation. Il a donc été décidé de reirradier les rats au moment de cette reprise de poids, afin de mieux contrôler la progression tumorale.

Rats	J14	J17	J19	J21	J24	J26	J28
1	242	224	228	236	249	254	260
2	234	222	220	228	250	256	260
3	230	228	236	242	252	250	252
4	220	202	196	208	222	226	234
5	228	214	194	180	219	224	232
6	250	242	248	256	273	276	278
7	224	216	212	214	233	238	244
8	240	220	206	210	227	236	242
9	248	214	190	176	206	218	230
10	236	220	216	226	241	248	252
11	238	226	206	226	251	258	264
12	238	206	188	218	231	240	246
13	255	240	250	256	264	278	278
14	266	254	262	255	248	260	260
15	262	228	234	250	260	272	270
16	261	234	222	244	260	274	280
17	251	216	198	203	216	224	216
18	270	250	230	239	252	268	270
19	247	234	232	227	228	236	236
20	258	242	244	253	260	270	274
21	251	228	206	192	204	226	238
22	259	208	198	215	210	196	176
23	261	238	228	234	252	268	272
24	264	254	252	258	264	272	272
25	253	246	230	240	256	272	280
26	261	248	234	244	248	258	262
27	258	248	258	262	256	264	268
28	262	246	248	258	266	280	282
29	268	248	250	254	242	254	250
30	252	240	238	248	256	264	270
31	269	250	244	252	264	282	280
32	258	230	224	230	240	244	214

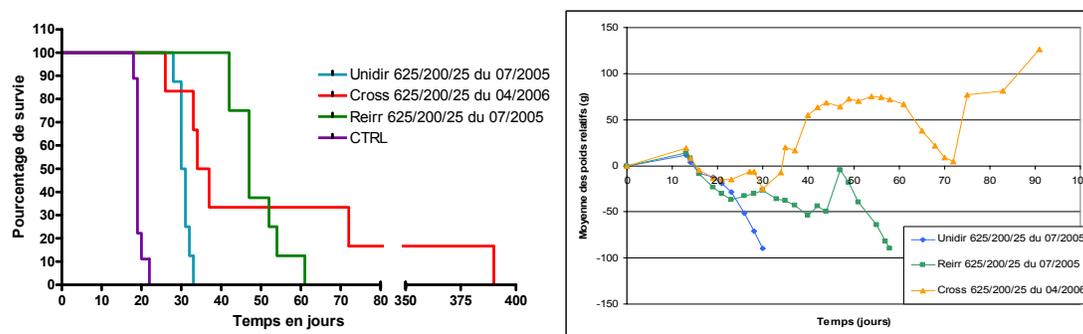
**Tableau 10 : poids des 32 premiers rats porteur d'une tumeur 9L intracérébrale et irradiés avec des microfaisceaux de 25 µm espacés de 200 µm en mode unidirectionnel. Les valeurs en orange indiquent une perte de poids et les valeurs en vert, un gain de poids.**

Les rats sont irradiés une première fois latéralement, 14 jours après l'implantation, en mode MRT avec des faisceaux unidirectionnels à 625/200/25 (zone d'irradiation de 10 mm de large et 11 mm de haut dont 1 mm dans l'air). Ils sont réirradiés 7 jours plus tard avec le même protocole mais dans la direction antéropostérieure, le centre de la zone de croisement des deux groupes de microfaisceaux correspondant au centre théorique de la tumeur (série reirr). Les résultats obtenus sont comparés avec une double irradiation à J14 en faisceaux croisés orthogonalement (irradiations latérale et antéropostérieure) à 625/200/25 avec les mêmes

zones d'irradiation (série cross). Ces résultats sont également comparés à ceux obtenus par une irradiation unidirectionnelle à 625/200/25.

La présence des tumeurs a été vérifiée la veille de l'irradiation par IRM et les rats dont la présence de tumeur n'a pu être diagnostiquée ont été sortis de l'étude. En juillet 2005, la tumeur a été vue avec certitude chez 120/139 rats. En avril 2006, 19/22 rats ont présenté un diagnostic positif.

La médiane de survie des rats réirradiés est supérieure à celle des séries des rats irradiés en faisceaux unidirectionnel et croisés (47 ; 30,5 et 35,5 jours, respectivement). La différence entre la courbe de survie des rats réirradiés et la courbe de survie des rats irradiés en unidirectionnel est significative ( $p < 0,0001$ ) tout comme la différence entre la courbe de survie des rats irradiés en faisceaux croisés et celle des rats irradiés en unidirectionnel ( $p = 0,0106$ ). Par contre il n'y a pas de différence significative entre les courbes de survie des rats irradiés en faisceaux croisés et en réirradiation ( $p = 0,9286$ ) (Figure 56).



Série	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	SLT	N=
Unidir 625/200/25 du 07/2005	30,5	30,6	0,53	0	8
Reirr 625/200/25 du 07/2005	47	49	2,27	0	8
Cross 625/200/25 du 04/2006	35,5	98,6	58,6	1	5+1
CTRL du 07/2005	19	18,8	0,2	0	5
CTRL du 04/2006	19,5	20	0,7	0	4

Figure 56 : En haut à gauche : courbes de survie des rats irradiés avec le collimateur Tecomet à 625 Gy avec des microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  espacés de 200  $\mu\text{m}$  en mode unidirectionnel, faisceaux croisés et réirradiation. En haut à droite : courbes de poids relatifs moyens des rats appartenant à ces trois séries. En bas : données statistiques sur les rats appartenant à ces trois séries.

Les avantages apportés par chacun de ces modes d'irradiation sont différents. En effet si l'irradiation en mode faisceaux croisés augmente la survie de 2 individus sur 6 dont un survivant à long terme, elle a peu d'influence sur la survie générale de tous les individus. La médiane de survie obtenue est très proche de la médiane de survie en mode unidirectionnel (Figure 56) pourtant les courbes de survie sont significativement différentes grâce aux deux

derniers survivants de la série irradiée en faisceaux croisés. Le survivant à long terme a vécu 390 jours avec un bon état clinique général.

La courbe de poids relatif moyen de la série réirradiation ne présente aucune augmentation notable : les rats maintiennent un poids plutôt faible et maigrissent petit à petit dans le temps. La tumeur est donc toujours présente mais sa croissance est ralentie chez tous les individus, leur permettant d'augmenter leur survie (médiane de survie largement augmentée par rapport aux 2 autres séries : Figure 56), même en l'absence de guérison totale.

Dans la série des rats irradiés en faisceaux croisés, 4/6 cerveaux de rats ont été analysés en histologie, parmi lesquels le rat survivant à long terme (Q11). Dans la série réirradiation, 7/8 cerveaux de rats ont été analysés. La comparaison entre le tissu sain doublement irradié (hémisphère droit) et le tissu sain irradié en unidirectionnel (hémisphère gauche) est rendu difficile par la présence de la tumeur envahissant la *quasi* totalité de l'hémisphère droit chez tous les rats (et chez un rat de la série faisceaux croisés la tumeur est également présente dans le cervelet). Seul le cerveau du rat Q11 ne présente aucune trace de tumeur. Chez ce rat le tissu sain lésé est compris en grande majorité dans les limites des faisceaux croisés, nettement visibles sur l'une des coupes (Figure 57).

Il semble que le tissu sain des rats irradiés en faisceaux croisés soit un peu plus endommagé que celui des rats de la série réirradiation chez lesquels il y a moins de télangiectasie. Par contre la quantité d'altérations spongiformes est équivalente dans les 2 séries. Des microcalcifications ne sont visibles que chez Q11 sans doute dues à la fois à l'âge du rat et aux effets des irradiations.

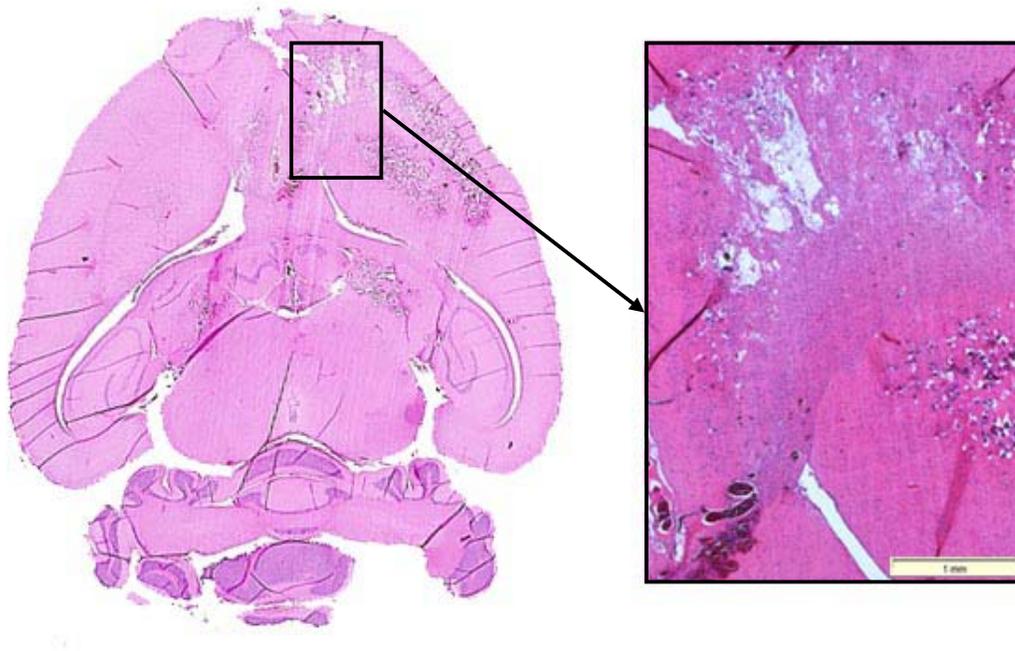
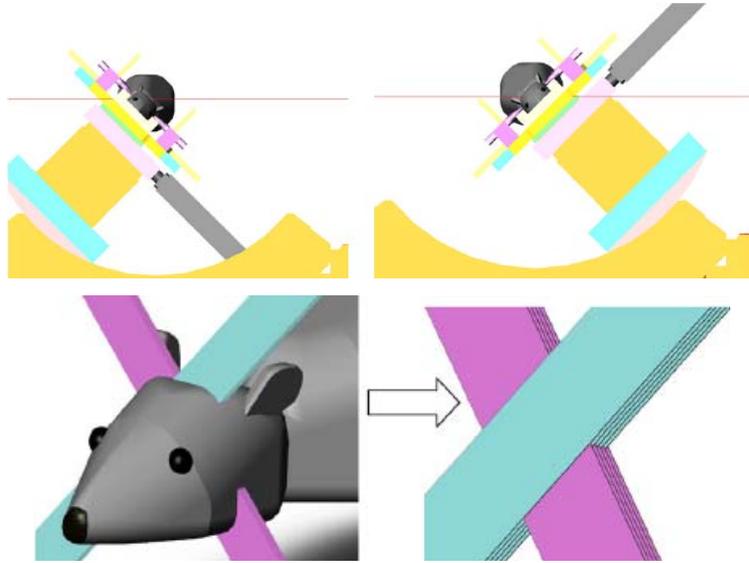


Figure 57 : Histologie HE de Q11 : le tissu sain est lésé dans la zone de croisement des microfaisceaux visibles dans la zone agrandie (G x 20).

### III.2.6. Irradiation en faisceaux croisés utilisant une géométrie originale

Il a été montré qu'un espacement de 200  $\mu\text{m}$  préserve suffisamment le tissu sain mais n'est pas assez efficace contre la tumeur alors qu'à 100  $\mu\text{m}$  le tissu sain est lésé mais les médianes et moyennes de survie des rats fortement prolongées (cf III.2.1.). Pouvoir combiner ces deux aspects devrait permettre d'allier efficacité thérapeutique et préservation des tissus sains. Une géométrie d'irradiation permettant l'irradiation du tissu sain avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  tout en irradiant le tissu tumoral avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  a donc été développée. La technique consiste en une première irradiation à 200  $\mu\text{m}$  d'espacement à un angle de  $-45^\circ$  par rapport au faisceau, suivie d'une seconde irradiation à  $+45^\circ$  toujours avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  mais décalée de 100  $\mu\text{m}$  par rapport à la première (Figure 58).



**Figure 58 : En haut : la première irradiation est réalisée avec un angle de  $-45^\circ$  par rapport au faisceau entrant, la seconde irradiation avec un angle de  $+45^\circ$ . En bas : Les microfaisceaux se croisent à la localisation de la tumeur.**

Outre les estimations théoriques de doses calculées grâce à des simulations Monte-Carlo (code Penelope), la faisabilité de cette technique a été validée par des irradiations de films et de fantômes, puis de rats. L’histologie réalisée 3 semaines après l’irradiation montre que la géométrie recherchée est bien présente et bien conservée dans les tissus, tout en étant limitée à la zone ciblée, permettant l’utilisation ultérieure de cette géométrie dans des protocoles de thérapie préclinique. Cette étude a été publiée dans le journal *Physics in Medicine and Biology* [Brauer-Krisch, 2005].



## New irradiation geometry for microbeam radiation therapy

E Bräuer-Krisch<sup>1</sup>, H Requardt<sup>1</sup>, P Régnard<sup>1</sup>, S Corde<sup>1</sup>, E Siegbahn<sup>1</sup>,  
G LeDuc<sup>1</sup>, T Brochard<sup>1</sup>, H Blattmann<sup>2</sup>, J Laissue<sup>3</sup> and A Bravin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ESRF, European Synchrotron Radiation Facility, BP 220, 6, rue Horowitz,  
38043 Grenoble Cedex, France

<sup>2</sup> Niederwiesstrasse 13 C, CH-5427 Unterschiggenhal, Switzerland

<sup>3</sup> Institute of Pathology, University of Bern, Murtenstrasse 31, 3010 Bern, Switzerland

E-mail: [brauer@esrf.fr](mailto:brauer@esrf.fr)

Received 14 February 2005, in final form 9 May 2005

Published 22 June 2005

Online at [stacks.iop.org/PMB/50/3103](http://stacks.iop.org/PMB/50/3103)

### Abstract

Microbeam radiation therapy (MRT) has the potential to treat infantile brain tumours when other kinds of radiotherapy would be excessively toxic to the developing normal brain. MRT uses extraordinarily high doses of x-rays but provides unusual resistance to radioneurotoxicity, presumably from the migration of endothelial cells from 'valleys' into 'peaks', i.e., into directly irradiated microslices of tissues. We present a novel irradiation geometry which results in a tolerable valley dose for the normal tissue and a decreased peak-to-valley dose ratio (PVDR) in the tumour area by applying an innovative cross-firing technique. We propose an MRT technique to orthogonally crossfire two arrays of parallel, nonintersecting, mutually interspersed microbeams that produces tumouricidal doses with small PVDRs where the arrays meet and tolerable radiation doses to normal tissues between the microbeams proximal and distal to the tumour in the paths of the arrays.

(Some figures in this article are in colour only in the electronic version)

### 1. Introduction

The principle of using microbeams as a potential alternative in radiotherapy lies on one hand in the destruction of the vascularization of the tumour and on the other hand in the high normal tissue tolerance of such microbeams. This unpredictable tolerance of normal tissue to microbeams was attributed to the narrowness of the beams, enabling the regeneration of blood vessels in the path of the beams, thanks to the minimally irradiated vasculature adjacent to that path. In conventional therapy, each beam is at least several millimetres, so that the biological advantage of rapid repair by migrating or proliferating endothelial cells is minimal or non-existent. Thus, the principle of MRT is based on the use of beams that are an order of magnitude

smaller than the smallest radiation beams currently in clinical use. This dose–volume effect might therefore be used in the future in radiotherapy where crucial tissue must be spared and selectively different sensitivities of the vasculature between tumour and the surrounding tissue can be exploited. During the past decade, potential applications of microbeam radiation therapy (MRT) have been studied experimentally at the National Synchrotron Light Source (NSLS) at Upton, New York, USA (Slatkin *et al* 1992, 1995, Dilmanian *et al* 2001, Laissue *et al* 1998) and at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble, France (Laissue *et al* 1999, 2001, Thomlinson *et al* 2000). For these MRT trials a synchrotron source of x-rays with an extremely high-dose rate is needed to irradiate tissues with, for example 300 Gy, in a fraction of a second, which assures minimal broadening of the microslices of intensely irradiated tissues attributable to movement of the target. The ESRF preclinical MRT program comprised irradiation of normal brain tissues in weanling piglets (Laissue *et al* 2001) and suckling rats followed by long-term (9–15 months) neurobehavioral observation, MRI imaging and finally histopathological studies. Laissue *et al* (1998, 1999, 2001) describe surprisingly high tissue tolerances to multiple microbeams, which is especially remarkable for developing tissues, well known as radiosensitive. MRT might palliate or even ablate malignant brain tumours if there is sufficient sparing of normal tissue radiation damage in the ‘valleys’ between individual microbeams. When such sparing is observed experimentally, it is of crucial importance to know the maximum valley doses in the normal, radiosensitive tissues of the target zone by predicting what doses and microbeam array geometries are safe and therapeutically useful in clinical research.

We present an irradiation geometry, optimizing the valley dose for the normal tissue to tolerable dose values and at the same time increasing the valley dose only in the tumour and its close vicinity. The mechanical feasibility of this technique is demonstrated and its potential to increase the efficiency for local dose deposition in the tumour is highlighted by Monte Carlo calculation. This microbeam-interspersed technique was used to crossfire 9 L gliosarcomas in the brains of Fischer rats. We have equally applied this cross firing technique to normal (non-tumour bearing) Fisher rats for better analysis of histopathological images to be provided 3 weeks after irradiation, when the microbeam tracks in the tissue are very well visible.

## 2. Peak-to-valley dose ratios in MRT

One important parameter in MRT is the PVDR (peak-to-valley dose ratio), namely the ratio between the dose value at the centre of the peak and the dose value in the region between two adjacent peaks (valley dose). The latter is essentially created by the multiple Compton scattered photons and the energy in the valley is as well deposited by the created photoelectrons, particularly in the region close to the peaks. The valley dose must not exceed a certain threshold dose to assure efficient tissue repair within intensely irradiated microslices. These valley doses depend on several parameters including: photon energy, number of microbeams, microbeam width and height, centre-to-centre distance, as well as the depth, shape and composition of tissues proximal to, within, and distal to the target. Several Monte Carlo (MC) codes were compared, the results of which emphasize the importance of electron tracking to compute dose depositions within  $\mu\text{m}$ -sized volumes (Stepanek *et al* 2000).

## 3. Instrumental set-up

The highly collimated synchrotron radiation (SR) x-ray beam is produced at the ID17 wiggler source. The current MRT program at the ESRF ID17 Biomedical Beamline uses a filtered,

'white' beam spectrum, where the lower energies are cut off by 1.5 mm of aluminium and 1.0 mm of copper with its maximum intensity at 83 keV. This filtering provides us with an energy spectrum from about 50 to well above 350 keV with a median energy of 107 keV. After the passage through a beryllium window, the SR beam is in air and passes through an ionization chamber (IC1) before impinging on the 'Archer' multislit collimator (Archer 1998) (MSC) which is placed at 33 m from the source (Bräuer-Krisch *et al* 2003). The collimator was set to produce an average of a microbeam width of 25  $\mu\text{m}$  with a centre-to-centre (c-t-c) distance of 211  $\mu\text{m}$  at the location of the goniometer. The primary and MRT slits were closed down to 8 mm horizontal opening, which should cover the total maximum width of the tumour, typically around 4 mm, including a certain safety margin. The animals were positioned on a stereotactic frame on top of a 90° circle mounted on our three-axis, Kappa-type goniometer (Huber, Germany). The irradiation is performed by moving the sample upwards through the beam, so that pre-selection of the speed of vertical translation of the target allows irradiating the selected tissue area with precisely the desired dose. A fast shutter system (Renier *et al* 2002), which is positioned upstream from the MSC and synchronized with the vertical translation of the goniometer, permits specifying the time that each element of the sample is exposed to the beam. An acceleration and deceleration time is calculated and automatically applied to ensure a perfectly constant movement of the target during the exposure. After anaesthesia, the animal is aligned with its long axis from nose to tail, perpendicular to the beam, rigidly fixed in the stereotactic frame. Thus, a perfect rotation around the tumour is assured (figures 1(a) and (b)). This represents a crucial aspect of the irradiation. The accurate alignment was verified by the use of radiochromic film dosimeters mounted at the location of the tumour, once horizontally, to correct for a possible misalignment in the 'roll' direction (around the beam axis), and then vertically, to correct with the theta rotation to insure perpendicular beams along their trajectory. For the first irradiation the animal is rotated 45° around an axis of rotation transverse to the direction of beam propagation that passes through the isocentre of the tumour (figure 1(a)). Before the second irradiation, the rat is rotated 90° around that axis (figure 1(b)). In order to interlace rather than intersect the orthogonally propagated microbeam planes, a horizontal translation of 105  $\mu\text{m}$ , transverse to the direction of propagation of the microbeams, is implemented before the second exposure (figure 2). The set-up for the irradiation is shown in figures 1(a) and (b), illustrating a first irradiation at -45° and the second at +45°. The ear plugs are at -45° (figure 1(a)) and at +45° with respect to the horizontal line and the animal is mounted facing the observer. The horizontal line corresponds to the SR beam impinging laterally from right to left onto the left side of the rat head, traversing the tumour at its isocentre.

#### 4. Monte Carlo calculations of dose deposition

Theoretical calculations are based on computations done using the Penelope Monte Carlo (MC) photon-electron transport code (Salvat *et al* 2003) to allow for very precise particle tracking when dose deposition at a micrometric range is required. In this work the Monte Carlo code PENELOPE Monte Carlo code has been used (Salvat *et al* 2003). The authors of this code have put special emphasis on implementing accurate low-energy electron interaction cross sections. This is of interest in MRT studies since the dose is deposited by secondary electrons of lower energies than in conventional radiotherapy. PENELOPE has been used in many other dosimetric studies in the medical field. The codes used in earlier studies of MRT, PSI-GEANT3 and EGS4 have different electron transport schemes compared to PENELOPE. PSI-GEANT3 performs detailed simulation of electron transport collision by collision. EGS4 groups electron collisions according to multiple-scattering distributions. PENELOPE on

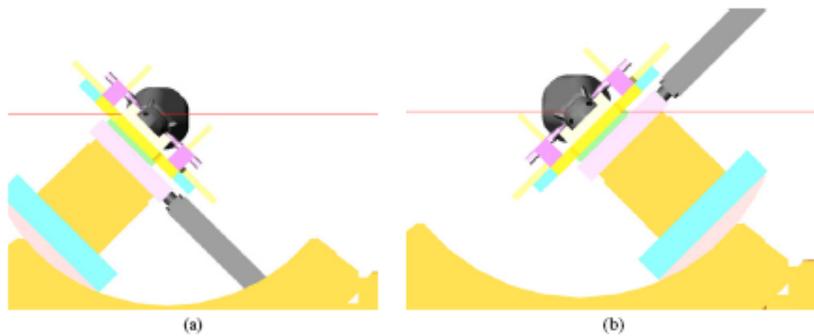


Figure 1. (a) First irradiation with the sample at  $-45^\circ$  with respect to the incoming beam. (b) Irradiation with the sample at  $+45^\circ$  with respect to the beam.

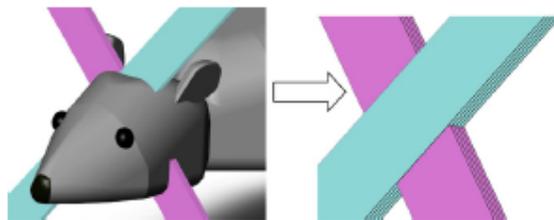


Figure 2. Planes of microbeams crossing at the location of the tumour.

the other hand can be run in either single- or multiple-scattering mode. Simulations with PENELOPE in either of these modes were shown to give nearly identical results.

Most of the theoretical calculations using MC codes have predicted the dose distribution around one single microbeam in the radial direction for very small voxel sizes such as  $5 \mu\text{m}$  (Dilmanian *et al* 2001). These calculations must be performed for distances from the microbeam peak extending perpendicularly several millimetres outwards in the direction of the beam, since the actual valley dose is calculated by adding the tails of many microbeam dose profiles. The rat was simulated as a PMMA-cylinder of radius 1 cm and length 4 cm in which the dose was scored between 9 and 11 mm depth which should correspond to the depth of the tumour. The simulation of one microbeam profile was performed since any number of microbeams can then be superimposed to get the composite distribution. The calculations must be performed for distances of several millimetres from the microbeam peak, extending perpendicularly to the direction of the beam, since the actual valley dose is calculated by adding the tails of many microbeam dose profiles. For the geometry presented here each of the two mutually orthogonal microbeam arrays traverses the tumour zone. The microbeams comprising those arrays are interspersed microscopically with each other within two overlapping zones of intersection in and around the tumour. Thus, the inter-beam spacing outside the target remains in the normal-tissue-sparing range,  $211 \mu\text{m}$ . Conversely, the centre-to-centre distance within the tumour is halved to  $105 \mu\text{m}$ , which has been found empirically to be within the tumouricidal range, and probably rather radiotoxic to normal brain tissues in

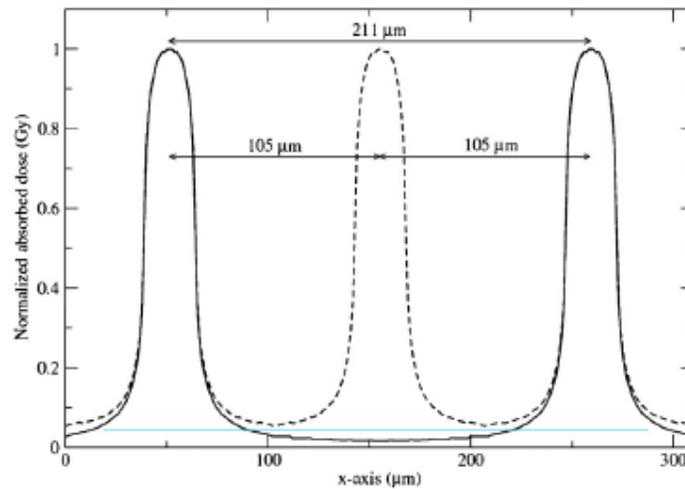


Figure 3. Dose distribution with different microbeam centre-to-centre distances: 105 and 211 microns. The horizontal line represents the threshold dose for healthy tissues.

Table 1. Summary of irradiation protocol, and peak and valley dose.

Dose (peak) (Gy)	625	550	450	Centre-to-centre distance
Dose (valley) (Gy)	11.7	10.3	8.4	211 $\mu\text{m}$
Normal tissue				
Dose (valley) (Gy)	34.4	30.3	24.8	105 $\mu\text{m}$
Tumour area				

the region of intersection. This will give rise to high valley doses only in the area around the tumour (table 1).

### 5. Irradiation protocol

Rats were irradiated with x-ray incident doses of 625, 550 and 450 Gy with 42 microplanar beams of 25  $\mu\text{m}$ , with a c-t-c distance of 211  $\mu\text{m}$ . Two lateral microbeam array irradiations were performed in a coronal plane, with an angle of 90° between both arrays, and an angle of -45° or +45°, respectively, with the incoming beam, each array straddling a fixed hypothetical horizontal anteroposterior line that passed through the isocentre of the tumour, transverse to the direction of propagation of the beams (figure 2).

Figure 3 shows a schematic illustration of PVDRs and their decrease of valley dose if the second irradiation plane is centered with its peak situated between the peaks of the first irradiation. A spacing of 211  $\mu\text{m}$  can result in a valley dose still low enough for the normal tissue to recover without any damage (the threshold dose lies just below the horizontal line), while the 105  $\mu\text{m}$  spacing in the tumour and its vicinity increases the valley dose to an absolute dose value indicated above the horizontal line.

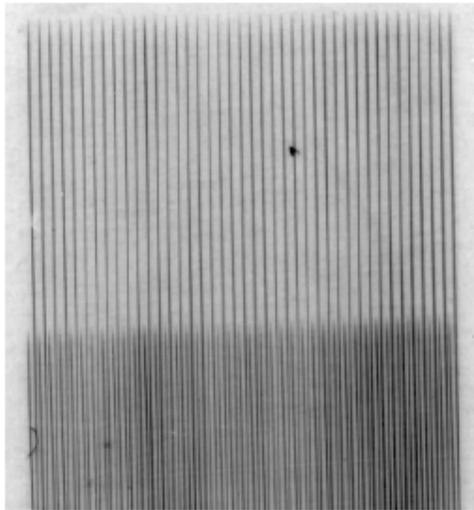


Figure 4. Gafchromic film image of interlaced microbeams; the upper part corresponds to a centre-to-centre distance of  $211\ \mu\text{m}$  and the lower part to  $105\ \mu\text{m}$ .

## 6. Preliminary results

Here we demonstrate that this irradiation geometry is technically feasible. The purely geometrical picture of the crossing microbeams is shown in figure 4, with the intersection in the horizontal plane where the second array is interlaced with the first one. The centre-to-centre distance of the microplanes in the first irradiation is  $211\ \mu\text{m}$  and the c-t-c distance of the second irradiation was about  $105\ \mu\text{m}$ . The mechanical feasibility can be demonstrated by the Gafchromic films, but in order to answer the question if the interlaced feature of our cross-fired microbeams is still preserved inside the brain of the irradiated specimen, we present in figures 5 and 6 the horizontal histology sections of such irradiated Fisher rats. Our histological slices are taken from 3 weeks post-irradiated specimen with microbeam entrance doses of 625 Gy and 550 Gy respectively. The parallelism of the microbeams is well preserved inside the tissue, despite the microscopic movements due to the pulsation of the heart beat and a non-rigid target like the brain. The perfectly parallel alignment of the microbeams inside the irradiated specimen is reduced only in the range of a few  $\mu\text{m}$ . The horizontal cuts actually represent sections inclined at  $45^\circ$  with respect to the incoming beams, which permits a judgment of the parallelism in one plane. Each slice from the top to the bottom of the brain was equally visualized under the microscope and no crossing of the microbeams was observed in any slice, but the same regular pattern of parallel beams. The theoretical distances of the interspersed beams should be  $105\ \mu\text{m}$ , but the measured distances of the microbeams are regularly altered between about  $90\ \mu\text{m}$  and  $120\ \mu\text{m}$ . This results in slightly different PVDRs as those presented in table 1, but the most important improvement lies in the fact that valleys doses can selectively be increased in the tumour area while high enough PVDRs can be kept for the normal tissue.

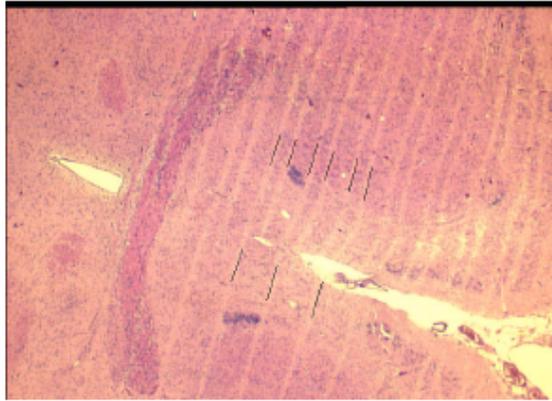


Figure 5. Horizontal histological section of one of the hindbrain of a rat irradiated in the geometry proposed above with 625 Gy. The black lines are additionally inserted to demonstrate the smaller c-t-c distances in the upper part of the picture (right hemisphere) and the larger c-t-c distances in the lower part of the picture (left hemisphere).



Figure 6. Histological section of an animal irradiated with 550 Gy, E site is the entrance for the microbeams (left hemisphere) showing about 210  $\mu\text{m}$  spacing c-t-c distances. The right, tumour-bearing side showing more densely packed microbeams of approximately 105  $\mu\text{m}$  c-t-c spacing. The tumour re-growth has modified the microbeam signature in the intermediate region.

The set-up presented in this paper allows us to provide a high-precision alignment of the parallel microbeams and a nearly perfect rotation around the centre of the tumour to make the microbeams intercept with each other in such a way that every other plane is positioned with its peak just at the centre of the valley from the first irradiation. The microbeam planes are (interspersed with each other) spatially condensed only within the tumour area. This results in an irradiation regime for the normal tissue of 625 Gy peak dose and a c-t-c distance of 211  $\mu\text{m}$  and a limited central tumour volume of as well 625 Gy peak dose but with a c-t-c distance of 105  $\mu\text{m}$ . The key point of this geometry is the increase of the valley dose to a potentially radiotoxic value limited at and around the tumour area. Recent results (Régnerd 2004) for unidirectional irradiations have shown that these dose values are very well tolerated by the normal tissue but the tumour control is incomplete. For the irradiation protocol using

a c-t-c distance of 105  $\mu\text{m}$ , the tumour control is far superior, but the valley doses are no longer very well tolerated by the healthy tissue. We have therefore suggested combining these findings in optimized conditions for an irradiation protocol that spares the normal tissue as much as possible and becomes more toxic in a very limited area around the tumour. According to our Monte Carlo calculations we should profit from the increase of the valley dose by about a factor of 3.

From experiments with the chorioallantoic membrane of the chicken egg (CAM) model (Blattmann *et al* 2002), we can see that high peak doses can completely destroy the capillaries; only when sufficient 'low-dose irradiated' volume has survived the irradiation can radiogenic lesions be repaired well enough to preserve tissue integrity. One could imagine such microbeam lesions like ultrathin cuts which can easily be repaired if they are thin enough, and there is sufficient space between them. By the approach described above we are hoping to put the lesions within the tumour area close enough to achieve its total destruction while keeping the necessary tissue sparing effects for the normal tissue.

## 7. Discussion

Little is known about the tissue tolerances and threshold doses for MRT of very small targets. There are several methods for increasing the therapeutic index of MRT, first of all by limiting the cross-fired zone more closely to the actual tumour area. This will be the case if an adequate imaging technique can be used for the same set-up and the densely irradiated volume will be reduced to the actual tumour size. Additionally, a better understanding between the physical and biological correlation of parameters such as microbeam planar width, c-t-c distances, etc, is needed to optimize the parameters which can then be selected more specifically for the normal tissue area and the tumour region. Moreover, this technique should result in a more important advantage if we move to bigger volumes to be irradiated, since in this case the ratios between the total volume of the brain, the irradiated volume and the more densely cross-fired tumour volume are becoming more favourable. Additionally, we can alleviate the limitation of normal tissue dose, and thereby the limitation of therapeutic efficiency due to skin dose thresholds.

## Acknowledgments

The authors thank D Dallery for all his assistance with the animals, C Clair for the histology, F Lopes for the Gafchromic film measurements and D N Slatkin for reviewing the manuscript.

## References

- Archer D W 1998 Collimator for producing an array of microbeams *US Patent No. 5771270*
- Blattmann H, Burkard W, Djonov V, Di Michiel M, Brauer E, Stepanek J, Bravin A, Gebbers J O and Laissue J A 2002 Microbeam irradiation of the chorio-allantoic membrane (CAM) of chicken embryo *Strahlenther. Onkol.* 178 (Suppl. 1) 118
- Bräuer-Krisch E, Bravin A, Rosenfeld A B, Lerch M, Stepanek J, DiMichiel M and Laissue J A 2003 MOSFET dosimetry for microbeam radiation therapy at the European Synchrotron Radiation Facility *Med. Phys.* 30 583–9
- Dilmanian F A *et al* 2001 Response of avian embryonic brain to spatially segmented x-ray microbeams *Cell. Mol. Biol.* 47 485–94
- Laissue J A *et al* 1998 Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous-brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated x-rays *Int. J. Cancer* 78 654–60
- Laissue J A *et al* 1999 Microbeam radiation therapy *Proc. SPIE* 3770 38–45
- Laissue J A *et al* 2001 The weanling piglet cerebellum: a surrogate for tolerance to MRT (microbeam radiation therapy) in pediatric neuro-oncology *Proc. SPIE* 4508 65–73

- Orion I, Rozenfeld A, Dilmanian F A, Telang F, Ren B and Namito Y 2000 Monte Carlo simulation of dose distributions from a synchrotron-produced microplanar beam array using the EGS4 code system *Phys. Med. Biol.* **45** 2497–508
- Renier M, Brochard T, Nemoz C and Thomlinson W 2002 A white-beam fast-shutter for microbeam radiation therapy at the ESRF *Nucl. Instrum. Methods A* **479** 656–60
- Régnard P 2004 Thérapie par micro-faisceaux appliquée à la pathologie tumorale cérébrale chez le rat *Veterinarian Medicine Thesis Ecole Nationale Vétérinaire Lyon, Lyon, France*
- Salvat F, Fernández-Varea J M and Sempau J 2003 *PENELOPE: A Code System for Monte Carlo Simulation of Electron and Photon Transport* (OECD Nuclear Energy Agency) Issy-les Moulineaux-France
- Slatkin D N, Spenne P O, Dilmanian F A and Sandberg M 1992 Microbeam radiation therapy *Med. Phys.* **19** 1395–400
- Slatkin D N, Spanne P O, Dilmanian F A, Gebbers J O and Laissue J A 1995 Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler *Proc. Natl Acad. Sci.* **92** 8783–7
- Stepanek J, Blattmann H, Laissue J A, Lyubimova N, DiMichiel M and Slatkin D 2000 Physics study of microbeam radiation therapy with PSI-version of Monte-Carlo code Geant as a new computational tool *Med. Phys.* **27** 1664–75
- Thomlinson W *et al* 2000 Research at the European Synchrotron Radiation Facility Medical Beamline *Cell. Mol. Biol.* **46** 1053–63

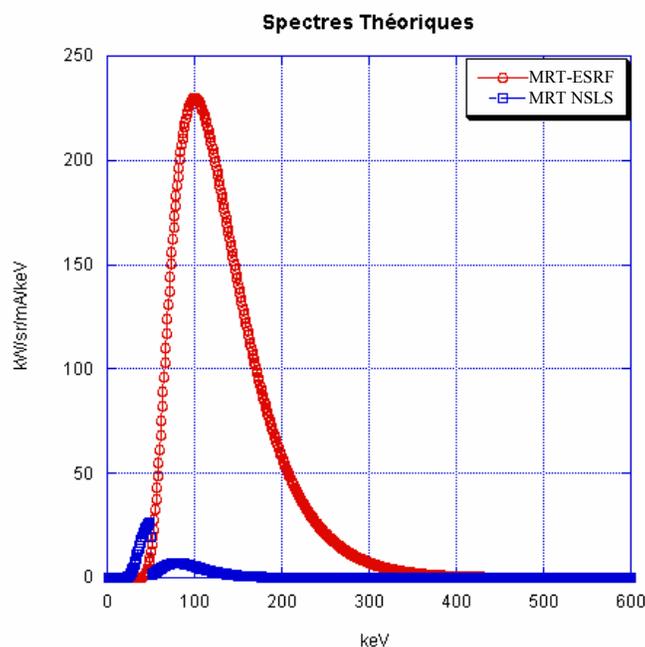
## III.3. Discussion

### III.3.1. L'espacement

Les irradiations réalisées avec des microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  espacées de 100, 150 et 200  $\mu\text{m}$  ont été effectuées à la même dose pic : 625 Gy. A 100  $\mu\text{m}$  d'espacement, bien que la médiane de survie soit considérablement augmentée (ILS = 235%) et que 5/11 rats soient guéris de leur tumeur, les animaux sont quand même décédés (survie maximale 158 jours) et l'analyse histologique de leurs cerveaux révèle un taux important de lésions du tissu sain irradié. Cette expérience peut être comparée à un protocole similaire (625/100/25) publié par Jean Laissue [Laissue, 1998] présentant un taux d'ablation de tumeur égale et une médiane de survie plus faible (44 jours contre 67 jours) mais plus de survivants à long terme (36%) qui ne survivront cependant pas plus d'un an.

Les différences de résultats apparaissant entre ces deux protocoles identiques (625/100/25) peuvent s'expliquer par d'autres variations ayant eu lieu en amont. Contrairement au NSLS, la compensation de l'équilibre électronique est pris en compte lors du calcul du temps d'irradiation à l'ESRF, aboutissant à une différence de dose déposée de 20% soit 636 Gy pour la dose pic et 31,3 Gy pour la dose vallée à l'ESRF et 500 Gy et 25 Gy pour les doses pic et vallée au NSLS (si le PVDR est supposé équivalent). Une dose plus faible permet alors une meilleure conservation du tissu sain (en conservant une efficacité suffisante pour détruire la tumeur) et prolonge la survie des animaux. A cela, peuvent s'ajouter des différences dues aux

spectres d'irradiation différents sur la ligne X17 du NSLS et ID17 de l'ESRF<sup>♦</sup> (Figure 59), et à l'utilisation d'un collimateur multifentes (Archer) au lieu d'une simple fente. L'utilisation d'un collimateur multifente entraîne (i) une irradiation plus rapide (irradiation de l'ordre de la seconde avec un collimateur multifente et de l'ordre de plusieurs minutes pour une simple fente) (ii) une moins bonne homogénéité des microfaisceaux (taille et intensité).



**Figure 59: Spectres théoriques comparés des faisceaux utilisés à l'ESRF et au NSLS pour les expériences de MRT.**

Le protocole à 200  $\mu\text{m}$  d'espacement, bien que moins performant que le protocole à 100  $\mu\text{m}$  d'espacement pour l'ablation des tumeurs (2/32 contre 5/11), permet de garder les individus guéris en bon état clinique. Il sera alors possible de mettre en place des protocoles plus complexes dont le but sera d'augmenter localement la dose.

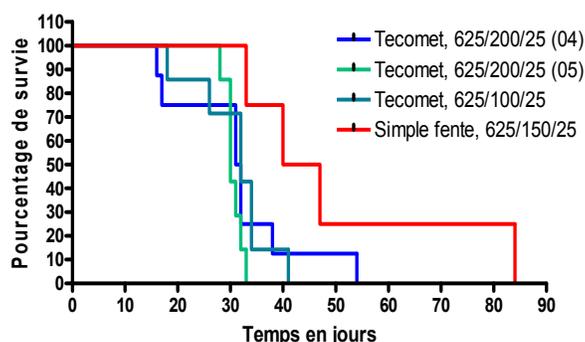
La série réalisée à 150  $\mu\text{m}$  en mode simple fente permet d'observer les effets d'un espacement d'irradiation intermédiaire entre 100 et 200  $\mu\text{m}$ . Les 4 rats ainsi irradiés ont présenté une médiane de survie comprise entre celles des rats irradiés avec les espacements de 100 et 200  $\mu\text{m}$  d'espacement (38,5, 43,5 et 67 jours pour les irradiations avec un espacement de 200, 150 et 100  $\mu\text{m}$ , respectivement). La médiane de survie des animaux est donc dépendante de l'espacement des microfaisceaux : dans l'intervalle étudié, plus l'espacement diminue, plus la médiane de survie augmente. Ainsi la distance entre les microfaisceaux est un paramètre

<sup>♦</sup> Il faut également noter que l'influence du mode de remplissage, s'il en a une, n'est pas connue.

important en ce qui concerne le ralentissement de la croissance tumorale, voire son élimination. L'utilisation de ce paramètre est cependant limitée par de plus grands dommages causés au tissu sain : les rats des séries irradiées à 150  $\mu\text{m}$  et 100  $\mu\text{m}$  ont présenté un plus grand nombre de signes cliniques et un gain de poids réduit à inexistant. Les brûlures causées à la peau entraînant l'apparition de croûtes à un espacement de 150  $\mu\text{m}$  sont sans doute dues à l'absence des 16 mm d'aluminium, présents dans le collimateur Archer. Il apparaît donc que l'irradiation à 150  $\mu\text{m}$  d'espacement en mode simple fente n'augmente que légèrement la médiane de survie des rats et semble toujours délétère pour le tissu sain à une dose de 625 Gy (courbe de poids). Cela peut expliquer l'absence de survivants à long terme (moyenne de survie de 51 jours) bien que le faible nombre de rats présent dans la série puissent également être une explication. De plus, le mode d'irradiation simple fente est très contraignant et peu fiable : le temps d'irradiation étant fortement prolongé et le nombre de mouvements opérés par les moteurs beaucoup plus nombreux, le risque d'apparition de problèmes durant une irradiation est beaucoup plus important (mouvement inconscient de l'animal ou problème de moteurs). Ainsi seul 4/10 rats irradiés ont pu être pris en compte dans cette étude. Les contraintes techniques, nuisant à la fiabilité des données, et les résultats mitigés obtenus à 150  $\mu\text{m}$  d'espacement limitent l'intérêt de ce mode d'irradiation. C'est pourquoi les expériences suivantes ont eu pour but d'améliorer les irradiations effectuées à partir des collimateurs multifentes, en prenant comme espacement de référence la valeur de 200  $\mu\text{m}$ .

### **III.3.2. Les collimateurs multifentes**

Le remplacement du collimateur Archer par le collimateur Tecomet est en fait responsable d'un décalage de toutes les courbes de survie vers la gauche, réduisant moyenne et médiane de survie (ILS et ILS<sub>re</sub> divisé par 2 ou plus). Bien qu'ayant connaissance de ce problème, il a dû être accepté en l'absence d'un 3<sup>ème</sup> collimateur disponible (à l'étude). L'utilisation du mode simple fente aurait pu être envisagée puisque les courbes de survie obtenues sont en adéquation avec les résultats Archer et supérieures aux résultats Tecomet (Figure 60). Cependant, une irradiation avec une simple fente ne sera jamais possible chez l'homme et afin de se rapprocher au maximum des protocoles développés pour de futurs essais cliniques les irradiations doivent être effectuées avec un collimateur multifentes. Le collimateur multifentes Tecomet est donc utilisé tout en sachant que les résultats obtenus sont *sub-*optimaux par rapport à ce qui pourrait être possible avec un meilleur collimateur.



**Figure 60:** Comparaison des courbes de survie obtenues en mode simple fente et avec le collimateur Tecomet.

Il est important de comprendre la ou les causes à l'origine des différences de survies obtenues avec les deux collimateurs. Leurs conceptions ont été totalement différentes puisque le collimateur Archer était destiné à l'usage préclinique sur rongeur alors que le collimateur Tecomet était conçu à la base en vue d'usage sur des grands animaux ou sur l'homme. Leurs principales caractéristiques sont résumées dans le Tableau 11.

	μfaisceaux	Espacement	Matériaux (longueur)	Épaisseur à traverser	à Dose vallée	Débit de dose
Archer	5-50 μm	210 μm	Au (150 μm) : vallée/ Al (50 μm) : pic	16 mm : vallée 16 mm : pic	+ haute	38 Gy/s
Tecomet	5-100 μm	400 μm	W (300 μm) vallée/ Air (100 μm) pic	16 mm : vallée 0 mm : pic	- haute	80 Gy/s

**Tableau 11:** Principales caractéristiques structurales et physiques des collimateurs multifentes Archer et Tecomet utilisés lors des expériences de MRT à l'ESRF.

Les 16 mm d'aluminium traversés par le faisceau lors de l'utilisation du collimateur Archer (contre 16 mm d'air dans le cas du collimateur Tecomet) entraînent une différence de spectre à la sortie du collimateur. Le spectre issu du collimateur Archer est donc amputé des rayons X les plus mous et les moins pénétrants. En mode simple fente ou en utilisant le Tecomet, ces rayons X de faible énergie peuvent être responsables de la présence de croûtes lors de l'irradiation. Pour une même dose pic, une même largeur de microfaisceaux et un même espacement, la dose vallée est légèrement plus importante avec le collimateur Archer qu'avec le Tecomet<sup>♦</sup> (PVDR plus important pour le collimateur Tecomet), puisque le spectre du

<sup>♦</sup> Résultats d'un calcul Monte-Carlo prenant en compte le spectre particuliers des collimateurs (les microfaisceaux issus des collimateurs sont considérés comme parfaitement parallèles et de tailles identiques, quel que soit le collimateur). Communication personnelle d'E. Bräuer-Krisch.

collimateur Tecomet est plus mou. La dose vallée étant le facteur primordial de la MRT, cette différence intervient sans doute dans le phénomène à l'origine des meilleurs résultats obtenus à partir du collimateur Archer. En effet, la dose vallée déposée lors de son utilisation étant plus élevée, elle va permettre de limiter plus efficacement la prolifération de la tumeur, pouvant même aller jusqu'à sa destruction avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$ <sup>^</sup>.

Cette explication ne permet cependant pas d'expliquer pourquoi avec le collimateur Tecomet la médiane de survie n'est pas dépendante de l'espacement des microfaisceaux (médiane de survie de 32 jours avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  et de 31,5 ou 30,5 jours avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$ ). D'autres paramètres différenciant les deux collimateurs doivent donc également être pris en compte. L'impact, peu connu, du débit de dose, qui est doublé avec l'utilisation du collimateur Tecomet, semble minime puisque dans les deux cas l'irradiation reste de l'ordre de quelques secondes, mais ne peut cependant être ignoré. L'influence du nombre d'irradiations nécessaires pour obtenir la distance de 100  $\mu\text{m}$  (2 pour le collimateur Archer et 4 pour le collimateur Tecomet) semble plus pertinente pour expliquer ce phénomène. D'autre part, l'homogénéité des microfaisceaux issus du collimateur Tecomet dépend de la partie du collimateur utilisée : en effet, il est composé de nombreuses feuilles de tungstène collées les unes aux autres et ce collage n'est pas parfait, entraînant des différences entre les microfaisceaux.

Alors que l'usure résultant de nombreux passages du collimateur Tecomet dans le faisceau blanc le détériore encore plus, un nouveau collimateur est actuellement en cours de caractérisation. Ce collimateur est composé de deux blocs pleins de tungstène (et non pas de collage de feuilles) dont seul la partie supérieure est évidée (à l'image d'un peigne) afin d'obtenir un espacement entre les microfaisceaux de 400  $\mu\text{m}$ . Les premières expériences sont encourageantes et montrent une grande homogénéité de la taille des microfaisceaux. Mais seules les premières expériences *in vivo* permettront d'en mesurer l'impact sur les tissus sains et tumoraux et de trouver les caractéristiques optimales de son utilisation.

Cependant, ce collimateur a été conçu en vue d'expériences sur de grands animaux. L'idéal serait donc d'en concevoir un second, avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$ , dédié aux essais précliniques sur le modèle rongeur. L'utilisation d'un matériel dédié est indispensable pour obtenir de meilleurs résultats en recherche préclinique, permettant de tester et de réaliser dans

---

<sup>^</sup> Concernant le PVDR, il diminue avec la profondeur de tissu. Lors d'irradiation de gros animaux ou pour des futurs essais cliniques, une valeur élevée du PVDR permettra une bonne pénétration et une bonne efficacité de la MRT. Pour les modèles de petits animaux, la question est plus délicate. Il semble qu'il existe une valeur optimale du PVDR qui reste à déterminer. Cette valeur n'est pas forcément la plus élevée (les effets respectifs de la dose pic et de la dose vallée n'étant pas connus).

des conditions optimales les différents protocoles de MRT (géométrie, drogue...). Il sera alors possible de développer cette technique de manière fiable et de préparer au mieux les essais cliniques sur gros animaux puis à plus longue échéance chez l'homme.

### **III.3.3. Optimisation des courbes de survie avec le collimateur Tecomet : variation des doses et des géométries d'irradiation**

#### **Variation de la dose pic**

Il a été montré dans le paragraphe III.2.4. que l'influence en irradiation unidirectionnelle de la dose pic sur les courbes de survie était quasiment inexistant sur des tumeurs irradiées 14 jours après l'implantation. A 200  $\mu\text{m}$  d'espacement, pour une dose pic variant de 625 à 900 Gy, les médianes et les moyennes de survie sont comprises entre 31 et 36 jours. Malgré les fortes variations de dose pic, les doses vallée restent toujours inférieures à 20 Gy d'après les simulations Monte-Carlo (Tableau 12). La dose vallée apparaît donc comme étant le paramètre primordial de la MRT au vu de ces variations de doses pic trop faible pour avoir un effet sur cette même dose vallée.

Il est intéressant de remarquer que la seule série présentant une moyenne de survie plus élevée est la série irradiée à 312 Gy avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  (51 jours). C'est la seule série avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  et une dose vallée inférieure à 20 Gy. Les autres séries irradiées avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  présentent une dose vallée à la tumeur supérieure à 30 Gy et les survies moyennes des rats sont de 31 et 36,6 jours à 625/100/25 et 500/100/25, respectivement. A 200  $\mu\text{m}$  d'espacement, aucune dose vallée ne dépasse 20 Gy à la tumeur et les moyennes de survies sont de 31,4 ; 34 et 34,7 jours à 625 ; 800 et 900 Gy respectivement. La limite de 20 Gy en dose vallée à la tumeur semble être une limite importante. A 200  $\mu\text{m}$  d'espacement cette dose vallée n'a jamais été dépassée alors qu'à 100  $\mu\text{m}$  le seul protocole présentant une amélioration de la survie est celui dont la dose vallée est inférieure à cette limite. Une irradiation permettant de dépasser la dose vallée de 20 Gy à 200  $\mu\text{m}$  pourrait permettre d'obtenir des résultats plus probants. A 100  $\mu\text{m}$  il conviendrait de diminuer encore cette dose vallée (en diminuant la dose pic) pour augmenter la différence de survie observée entre l'irradiation à 312 Gy et les irradiations à 500 et 625 Gy<sup>♦</sup>.

---

<sup>♦</sup> Il serait également intéressant de comparer ces résultats à ceux obtenus en irradiant des animaux sains. En effet, il faut noter que l'irradiation de témoins peut être létale, et même davantage que chez les animaux porteurs de tumeurs (car plus de tissu sain sera irradié et certaines structures peuvent être « déplacées » par la tumeur.

Il faut cependant rappeler que les calculs théoriques de doses ne prennent pas en compte le collimateur, qui influence grandement ces résultats de survie comme démontré dans le paragraphe précédent. L'intégration du collimateur dans les simulations de doses permettrait une meilleure analyse des résultats et une meilleure conception des futures expériences.

A 200  $\mu\text{m}$  d'espacement

	<b>Dose pic (Gy)</b>			<b>Dose vallée (Gy)</b>		
<b>A la peau</b>	625	800	900	8.8	11.3	12.7
<b>A la tumeur (5 mm)</b>	533	682.2	767.5	12.6	16.2	18.2

A 100  $\mu\text{m}$  d'espacement

	<b>Dose pic (Gy)</b>			<b>Dose vallée (Gy)</b>		
<b>A la peau</b>	636	509	317.5	31.3	25	15.5
<b>A la tumeur (5 mm)</b>	545	436	272	38.5	30.7	19

**Tableau 12 : Doses pic et doses vallée à la peau et à la tumeur, calculées pour un rat, en fonction de la dose d'entrée, à 200 et 100  $\mu\text{m}$  d'espacement.**

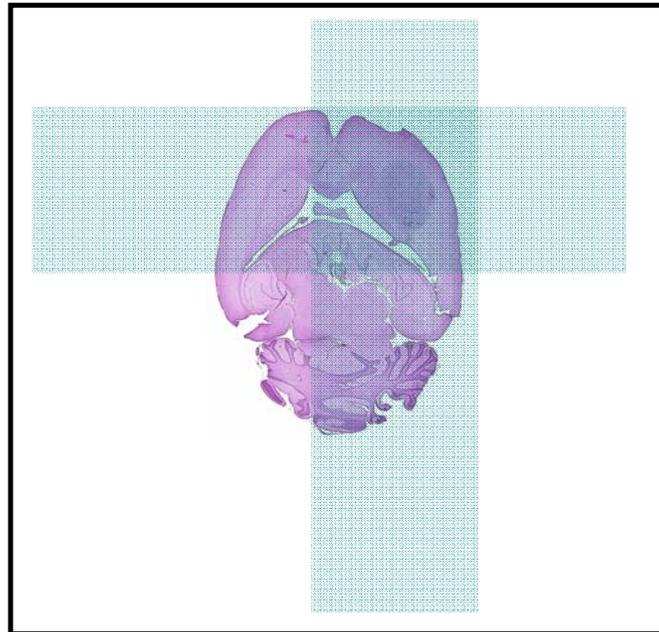
### **Variation de la largeur des microfaisceaux**

La variation de la largeur des microfaisceaux de 25 à 50  $\mu\text{m}$  pour un espacement de 200  $\mu\text{m}$  n'a pas non plus entraîné d'augmentation de survie. A 50  $\mu\text{m}$  d'espacement, pour une dose pic à la peau de 625 Gy, il a été calculé une dose vallée à la peau de 23 Gy qui est pourtant plus conséquente que la plus forte des doses vallée obtenue avec la simple augmentation de dose pic (12,7 Gy en vallée à la peau pour une dose pic de 900 Gy). Un survivant à long terme est apparu dans cette série, caractérisée aussi par un faible nombre de rats présentant des signes cliniques. De plus amples investigations des effets de la variation de la largeur des microfaisceaux sont actuellement en cours (Dr Raphaël Serduc).

### **Irradiation en faisceaux croisés**

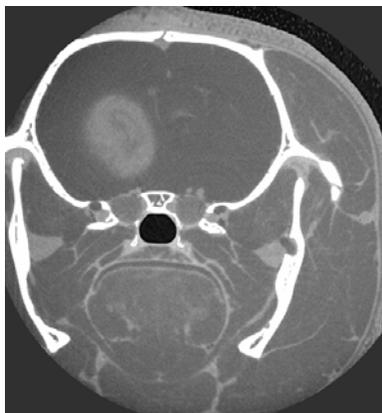
En revanche, l'irradiation en faisceaux croisés orthogonalement permet une augmentation importante de la moyenne de survie par rapport à une irradiation simple dans les mêmes conditions : 625/200/25 (moyenne = 98,6 jours et 30,6 jours respectivement). Il faut noter la présence d'un survivant à long terme dont la survie est supérieure à 1 an sur les 6 animaux irradiés. Cette augmentation de la survie ne doit pas faire perdre de vue la présence de signes cliniques alarmants chez les survivants. En fait le champ d'irradiation choisi (10 mm x 10 mm) est trop important, par comparaison à la taille moyenne des tumeurs ( $\approx 100 \text{ mm}^3$ , cf VI.2.4.1.). En effet, même s'il est toujours nécessaire d'irradier au-delà des marges de la

tumeur afin de prendre en compte les îlots de cellules extérieurs à celle-ci [Hofer, 2002], les marges de sécurité utilisées pour ces irradiations sont surestimées à cause de l'absence d'outil d'imagerie utilisable dans la cabine expérimentale, juste avant l'irradiation (Figure 61). Cette surestimation se fait au détriment de la préservation du tissu sain : le rat Q11 est décédé 390 jours après l'implantation mais la survie moyenne des rats Fischer se situerait plutôt autour de 600 jours.



**Figure 61 : Zones d'irradiations reportées sur un cerveau de rat porteur d'une tumeur 9L, 14 jours après implantation.**

Afin de pallier ce problème, un monochromateur a été installé dans la cabine optique de MRT durant le deuxième semestre de l'année 2005. De premières expériences d'imagerie ont été réalisées avec de premières images obtenues en octobre 2006 sur un rat porteur d'une tumeur 9L, 14 jours après l'implantation et après l'injection dans la veine caudale de 4 ml d'iode (Iomeron 350®, Bracco S.P.A., Milan, Italie). Les images ont été réalisées un peu au dessus du seuil K de l'iode et le système de détection utilisé est une caméra de type FRELON (Figure 62).



**Figure 62 : Une des premières images de tumeur obtenue à l'aide du monochromateur installé dans la cabine de MRT. Le rat est porteur d'une tumeur 9L implantée depuis 14 jours et a reçu 4 ml d'Iomeron® 350 par voie intraveineuse. Les images ont été réalisées au dessus du seuil K de l'iode. Le système de détection utilisé est une caméra de type Frelon.**

Le système d'imagerie n'est cependant pas encore opérationnel pour les sessions d'irradiations pour plusieurs raisons :

- le système de détection utilisé, la caméra FRELON, est caractérisé par une très bonne résolution (47  $\mu\text{m}$ , 2048 pixels) mais son efficacité de détection est de 50% ce qui nécessite une injection importante d'agent de contraste pour pouvoir détecter la tumeur (3 à 4 ml minimum lors des expériences d'octobre 2006). En comparaison, le détecteur germanium [Elleaume, 1999], utilisé lors de l'imagerie en SSRT est doté d'une résolution moindre (350  $\mu\text{m}$ , 432 pixels) mais possède une efficacité de détection très élevée (99%) permettant de détecter la tumeur après une injection d'1 à 2 ml d'iode, ce qui est beaucoup plus adapté au volume sanguin du rat. A cela s'ajoute un temps d'acquisition et surtout de traitement des données plus important avec la caméra FRELON qu'avec le détecteur germanium. Il est également important de noter que la caméra FRELON contient du gadolinium dans son écran, rendant impossible l'utilisation de cet élément en tant que produit de contraste.

- Le champ de vue, permettant de cibler la zone à imager, est réduit à cause de la taille du faisceau qui n'est que de 15 à 20 mm alors que le champ de vue utilisable sur la caméra FRELON est de 95 mm. Aucune vue d'ensemble, permettant de cibler les zones à imager, n'est possible et il est très difficile de situer l'image effectuée par rapport à la zone où se trouve la tumeur (et donc de savoir où réaliser l'image suivante). A titre de comparaison, le champ de vue et la taille du faisceau dans la cabine d'imagerie sont tous les deux de 150 mm.

- Le protocole d'imagerie établi en MRT n'est pas adapté à une utilisation en routine : les réglages de la caméra FRELON ne sont pas automatisés et les moteurs disponibles ne permettent pas d'amener la tumeur au centre de rotation (si la tumeur n'est pas au centre de

rotation, elle n'est pas centrée sur l'image et une irradiation à plusieurs ports d'entrées centrée sur la tumeur est impossible).

Le programme d'imagerie MRT est donc toujours en cours de réalisation. L'importation d'un logiciel adapté à une imagerie de routine est prévue durant l'automne-hiver 2007-2008 et de nombreux travaux prévus sur la ligne de lumière ID17 devraient permettre de rendre l'imagerie en MRT plus opérationnelle notamment en agrandissant la taille du faisceau. Il serait également pertinent de mettre en place un système de positionnement permettant de basculer du référentiel d'imagerie au référentiel de thérapie.

### **Le protocole de réirradiation**

La courbe de survie obtenue avec les rats irradiés latéralement à J14 puis réirradiés dans le sens antéropostérieur 7 jours plus tard, est significativement différente de la courbe de survie des rats irradiés uniquement latéralement. La médiane et la moyenne de survie des rats réirradiés sont augmentées par rapport à celles des rats de la série unidirectionnelle (médiane = 47 et 30,5 jours ; moyenne = 49 et 30,6 ; respectivement). Un gain substantiel d'espérance de survie de tous les individus irradiés apparaît donc avec ce mode d'irradiation, contrairement au mode d'irradiation en faisceaux croisés qui apporte un gain de survie à un petit nombre d'individus.

Cette augmentation de la médiane de survie (28 jours de plus que les rats contrôle) est supérieure au double du gain de survie apporté par une irradiation unidirectionnelle ( $11,5 \times 2 = 23$  jours) démontrant un effet supra-additif du protocole de réirradiation pour le contrôle de la tumeur. De plus, le délai de 7 jours entre les deux irradiations ne peut être que favorable à la préservation du tissu sain. Le seul inconvénient de ce protocole est sa programmation dans l'emploi du temps des expériences de la ligne de lumière ID17 qui doit prendre en compte de nombreuses expériences d'utilisateurs.

### **Géométrie innovante**

En parallèle, certaines expériences ont été menées pour trouver des géométries d'irradiation innovantes et permettant de tirer parti au maximum des caractéristiques bien particulières de la MRT. La géométrie d'irradiation présentée dans le paragraphe III.2.6. permet d'irradier la zone tumorale avec un espacement de 100  $\mu\text{m}$  alors que le tissu sain sera majoritairement irradié avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$ , espacement très peu invasif pour le tissu sain comme montré au paragraphe III.2.1. La théorie et la faisabilité de cette technique ont été publiées. Cependant, cette technique ne peut s'affranchir au préalable d'une session d'imagerie *in situ*,

afin de pouvoir cibler la zone devant être irradié à 100  $\mu\text{m}$  d'espacement. Par ailleurs, la mise en place de cette géométrie d'irradiation reste délicate chez le rongeur, du fait de sa petite taille.

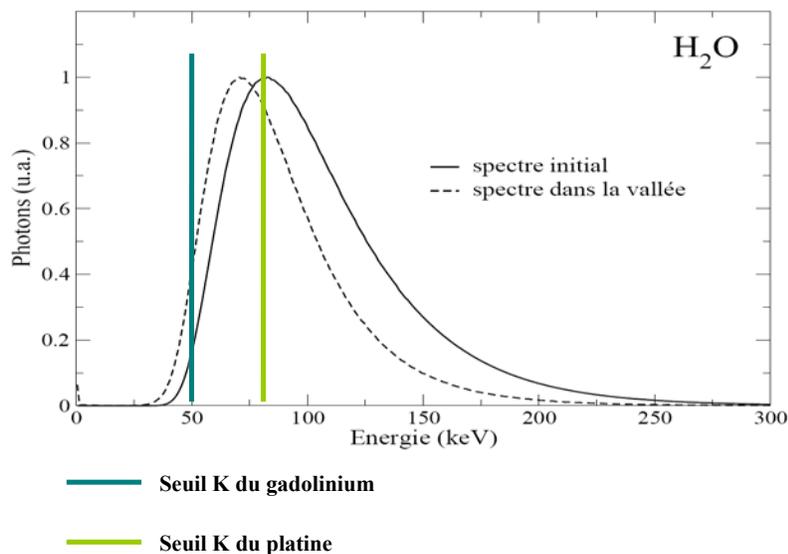


## IV. Utilisation de drogues en MRT

### IV.1. Contexte de l'étude

En vue d'améliorer les résultats obtenus en MRT, différents types de drogues, ont été testées en utilisant le protocole standard mis au point dans le chapitre précédent : dose de 625 Gy, espacement de 200  $\mu\text{m}$ , largeur de microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  et irradiation unidirectionnelle. Volontairement, il a été décidé de « screener » 3 drogues, dans les mêmes conditions d'irradiation et d'administration et durant la même session expérimentale (ce qui a également pour effet de réduire le nombre d'animaux par série) :

- Le cisplatine est à la fois une drogue de chimiothérapie et un agent à numéro atomique élevé ( $Z = 78$ ). L'utilisation de l'élément platine lors du traitement des gliomes de haut grade est marginale et fait appel au carboplatine [Laigle-Donadey, 2006], moins toxique que le cisplatine. Cependant, l'injection de cisplatine par voie intratumorale chez le rat a déjà été réalisée avec succès à plusieurs reprises et il est bien toléré à la dose de 3  $\mu\text{g}$  [Kimler, 1993]. Le cisplatine est également la drogue utilisée actuellement pour les expériences de SSRT à l'ESRF sur le modèle de tumeur F98 [Biston, 2004a ; Biston, 2004b]. Son seuil K est en adéquation avec le spectre blanc du faisceau (Figure 63). Lors de cette expérience, 5  $\mu\text{l}$  contenant 3  $\mu\text{g}$  de cisplatine ont été injectés manuellement par voie intratumorale au centre théorique de la tumeur 24 h avant l'irradiation MRT (série 625/200/25 + Cispt), selon un protocole publié [Biston, 2004a].



**Figure 63 : Seuils K du platine et du gadolinium placés sur le spectre du faisceau polychromatique de MRT.**

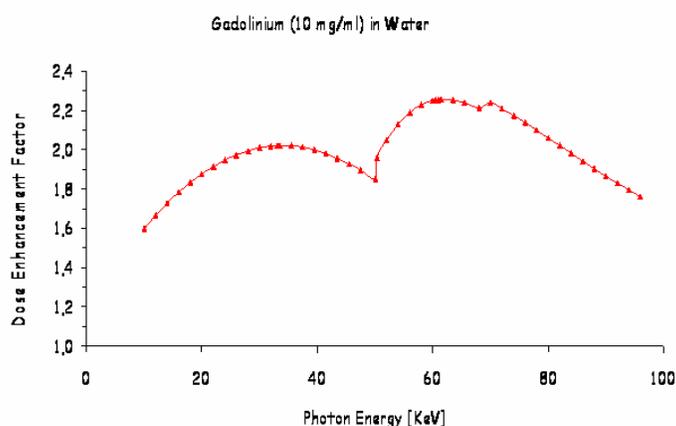
- Le témozolomide, agent alkylant (caractérisé par une bonne pénétration dans le système nerveux central) constitue, en association avec la radiothérapie, le nouveau standard de traitement des glioblastomes [Laigle-Donadey, 2006]. Comme les gliomes malins métastasent rarement, une chimiothérapie systémique n'est pas nécessaire, et l'injection directe par voie intratumorale des agents de chimiothérapie permet d'augmenter l'efficacité de la drogue en augmentant la dose délivrée, tout en réduisant la toxicité systémique. Il convient de noter que le temozolomide est plus toxique chez le rat et le chien que chez les humains pour lesquels la dose clinique équivaut à la dose létale minimum chez les rats et les chiens. Cependant, son injection intracérébrale a déjà été réalisée avec succès à l'aide d'une pompe osmotique délivrant 8  $\mu\text{l/h}$  d'une solution contenant 3,1 mg/ml de témozolomide, jusqu'à un total de 200  $\mu\text{l}$ . Ce traitement a permis augmentation de 128% de la médiane de survie de rats porteurs de tumeur humaine D54-MG [Heimberger, 2000].

Lors de ce travail, il a été décidé d'injecter 10  $\mu\text{l}$  de solution contenant 3,1 mg/ml de témozolomide (pharmacie de l'Hôpital Cantonal de Lucerne, Suisse) afin de pouvoir comparer entre eux les résultats obtenus lors de l'utilisation des différentes drogues (avec le gadolinium et le cisplatine). L'injection a été réalisée en 1 minute au centre théorique de la tumeur, 10 à 20 minutes avant l'irradiation par MRT (série 625/200/25 + témo).

- Le gadolinium est une drogue à numéro atomique élevé ( $Z = 64$ ) permettant d'augmenter le dépôt de dose en fonction de l'énergie d'irradiation. Le gadolinium avait déjà été pressenti en

tant qu'élément pouvant potentialiser les effets d'un rayonnement ionisant [Miller, 1999]. Il a notamment été étudié dans le contexte de la « Gadolinium Neutron Capture Therapy » [De Stasio, 2005]. De Stasio a montré qu'après exposition *in vitro* de cellules de glioblastome humain TB10 au Gd-DTPA, des atomes de gadolinium ont été retrouvés dans le noyau et le cytoplasme (84% des noyaux sur 76 cellules analysées contenaient du Gd-DTPA). La concentration de Gd-DTPA était supérieure dans le noyau. Par contre, *in vivo*, seulement 6,1% des noyaux de cellules tumorales de glioblastomes humains contenait du gadolinium après injection de Gd-DTPA dans le sang.

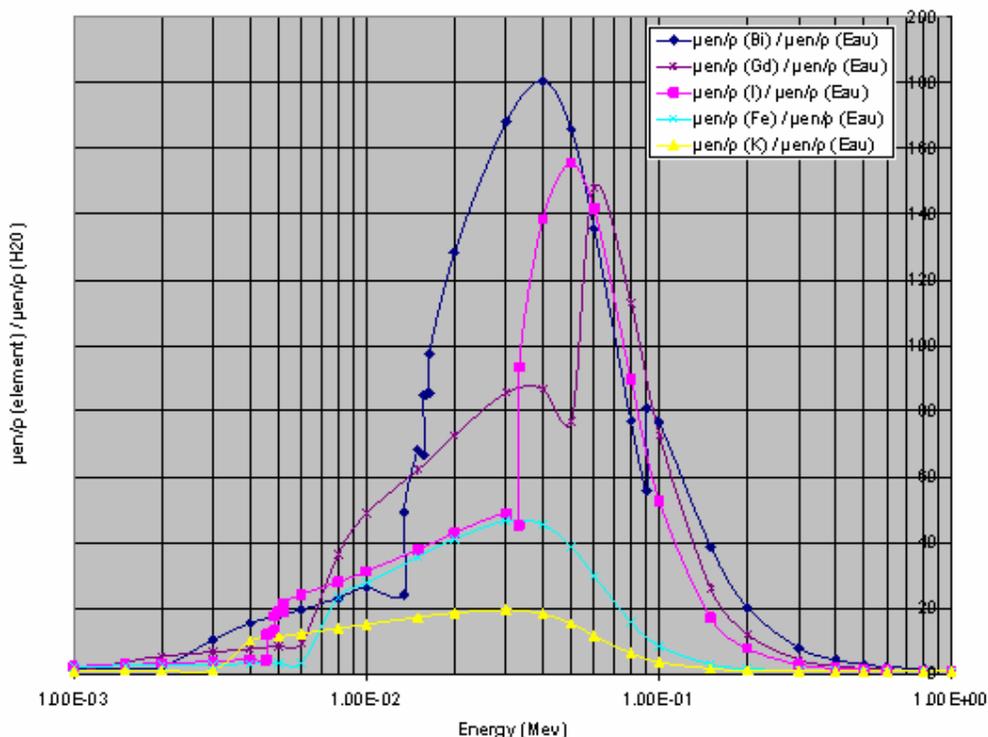
Dans le cas de la MRT, le gadolinium est particulièrement bien adapté au spectre du faisceau pour augmenter la dose déposée. Il présente un facteur d'augmentation de dose (DEF : Dose Enhancement Factor) maximum entre 50 et 75 keV ce qui correspond au pic de concentration de photon du spectre de MRT (Figure 63 et Figure 64).



**Figure 64 : facteur d'augmentation de dose (DEF) du gadolinium en fonction de l'énergie à une concentration de 10 mg/ml. Le DEF maximal est situé entre 50 et 75 keV. D'après le programme de <http://www.esrf.fr/Accelerators/Groups/InsertionDevices/Software/Xray>.**

Le gadolinium est également l'élément qui apporte la plus grande augmentation de dose entre 60 et 100 keV (par comparaison avec le bismuth, l'iode, le fer et le potassium), ce qui correspond au pic d'énergie du spectre de MRT dans la vallée (Figure 65). Les expériences présentées dans ce travail ont été réalisées en utilisant un chélate de gadolinium classique (Gd-DTPA, Magnevist®, Bayer-Schering, Berlin) pour différentes raisons. Ce chélate, utilisé en routine depuis une vingtaine d'années présente une toxicité neurale faible et une bonne stabilité thermodynamique [Vogler, 1995]. De plus, il a fait l'objet d'études et de publications au sein du groupe [Fiedler, 2000 ; Le Duc, 2004]. Il faut noter que sa concentration reste faible par rapport aux composés iodés, mais toutefois élevée par rapport au cisplatine

(469 mg/ml contre 1 mg/ml, pour le gadolinium et le cisplatine respectivement). Deux techniques d'injection différentes ont été utilisées lors de cette expérience : (i) 10  $\mu$ l de gadolinium à une concentration de 469  $\mu$ g/ $\mu$ l ont été injectés par voie intratumorale 10 à 20 minutes avant l'irradiation (série 625/200/25 + Gado IC) ; (ii) 1,5 ml de gadolinium à la même concentration ont été injectés par voie intraveineuse 10 à 20 minutes avant l'irradiation (série 625/200/25 + Gado IV).



**Figure 65 : Augmentation de la dose : rapport entre le coefficient d'absorption massique en énergie de l'élément pur avec celui de l'eau, d'après [Patel, 2006].**

Lors de la même expérience, une série de rats uniquement irradiés par MRT a été également réalisée pour comparaison (série 625/200/25).

Les résultats de cette expérience permettront de déterminer avec quelle(s) drogue(s) poursuivre les recherches.

## IV.2. Résultats

### IV.2.1. Test de différentes drogues

Pour cette expérience, 86% des tumeurs ont été diagnostiquées à l'IRM, 12 à 13 jours après l'implantation. Les courbes de survie obtenues sont représentées Figure 66. La courbe de survie des rats contrôle 9L non irradiés est en adéquation avec les résultats précédents (médiane 19 jours, moyenne 18,8 jours). De façon surprenante, l'administration de drogue sans irradiation n'a aucun effet sur la survie comme sur le poids des rats, dans le cas du cisplatine comme du témozolomide. Le gadolinium étant un agent de contraste, il n'a normalement aucun effet sur la survie des rats contrôle (ceci a été vérifié lors d'une expérience indépendante). La survie obtenue lors de l'irradiation en MRT seule correspond à celle obtenue lors de l'expérience précédente en février 2004 (cf III.2.4. ; médiane : 30,5 et 31,5 jours ; moyenne : 30,6 et 31,4 jours ; respectivement). L'administration de 3 µg de cisplatine (par voie intratumorale) ou de 1,5 ml de Gd-DTPA (par voie intraveineuse) à ce protocole n'apporte aucune amélioration. Remarquablement, l'injection de 10 µl de témozolomide ou de gadolinium (intratumorale) avant l'irradiation a des effets bénéfiques sur la survie des rats (non significative mais le test du log-rank n'est pas capable de détecter les différences entre les groupes qui se croisent les uns les autres au début des courbes de survie à cause des morts précoces [Klein, 2003]) et sur leur courbe de poids. L'administration de témozolomide entraîne l'apparition d'un survivant à long terme, mais n'améliore pas la survie générale de chaque individu (moyenne = 131,7 jours ; médiane = 29,5 jours). L'ajout de gadolinium par voie intratumorale améliore la survie générale de chaque individu et entraîne l'apparition d'un survivant à long terme (moyenne = 138,9 jours ; médiane = 44 jours).

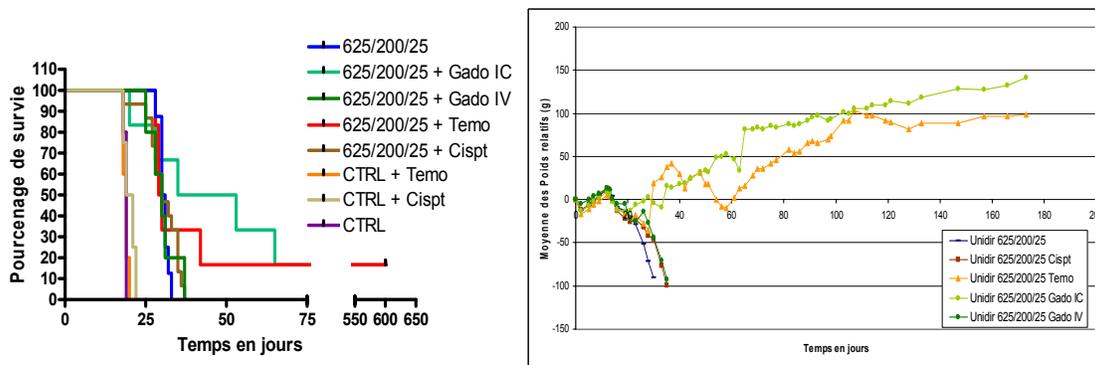


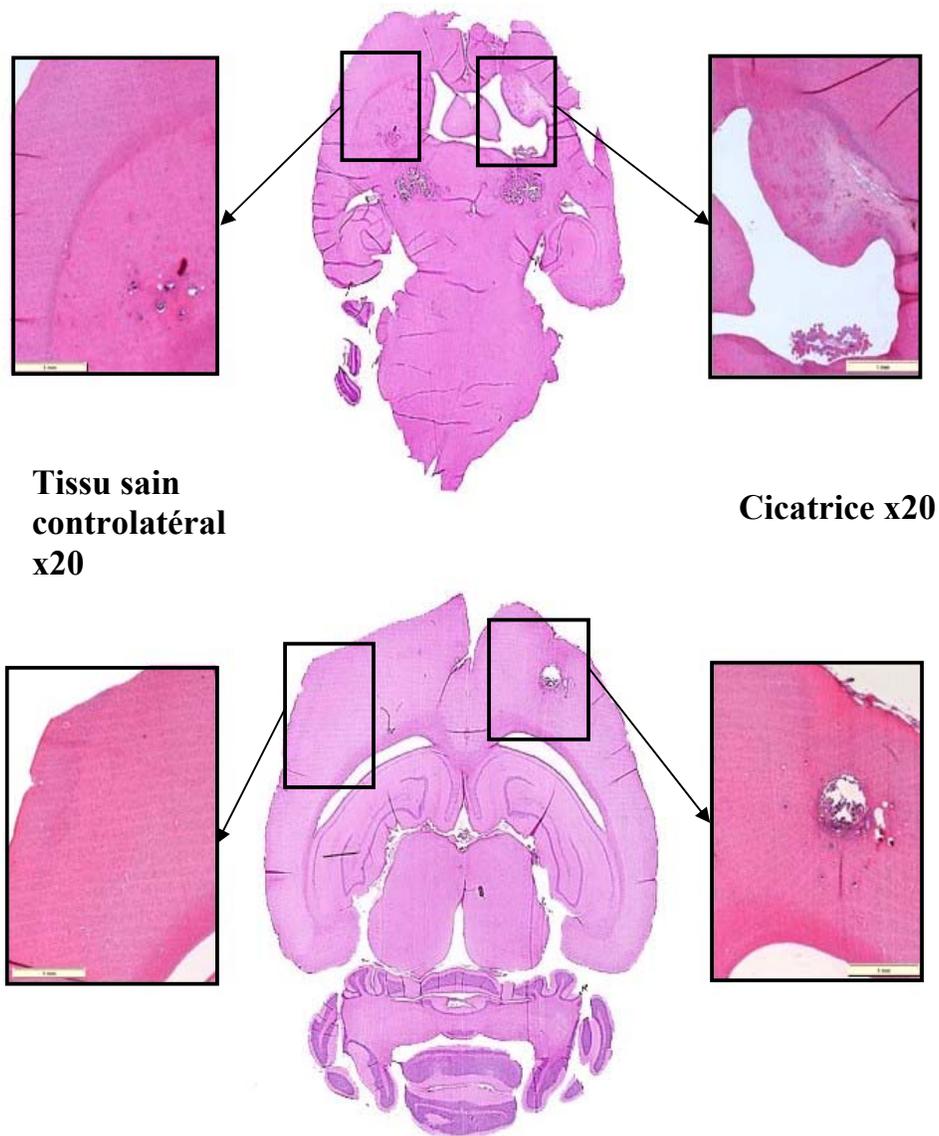
Figure 66 : En haut à gauche : Courbes de survie des rats contrôle, contrôle avec drogues, irradiés avec le collimateur Tecomet à 625 Gy avec des microfaisceaux de 25 µm espacé de 200 µm en mode unidirectionnel sans drogue ou après injection de drogues (IC = intracérébral, IV = intraveineux). Les rats sont porteurs de tumeur 9L. En haut à droite : Courbes de poids relatives moyennes des rats appartenant à ces séries. En bas : Données statistiques sur les rats appartenant à ces séries.

Figure 66 : En haut à gauche : Courbes de survie des rats contrôle, contrôle avec drogues, irradiés avec le collimateur Tecomet à 625 Gy avec des microfaisceaux de 25 µm espacé de 200 µm en mode unidirectionnel sans drogue ou après injection de drogues (IC = intracérébral, IV = intraveineux). Les rats sont porteurs de tumeur 9L. En haut à droite : Courbes de poids relatives moyennes des rats appartenant à ces séries. En bas : Données statistiques sur les rats appartenant à ces séries.

La courbe des poids relatifs moyens des rats de la série MRT avec injection de Gd-DTPA intratumorale suit une progression constante qui est le reflet du bon état clinique de ces rats jusqu'à la résurgence de la tumeur. En effet, sur les 6 rats composant la série, seuls 2 rats présentent des signes cliniques. De plus, le rat survivant à long terme présente un bon état clinique. Il faut noter que le survivant à long terme de la série témozolomide a présenté des troubles cliniques, comme 3 autres rats de cette série. Dans les autres groupes une minorité de rats a présenté des signes cliniques, n'impliquant aucune suspicion majeure quant à un effet pervers du traitement.

Tous les rats des séries gadolinium (par voie intratumorale) et témozolomide ont été analysés en histologie, ainsi que 8/15 rats ayant reçu du cisplatine. L'analyse des cerveaux des rats décédés avant J100 confirme la présence d'une tumeur de taille importante. Après irradiation et quelle que soit la drogue injectée, l'intégrité du tissu sain est préservée (qualité de moyenne à bonne, difficulté à l'analyse due parfois à des artefacts de coupe). L'étude des cerveaux des 2 survivants à long terme (euthanasiés 632 jours après l'implantation) permet de confirmer l'ablation de la tumeur. Le tissu sain apparaît bien conservé chez les deux rats. La présence

d'une cicatrice est visible, avec un aspect variable selon la série (Figure 67). Des microcalcifications dues à l'âge des rats sont également présentes sur ces coupes. Les microfaisceaux sont toujours visibles chez ces survivants à long terme.



**Figure 67 : Coupes histologiques en HE : En haut : rat survivant à long terme 625/200/25 + témozolomide. En bas : rat survivant à long terme 625/200/25 + gadolinium. L'échelle fait 1 mm sur chaque image.**

En conclusion :

- L'injection intratumorale de Gd-DTPA avant l'irradiation par MRT permet de doubler la médiane de survie des rats contrôle et de doubler l'ILS des rats irradiés en MRT (ILS = 131,6% et 60,5%, respectivement). Elle permet également de guérir 1/6 rat traités.

- Aucun effet de la chimiothérapie n'est visible après injection de cisplatine ni chez les rats contrôle, ni avec les rats irradiés.
- Alors que le témozolomide seul n'entraîne pas d'augmentation de survie des rats contrôle par son effet chimiothérapeutique, il semble qu'un effet synergique apparaisse lors de la combinaison de l'injection de témozolomide avec l'irradiation par MRT. Cette synergie permet de guérir 1/6 rat. Ceci reste cependant une hypothèse.

## **IV.2.2. Cas particulier du gadolinium et irradiation en faisceaux croisés**

Suite aux résultats décrits précédemment, il a été choisi de poursuivre des expériences en utilisant le gadolinium comme agent permettant d'augmenter le dépôt de dose.

Afin de préserver le tissu sain, l'usage en radiothérapie est de multiplier les portes d'entrée du faisceau (radiothérapie conformationnelle [Pontvert, 2004]). C'est pourquoi il a été décidé d'utiliser le mode faisceaux croisés orthogonaux en MRT. La dose typique de 625 Gy en faisceau unidirectionnel risquant cependant d'être trop élevée en irradiation croisée, une première expérience a permis de déterminer, parmi 3 doses, laquelle était la plus appropriée avec ce mode d'irradiation (campagne de juillet 2006). Une seconde série d'expériences a permis d'évaluer l'impact de l'utilisation d'une pompe micrométrique pour obtenir une injection de gadolinium reproductible et homogène, au lieu d'une injection manuelle (campagne de juillet 2007). En effet, des études récentes ont montré que l'utilisation de pompes à pression constante pour l'injection intratumorale de drogues (CED : Convection-enhanced Delivery) peut être utilisée sans risque pour injecter des composés de tout poids moléculaire d'une manière ciblée et homogène [Kaiser, 2000 ; Morrison, 1994].

### **IV.2.2.1. Détermination de la dose optimale en irradiation par faisceaux croisés couplée à l'injection de Gd-DTPA**

Des rats porteurs de gliosarcome 9L ont été traités 14 jours après l'implantation et après confirmation de la présence de la tumeur par IRM à J13 (92% de tumeurs vues avec certitude). 3 groupes constitués de 16, 17 et 15 rats, ont été irradiés en mode MRT faisceaux croisés avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$ , une largeur de microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  et une dose pic de 625, 460 et 312 Gy, respectivement. Le 4<sup>ème</sup> groupe (n = 9) a été irradié de façon

croisée avec 2 faisceaux larges de 10 Gy chacun (soit 20 Gy en zone de croisement ce qui correspond à la dose vallée en irradiation MRT faisceaux croisés, à 460 Gy). Le champ d'irradiation de chaque faisceau est de 10 mm x 11 mm dont 1 mm dans l'air. Une injection de 15 µl de Gd-DTPA (Magnevist®) par voie intratumorale a été réalisée sur les rats irradiés, 14 à 25 minutes<sup>♦</sup> avant la radiothérapie. La médiane et la moyenne de survie des rats contrôle sont toutes les deux de 19,5 jours.

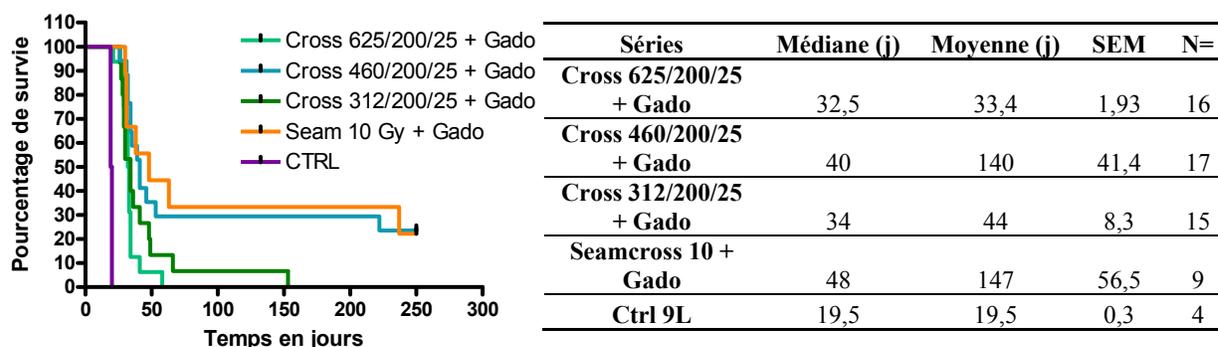


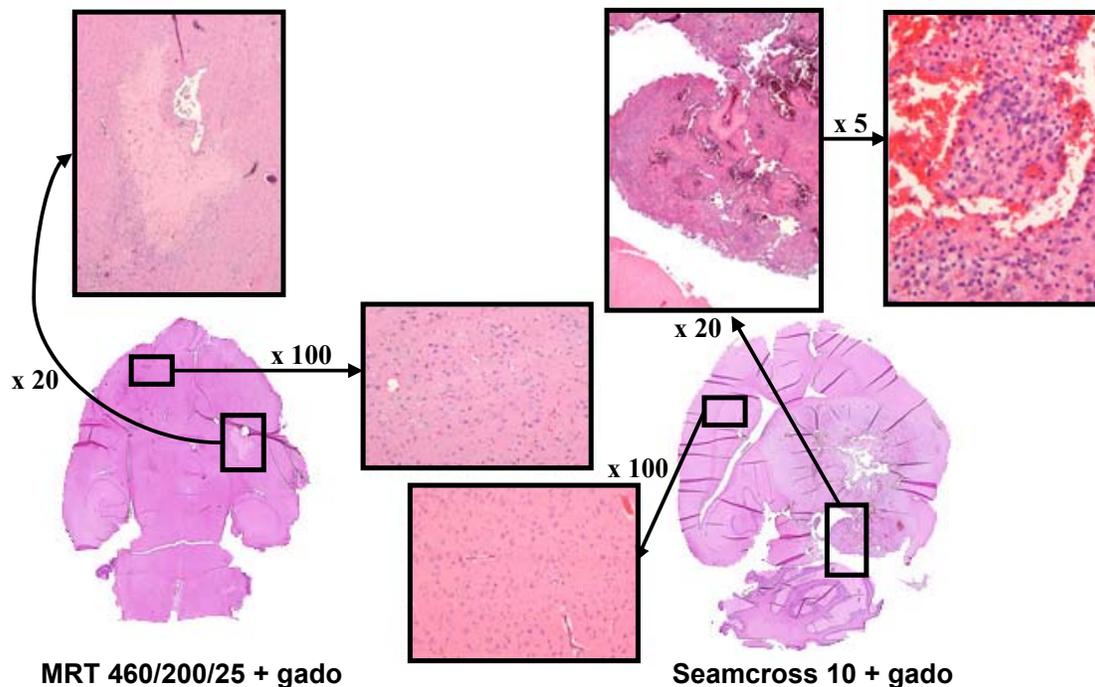
Figure 68 : A gauche : courbes de survie des rats irradiés 14 jours après l'implantation de tumeurs 9L en MRT faisceaux croisés et faisceaux larges croisés à différentes doses en juillet 2006. A droite : données statistiques de la survie de ces rats.

Toutes les courbes de survie obtenues après injection de gadolinium sont significativement différentes de la courbe de survie des rats contrôle (Figure 68). Les protocoles Cross 312/200/25 + Gado et Cross 625/200/25 + Gado ne sont pas adaptés à cette configuration. La médiane de survie de ces séries est faible et le seul survivant à long terme qui apparaît dans la série à 312 Gy est décédé 153 jours après implantation. Au contraire, la série Cross 460/200/25 + Gado permet d'obtenir une bonne médiane de survie (40 jours) et surtout 5 survivants à long terme (30%) dont 4 ont survécu plus d'un an sans signes cliniques particuliers et avec un poids correct. La courbe de survie de cette série est significativement différente des courbes de survie obtenues avec des doses pic de 625 et 312 Gy ( $p = 0,0026$  et  $p = 0,0374$ , respectivement). Cependant, il est surprenant de voir que la série Seamcross 10 + Gado permet d'obtenir les mêmes résultats que la série Cross 460/200/25 + Gado avec une médiane de survie de 48 jours et 3 survivants à long terme (33%) dont 2 survivront plus d'un an, sans signes cliniques et avec des poids corrects. Elle est également significativement différente des séries à 625 et 312 Gy ( $p = 0,0119$  et  $p = 0,0384$ , respectivement). Bien que la

<sup>♦</sup> En raison de la distance entre l'animalerie et la cabine d'irradiation, du temps de la ronde de sécurité avant la mise en place du faisceau... il est difficile d'irradier les rats exactement 15 minutes après l'injection de drogue.

médiane de survie de la série en faisceaux larges soit supérieure à celle de la série MRT à 460 Gy, cette dernière regroupe plus d'individus.

L'examen histologique de 5/16 cerveaux des rats irradiés dans la série Cross 625/200/25 + Gado et de 4/15 cerveaux des rats irradiés en Cross 312/200/25 + Gado donne des résultats identiques : la présence d'une grosse tumeur généralement nécrotique et hémorragique est observée et le tissu sain est bien préservé. Il présente cependant des lésions autour de la tumeur et de nombreuses télangiectasies (plus présentes à 625 Gy qu'à 312 Gy). Les microfaisceaux sont généralement visibles, notamment dans le cervelet. Il faut préciser que parmi les cerveaux analysés dans la série à 312 Gy se trouvait celui du survivant à long terme. A 460 Gy et en faisceaux larges, chez tous les rats décédés avant J100 analysés (4/12 à 460 Gy et 3/6 en faisceaux larges), une tumeur était présente, toujours de taille importante mais plus nécrotique chez ceux irradiés en MRT. Le tissu sain de ces animaux est relativement bien conservé avec une présence quand même importante de télangiectasies dans les deux séries. Néanmoins, chez les rats survivants à long terme des différences apparaissent. Chez les 2 rats décédés entre 220 et 240 jours après implantation (un dans chaque série), alors que le tissu sain a une apparence identique, montrant dans un cas comme dans l'autre une bonne préservation, le rat de la série Seamcross 10 + Gado présente une large plage de cellules tumorales à faible densité cellulaire alors que le rat de la série Cross 460/200/25 + Gado, présente une cicatrice de faible amplitude et aucune trace de tissu tumoral (Figure 69). La cause de la mort est inconnue.



**Figure 69:** Histologie HE des cerveaux des rats décédés entre 220 j et 240 j après une irradiation en MRT faisceaux croisés à 460/200/25 et 15 minutes après injection de 15  $\mu$ l de Magnevist® (à droite) après une irradiation en faisceaux larges croisés à une dose de 10 Gy chacun 15 minutes après injection de 15  $\mu$ l de Magnevist® (à gauche). Au centre, se trouve un grossissement du tissu sain. Au dessus se trouve un grossissement de la cicatrice, pour le rat irradié en MRT, et de la tumeur a faible densité cellulaire, pour le rat irradié en faisceaux larges croisés.

Afin de procéder à l'analyse histologique, les 6 rats survivants ont été euthanasiés le même jour, soit 428 et 423 jours après implantation pour les rats irradiés en MRT et en faisceaux larges, respectivement.

Chez les 4 rats de la série MRT Cross 460/200/25 + Gado, le tissu sain de l'hémisphère droit est très abîmé avec des zones, plus ou moins étendues selon l'animal, dans lesquels les tissus ont disparu pour laisser place à des microcalcifications avec ou sans hématies (Figure 70). Le tissu sain de l'hémisphère controlatéral, par contre, est en bon état, bien que quelques télangiectasies soient présentes. Aucune trace de tissu tumoral n'a été relevée lors de l'analyse des lames. Les microfaisceaux étaient très nets chez 3/4 rats, et visibles chez le dernier.

Chez les 2 rats de la série Seamcross 10 + Gado, le tissu sain est presque aussi bien conservé dans les deux hémisphères quoique l'apparition de microcalcifications sur une faible zone soit relevée chez l'un de ces rats. Une suspicion de présence de cellules tumorales dans l'espace ventriculaire est notée chez l'autre rat, pouvant permettre une reprise de la pathologie (Figure 70), il pourrait également s'agir d'un amas de cellules épendymales, ce qui n'aurait alors aucune conséquence.

En conclusion, sur les 5 rats survivants à long terme de la série Cross 460/200/25 + Gado, aucun signe de présence tumorale n'a pu être décelé et malgré des lésions histologiques du tissu sain, la survie des animaux n'a pas été compromise chez 4/5 d'entre eux. Ces 4 rats étaient en bon état clinique. Sur les 3 rats survivants à long terme de la série Seamcross 10 + Gado, 1 ou 2 rats (sur 3) étaient encore porteur d'une tumeur à caractère peu prolifératif. Par contre, le tissu sain présentait peu de lésions importantes.

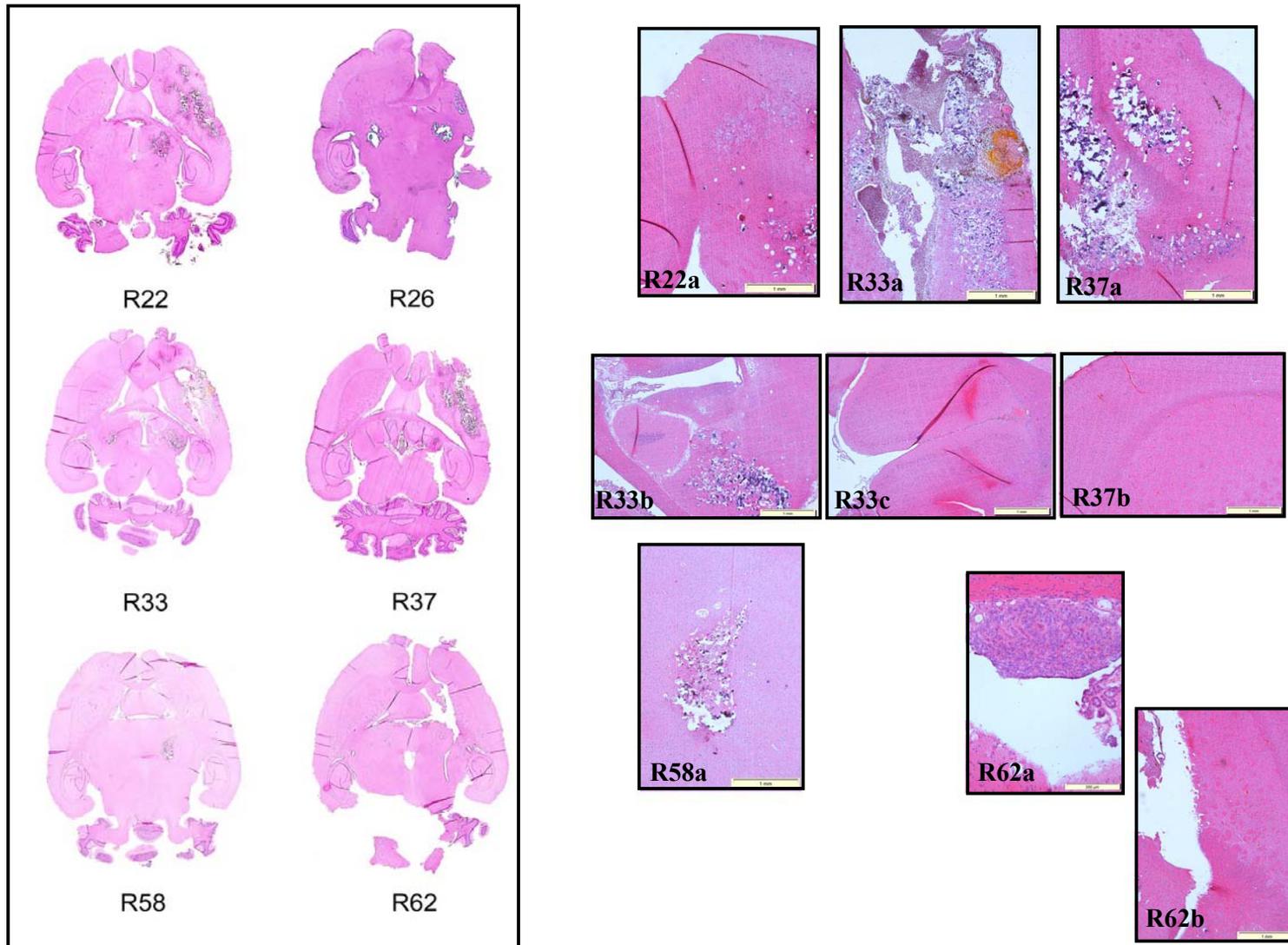
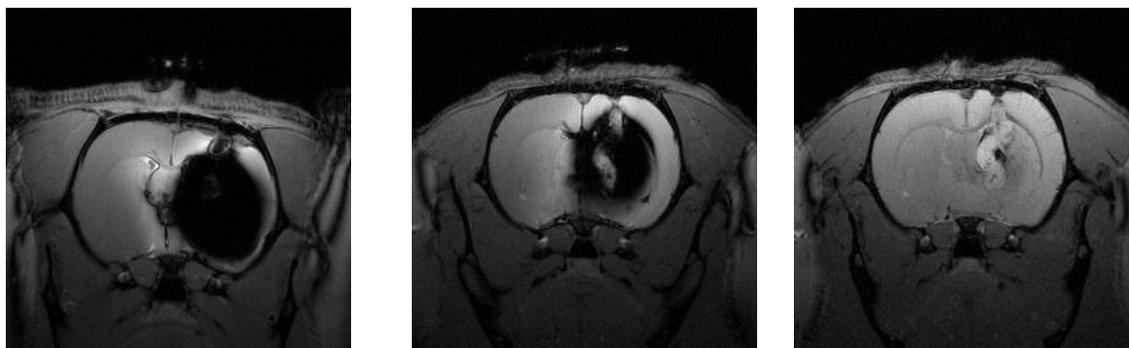


Figure 70: A gauche : scan des cerveaux en HE des rats survivants plus de 400 jours dans la série Cross 460/200/25 + Gado (R22, R26, R33 et R37) et dans la série Seamcross 10 + Gado (R58 et R62). A droite : détails de certaine régions de ces cerveaux. R22a, R33a, R37a : G x20, détails de l'hémisphère droit avec microcalcifications. R33b, R33c : G x20, détails de zones de croisement des microfaisceaux. R37b : G x20, hémisphère controlatéral. R58a : G x20, microcalcifications. R62a : G x100 : zone interventriculaire, cellules tumorales ou épendymales. R62b : G x20 : détails hémisphère droit

#### IV.2.2.2. Injection de gadolinium à l'aide d'une pompe

Le Gd-DTPA étant initialement l'agent de contraste de l'IRM, des images IRM ont été réalisées 48 h avant l'irradiation sur 3 animaux, à la plateforme Animage de Lyon, afin d'appréhender la répartition de l'agent de contraste dans la tumeur et le cerveau suite à (i) l'injection manuelle de 15  $\mu$ l de Gd-DTPA ; (ii) l'injection à la pompe (0,5  $\mu$ l/min) de 15  $\mu$ l de Gd-DTPA (cet animal sera re-imagé 24 h après l'administration de la drogue); (iii) l'injection à la pompe (0,5  $\mu$ l/min) de 5  $\mu$ l de gadolinium. Les images obtenues sont présentées Figure 71.

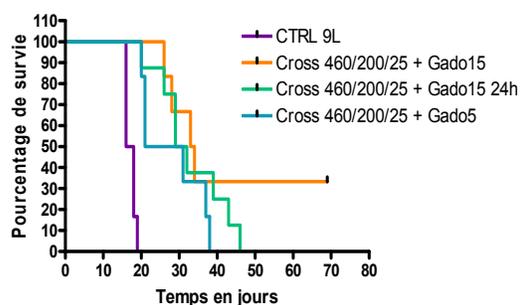


**Figure 71** : Images acquises sur un aimant horizontal de 7 T à l'aide d'une séquence pondérée en  $T_1$  (antenne : volumique 72 mm, software : paravision) après injection de 15  $\mu$ l de Gd-DTPA : manuellement, image 15 minutes après (à gauche) ou à l'aide d'une pompe (0,5  $\mu$ l/min), image 15 minute après (au milieu) et 24 h après (à droite). Les deux images réalisées suite à l'injection par pompe viennent du même rat alors que l'image réalisée suite à l'injection manuelle provient d'un second rat.

Il convient de décrire ces images du point de vue la RMN et de ses effets physiques : le gadolinium est un agent aux propriétés paramagnétiques et il est notoirement utilisé pour son effet sur le temps de relaxation  $T_1$ , qu'il diminue, contribuant ainsi à augmenter le contraste de l'image par un rehaussement du signal. Une injection par voie intraveineuse de 1,5 ml de Gd-DTPA à un rat équivaut à une quantité de 117 mg de Gd dans le système circulatoire, soit 0,5 mg/ml de Gd dans la tumeur [Le Duc, 2004], responsable d'un effet  $T_1$ . Dans le cas présent, 15  $\mu$ l de Gd-DTPA directement injecté par voie intratumorale correspondent à 1,18 mg de Gd soit dix fois plus. Cette forte concentration de Gd DTPA est responsable d'une extinction du signal en  $T_2$  créant des zones sombres. L'effet classique du Gd-DTPA sur le signal (se traduisant par un rehaussement positif) est par contre visible en périphérie.

La répartition de 15 µl de gadolinium injectés dans les tissus à l'aide d'une pompe micrométrique semble plus réduite et plus homogène que quand l'injection est réalisée sans pompe. Le volume contenant le gadolinium reste quand même très important. Ce volume diminue lorsque la quantité de gadolinium injectée diminue. Il est intéressant de constater que 24 h après l'injection de gadolinium, celui-ci semble présent uniquement dans la tumeur (Figure 71 à droite).

L'utilisation d'une pompe pour l'injection de gadolinium a donc été combinée à une irradiation MRT en mode faisceaux croisés avec des microfaisceaux de 25 µm espacés de 200 µm et une dose de 460 Gy. 5 µl et 15 µl de gadolinium ont été injectés 15 minutes avant l'irradiation. L'injection de 15 µl de gadolinium 24 h avant l'irradiation a également été testée (Figure 72). La présence de la tumeur a été vérifiée par IRM un jour avant l'irradiation et les rats ne présentant pas de trace de tumeur sont sortis de l'étude.



Séries	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	N=
<b>Cross 460/200/25 + Gado 15 µl</b>	33,5	?	?	6
<b>Cross 460/200/25 + Gado 15 µl – 24h</b>	30,5	33	3,1	8
<b>Cross 460/200/25 + Gado 5 µl</b>	26	28	3,4	6
<b>CTRL 9L</b>	17	17,2	0,5	6

Figure 72 : A gauche : courbes de survie des rats irradiés à 460 Gy en faisceaux croisés et injectés à l'aide d'une pompe 24 h ou 15 minutes avant l'irradiation avec 5 ou 15 µl de gadolinium. A droite : données statistiques de ces mêmes séries.

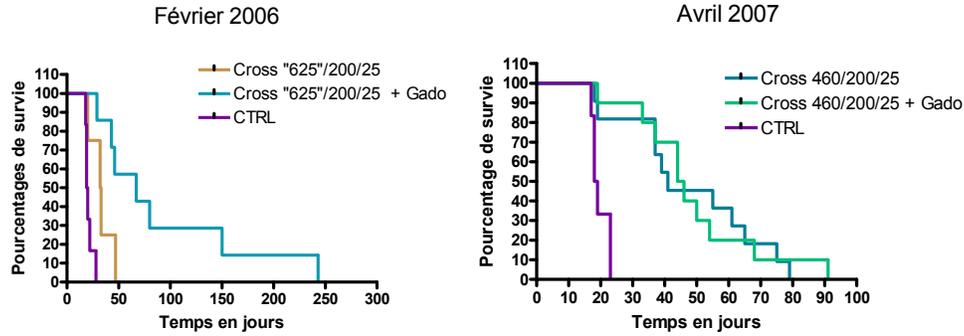
Il est important de noter que la courbe de survie des rats contrôle est un peu décalée vers la gauche (médiane de 17 jours) par rapport aux courbes des rats contrôle habituels (19-21 jours). De plus 3 rats sont décédés avant J14 et avant toute anesthésie, laissant présager des tumeurs de taille plus importante qu'habituellement. L'injection intratumorale de 15 µl de gadolinium 15 minutes avant l'irradiation à 460 Gy permet d'obtenir 33% de survivants (2/6 rats, bon état clinique à J100). Bien que la médiane de survie de cette série soit inférieure à celles obtenues précédemment (33,5 jours en juillet 2007 et 40 jours en juillet 2006), l'augmentation de l'espérance de survie est équivalente (ILS = 97% en juillet 2007 et 105% en juillet 2006). Les résultats obtenus suite à l'injection de 5 µl de gadolinium 15 minutes avant l'irradiation ou 15 µl de gadolinium 24 h avant l'irradiation sont peu concluants.

### **IV.2.2.3. Expériences sujettes à débat**

*Les deux expériences relatées dans ce chapitre auraient pu être écartées des résultats du fait de problèmes lors de leur réalisation. Cependant, dans la mesure où elles ont suscité et alimenté des discussions au sein du groupe, il nous a semblé important de les relater. Ces deux expériences ayant été effectuées à l'occasion de campagne d'expériences plus globales, seule la partie concernant le gadolinium sera traitée ici.*

En février 2006, il a été testé pour la première fois la combinaison entre les faisceaux croisés de MRT et l'injection intratumorale de gadolinium. Un problème d'instrumentation mis à jour après les expériences montre que la dose déposée n'est pas la dose initialement prévue (625 Gy) et aucune donnée dosimétrique ne permet d'estimer la valeur de la dose réellement déposée. Par comparaison avec la survie obtenue lors d'autres expériences, cette dose a été estimée entre 460 Gy et 625 Gy.

En avril 2007, l'expérience précédente a été répétée mais à une dose de 460 Gy. Le champ d'irradiation pour cette expérience était de 13 mm (au lieu de 10 mm dans cette thèse) en profondeur.

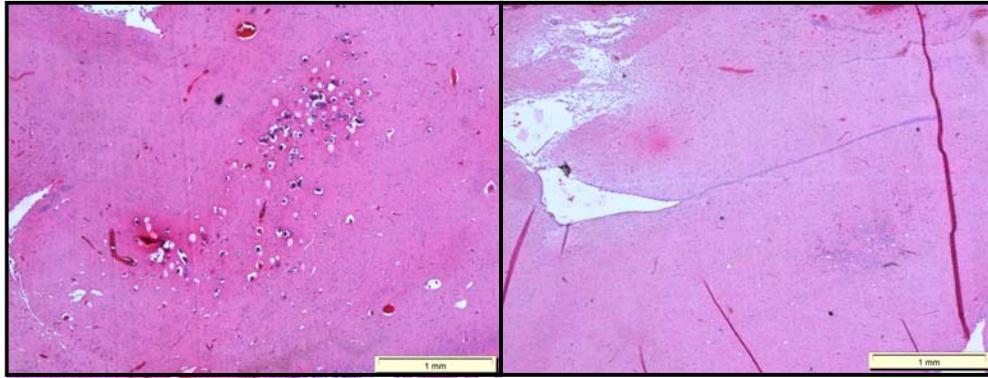


Séries	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	N=	ILS (%)	ILSre (%)
Cross "625"/200/25 février 06	32,5	33	5,5	4	66,7	57
Cross "625"/200/25 + Gado février 06	67	94	29	7	243,6	347,6
Cross 460/200/25 avril 07	41	45	6,3	11	121,6	128,4
Cross 460/200/25 + Gado avril 07	45	48,6	6,2	10	143,2	146,7
CTRL février 06	19,5	21	1,5	6		
CTRL avril 07	18,5	19,7	1,1	6		

Figure 73: En haut à gauche : courbes de survie des rats irradiés en février 2006 avec et sans gadolinium injecté par voie intratumorale en mode MRT faisceaux croisés (la dose déposée n'est pas celle prévue suite à un problème d'instrumentation). En haut à droite : courbes de survie des rats irradiés en avril 2007 avec et sans gadolinium injecté par voie intratumorale en mode MRT faisceaux croisés à 460 Gy (le champ d'irradiation avait exceptionnellement été élargi à 13 mm d'irradiation dans le tissu). En bas : tableau des données statistiques des séries de rats mentionnés dans les courbes de survie.

A « 625 Gy », la différence entre les courbes de survie (Figure 73 en haut à gauche et en bas) des rats irradiés, avec ou sans gadolinium, en mode faisceaux croisés est significative ( $p = 0,0467$ ). Cette différence s'illustre également par le doublement de la médiane de survie lors d'ajout de gadolinium (32,5 jours sans gadolinium et 67 jours avec gadolinium). Cette valeur reste la plus élevée des médianes de survie obtenues après injection de gadolinium, toutes configurations confondues. C'est cette observation intéressante qui justifie la présence de cette courbe dans ce travail.

A l'histologie, la présence d'une tumeur a été relevée chez 5/7 rats. Les 2 rats sans tumeur sont décédés à J46 et J243. Chez tous les animaux, le tissu sain était particulièrement abîmé dans la zone de croisement des faisceaux mais bien préservé dans les zones de simple irradiation. Dans le cas du rat décédé à J243, une grande partie du tissu sain est endommagé (Figure 74). Des signes cliniques d'hyperexcitabilités voire des crises convulsives ont été notés chez certains de ces rats, parmi lesquels les deux rats affichant la plus longue survie.



**Figure 74 : A gauche : Tissu sain dans la zone de croisement des microfaisceaux du rat décédé à J243, G x20, HES. A Droite : Tissu sain de l'hémisphère controlatéral (sans tumeur) d'un rat de la série « 625 »/200/25 + Gado, G x20, HE.**

Au contraire, à 460 Gy (dans le cas de l'expérience d'avril 2007), aucune différence n'apparaît, ni entre les courbes de survie ni entre les médianes de survie des rats irradiés en MRT faisceaux croisés 460/200/25 avec ou sans gadolinium (Figure 73 en haut à droite et en bas). Il faut cependant noter qu'habituellement à 460 Gy, 30 % de survivants à long terme apparaissent, ce qui n'a pas été le cas lors de cette expérience particulière. Cette expérience étant récente, la réalisation des coupes histologiques est en cours.

### **IV.2.3. Conclusion**

L'augmentation du dépôt de dose liée à la présence du gadolinium avec le spectre de faisceau blanc disponible sur ID17 pour la thérapie se vérifie en faisceau large comme en MRT. En faisceau large unidirectionnel, avec une dose de 20 Gy, la survie médiane des rats est de 37,5 jours (cf III.2.1.) sans aucun survivant. Pour une même dose à la tumeur (20 Gy, croisement de 2 faisceaux larges de 10 Gy) et administration de Gd-DTPA, la médiane augmente de  $\approx 10$  jours (48 jours) et 33 % de survivants à long terme apparaissent. En MRT (Tableau 13), l'ajout de Gd-DTPA augmente la médiane et le nombre de survivants à long terme après une irradiation unidirectionnelle (ILS doublé, apparition de 16,7% de survivants à long terme) ou croisée (ILS triplé, apparition de 30% de survivants à long terme en mauvais état clinique). Il est remarquable de constater que la médiane de survie est la même en faisceaux croisés à 460 Gy (ILS = 97-105%) et en mode unidirectionnel à 625 Gy (ILS = 131%). Par contre, à 460 Gy, le nombre de survivants à long terme, en bon état

clinique, double (de 16,7% à 30%). Il convient ici de noter l'effet supra-additif entre le gadolinium et l'irradiation MRT<sup>▲</sup>.

Séries	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	N=
625/200/25 + Gadolinium IC 10 µl	44	138,9	98,9	6
Cross 625/200/25 + Gado juillet 06	32,5	33,4	1,93	16
Cross 460/200/25 + Gado juillet 06	40	140	41,4	17
Cross 312/200/25 + Gado juillet 06	34	44	8,3	15
Cross "625"/200/25 + Gado février 06	67	94	29	7
Cross 460/200/25 + Gado avril 07	45	48,6	6,2	10
Cross 460/200/25 + Gado 15 µl, avec pompe	33,5	en cours	en cours	6

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des données statistiques de survie des séries de rats ayant reçu un traitement combiné MRT + Gd-DTPA.

## IV.3. Discussion

### IV.3.1. Cisplatine et témozolomide

Il a été montré que l'ajout de cisplatine à un protocole standard de MRT n'entraînait pas d'amélioration de la moyenne ou de la médiane de survie par rapport aux irradiations en MRT seule. Ces résultats peuvent s'expliquer : l'effet du cisplatine en tant que drogue de chimiothérapie n'a aucun effet sur les rats contrôle (ILS = 5,3% et ILS<sub>re</sub> = 6,4%). La faible concentration de cisplatine (3 µg injectés) est limitante pour l'action de l'effet photoélectrique. De plus, dans le cas de cette étude (i) sa concentration intratumorale (entre 147 et 177 ppm [Biston, 2004a]) limitée, (ii) associée à une irradiation en faisceau polychromatique (par comparaison à des expériences en faisceau monochromatique avec une énergie située juste au dessus du seuil K du platine) ne semblent pas suffire pour induire un effet Auger [Fairchild, 1984]. La toxicité intracérébrale du platine, bien que moindre avec le carboplatine, permettra sans doute peu d'amélioration par rapport aux résultats obtenus. Il faut noter que ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus par Kimler *et al.* qui n'obtiennent aucune amélioration de la survie de rats porteurs de tumeur 9L après l'injection de 3 µg de cisplatine seul. Il obtient aussi une différence de survie de 14 jours entre l'irradiation à 16 Gy (avec une source au Cesium-137) sans et avec cisplatine respectivement, différence non significative [Kimler, 1993]. Pour mémoire, cette discussion sur le CisPt sera

▲ L'utilisation de différentes doses associées de deux produits permet d'observer un effet sub-additif, additif ou supra-additif. L'effet synergique ou supra-additif traduit que l'effet de l'association de deux produits est supérieur à la somme de l'effet des produits utilisés isolément.

reprise de façon plus détaillée dans un chapitre de comparaison des techniques de SSRT et de MRT et des modèles tumoraux 9L et F98 (Chapitres V et VI).

Les résultats obtenus avec le témozolomide sont encourageants. L'augmentation de la moyenne de survie des rats due à l'apparition d'un survivant à long terme ( $ILS_{re} = 600,5\%$ ) laisse présager un effet entre l'irradiation en MRT et la chimiothérapie par témozolomide intratumoral. En effet, l'injection de témozolomide seul n'apporte aucun gain de survie ( $ILS$  et  $ILS_{re} = 0\%$ ) alors que l'irradiation MRT seule ne permet la survie d'aucun survivant à long terme ( $ILS = 60,5\%$  et  $ILS_{re} = 63\%$ ). Cette expérience et les résultats qui en découlent restent préliminaires. En termes de perspectives, il est possible d'augmenter le volume de témozolomide injecté (10  $\mu$ l dans cette étude) par au moins deux techniques. Heimberger et al. décrivent avec succès l'implantation de micro-pompes osmotiques délivrant 200  $\mu$ l d'une solution de témozolomide à une concentration de 3,1 mg/ml et augmentant la médiane de survie de rats porteurs de tumeur humaine D54-MG de 128% [Heimberger, 2000]. De même, l'utilisation de polymères biodégradables composés à 50% de témozolomide, 5 jours après l'implantation, prolonge la médiane de survie des rats porteurs de tumeur 9L de 13 jours (contrôles) à 28 jours ou 41 jours selon l'expérience, avec 25 ou 37,5% de survivants à long terme (>120 jours). L'ajout d'une irradiation à une dose de 20 Gy sur un diamètre de 1 cm après le dépôt du polymère entraîne la survie de 87,5% des animaux 120 jours après l'implantation de la tumeur [Brem, 2007]. L'utilisation de pompes osmotiques intra cérébrales ou de polymères de témozolomide couplés à une irradiation en MRT pourrait être envisagée.

### **IV.3.2. Gadolinium**

#### **Effet d'une irradiation MRT après injection de gadolinium sur la survie des rats**

Comme le laissent présager les calculs théoriques, le gadolinium semble apte à potentialiser l'effet de la MRT en augmentant localement la dose déposée. L'injection de Magnevist® 15 à 20 minutes avant l'irradiation MRT unidirectionnelle 625/200/25 permet d'augmenter la médiane et la moyenne de survie des rats porteurs de tumeur 9L. La médiane de survie augmente de 30 à 44 jours (avec apparition d'un survivant à long terme) lors de l'injection de 10  $\mu$ l de Gd-DTPA par voie intratumorale avant l'irradiation. Étonnamment, l'injection par voie intraveineuse de 1,5 ml de Gd-DTPA avant l'irradiation n'apporte aucune modification de la survie des animaux par rapport à la MRT seule. Certaines différences entre les 2 modes

d'injection peuvent expliquer ce résultat. D'une part, la quantité de gadolinium présente dans la tumeur est plus élevée lors de l'injection intratumorale : une injection de 10 µl de Gd-DTPA à 0,5 mmol/ml équivaut à une quantité de 0,8 mg de Gd alors que l'injection de 1,5 ml du même produit par voie intraveineuse équivaut à une quantité de 117 mg de Gd dans le système circulatoire entraînant une quantité de Gd dans la tumeur de 0,5 mg/ml [Le Duc, 2004]. D'autre part, après une injection intraveineuse, le produit est présent principalement dans le réseau vasculaire tumoral et aux alentours (du fait des ruptures de la BHE), et donc il reste confiné dans la zone péri-tumorale vascularisée, au détriment des zones de haute densité cellulaire. Au contraire, l'injection intratumorale permet une répartition plus globale. Enfin l'intervalle injection/irradiation était peut être moins favorable au mode d'injection intraveineux.

La synergie du Gd-DTPA avec l'irradiation en mode faisceaux croisés MRT a également été démontrée en février 2006 (médiane de 67 jours avec du Gd-DTPA et de 32,5 jours sans Gd-DTPA ; moyenne de 94 jours avec Gd-DTPA et de 33 jours sans Gd-DTPA ; courbes de survie significativement différentes). Lors de cette expérience, la médiane de survie a été doublée avec l'ajout du gadolinium et la moyenne de survie presque triplée. Cependant, les signes cliniques et l'analyse histologique révèlent une irradiation trop invasive notamment dans la zone de croisement des microfaisceaux.

### **Optimisation de la dose pic à délivrer en faisceaux croisés après l'injection de gadolinium : essais à 625 Gy, 460 Gy et 312 Gy**

Parmi les 3 doses testées, la dose de 460 Gy en faisceaux croisés a apporté les meilleurs résultats (médiane de survie de 40 jours et 30% de survivants à long terme). Les rats irradiés en faisceaux larges croisés après injection de gadolinium selon la même géométrie que la MRT et avec une dose de 10 Gy par faisceaux larges (soit 20 Gy dans la zone de croisement) présentent une médiane de survie et un taux de survivants à long terme équivalent (médiane de survie de 48 jours et 33% de survivants à long terme) qui pourrait remettre en cause l'intérêt de l'irradiation par MRT. Cependant, seuls 1 ou 2 rats (sur 3) sont guéris dans la série Seamcross 10 + Gado, alors qu'aucune cellule tumorale n'a été détectée chez les 5 rats survivants à long terme de la série MRT Cross 460/200/25 + Gado. Malgré un tissu sain plus endommagé à l'histologie, les rats MRT survivants avaient un comportement tout à fait normal, exempt de signes cliniques, et un poids normal. Au final chez les survivants à long

terme, 30% des rats MRT étaient délivrés de leur tumeur contre 11 ou 22% en faisceaux larges croisés.

L'irradiation en faisceaux larges croisés avec une dose de 10 Gy semble être la configuration optimale pour ce type d'irradiation. En effet, une seule irradiation latérale en faisceau large à 20 Gy sur des rats porteurs de tumeur 9L implantée 14 jours avant l'irradiation permet d'obtenir une médiane de survie de 37,5 jours, un tissu sain bien préservé, mais pas de survivants à long terme (cf III.2.1.). Par ailleurs, il est rapporté dans la bibliographie qu'une irradiation à 22,5 Gy en faisceau large (irradiateur à 250 kVp) sur des rats porteurs de tumeur 9L implantée 14 jours avant l'irradiation permet d'obtenir une médiane de survie de 35 jours avec 20 % de survivants à long terme<sup>♦</sup> mais entraîne de très graves lésions bilatérales du tissu sain [Coderre, 1994b]. L'irradiation en faisceaux larges croisés de 10 Gy avec injection de Gd-DTPA combine l'effet curatif (33% de rats survivants à long terme dont 11 à 22 % délivrés de leur tumeur et médiane de survie de 48 jours) avec une bonne préservation du tissu sain. Par contre, les résultats obtenus en MRT à 460 Gy après injection de gadolinium ne semblent pas optimaux. En effet la dose vallée à la tumeur calculée par simulation Monte-Carlo est de 9,3 Gy soit l'équivalent de l'irradiation en faisceau large, mais les simulations ne donnent qu'une estimation de la dose vallée qui d'après des comparaisons « calculs Monte-Carlo » / « Mesure en dosimétrie » (fantômes) sont sous estimées d'au moins 20%. La dose vallée serait donc plus proche des 22 Gy en zone de croisement. A cette dose, il faut ajouter l'effet des doses pic. Un calcul de la dose moyenne délivrée dans cette configuration en MRT, pondérée par les zones irradiées en pic (460 Gy) et en vallée (9,3 Gy) donne une valeur de 59 Gy en irradiation unidirectionnelle, soit 108 Gy en zone de croisement. Bien que la dose effective sur le tissu sain soit sans doute plus proche de la dose vallée que de la dose moyenne pondérée, les dommages causés par une telle dose en MRT restent limités, soulignant la faculté de préservation du tissu sain par cette technique. Puisque l'irradiation à 460 Gy semble un peu trop invasive et que celle à 312 Gy ne permet pas d'obtenir de tels résultats, il serait intéressant pour le futur de tester une dose pic aux alentours de 400-420 Gy. Enfin, il a déjà été démontré que le collimateur Tecomet n'était pas adapté à la thérapie sur petits animaux, limitant les résultats de la MRT, d'autant plus que ce collimateur se dégrade au fur et à mesure des expériences (et de son exposition au faisceau blanc) du fait de sa structure en feuilles collées.

---

<sup>♦</sup> La comparaison des courbes de survie des rats même porteur du même type tumoral (gliosarcome 9L dans ce cas) est hasardeux entre différents laboratoire car les cellules peuvent avoir évoluées différemment (cf partie VI).

Concernant les résultats obtenus avec les faisceaux larges (20 Gy à la tumeur), il est prévu de réaliser des expériences dès la reprise du faisceau sur ID17 (i) en faisceau monochromatique ajusté au dessus du seuil K du gadolinium (afin de maximiser l'effet d'augmentation de dépôt de dose) ; (ii) avec un irradiateur classique et un spectre adéquat.

### **Effet de dose**

Les résultats obtenus en février 2006 notamment au niveau de la médiane (67 jours) et de l'aspect du tissu sain à l'histologie (très abîmé) en comparaison des résultats de l'expérience de juillet 2006, semblent indiquer que la dose pic délivrée à la tumeur est en fait supérieure à 625 Gy pour cette expérience. L'index thérapeutique de la MRT en faisceaux croisés avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  présenterait alors deux pics thérapeutiques : l'un au dessus de 625 Gy, dont l'effet thérapeutique est contrebalancé par les lésions causées au tissu sain, et un second, un peu plus faible aux alentours de 400 – 460 Gy qui, lui, permet à la fois de détruire la tumeur et de conserver le tissu sain. Deux vallées thérapeutiques se situeraient, pour l'une aux alentours de 625 Gy avec une préservation correcte du tissu sain mais une dose (ou plus exactement pour la MRT une géométrie dose pic/dose vallée) inadaptée à la destruction de la tumeur, et pour la seconde en dessous de 312 Gy avec un effet curatif trop faible. La courbe classique de l'effet thérapeutique comprendrait alors, à cause de la géométrie particulière de la MRT en mode faisceaux croisés, une zone de dépression située aux alentours d'une dose pic de 625 Gy (Figure 75). Cette hypothèse devrait être vérifiée par des irradiations de rats porteurs de tumeurs 9L, en MRT faisceaux croisés, à des doses de 312 Gy, 420 Gy, 625 Gy, 700 Gy et 800 Gy, avec et sans injection de Gd-DTPA avant l'irradiation.

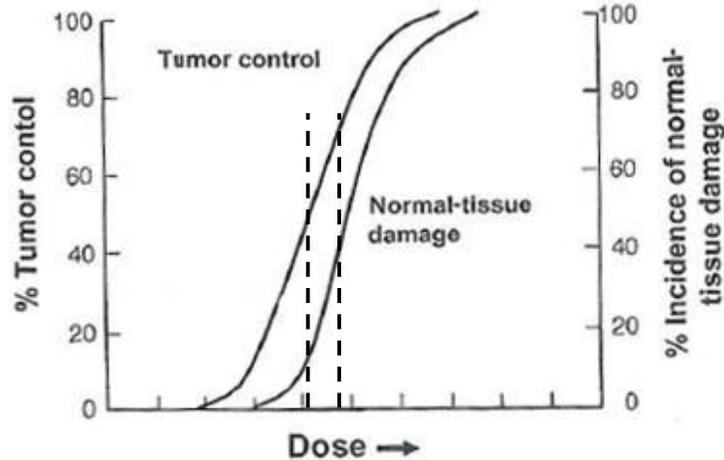


Figure 75 : Courbes de réponse du contrôle tumoral et des dommages aux tissus sains en fonction de la dose. Dans le cas particulier de la MRT en faisceaux croisés, il pourrait exister une chute de la courbe de contrôle de la tumeur dans la zone représentée entre les lignes pointillées. Cette zone se situerait aux alentours d'une dose pic de 625 Gy.

### Variation des résultats

Etrangement, l'effet supra-additif du gadolinium avec l'irradiation par MRT n'a pas été mis en évidence lors de l'expérience d'avril 2007 (ILS = 143% ; survivants à long terme à J100 : 0%). Cette exception dans les résultats, quoi que troublante, peut être expliquée par de nombreux paramètres variables qui peuvent influencer positivement ou négativement les effets de la thérapie : (i) il est possible d'incriminer une dérive de l'homogénéité des microfaisceaux du collimateur Tecomet (visible sur les films gafchromics) entraînant des variations de résultats par rapport aux expériences précédentes. Ce point a été aussi remarqué par d'autres expérimentateurs. (ii) Lors de cette expérience, la hauteur du champ d'irradiation a été augmenté de 10 mm à 13 mm car les tumeurs semblaient de plus grande taille à l'IRM. (iii) Enfin l'injection manuelle de drogues peut être à la source d'un manque de reproductibilité. Le retour au champ d'irradiation habituel et l'utilisation d'une pompe micrométrique pour délivrer le Gd-DTPA [Rousseau, 2007b] de manière reproductible a permis de retrouver des résultats conformes à ceux de juillet 2006 (ILS = 105,12 et 97% ; survivants à long terme à J100 : 30% et 33% en juillet 2006 et juillet 2007, respectivement).

### Perspectives

Afin d'augmenter l'efficacité de l'irradiation en MRT de manière générale et plus particulièrement dans les protocoles MRT + gadolinium, il est primordial d'optimiser l'instrumentation en développant :

- **la mise en place d'un système d'imagerie** permettant de cibler la tumeur et de réduire les champs d'irradiation, en particulier lors d'irradiations en mode faisceaux croisés qui sont les plus délétères pour le tissu sain.
- **la mise en place d'un collimateur fiable et spécifique** aux irradiations précliniques de modèles petits animaux, avec un espacement de 200  $\mu\text{m}$  de préférence. Les essais précliniques sont indispensables pour la compréhension et l'optimisation de la MRT. Par ailleurs, une redondance d'un tel équipement ne semble pas inutile.
- **L'augmentation de la concentration locale en gadolinium**, en utilisant par exemple des nanoparticules de gadolinium [Bridot, 2007].
- **L'optimisation du système de délivrance de la drogue**, pour obtenir un effet reproductible et homogène, et également d'augmenter la concentration de drogues [Morrison, 1994].
- **une meilleure connaissance de la dose réellement déposée en MRT**, notamment dans la vallée. Cette connaissance est nécessaire pour pouvoir irradier des rats à la même dose en faisceau large et pouvoir établir une comparaison fiable entre ces deux modes d'irradiation.

Actuellement, 15  $\mu\text{l}$  de Magnevist® sont délivrés par voie intratumorale soit 1,18 mg de gadolinium. Les tumeurs 9L ont une taille moyenne à J14 estimée à 100  $\text{mm}^3$  environ par imagerie synchrotron (cf VI.2.4.1.) soit  $\approx 0,1$  ml. En estimant que le produit délivré se répartisse uniquement dans la tumeur, la concentration en gadolinium serait de 12 mg/ml. Solberg *et al.* ont calculé une augmentation de dose de 1,64 pour une concentration de 5 mg/ml de gadolinium dans l'eau, irradié avec une source classique de rayons X de 140 kVp [Solberg, 1992a]. Bien que le spectre utilisé en MRT soit différent d'un spectre de rayons X classique, cette valeur permet d'avoir une première estimation de l'effet du gadolinium sur le dépôt de dose qui entrainerait une augmentation de dose proche d'un facteur 4. Pour la MRT, seule une simulation Monte-Carlo prenant en compte l'interaction du faisceau blanc avec le gadolinium, et notamment le passage de l'interaction avec la matière d'un effet Compton prédominant avec l'eau à un effet photoélectrique prédominant avec le gadolinium, permettra d'en savoir plus sur l'augmentation du dépôt de dose effectif.

Plusieurs possibilités permettront d'augmenter la concentration de drogue tout en optimisant le système de délivrance de gadolinium. Certaines d'entre elles ont déjà été explorées. L'utilisation de Gadovist®, produit 2 fois plus concentré que le Magnevist®, en injection intratumorale a dû être abandonnée à cause de sa plus grande toxicité neurale qui a entraîné

des symptômes nerveux importants chez les animaux, nécessitant l'euthanasie immédiate ( $DL_{50}$  en intracisternal chez le rat : 740  $\mu\text{mol/kg}$  pour le Magnevist® et 86  $\mu\text{mol/kg}$  pour le Gadovist® [Vogler, 1995]). L'utilisation d'une pompe (débit de 0,5  $\mu\text{l/min}$ ) lors de l'injection intratumorale a permis d'homogénéiser la répartition de la drogue et permettrait de délivrer une plus grande quantité de produit. Cependant, cela risque d'entraîner une répartition plus importante du produit dans le tissu plutôt qu'une concentration plus importante au sein de la tumeur, ce qui serait défavorable. Aussi, des systèmes de délivrance de drogues par voie intratumorale, lents et réguliers, tels que des micro-pompes osmotiques ou des polymères biodégradables de gadolinium peuvent être utilisés pour augmenter l'imprégnation de la tumeur en Gd-DTPA. La combinaison avec l'irradiation en faisceaux croisés différés peut être intéressante en injectant de la drogue avant chacune des deux irradiations permettant ainsi de mieux préserver le tissu sain et de doubler la dose de gadolinium.

En conclusion, l'injection de gadolinium préalablement à l'irradiation par la technique de MRT entraîne un effet positif sur la survie des rats.

# V. Deux approches thérapeutiques utilisant le rayonnement synchrotron : SSRT et MRT

## V.1 Contexte de l'étude

Le rayonnement synchrotron est apparu récemment comme un outil complémentaire dans le domaine de la radiothérapie en proposant deux techniques : la Thérapie par Microfaisceaux (MRT ou Microbeam Radiation Therapy) et la Thérapie Stéréotaxique par Rayonnement Synchrotron (SSRT ou Synchrotron Stereotactic Radiation Therapy). En 2002, lors des Journées du Groupe Imagerie de l'ESRF au Col de Porte (Grenoble), les meilleurs résultats obtenus en MRT et en SSRT, acquis respectivement par l'Unité INSERM de François Estève et l'équipe MRT de l'Université de Berne de Jean Laissue avaient été présentés. En MRT, une médiane de survie de 159 jours (avec 50% de survivants 100 jours après implantation) avait été obtenue sur des rats porteurs de gliosarcomes 9L (faisceaux croisés, 625/100/25, sans drogues) [Laissue, 1998]. En SSRT, une médiane de survie 214 jours (avec 30% de survivants 1 an après) avait été obtenue sur des rats porteurs de gliomes F98 après injection de 3  $\mu\text{g}$  de cisplatine (irradiation de 15 Gy à 78 keV) [Biston, 2004b]. Ces résultats prometteurs ont été à l'origine du programme d'essais cliniques, en cours de préparation aujourd'hui sur la ligne médicale et des débats visant à comparer l'efficacité relative des deux techniques et leurs principales indications. Cependant, à cette époque et au début de ce travail de thèse, les expériences n'avaient pas été reproduites, ni par les équipes concernées, ni par d'autres. Par ailleurs, chacune de ces techniques a été développée avec un modèle cellulaire différent : le gliome F98 pour la SSRT implanté dans le noyau caudé avec  $10^3$  cellules dans 5  $\mu\text{l}$  [Barth, 2000 ; Biston, 2004b] et le gliosarcome 9L pour la MRT implanté dans le noyau caudé avec  $10^4$  cellules dans 1  $\mu\text{l}$  [Dilmanian, 2002 ; Laissue, 1998]. De plus, alors que la SSRT s'appuie sur un effet supra-additif entre une drogue de chimiothérapie et une augmentation de dépôt de dose en faisceau monochromatique, la MRT utilise un spectre blanc, avec une géométrie particulière (un fractionnement micrométrique et l'emploi de doses à la peau très élevées en une seule irradiation). Il semblait donc logique de répéter ces expériences en mixant modèles et techniques, avec pour dénominateur commun le cisplatine (Tableau 14).

	SSRT	MRT	
	+3 µg de CisPt dans 5µl	Sans CisPt	+3 µg de CisPt dans 5µl
9L : 10 <sup>4</sup> cellules dans 1 µl	15 Gy, 78,8 KeV, 17 rats	Unidirectionnel, 625/200/25, 8 rats d'après [Laissue, 1998]	Unidirectionnel, 625/200/25, 15 rats
F98 : 10 <sup>3</sup> cellules dans 5 µl	15 Gy, 78,8 KeV, 14 rats d'après [Biston, 2004b]	Unidirectionnel, 625/200/25, 6 rats	Unidirectionnel, 625/200/25, 7 rats

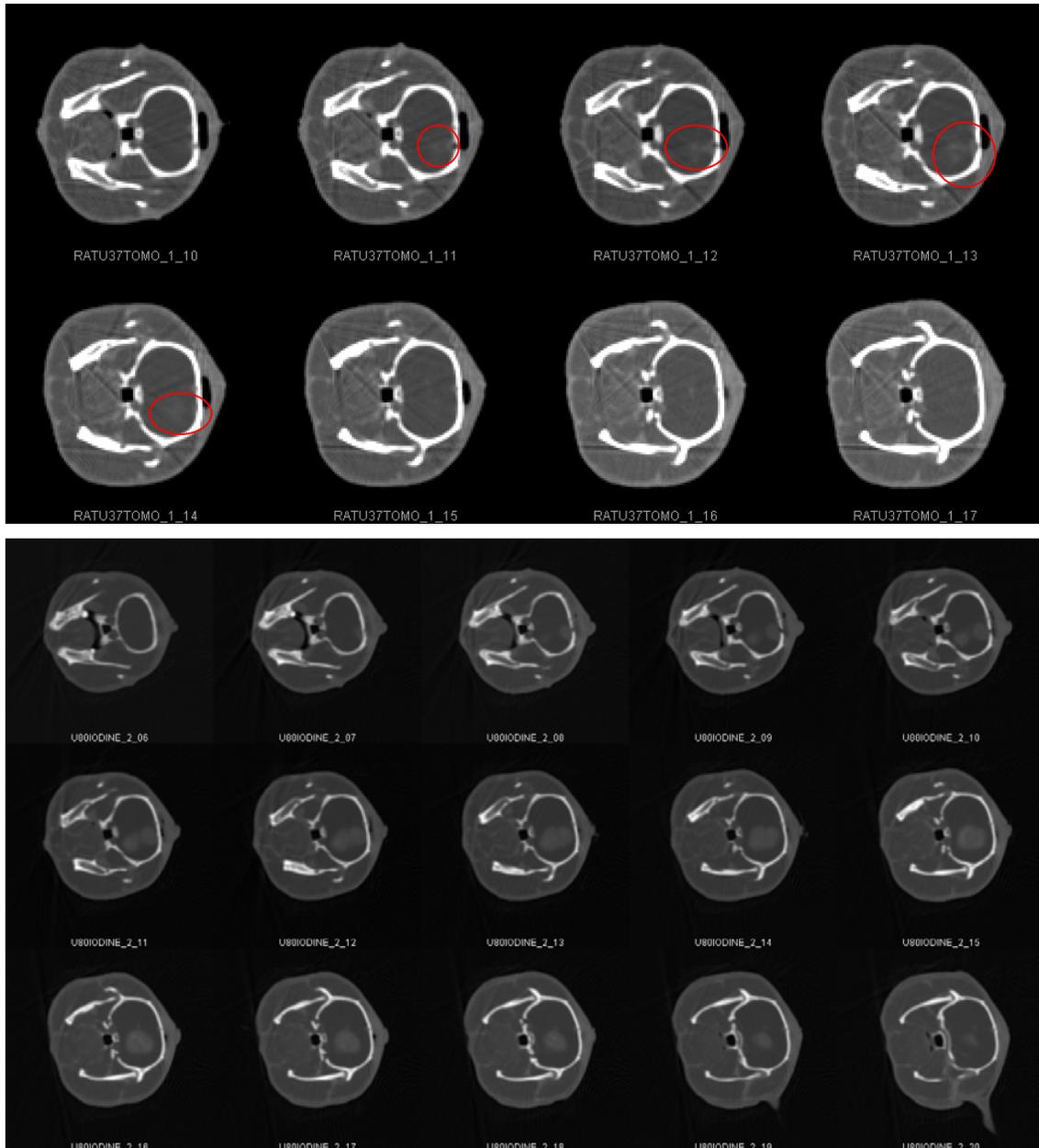
Tableau 14 : Présentation des différents protocoles de MRT et SSRT avec les modèles tumoraux 9L et F98. Les cases bleutées représentent l'emplacement des protocoles originels proches publiés.

## V.2 Résultats

### V.2.1. Résultats de SSRT

#### V.2.1.1. Tomographie Quantitative par Rayonnement Synchrotron

Tous les rats ayant reçu du cisplatine (irradiés ou non) ont été imagés par Tomographie Quantitative par Rayonnement Synchrotron (SRCT ou Synchrotron Radiation Computed Tomography) [Elleaume, 1999] quelques minutes après injection de 2 ml d'un produit de contraste iodé dans l'une des veines caudales. Dans le cas du modèle F98, la « brillance » des tumeurs était faible compte tenu de la quantité d'iode injectée. La tumeur est visible dans le cas de 9/23 rats. Pour 10 rats, la tumeur était peu visible. Enfin, 4 rats ont été sortis de l'étude. Dans le cas des tumeurs 9L, sur 25 rats imagés (1 rat est décédé juste après l'imagerie et irradiation) toutes les tumeurs étaient clairement visibles.



**Figure 76 : Image en tomographie quantitative par rayonnement synchrotron (SRCT) d'un rat porteur d'une tumeur F98 (en haut) et d'un rat porteur d'une tumeur 9L (en bas) 14 jours après l'implantation de  $10^3$  cellules dans 5  $\mu$ l et  $10^4$  cellules dans 1  $\mu$ l, respectivement.**

Typiquement, chez un rat porteur d'une tumeur F98 imagée en SRCT, 14 jours après l'implantation, une tumeur diffuse est visible avec un faible contraste sur 4 coupes. Chez un rat porteur d'une tumeur 9L imagé en SRCT, 14 jours après l'implantation, une tumeur de grande taille est clairement visible sur 14 coupes (Figure 76). Il faut noter la structure bilobée de la tumeur 9L sur les premières coupes.

### V.2.1.2. Courbes de survie

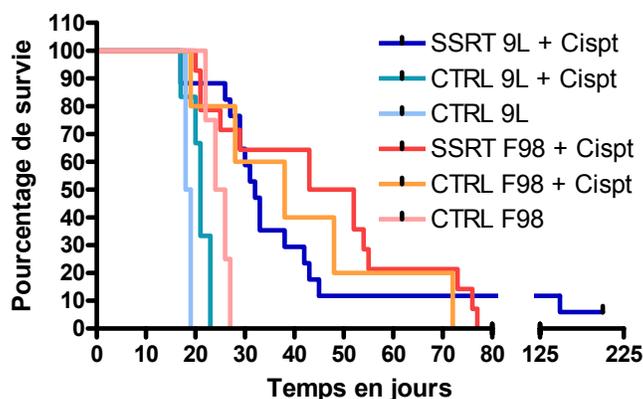
La médiane de survie des rats CTRL est de 18,5 jours pour les rats porteurs de tumeur 9L et de 25 jours pour les rats porteurs de tumeur F98 (Figure 77). Dans le cas des tumeurs 9L, le nombre de rats représentés par cette courbe étant très limité ( $n = 2$ ), il est important de noter que ces valeurs sont typiques et en totale concordance avec les autres valeurs des rats contrôle 9L obtenues lors des autres expériences (moyenne  $19.7 \pm 2$  jours ; médiane 19 jours ; sur un total de 54 rats).

La courbe de survie des rats CTRL 9L + Cispt (médiane de 21 jours) est peu différente de celle des rats CTRL 9L. Au contraire, la courbe de survie des rats CTRL F98 + Cispt se détache nettement de celle des rats CTRL F98, avec une médiane de survie est égale à 38 jours (Figure 77). Les courbes de survie des rats contrôle 9L et F98 sont significativement différentes ( $p = 0.0177$ ) tout comme les courbes de survie des rats contrôle 9L + Cispt et F98 + Cispt ( $p = 0.0271$ ).

Les courbes de survie des séries SSRT F98 + Cispt et CTRL F98 + Cispt sont quasiment identiques, et aucune ne présente de survivants à long terme (Figure 77). Elles sont toutes deux significativement différentes de la série CTRL F98 ( $p = 0.0292$  et  $0.048$ , respectivement) mais ne le sont pas entre elles ( $p = 0.3323$ ).

Pour les rats 9L, la courbe de survie des rats traités avec la combinaison SSRT et Cisplatine ressemble aux courbes obtenues avec le modèle F98 (SSRT + Cispt, CTRL +Cispt). Elle est significativement différente des deux autres courbes 9L ( $p = 0.0058$  avec la courbe CTRL 9L et  $p < 0.0001$  avec la courbe CTRL 9L + Cispt). Les 2 rats survivants sont des rats 9L : l'un décèdera à J149 et l'autre est toujours vivant plus de 200 jours après l'irradiation.

Il convient de noter que certains rats des séries SSRT F98 + Cispt et CTRL F98 + Cispt décèdent avant la mort du premier rat contrôle.



	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	%ILS	%ILSre	N =
<b>SSRT 9L + Cispt (J200)</b>	32	48,3		73	161	17
<b>SSRT F98 + Cispt</b>	47,5	45,8	5,5	90	85	14
<b>CTRL 9L + Cispt</b>	21	20,8	0,91	13,5	12,5	6
<b>CTRL F98 +Cispt</b>	38	41	9,14	52	65,6	5
<b>CTRL 9L</b>	18,5	18,5	0,5			2
<b>CTRL F98</b>	25	24,75	1,11			4

Figure 77 : En haut: courbes de survie des rats implantés avec des tumeurs 9L et F98 sans traitement ou traités avec injection intratumorale de cisplatine seul ou injection intratumorale de cisplatine accompagnée 24 h après par une irradiation à 15 Gy en mode SSRT à 78,8 keV. En bas : tableau des données statistiques des séries de rats présents sur la courbe de survie.

Dans les expériences présentées ci-dessus, la combinaison SSRT (+ cisplatine) est plus efficace sur les tumeurs 9L que sur les tumeurs F98 pour lesquels c'est plutôt le cisplatine seul qui semble faire effet.

### V.2.1.3. Poids et signes cliniques

Les rats CTRL F98 et 9L présentent les signes typiques de rats porteurs d'une tumeur de stade avancé. Les courbes de poids moyens des séries SSRT 9L + Cispt, SSRT F98 + Cispt et CTRL F98 + Cispt ont une évolution typique et sont très proches.

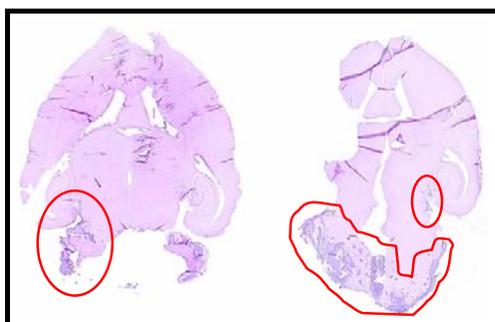
Un nombre plus important de signes cliniques a été observé sur les rats F98. Notamment chez les rats témoins avec drogue, 1 rat sur 6 présente des signes cliniques particuliers dans la série 9L contre 3/5 rats dans la série F98. Cependant les rats CTRL F98 + Cispt ont une moyenne de survie deux fois plus élevée que leurs homologues 9L. Pour les séries SSRT, un quart (4/17) des rats présentent des signes cliniques du système nerveux dans la série 9L contre la moitié (8/14) des rats dans la série F98. De façon remarquable, les 4 rats exclus de l'étude *via* les résultats d'imagerie présentent tous, et exclusivement, des symptômes cliniques nerveux

très poussés. Ces 4 rats tournaient dans leurs cages, toujours dans le même sens, et à très grande vitesse. Ceci était accompagné soit d'une démarche parfois incertaine, tête penchée, soit par une très grande excitabilité.

#### V.2.1.4. Analyse histologique

##### Pour les rats implantés avec les cellules F98

L'analyse histologique a été réalisée sur 4/5 rats pour la série CTRL + Cispt, 8/14 rats pour la série SSRT + Cispt. Parmi les rats qui avaient été exclus de l'étude, 2/4 rats ont été analysés. Chez ces deux individus, décédés 21 et 27 jours après l'implantation, aucune trace de tumeur n'est visible dans l'hémisphère droit sur les coupes examinées. Des groupes de cellules tumorales sont par contre présentes sous l'hippocampe et/ou au niveau du cervelet (Figure 78). Il faut rappeler que l'imagerie ayant lieu après l'irradiation, ces rats ont été traités de la même manière que tous les autres.

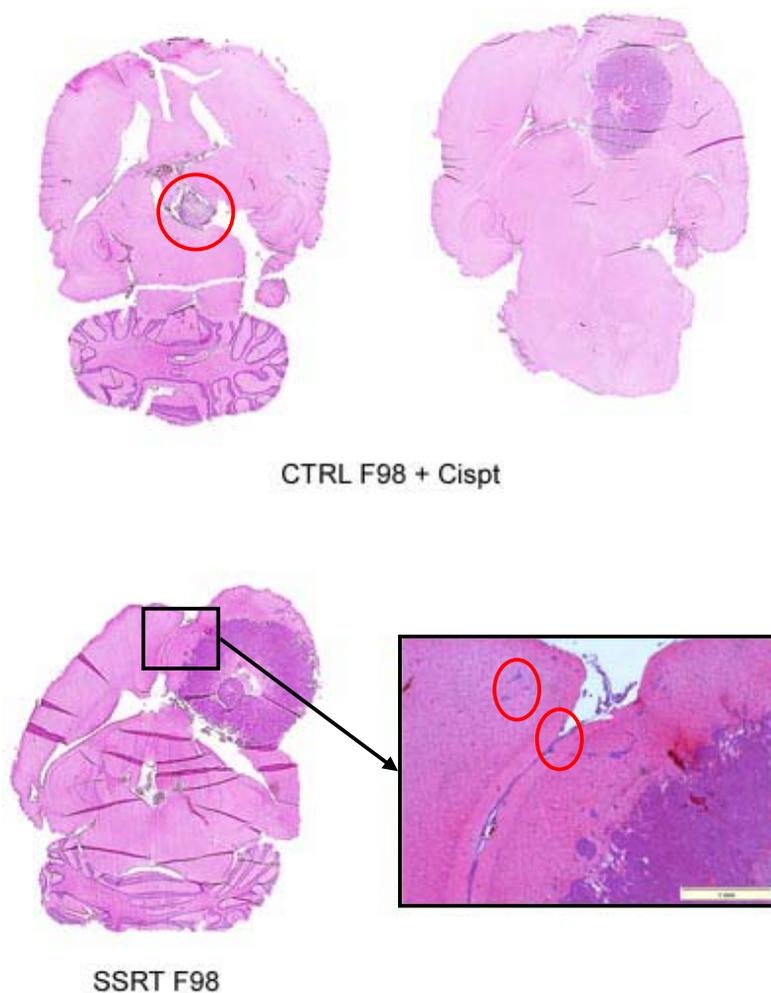


**Figure 78 : Coupes histologiques d'un rat traité dont la tumeur n'était pas visible à l'imagerie. Ce rat est décédé à J27. Le processus tumoral est visible uniquement dans le cervelet et au niveau des hippocampes.**

Sur les 5 rats CTRL F98 + Cispt, 4 ont été analysés en histologie. La tumeur est présente chez trois d'entre eux sous les hippocampes et parfois dans le cervelet et dans la scissure interventriculaire, mais jamais à la localisation habituelle dans l'hémisphère droit. Au contraire, chez le 4<sup>ème</sup> rat (ayant survécu le plus longtemps dans cette série : 72 jours), une masse tumorale importante est présente uniquement dans l'hémisphère droit à l'emplacement habituel (Figure 79).

Les résultats obtenus à l'analyse de 8/14 cerveaux de la série SSRT F98 + Cispt sont très hétérogènes. Dans le cas de 6 rats, la tumeur est toujours présente dans l'hémisphère droit mais à des tailles très variables (Figure 79). Des zones tumorales sont également présentes chez 4/6 rats dans des zones atypiques (au niveau des hippocampes, du cervelet ou de la

scissure interventriculaire) avec des tailles parfois égales ou supérieures à la zone tumorale de l'hémisphère. De plus, 1 rat mort à J20 ne présente pas de tumeur : il peut s'agir d'une localisation anormale de la tumeur et non décelable sur les coupes analysées ou d'une petite tumeur détruite par la thérapie, et d'une mort due à la toxicité du cisplatine. Un second rat présente de très petits foyers tumoraux, sans masse tumorale importante. Aucune lésion majeure n'a été relevée dans le tissu cérébral sain. Il est important de noter que les 2/8 rats pour lesquels aucune trace, ou de faibles traces de tumeurs, ont été relevées sont morts à J20 et J21, alors que les 6 autres rats sont tous morts après J43.



**Figure 79:** Histologie HE de cerveaux de rats porteurs de tumeur F98 ayant reçu 3  $\mu\text{g}$  de cisplatine seul (en haut, avec à gauche une tumeur en zone atypique) ou ayant été traité par SSRT (en bas). Sur l'agrandissement (G x20) réalisé, des cellules tumorales sont visibles dans la scissure interventriculaire et dans l'hémisphère gauche.

### **Pour les rats implantés avec les cellules 9L (Figure 80)**

L'analyse histologique de 8/15 cerveaux de rats de la série SSRT 9L + Cispt et décédés avant J100 confirme la présence de tumeurs de tailles moyennes à importantes dans l'hémisphère droit avec parfois des nécroses et/ou des hémorragies importantes. La présence de tissu cicatriciel (ou radionécrose ?) est parfois notée à côté de la zone tumorale. Peu de détériorations importantes du tissu sain ont été relevées (lésions en général concentrées autour de la tumeur). Le cerveau du rat décédé à J149 a également été analysé et ne présente plus de trace de tumeur. Une zone cicatricielle avec des microcalcifications est présente dans l'hémisphère droit. De nombreuses petites télangiectasies accompagnées d'altérations spongiformes sont disséminées dans tout le tissu sain.

Concernant les rats de la série CTRL 9L + Cispt, 2/6 rats ont été analysés et présentaient une tumeur de taille importante dans l'hémisphère droit.

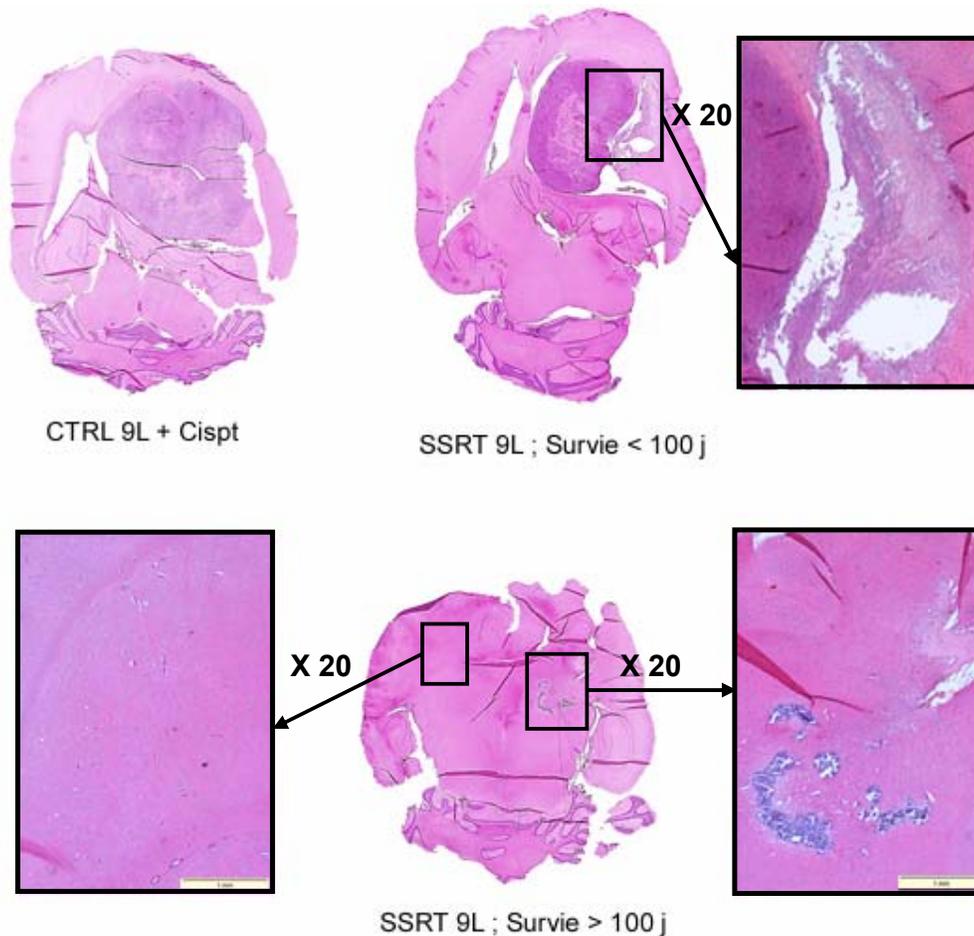


Figure 80 : Histologie HE de cerveaux de rats porteurs de tumeur 9L ayant reçu 3  $\mu\text{g}$  de cisplatine seul (en haut à gauche) ou ayant été traités par SSRT : de grosses masses tumorales sont présentes chez tous les rats décédés avant J100 avec parfois des zones de radionécrose autour de la tumeur (en haut à droite, G x20). Le rat décédé à J149 présente une zone cicatricielle et une zone de microcalcifications (en bas à droite, G x20), le tissu sain n'est pas parfaitement épargné (en bas à gauche, G x20).

## V.2.2. Résultats de MRT

### V.2.2.1. Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire

Tous les rats irradiés ont passé une IRM à J12 ou à J13.

Pour le modèle F98, la tumeur a été vue avec certitude chez 4/13 rats, elle n'a pas été vue chez 5 rats. Les 4 rats restant sont ceux pour lesquels le diagnostic est incertain. Le détail des diagnostics par série est présenté dans le Tableau 15. Parmi les rats survivants le plus longtemps dans ces 2 séries, aucun n'appartient au groupe dont la tumeur n'était pas visible à l'IRM. Les rats contrôle ont, quant à eux, été imagés à J15. Sur 5 rats, la tumeur était bien visible chez l'un d'entre eux, douteuse chez 2, et n'était pas visible chez les deux derniers

rats. Ces 5 rats sont morts entre J23 et J26. Dans le cas des cellules 9L, l'IRM a été particulièrement utile pour cette session (comprenant, entre autres, les rats de cette étude sur le cisplatine) dans laquelle seule 86% (120/139) des tumeurs étaient visibles. Seuls ces rats ont été retenus lors du traitement des données.

	Tumeur visible	Douteux	Tumeur pas visible
Unidir "625"/200/25 F98 fev06	1/6	2/6	3/6
Unidir "625"/200/25 + cispt F98 fev06	3/7	2/7	2/7

**Tableau 15 : Diagnostic IRM des rats implanté avec  $10^3$  cellules F98 à J13.**

Il faut rappeler que les tumeurs 9L qui ne sont pas vues à l'IRM soit n'existent pas (à cause d'une erreur d'implantation), soit ont une vitesse de croissance réduite. L'IRM permet alors d'obtenir des séries de tumeurs homogènes. Avec les cellules F98, les tumeurs, bien que présentes et ayant une vitesse de croissance normale (cf témoins), sont généralement peu visibles.

En conclusion, les tumeurs F98 sont beaucoup plus difficiles à voir en pondération  $T_2$  sans agent de contraste que les tumeurs 9L, ce qui est l'une des faiblesses de ce modèle.

### V.2.2.2. Courbes de survie

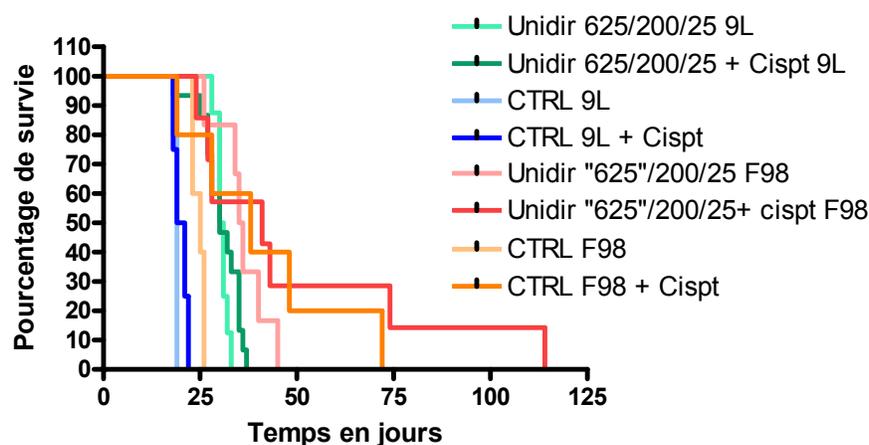
La médiane de survie des rats CTRL est de 19 jours pour les rats porteurs de tumeur 9L et de 25 jours pour les rats porteurs de tumeur F98 (Figure 81), valeurs conformes à celles obtenues auparavant. La courbe de survie des rats CTRL F98 est significativement différente de toutes les autres courbes de rats porteurs de tumeur F98 ( $0,0428 > p > 0,0005$  selon les séries), alors que celle des CTRL 9L est significativement différentes des courbes des séries irradiées ( $0,0005 > p > 0,0002$  selon les séries) mais pas de la courbe des rats CTRL + Cispt.

La courbe de survie des rats CTRL 9L + Cispt (médiane de 19 jours) est peu différente de celle des rats CTRL 9L. Au contraire, la courbe de survie des rats CTRL F98 + Cispt se détache nettement de celle des rats CTRL F98, avec une médiane de survie est égale à 38 jours (Figure 81). Il convient de noter que les courbes des rats contrôle 9L et contrôle F98 sont significativement différentes entre elles ( $p = 0.0035$ ) tout comme les courbes des rats contrôle 9L + Cispt et contrôle F98 + Cispt ( $p = 0.0252$ ).

Les rats porteurs de tumeur F98 traités en MRT sans et avec cisplatine ont des médianes de survie de 35,5 jours et de 41 jours, respectivement (Figure 81). Malgré cette différence de

médiane et l'apparition d'un survivant à long terme dans la série Unidir "625"/200/25 F98 + Cispt, la différence avec la série Unidir "625"/200/25 F98 n'est pas significative. Les courbes de survie de ces deux séries ne sont pas non plus significativement différentes de celle la série CTRL F98 + Cispt.

Au contraire, les courbes des séries 9L traités en MRT avec ou sans cisplatine sont significativement différentes de la courbe CTRL 9L + Cispt ( $p < 0,0001$  et  $p = 0,0002$ , respectivement) mais ne sont pas significativement différentes entre elles (médiane de survie de 30 jours et 30,5 jours, respectivement).



Séries	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	%ILS	%ILS re	N =
<b>Unidir 625/200/25 9L</b>	30,5	30,6	0,53	60,5	63	8
<b>Unidir "625"/200/25 F98</b>	35,5	36	2,6	42	46,3	6
<b>Unidir 625/200/25 9L + Cispt</b>	30	30,4	1,3	57,9	60,9	15
<b>Unidir "625"/200/25 F98 + Cispt</b>	41	50,1	12,4	64	103,8	7
<b>CTRL 9L + Cispt</b>	20	20	0,91	5,3	6,4	4
<b>CTRL F98 + Cispt</b>	38	41	9,14	52	66,7	5
<b>CTRL 9L</b>	19	18,8	0,2			5
<b>CTRL F98</b>	25	24,6	0,7			5

**Figure 81:** En haut : courbes de survie des rats contrôle et des rats irradiés en mode MRT unidirectionnel, avec ou sans adjonction de cisplatine. En bas : données statistiques correspondantes aux séries présentes sur les courbes de survie.

L'effet de l'ajout de cisplatine au protocole de MRT est visible pour les rats implantés avec des cellules F98 et irradiés en mode unidirectionnel, alors que pour les mêmes protocoles sur des rats implantés avec des cellules 9L cette différence est minime. Ainsi, alors que pour les rats implantés avec des cellules 9L (i) il y a très peu de différences entre les séries CTRL et CTRL + Cispt, (ii) il y a une grande différence entre les séries CTRL + Cispt et MRT (avec ou sans drogue), c'est l'inverse pour les rats porteurs de tumeur F98. Avec les rats porteurs de

tumeur 9L, il n'y a pas de différence avec ou sans cisplatine. Pour les rats porteurs de tumeur F98, une différence (plus ou moins importante) est présente tant au niveau des rats contrôle que des rats irradiés en mode unidirectionnel.

### V.2.2.3. Courbes de poids et signes cliniques

Les courbes de poids moyens relatifs restent conformes à ce qui est attendu pour des rats porteurs de gliomes et subissant une radiothérapie cérébrale, bien que la série MRT Unidir 625 Gy ne présente pas d'augmentation de poids aux alentours de J20, comme c'est généralement le cas, et continue même à chuter. La chute de poids et la mort d'un des 2 rats survivants après J50 de la série Unidir "625"/200/25 F98 + Cispt est visible aux alentours de J76 (Figure 82).

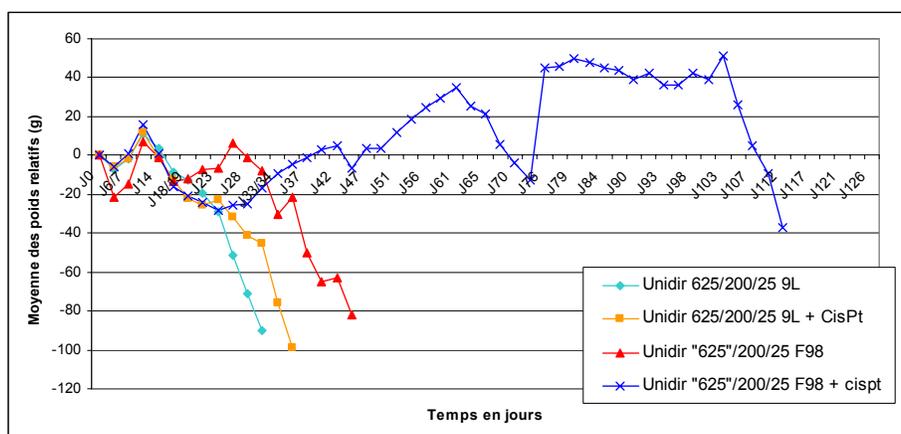


Figure 82: Courbes de poids des rats MRT irradiés en mode unidirectionnel avec ou sans cisplatine.

Que ce soit pour les rats porteurs de cellules F98 ou 9L, l'ajout de Cisplatine au protocole de MRT n'a pas entraîné d'augmentation du nombre de signes cliniques. Le nombre de signes cliniques développés est cependant plus important chez les rats implantés avec des cellules F98 (7/13) que chez les rats implantés avec des cellules 9L (5/24).

#### **V.2.2.4. Analyse histologique**

8/15 cerveaux de rats de la série Unidir 625/200/25 9L + Cispt et 4/7 cerveaux de rats de la série Unidir “625“/200/25 F98 + Cispt (parmi lesquels les rats décédés à J74 et J114) ont été analysés. Tous ces rats étaient porteurs d'une tumeur de taille variable mais généralement importante. Le tissu sain est bien conservé bien que quelques microcalcifications soient visibles chez les deux rats ayant survécu 74 et 114 jours. Une suspicion de tumeur dans le cervelet est relevée chez un rat implanté avec des cellules F98.

### **V.2.3. Comparaison MRT/SSRT**

#### **V.2.3.1. Avec les cellules F98**

##### **Courbes de survie :**

Les courbes de survie des rats irradiés avec du cisplatine en MRT et SSRT ne sont pas significativement différentes (médiane de survie de 41 et 47,5 jours respectivement). Étonnamment, quel que soit le traitement effectué après l'injection de cisplatine intratumorale, le gain de survie apporté par le rayonnement reste limité comparé à la survie des rats CTRL F98 + Cispt (Figure 83).

Il faut rappeler que les rats porteurs de cellules F98, et irradiés en mode MRT, l'ont été durant la session de février 2006 pour laquelle des problèmes instrumentaux sont survenus. La dose déposée est incertaine mais semble être supérieure à 625 Gy (cf IV.3.2.), elle sera notée « 625 ». Étant donné que cette étude permet de tester l'effet de deux techniques différentes sur un même modèle cellulaire (F98 dans ce cas) et que la dose de 625 Gy en MRT est choisie en fonction des expériences précédentes réalisées sur le modèle 9L, la conséquence de cette incertitude de dose est ici moins importante.

Les rats CTRL F98 + Cispt sont ceux réalisés lors de l'expérience de SSRT.

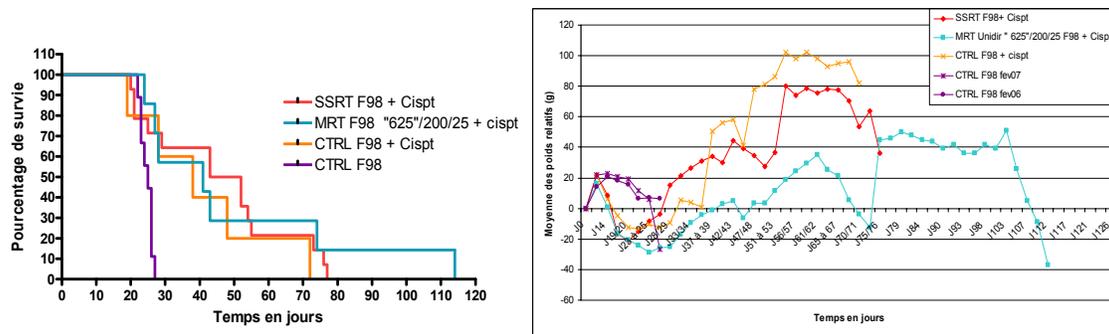


Figure 83 : En haut à gauche : courbes de survie des rats F98 CTRL, MRT et SSRT avec ou sans cisplatine. Les rats CTRL F98 de février 06 et 07 sont groupés sur la courbe. En haut à droite : courbes de poids moyens relatifs de ces mêmes rats. En bas : tableau des données statistiques.

### Poids et signes cliniques :

Les courbes de poids des rats CTRL sont quasi superposées, donc très reproductibles. Les rats irradiés en mode MRT présentent des courbes de poids relatifs moyens inférieures aux courbes SSRT et CTRL + Cispt. Dans les 3 séries traitées, le nombre de rats présentant des signes cliniques varie entre 57% et 71%. Cet écart est faible, compte tenu du nombre de rats présents dans chaque série.

### Histologie :

Pour les deux techniques, le tissu sain est relativement bien conservé. Les tumeurs sont assez hétérogènes et sont parfois retrouvées dans des localisations inhabituelles. Ceci a été observé chez les rats CTRL + Cispt et chez les rats irradiés en SSRT, mais peu chez les rats irradiés en MRT dont le nombre analysé était cependant moindre.

## V.2.3.2. Avec les cellules 9L

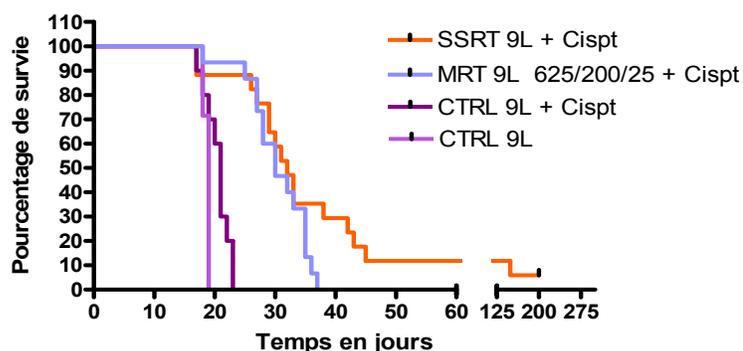
### Courbes de survie :

Dans les courbes de survie les CTRL de février 06 et 07 sont groupés tout comme les CTRL + Cispt (Figure 84).

Les courbes de survie des séries CTRL et CTRL + Cispt sont très proches, elles sont cependant significativement différentes ( $p = 0,0232$ ). Il faut cependant noter que la différence entre les CTRL 9L + Cispt et l'ensemble ( $n = 54$ ) des CTRL 9L n'est pas significative ( $p = 0.2826$ ).

Les courbes SSRT et MRT + Cispt sont très proches (médiane de survie = 32 jours et 30 jours, respectivement) et ne sont pas statistiquement différentes. Cependant, le seul survivant à long terme apparaît dans la série SSRT, laissant présager une efficacité un peu supérieure de cette technique pour traiter le gliosarcome 9L.

Ces 2 courbes de survie sont significativement différentes de la courbe CTRL 9L ( $p = 0,0005$  pour la série SSRT et  $p < 0,0001$  pour la série MRT) et de la courbe CTRL + Cispt ( $p < 0,0001$  pour les deux séries).



	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	%ILS	%ILSre	N=
<b>SSRT 9L + Cispt (J200)</b>	32	48,3		73	161	17
<b>MRT 9L 625/200/25 + Cispt</b>	30	30,4	1,3	58	61	15
<b>CTRL 9L + Cispt fev07</b>	21	20,8	0,91	13,5	12,5	6
<b>CTRL 9L + Cispt juil05</b>	20	20	0,91	5,3	6,4	4
<b>CTRL 9L fev07</b>	18,5	18,5	0,5			2
<b>CTRL 9L juil05</b>	19	18,8	0,2			5

Figure 84: En haut : courbes de survie des rats 9L CTRL, MRT et SSRT avec ou sans cisplatine. Les rats contrôle 9L de février 07 et juillet 05 ont été regroupés sur la courbe. En bas : tableau des données statistique de ces séries.

### Poids et signes cliniques :

Les courbes de poids ne présentent aucune particularité. Le pourcentage de rats présentant des signes cliniques ne dépasse 30% dans aucune des séries présentées dans ce paragraphe.

## V.3. Discussion

### V.3.1. Comparaison des résultats de SSRT F98 avec la bibliographie

Deux études de SSRT, également réalisées à l'ESRF, utilisant le modèle F98 ont été publiées. Le protocole expérimental de l'étude publiée en 2004 [Biston, 2004b], est exactement le même que le protocole utilisé dans le chapitre précédent : 5 µl contenant 10<sup>3</sup> cellules F98 sont injectés manuellement dans le noyau caudé des rats, 13 jours après implantation ces animaux reçoivent 3 µg de cisplatine en injection intratumorale. 14 jours après implantation, ils sont irradiés (en rotation) à une énergie de 78,8 keV, afin de recevoir 15 Gy à la tumeur. La seconde étude publiée en 2007, par la même équipe [Rousseau, 2007a], est réalisée à partir d'un protocole qui a évolué : les 5 µl contenant 10<sup>3</sup> cellules F98 sont maintenant injectés à l'aide d'une pompe micrométrique, et ce sont 20 µg de carboplatine qui sont injectés en CED par voie intratumorale, 13 jours après l'implantation. L'irradiation est réalisée de manière fractionnée à partir de J14, pendant 3 jours, avec une dose délivrée à la tumeur de 8 Gy par jour, à une énergie de 80 keV (Tableau 16).

Protocole	N =	Intervalle de survie	Médiane (j)	Survivants >100 j
CTRL [Biston, 2004b]	12	24 – 37	26	/
CTRL [Rousseau, 2007a]	6	26 – 32	28	/
CTRL, cette étude	9	22 – 27	25	/
CTRL + 15 Gy [Biston, 2004b]	10	33 – 70	48	/
CTRL + (3 x 8) Gy [Rousseau, 2007a]	11	42 – 65	51	/
CTRL + 3 µg Cispt [Biston, 2004b]	10	28 – 60	37	/
CTRL + 20 µg Carbopt [Rousseau, 2007a]	10	32 – 120	45	10%
CTRL + 3 µg Cispt, cette étude	5	19 – 72	38	/
SSRT (3 µg Cispt ; 15 Gy) [Biston, 2004b]	18	42 – 365*	206,5	30%
SSRT (20 µg Carbopt ; 3 x 8 Gy) [Rousseau, 2007a]	12	47 – 200*	60	16%
SSRT (3 µg Cispt ; 15 Gy), cette étude	14	20 – 77	47,5	0%

**Tableau 16 : Récapitulatif des différents intervalles et médianes de survies, obtenus lors des expériences de SSRT réalisée à l'ESRF avec des rats porteurs de gliomes F98, dans les études publiées et dans ce travail de thèse. Les études de survies ont pris fin aux dates suivies d'une \*.**

Au regard de ce tableau, deux constatations s'imposent :

- La survie obtenue avec le même protocole expérimental en SSRT est largement inférieure dans cette étude (médiane de survie de 47,5 jours ; pas de survivants à long terme) par rapport aux résultats publiés en 2004 (médiane de survie : 206,5 jours ; 30% de survivants à long terme) par Biston *et al.*.

- Même avec un protocole affiné, l'augmentation de survie obtenue dans l'étude de 2007 n'est pas aussi importante que dans l'étude de 2004 (médiane de survie de 60 jours et 16% de survivants à long terme pour Rousseau *et al.* ; médiane de survie de 206,5 jours et 30 % de survie à long terme pour Biston *et al.*).

Les résultats obtenus en SSRT lors de ce travail de thèse sont cependant plus proches de ceux obtenus par Rousseau *et al.* en 2007 malgré les différences de protocoles (injection d'une plus grande quantité de drogue de manière homogène (par CED) et irradiation fractionnée pour les travaux de Rousseau *et al.*). Il existe en fait un élément qui différencie ces deux expériences de celle de Biston *et al.* parue en 2004 : de nouvelles cellules F98 ont été achetées et utilisées suite à une série de rats contrôle non décédés en février 2004<sup>▲</sup>. Ainsi, alors que l'intervalle de survie des rats CTRL de l'étude de 2007 est de 6 jours, que celui des rats CTRL de ce travail de thèse est de 5 jours, cet intervalle est de 13 jours dans l'étude publiée en 2004. Il est donc possible que les cellules F98 utilisées lors des travaux de Biston *et al.* aient déjà commencé à avoir une croissance plus lente expliquant en grande partie ces différences de résultats. Un autre facteur de survie important est la concordance de répartition entre la drogue et la tumeur, dépendant de la manière dont elles sont injectées. En 2007, Rousseau *et al.* ont injectés la drogue par CED alors que les cellules tumorales étaient toujours injectées rapidement donnant un aspect allongé et difforme à la tumeur en résultant, alors que la drogue est répartie de manière homogène à partir du point d'injection pouvant laisser certaines parties de la tumeur exclues de la zone de répartition de la drogue<sup>▲</sup>. Cette différence n'intervient cependant pas entre les résultats de ce travail de thèse et ceux publiés en 2004 puisque les protocoles d'injection sont identiques. Il faut par contre noter que l'apparition de tumeurs secondaires dans des localisations anormales (10/18 rats analysés en histologie, implantés avec  $10^3$  cellules F98 dans 5  $\mu$ l) peut entraîner d'importantes conséquences sur la survie des rats si cette dissémination a lieu avant J14. En effet, ceci pourrait expliquer la faible médiane de survie et l'absence de survivants à long terme obtenue lors de notre expérience de SSRT.

Au vu de tous ces résultats, il convient également de noter la bonne efficacité des drogues de chimiothérapie platinée sur la survie des rats porteurs de tumeur F98. Il semblerait même que l'efficacité de la SSRT soit due à un effet synergique entre la drogue et le rayonnement X plutôt qu'à un effet Auger. En effet, avec un même protocole, une irradiation à 6 MV obtenue à partir d'un irradiateur médical donne des résultats équivalents à une irradiation à 80 keV obtenue à partir du rayonnement monochromatique de l'ESRF [Rousseau, 2007a].

---

<sup>▲</sup> Communication personnelle de H. Elleaume, unité INSERM U836 – équipe 6, RSRM

### **V.3.2. Analyses des résultats obtenus lors des expériences de MRT et de SSRT avec des protocoles identiques**

Ces deux techniques, avec les paramètres décrits dans ce chapitre, sont bien supportées par le tissu sain.

#### **Efficacité des techniques de SSRT et de MRT en fonction du modèle tumoral**

Les techniques de MRT et de SSRT ont donc été appliquées aux deux modèles tumoraux utilisés habituellement (tumeurs 9L et F98).

En SSRT, alors que la médiane de survie est supérieure lors de l'application de cette thérapie aux tumeurs F98 (47,5 jours contre 32 jours pour les rats porteurs de tumeur 9L), 2 survivants à long terme apparaissent dans la série des rats porteurs de tumeur 9L. La différence entre les deux courbes de survie n'est pas significative ( $p = 0,4963$ ). L'efficacité thérapeutique de la SSRT a donc été équivalente avec les deux modèles tumoraux. Cette technique a été bien plus efficace lors de l'expérience réalisée par Biston *et al.* en 2004 [Biston, 2004b] pour les raisons citées dans le paragraphe précédent.

En MRT, la médiane de survie des rats porteurs de tumeur F98 ayant reçu une injection de cisplatine (41 jours) est supérieure à la médiane des rats porteurs de tumeur 9L irradiés dans les mêmes conditions (30 jours). La différence entre les courbes de survie de ces 2 séries est significative ( $p = 0,0339$ ) tout comme la différence entre les courbes des rats traités par MRT seule ( $p = 0,0063$ ) dont les médianes de survie sont pourtant proches (30,5 jours pour les rats 9L contre 35,5 jours pour les rats F98). Pour les conditions testées, l'efficacité thérapeutique de la MRT est supérieure avec les tumeurs F98. Il est toutefois important de noter que les séries 9L d'une part et F98 d'autre part n'ont pas été irradiées durant la même session expérimentale et que la dose déposée lors de l'irradiation des rats porteurs de tumeur F98 semble être supérieure à 625 Gy (cf IV.3.2.) ce qui pourrait expliquer la meilleure réponse des tumeurs F98 à ce traitement. Cependant, alors que la courbe de survie des rats F98 irradiés en MRT seule reste très proche des courbes de survie des rats 9L irradiés en MRT avec ou sans cisplatine, la courbe de survie des rats F98 irradiés en MRT + cisplatine s'en détache **en même temps** que celle des rats F98 CTRL + Cispt. Il est alors évident que l'effet du cisplatine joue un rôle important dans la différence d'efficacité du traitement entre les rats F98 et les rats 9L, principalement pour l'augmentation de la médiane de survie.

En conclusion, les gliosarcomes 9L, utilisés lors de ce travail de thèse, traités de manières équivalentes aux gliomes F98 sont tout autant, voire plus difficiles à soigner tant en MRT

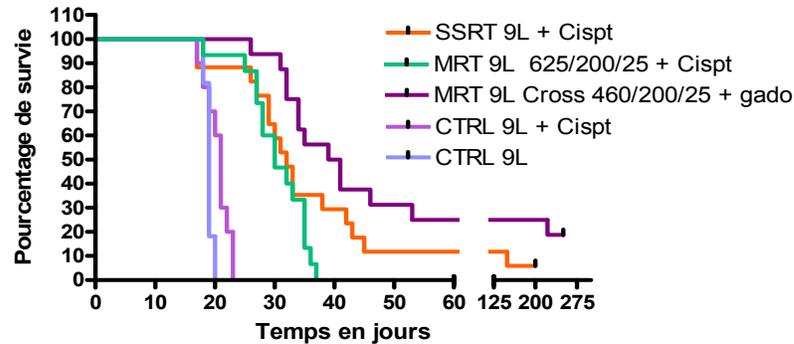
qu'en SSRT et semblent donc être de bons modèles tumoraux lors de l'étude de survie de rats, et ce contrairement à certaines affirmations [Barth, 1998 ; Barth, 2003].

### **Efficacité des techniques de MRT et de SSRT sur un même modèle tumoral**

Utilisée sur un même modèle tumoral, la MRT et la SSRT vont pouvoir être comparées en fonction du modèle. Il est important se souvenir que l'efficacité thérapeutique reste dépendante d'un type tumoral et qu'il convient de trouver dans quelles conditions et contre quelles tumeurs la technique étudiée sera la plus efficace.

Avec le modèle F98, aucune des deux techniques étudiées ne montre une efficacité thérapeutique supérieure à l'autre. Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus en irradiant en MRT faisceaux croisés à « 625 »/200/25 une série de rats porteurs de tumeur F98. Après l'irradiation en faisceaux croisés, une faible augmentation de survie apparaît par rapport aux séries MRT 625/200/25 + Cispt en mode unidirectionnel et SSRT + Cispt. Mais cette différence entre les courbes de survie n'est pas significative (résultats non présentés).

Avec le modèle 9L, lors d'irradiation avec du cisplatine, l'efficacité thérapeutique est supérieure en SSRT avec l'apparition de 11% (2/17) de survivants à long terme. Cependant les médianes de survie obtenues en MRT et en SSRT sont identiques et les courbes de survie ne sont pas significativement différentes. Il est intéressant de comparer les résultats de SSRT obtenus avec ceux de la série de MRT faisceaux croisés 460/200/25 + gadolinium (Figure 85) présentés dans le chapitre IV. L'efficacité thérapeutique de ce protocole de MRT permet d'obtenir une meilleure médiane de survie qu'en SSRT (40 jours contre 32 jours, respectivement) et 3 fois plus de survivants à long terme (30% contre 11%, respectivement). Les courbes de survie de ces deux séries ne sont cependant pas significativement différentes.



	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	%ILS	%ILSre	N=
<b>SSRT 9L + Cispt (J200)</b>	32	48,3		73	161	17
<b>MRT 9L 625/200/25 + CisPt</b>	30	30,4	1,3	58	61	15
<b>MRT 9L Cross 460/200/25 + Gado</b>	40	140	41,4	105	618	17
<b>CTRL 9L + Cispt fev07</b>	21	20,8	0,91	13,5	12,5	6
<b>CTRL 9L + CisPt juil05</b>	20	20	0,91	5,3	6,4	4
<b>CTRL 9L fev07</b>	18,5	18,5	0,5			2
<b>CTRL 9L juil05</b>	19	18,8	0,2			5
<b>CTRL 9L juil06</b>	19,5	19,5	0,3			4

Figure 85 : En haut : courbes de survie des rats porteurs de tumeur 9L soumis à différents type de traitement. En bas : tableau des données statistiques de ces séries.

Ces résultats permettent une première approche comparative de ces deux techniques de radiothérapie utilisant le rayonnement synchrotron. Dans ce but, les protocoles ont été standardisés au maximum. Par exemple pour l'application la technique de SSRT sur les rats porteurs de tumeur 9L, le protocole expérimental utilisé est le protocole standard qui a été publié pour traiter les rats porteurs de tumeur F98. L'utilisation d'une autre drogue avec une énergie d'irradiation différente ou d'une autre dose aurait peut être été plus efficace. Le travail réalisé précédemment en MRT a permis une meilleure mise en valeur de cette technique. Il faut donc toujours garder à l'esprit que ce n'est pas une technique qui doit être appliquée mais une pathologie qui doit être traitée.

### V.3.3. Conclusion

Alors que les tumeurs 9L sont peu sensibles au cisplatine seul, les courbes de survie obtenues sur des rats porteurs de tumeur F98 traités avec du cisplatine seul sont significativement différentes de celles des rats non traités. L'addition d'un protocole de radiothérapie (MRT ou SSRT) à ces rats (F98 + Cispt) n'apporte pas d'amélioration significative à leur survie. Au vu des résultats précédemment publiés [Adam, 2006 ; Biston, 2004b ; Rousseau, 2007a], cette

réaction des tumeurs F98 ne semble pas normale. Les cellules utilisées étant les mêmes que celles utilisées par Rousseau *et al.*, le modèle cellulaire n'est pas en cause. Par contre il est intéressant de noter que Rousseau *et al.* utilisent maintenant une pompe micrométrique pour injecter les 5 µl contenant les cellules F98 en solution dans de l'agarose. En histologie, des foyers secondaires tumoraux étaient visibles au niveau du cervelet et/ou des hippocampes, et en imagerie SRCT, les tumeurs F98 étaient peu visibles. Il est possible que les cellules F98 telles qu'elles ont été implantées se disséminent dans d'autres localisations avant l'irradiation, ce qui limiterait bien entendu l'action de la radiothérapie, localisée sur le site d'injection de la tumeur. L'utilisation d'une pompe aurait alors permis de limiter le phénomène. Il devient alors nécessaire non seulement de bien connaître le modèle tumoral utilisé *in vitro* mais également son évolution *in vivo*, qui semble dépendre également des paramètres d'implantation. Le protocole d'implantation utilisé lors de cette étude est pourtant identique à celui utilisé par Biston *et al.* lors de leurs travaux publiés en 2004.

A ce propos, en utilisant le même protocole d'implantation, chez les mêmes rats, avec la même instrumentation pour une irradiation à la même dose et à la même énergie, les résultats obtenus sont pourtant totalement différents de ceux obtenus et publiés par Biston *et al.* [Biston, 2004b]. Bien que la lignée cellulaire soit identique par le nom, la souche utilisée a changé entre les expériences. Il est alors probable que les expériences décrites dans cette publication aient bénéficié de paramètres avantageux tels qu'une souche cellulaire un peu moins agressive et une bonne superposition aléatoire de la drogue et de la tumeur permettant d'obtenir ces courbes de survie exceptionnelles. Dans tous les cas, les différences d'efficacité obtenues par les différents auteurs incitent à la prudence quant à l'extrapolation aux essais cliniques.

Enfin, il est aussi important de rappeler que seule la reproductibilité des résultats expérimentaux permettra de les confirmer et que d'autres sessions expérimentales seront donc nécessaires, permettant également d'affiner le protocole d'injection des cellules tumorales.



# VI. Synthèse sur les caractéristiques des modèles tumoraux

## VI.1. Contexte de l'étude

De façon générale dans la littérature scientifique et de façon plus particulière sur ID17, la plupart des recherches de thérapie préclinique sur les tumeurs cérébrales sont réalisées sur des rats porteurs soit du gliome F98 soit du gliosarcome 9L. Le modèle le plus utilisé est le modèle 9L avec un nombre d'articles référencés<sup>♦</sup> de 411 contre 68 pour le modèle F98. Il existe d'autres modèles cellulaires utilisés en recherche de thérapies précliniques notamment :

- (i) Le modèle de gliome C6 a été et est toujours largement utilisé en recherche de thérapie préclinique (339 citations). Pourtant ce modèle cellulaire n'a pas d'hôte syngénique ce qui entraîne une sérieuse limitation et diminue son utilité pour les études de survie [Barth, 1998].
- (ii) Le modèle de gliome RG2 est moins utilisé que les autres modèles (41 citations). Il semble décrit comme un bon modèle pour les glioblastomes humains [Barth, 1998].

Les comparaisons de résultats obtenus selon des modalités thérapeutiques différentes sont fréquentes (et nécessaires), mais elles prennent rarement en compte les différences liées aux modèles biologiques utilisés (inter ou intra-modèles), biaisant l'évaluation de l'efficacité de l'une ou l'autre de ces techniques.

A la lumière des observations accumulés durant ce travail de thèse, il est proposé ici un chapitre de synthèse des connaissances acquises sur les deux modèles utilisés dans le cadre de ce travail, en vue de les caractériser, mais aussi de voir comment le choix du modèle peut affecter de façon relative (positivement ou négativement) l'efficacité d'une technique.

---

<sup>♦</sup> En utilisant le moteur de recherche pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) avec les mots clés « 9L (ou F98) and brain tumor therapy »

## VI.2. Résultats

### VI.2.1. Stabilité dans le temps des modèles utilisés sur la ligne biomédicale de l'ESRF

La stabilité des deux lignées cellulaires utilisées pour les expériences de MRT ou SSRT (du point de vue de la survie des rats implantés) a été évaluée en rassemblant les données acquises durant le travail de thèse.

Pour les rats implantés avec des tumeurs 9L, les moyennes et médianes de survie de 12 séries contrôles sont comprises entre 18 et 21 jours avec des SEM toujours compris entre 0,2 et 2,03 (Tableau 17). Tous les rats contrôle ont été regroupés en une seule série de référence. La comparaison de chacune des séries de rats contrôle à cette série de référence démontre que seuls les contrôles d'avril 2005 (à effectif réduit) en sont statistiquement différents.

	médiane (j)	moyenne (j)	SEM	N =
<b>02/2003</b>	20	19,5	0,34	6
<b>02/2004</b>	21	20,5	2,03	3
<b>06/2004</b>	19,5	20,1	0,74	8
<b>12/2004</b>	20	19,7	0,33	3
<b>04/2005</b>	18	18	0,58	3
<b>07/2005</b>	19	18,8	0,2	5
<b>12/2005</b>	20	19,5	0,87	4
<b>02/2006</b>	19,5	21	1,5	6
<b>04/2006</b>	19,5	20	0,7	4
<b>07/2006</b>	19,5	19,5	0,3	4
<b>03/2007</b>	19,5	19,5	0,5	2
<b>04/2007</b>	18,5	19,7	1,08	6
<b>Tous</b>	19	19,7	0,27	54

**Tableau 17 : Suivi dans le temps des survies des rats contrôle 9L**

Pour les rats implantés avec des tumeurs F98, les moyennes et médianes de survie des rats contrôle de 6 sessions expérimentales sont toutes comprises entre 23 et 25,5 jours avec des SEM compris entre 0,67 et 1,69 (Tableau 18). Les rats des séries d'avril, juillet et novembre 2006 ont été implantés avec des cellules décongelées (aliquotées à la concentration adéquate au préalable, implantations réalisées pour un utilisateur de l'ESRF, MD263, Thomas Nawroth). Une étude statistique réalisée entre ces différentes courbes par rapport à la courbe de référence (rassemblant tous les rats contrôle F98) ne montre aucune différence significative.

	médiane (j)	moyenne (j)	SEM	N =
02/2003	24,5	24,5	0,85	12
02/2006	24	23	1,69	6
04/2006	24	23,14	0,67	7
07/2006	23	23,7	1,2	3
11/2006	25	25,25	1,65	4
02/2007	25	24,75	1,11	4
Tous	24	24	0,47	36

Tableau 18 : Suivi dans le temps des survies des rats contrôle F98

Les tailles (diamètre 1, diamètre 2, profondeur) des œdèmes, visibles à l'IRM, ont été mesurées chez des rats choisis au hasard dans les séries imagées et représentées Figure 86. Le choix des animaux au sein des séries imagées a été effectué de la façon suivante :

9L : 7 rats juin 2003, J12 (100% de tumeurs 9L vue à J12)

7 rats juin 2004, J12 (92% de tumeurs 9L vue à J12)

7 rats juillet 2005, J12 (83% de tumeurs 9L vue à J12)

7 rats juillet 2006, J13 (92,3% de tumeurs 9L vue à J13)

F98 : 6 rats février 2003, J11 (50% de tumeurs F98 vue à J11)

6 rats février 2006, J13 (36% de tumeurs F98 vue à J13)

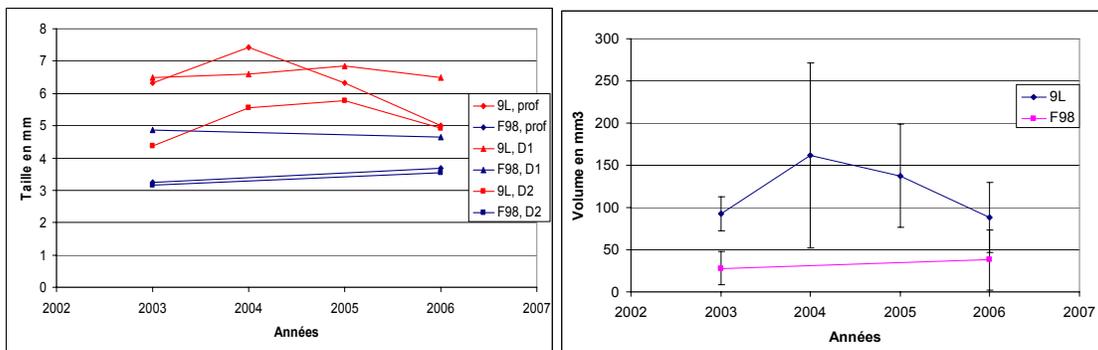


Figure 86 : A gauche : Taille des œdèmes en IRM au cours du temps selon les modèles tumoraux. Les 3 mesures réalisées sont : la profondeur de coupes sur lesquels les œdèmes sont visibles (prof), le diamètre le plus grand (D1) et le plus petit (D2) mesurés sur la coupe où la tumeur apparaît la plus grande. L'écart type n'a pas été mentionné par soucis de lisibilité. A droite : Volumes des œdèmes tumoraux mesurés en IRM au cours du temps.

L'augmentation de la taille des œdèmes des tumeurs 9L en 2004 (+75% par rapport à 2003) est due à une légère augmentation de la profondeur des tumeurs (+ 17%) et d'un des diamètres (+ 28%). Cette augmentation est surtout le reflet d'une plus grande hétérogénéité des tumeurs lors de cette session (doublé à triplé pour ces deux paramètres) mais ne remet pas

en cause la stabilité du modèle dans le temps au vu des données de 2005 et 2006. Les tumeurs F98 sont toujours 2 à 3 fois plus petites que les tumeurs 9L (pour un écart type équivalent).

## **VI.2.2. Imagerie fonctionnelle par IRM du modèle 9L**

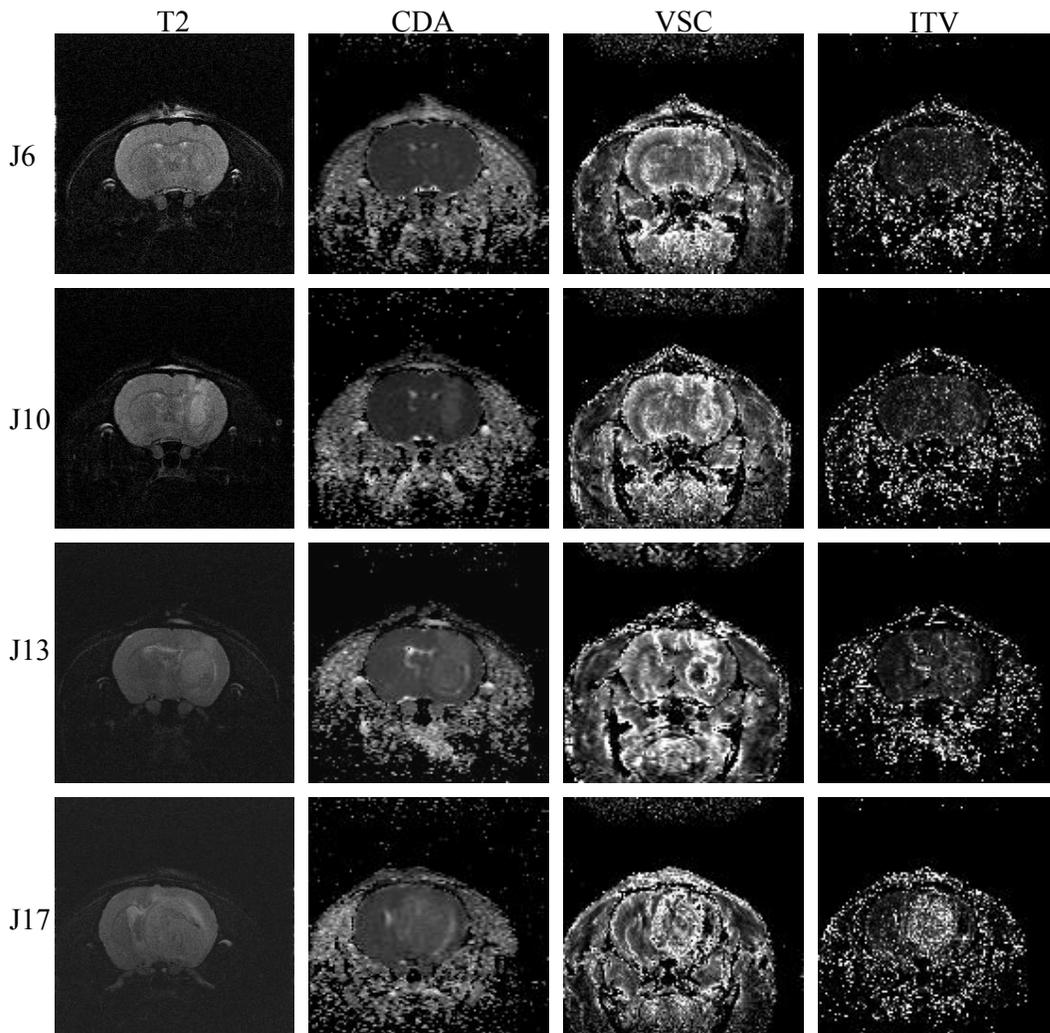
Une étude plus approfondie de différentes caractéristiques du modèle de tumeur 9L (taille, paramètres de vascularisation) a pu être effectuée en utilisant l'IRM. Cette technique mesure le coefficient de diffusion apparent (CDA) qui permet de caractériser la nature (pathologique ou non) des tissus et d'évaluer le volume lésionnel. Elle permet également de déterminer le volume sanguin cérébral ou tumoral (VS) et de mesurer l'index de taille des vaisseaux (ITV), qui représente le rayon moyen pondéré par la distribution des rayons des vaisseaux.

Les mesures du volume sanguin cérébral et celles de l'index de taille des vaisseaux reposent sur l'utilisation et l'injection intraveineuse d'un traceur intravasculaire, le Sinerem® (Guerbet, Roissy, France). Le Sinerem est un agent de contraste superparamagnétique de 20 à 30 nm de diamètre. Le noyau (4 à 6 nm) est composé d'oxyde de fer et il est recouvert d'une pellicule de dextran. Contenu dans l'espace vasculaire, ce dernier peut affecter les temps de relaxation  $T_2$  et  $T_2^*$  des molécules d'eau des espaces extravasculaires par des effets de susceptibilité de champ magnétique. L'espace occupé par le sang dans le cerveau est de quelques pourcents et le signal RMN provient dans sa très grande majorité des molécules d'eau du parenchyme cérébral situé à proximité des vaisseaux. Par conséquent, les modifications des temps de relaxations mesurées après injection du produit de contraste reflètent indirectement les paramètres vasculaires dans le voxel de mesure. Le principe de la méthode repose sur la mesure des différences de vitesse de relaxation transversales  $R_2$  et  $R_2^*$  obtenues avant et après injection du produit de contraste, avec  $R_2$  et  $R_2^*$  respectivement égaux à  $1/T_2$  et  $1/T_2^*$ .

A différents délais après implantation (J6, J10, J13 et J17), 6 animaux sont étudiés par RMN. Les mesures du CDA, VS et l'ITV sont effectuées à 100 MHz dans un aimant Bruker de 2,35 T sur une console de type SMIS (Figure 87). Quatre animaux ont été suivis tout au long de l'expérience, 2 ont été sacrifiés, les cerveaux prélevés pour des études histologiques et immunohistologiques ultérieures. Cette étude a été effectuée en collaboration avec le Dr Raphaël Serduc<sup>♦</sup> au sein du laboratoire de l'unité INSERM U836 – équipe 5.

---

<sup>♦</sup> Et avec l'aide précieuse de Marine Beaumont et d'Emmanuel Barbier



**Figure 87 : Croissance du gliosarcome 9L suivi par IRM. Horizontalement : image pondérée T2 ; cartes de CDA ; imagerie du VS (plus le VS est élevé plus les pixels sont blancs) ; imagerie de l'ITV (plus le VS est élevé plus les pixels sont blancs). Verticalement : J6, J10, J13 et J17. Le même animal a été imagé lors des 3 premiers délais après implantation. A J17, cet animal était trop faible pour subir une nouvelle séquence d'imagerie et un autre animal a été étudié.**

Les rats ont été pesés avant chaque session d'IRM (Figure 88) et commencent à perdre du poids entre J13 et J17, signe de la croissance rapide de la tumeur et de son effet sur le métabolisme de l'animal à partir de cette période. En effet les tumeurs 9L voient leur taille moyenne multipliée par 7 entre J6 et J13 (Figure 88).

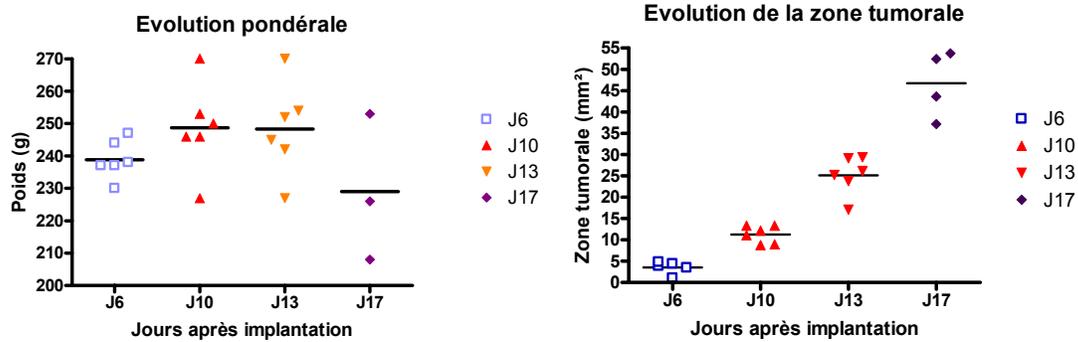


Figure 88 : Evolution pondérale et évolution de la zone tumorale chez des rats porteurs de tumeur (implanté à J0 avec  $10^4$  cellules 9L dans le noyau caudé) en fonction du temps de croissance tumoral.

A J6 post implantation, seule une tumeur n'a pu être détectée sur 6 animaux imagés (œdème cérébral peu important). En suivant la progression de la croissance tumorale chez un rat (Figure 87), une légère augmentation du CDA correspondant à une accumulation d'eau intralésionnelle est associée à la faible présence de la tumeur à J6, mais les paramètres vasculaires (VS) semblent peu modifiés par rapport à l'hémisphère controlatéral. Quatre jours plus tard, la taille de la tumeur s'est fortement accrue, l'eau extracellulaire induit une forte augmentation du CDA dans la lésion et la vascularisation de la tumeur est devenue beaucoup plus performante (Figure 87 et Figure 89). A J13, soit un jour avant l'irradiation dans les protocoles de thérapie, le volume de la tumeur atteint 50% du volume de l'hémisphère droit. Le centre de la tumeur possède un faible volume sanguin contrairement à sa périphérie qui possède un volume sanguin élevé, associé à une augmentation du diamètre moyen des vaisseaux. A J17, la tumeur occupe la quasi-totalité de l'hémisphère droit (valeurs des paramètres identiques entre la tumeur et l'hémisphère tumoral, Figure 89). La répartition du VS se confirme, imitée par la répartition de l'ITV. La bordure de lésion où la présence de ces 2 paramètres est très forte contraste avec le centre de cette lésion dans lequel le volume sanguin est à peine supérieur à celui retrouvé dans l'hémisphère controlatéral. Pourtant leurs proportions s'inversent : alors que le VS diminue, l'ITV augmente fortement, pouvant traduire un défaut d'irrigation, une vascularisation anarchique, ou une diminution de la densité vasculaire.

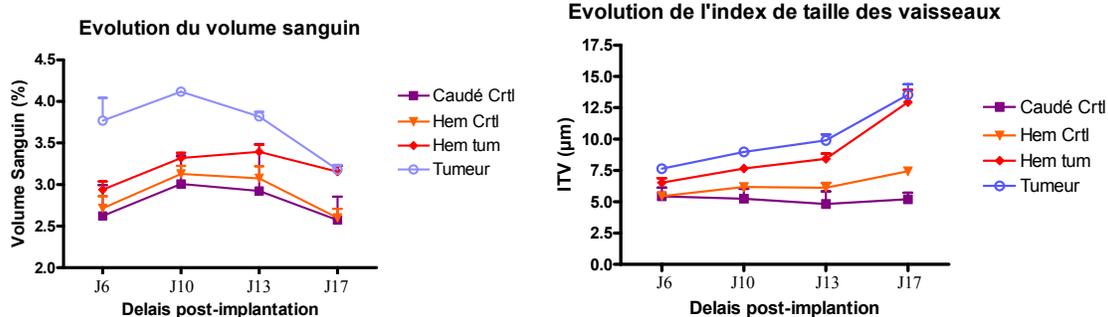


Figure 89 : A droite : évolution du volume sanguin dans le cerveau de rats porteurs de tumeur (implanté à J0 avec  $10^4$  cellules 9L dans le noyau caudé) en fonction du temps de croissance tumoral. A gauche : évolution de l'index de taille des vaisseaux dans le cerveau d'un rat (implanté à J0 avec  $10^4$  cellules 9L dans le noyau caudé) en fonction du temps de croissance tumoral.

### VI.2.3. Variation des modalités d'implantation

Des rats Fischer ont été implantés avec des cellules F98 ou 9L en faisant varier les paramètres de la suspension cellulaire injectée aux animaux :  $10^3$  cellules dans  $5 \mu\text{l}$  (F98/9L- $10^3$ -5) ;  $10^4$  cellules dans  $5 \mu\text{l}$  (F98/9L- $10^4$ -5) et  $10^4$  cellules dans  $1 \mu\text{l}$  (F98/9L- $10^4$ -1). Le même mode opératoire et les mêmes coordonnées d'implantations ont été appliqués. Pour chacun de ces protocoles une partie des rats a été sacrifiée 14 jours après implantation pour une étude histologique au stade où sont irradiés habituellement les animaux. Une étude de survie sera menée sur les autres rats (CTRL) suivi d'une étude histologique.

#### VI.2.3.1. Survie

Deux groupes très distincts sont discernables d'après les courbes de survie : les séries de rats implantés avec  $10^4$  cellules d'une part et celles des rats implantés avec  $10^3$  cellules d'autre part, que ces cellules soient des 9L ou bien des F98 (Figure 90). La courbe de survie de la série F98 - $10^3$ -5 est significativement différente des deux courbes de survie des séries F98- $10^4$ . C'est également le cas pour les cellules 9L.

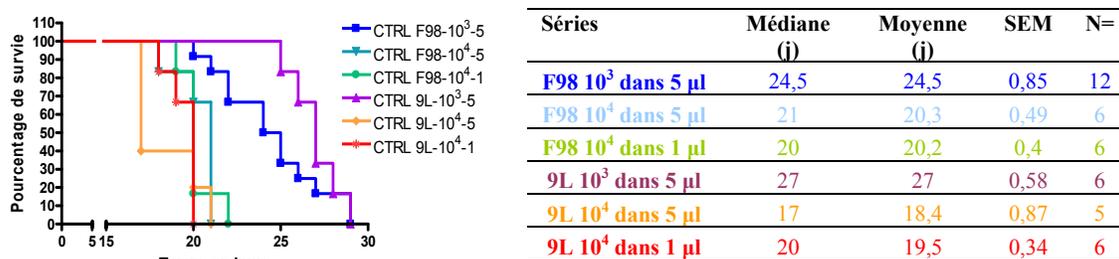


Figure 90 : A droite : survie des rats contrôle selon différents protocoles d'implantation. A gauche : informations statistiques sur la survie des rats implantés selon différents protocoles.

La médiane de survie des animaux dépend directement du nombre de cellules implantées, avec les cellules 9L comme avec les cellules F98. Les valeurs de la médiane et de la moyenne de survie sont très proches pour une même série. Les SEM sont tous < 1 (Figure 90).

Avec un même protocole d'implantation (même nombre de cellules et même volume injectés) il n'y a aucune différence de survie significative entre les rats porteurs de gliomes F98 et les rats porteurs de gliosarcomes 9L. Parmi les rats implantés avec 10<sup>4</sup> cellules, il n'y a pas de différence significative de survie entre les rats implantés avec une même lignée cellulaire mais avec un volume différent. Leurs courbes et leurs médianes de survie sont très proches et le volume injecté ne semble pas avoir d'influence sur la survie des rats. Il faut au contraire noter que la survie des rats CTRL implantés avec 10<sup>3</sup> cellules est significativement différente de la survie de ceux implantés avec 10<sup>4</sup> cellules, quel que soit le modèle ( $p < 0,0012$ ).

En particulier la différence de survie entre la série F98-10<sup>3</sup>-5 et la série 9L-10<sup>4</sup>-1, qui sont les deux modalités d'implantation utilisées historiquement en SSRT et en MRT, est la plus significative ( $p < 0,0001$ ). Ces deux séries ont des médianes de survies de 24,5 et 20 jours et des moyennes de survies de 24,5 et 19,5 jours, respectivement.

### VI.2.3.2. Analyse histologique

Le Tableau 19 récapitule les informations obtenues lors de l'analyse histologique des cerveaux des rats sacrifiés à J14 ou en fin de survie et implantés avec les différentes suspensions cellulaires testées :

		N=	petit diamètre (mm)	SEM	grand diamètre (mm)	SEM	Nécrose (de 0 à 4)	Irrigation (de 0 à 4)	remarques
F98-10 <sup>3</sup> -5	J14	4	0,6	1,2	1	1,4	0	0,7	2/4 : tumeurs pas visibles ; 1/4 : foyer bilatéral ?
	CTRL	5	3,7	1,1	5	1,6	1,4	1,8	3/5 : plusieurs foyers tumoraux
F98-10 <sup>4</sup> -5	J14	6	2,8	0,3	4,4	0,9	1,3	1	3/6 : plusieurs foyers tumoraux, infiltrations
	CTRL	5	6,1	0,8	8,4	0,6	1,8	1,4	1/5 : plusieurs foyers tumoraux
F98-10 <sup>4</sup> -1	J14	6	1,7	0,5	2	0,5	0,5	0,8	Beaucoup d'infiltrations
	CTRL	6	4,7	0,4	5,5	0,4	2	1,3	infiltrations
9L-10 <sup>3</sup> -5	J14	4	0,6	0,2	0,8	0,3	0	0,75	2/4 : plusieurs foyers tumoraux ?
	CTRL	6	7,4	0,4	8,7	0,2	0,7	2,2	Parfois infiltration
9L-10 <sup>4</sup> -5	J14	6	4,2	1	5,4	1,3	0,25	1,5	2/6 : tumeur pas visible
	CTRL	2	7,3	0,2	7,9	0	1	2,5	/
9L-10 <sup>4</sup> -1	J14	5	3,1	0,1	4,4	0,9	0	1	/
	CTRL	3	7,5	0,8	9	0,7	0,7	3	/

**Tableau 19 : différents paramètres caractérisant les protocoles d'implantation des tumeurs : taille moyenne des tumeurs par série en mm, nécrose, irrigation (présence des vaisseaux sanguins) et particularités de ces tumeurs. Les protocoles d'implantations sont désignés comme suit : lignée des cellules tumorales injectées – nombre de cellules injectées – volume injecté en µl.**

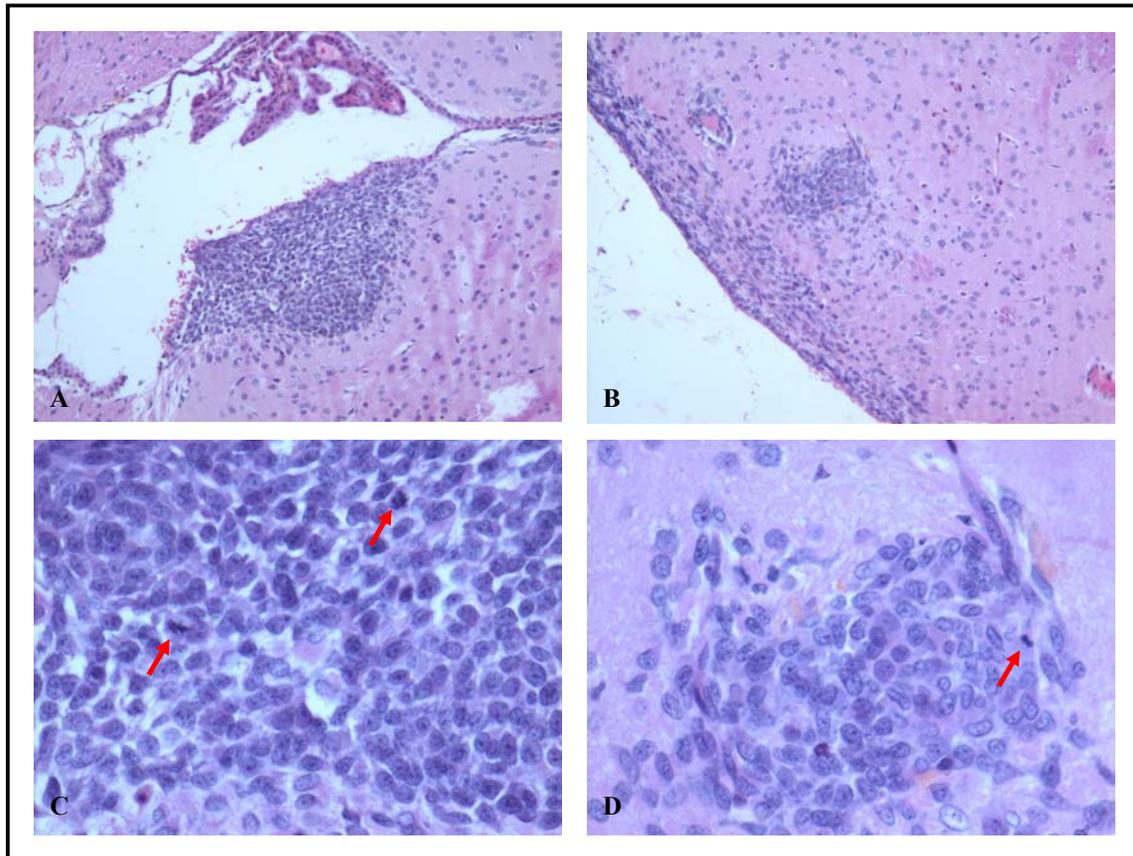
Sur les 20 rats implantés avec un volume de 5 µl et euthanasiés à J14 (toutes tumeurs confondues), 4 ne présentaient pas de tumeur sur les coupes analysées. L'hypothèse la plus probable est une taille réduite de la tumeur des rats concernés qui n'est pas présente dans la zone de coupe, et non pas une absence totale de tumeur au cerveau.

Pour un même protocole d'implantation, les tumeurs F98 sont plus petites en fin de vie du rat que les tumeurs 9L (14,5 ; 40,2 et 20,3 mm<sup>2</sup> pour les F98 et 50,5 ; 45,3 et 53 mm<sup>2</sup> pour les 9L selon les séries).

Logiquement, les tailles à J14 des tumeurs implantées avec 10<sup>3</sup> cellules sont plus petites que les tailles à J14 des tumeurs implantées avec 10<sup>4</sup> cellules. Les tumeurs F98 semblent plus nécrotiques en fin de survie que les tumeurs 9L et les tumeurs 9L plus vascularisées en fin de survie que les tumeurs F98 (Figure 92, Figure 93, Figure 94). Des mitoses ont été vues dans toutes les tumeurs.

Il est important de noter que lors de certaines implantations avec un volume de 5 µl de milieu, une dissémination des foyers tumoraux apparaît. Les localisations préférentielles des foyers secondaires sont le cervelet et la zone située au dessus de l'hippocampe (Figure 93). Ce phénomène est plus fréquent avec les tumeurs F98 (8/20) qu'avec les tumeurs 9L (2/18). Il est possible que ceci soit lié au caractère plus infiltrant des tumeurs F98 à stade précoce. Ce phénomène semble déjà visible 14 jours après l'implantation dans le cerveau d'un rat

implanté avec  $10^3$  cellules dans  $5 \mu\text{l}$ , alors que les tumeurs sont encore de faible taille. En effet des cellules suspectes sont vues dans les deux hémisphères de ce rat. La présence d'au moins une mitose à chacun des sites est en faveur du diagnostic de tumeur (Figure 91). Quoiqu'il en soit, ceci peut s'avérer très gênant en thérapie si la tumeur est disséminée dans des sites non irradiés.



**Figure 91** : Coupes histologiques HE du cerveau d'un rat de la série J14-F98- $10^3$ -5. L'image A (G x 100) a été prise dans l'hémisphère gauche et l'image B (G x 100) dans l'hémisphère droit. Les images C (G x 400) et D (G x 400) sont des agrandissements des masses suspectes présentes sur les images A et B, respectivement. Les flèches rouges pointent sur des cellules en mitose.

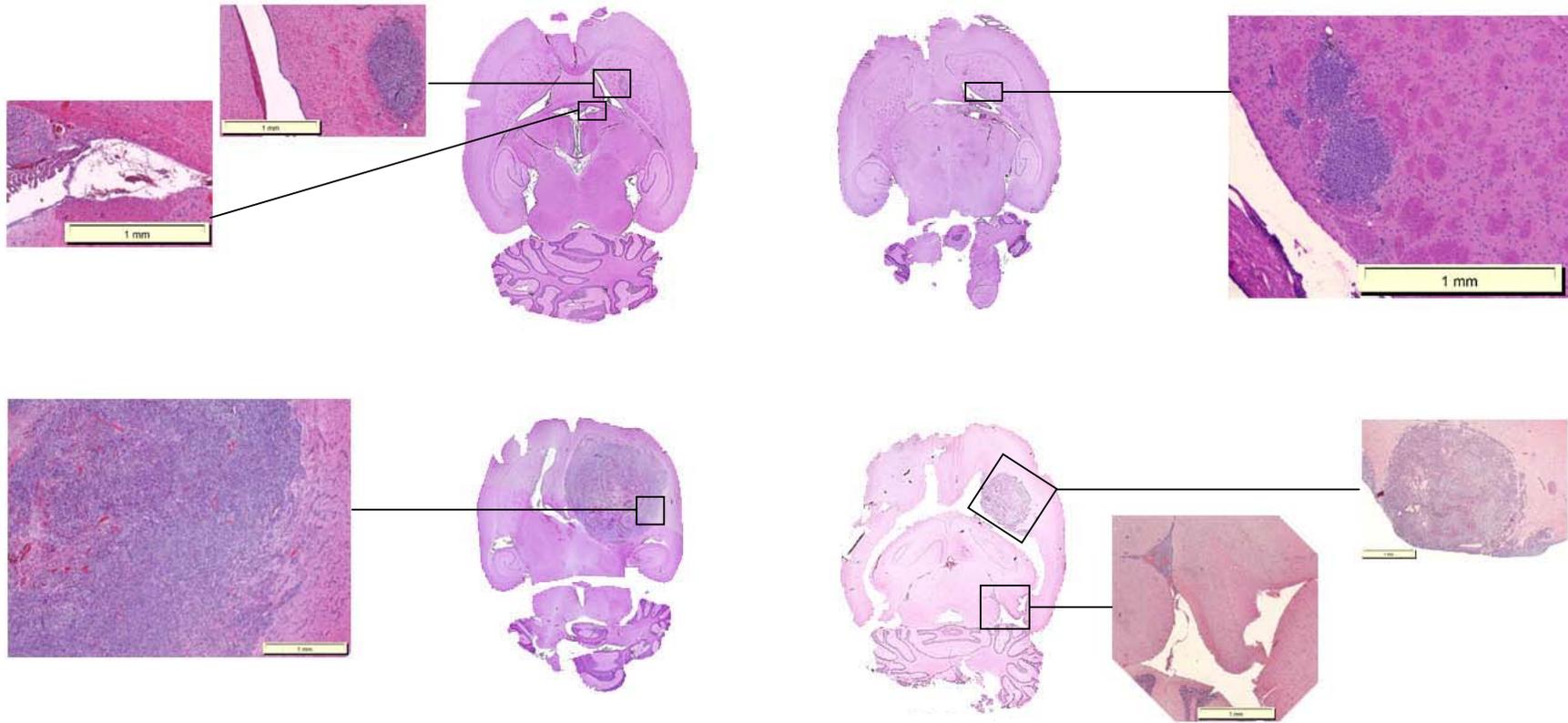
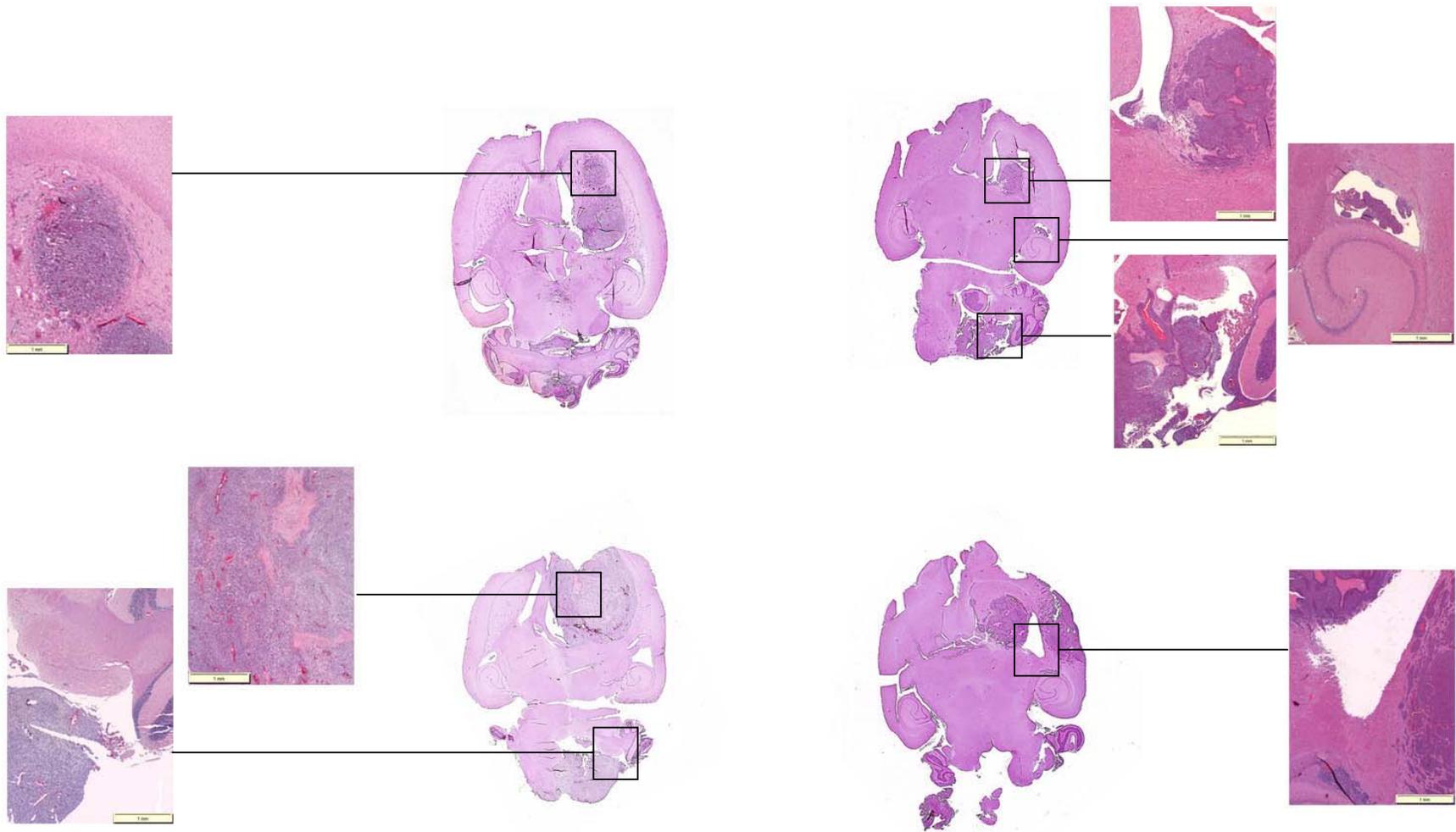
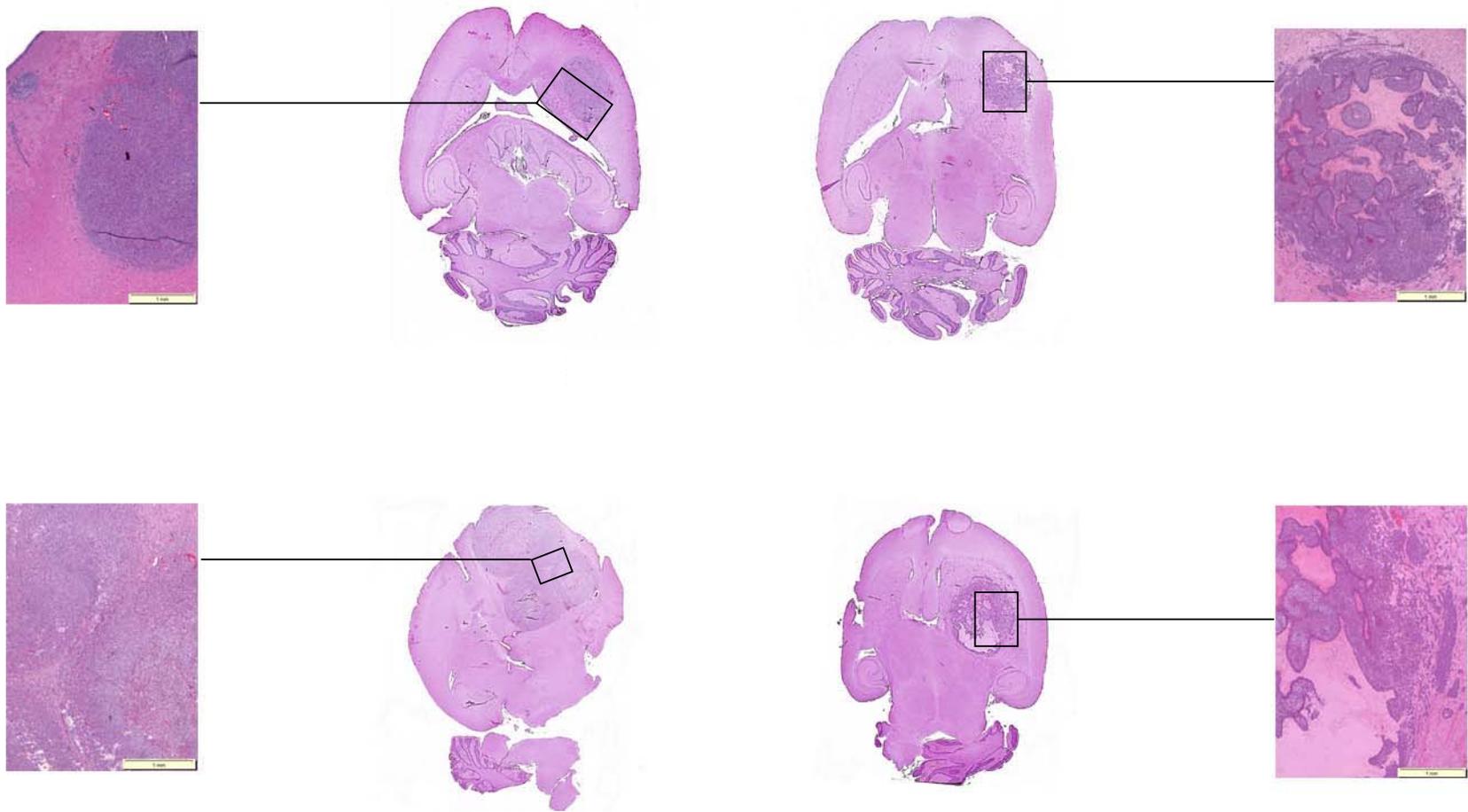


Figure 92 : Histologie HE des tumeurs des rats implantés avec  $10^3$  cellules dans  $5 \mu\text{l}$ . Toutes les images ont été prises avec un grossissement de  $\times 20$ . L'échelle représentée fait toujours 1mm. En haut à gauche : tumeur 9L-10<sup>3</sup>-5 à D14 : le foyer tumoral est de taille réduite, une masse suspecte est présente dans le ventricule. En bas à gauche : tumeur 9L-10<sup>3</sup>-5 en fin de survie : tumeur de taille importante, nombreux vaisseaux visibles. En haut à droite : tumeur F98-10<sup>3</sup>-5 à D14 : petit foyer tumoral proche du ventricule. En bas à droite : tumeur F98-10<sup>3</sup>-5 en fin de survie : foyer tumoral important dans l'hémisphère droit et présence d'un second foyer tumoral au dessus du cervelet.



**Figure 93 : Histologie HE des tumeurs des rats implantés avec  $10^4$  cellules dans  $5 \mu\text{l}$ . Toutes les images ont été prises avec un grossissement de x20. L'échelle représentée fait toujours 1mm. En haut à gauche : tumeur 9L-10<sup>4</sup>-5 à D14 : un foyer tumoral bilobé de taille moyenne est visible. En bas à gauche : tumeur 9L-10<sup>4</sup>-5 en fin de vie : grand foyer tumoral dans l'hémisphère droit, un second foyer important est présent dans le cervelet. En haut à droite : tumeur F98-10<sup>4</sup>-5 à D14 : trois foyers de taille réduite à moyenne sont présents dans l'hémisphère droit, dans le cervelet et au dessus de l'hippocampe. En bas à droite : tumeur F98-10<sup>4</sup>-5 en fin de vie : 2 foyers tumoraux de taille moyenne sont présents dans l'hémisphère droit et un 3<sup>ème</sup> foyer réduit est présent au dessus de l'hippocampe.**



**Figure 94 : Histologie HE des tumeurs des rats implantés avec  $10^4$  cellules dans  $1 \mu\text{l}$ . Toutes les images ont été prises avec un grossissement de  $\times 20$ . L'échelle représentée fait toujours 1mm. En haut à gauche : tumeur 9L- $10^4$ -1 à D14 : un foyer tumoral de taille moyenne est présent avec quelques infiltrations dans le tissu sain adjacent. En bas à gauche : tumeur 9L- $10^4$ -1 en fin de survie : présence d'une grosse masse tumorale peu nécrotique trilobée qui dévie la ligne médiane du cerveau, de nombreuses vascularisations sont visibles. En haut à droite : tumeur F98- $10^4$ -1 à D14 : présence d'une tumeur de taille moyenne avec des zones de nécrose. En bas à droite : tumeur F98- $10^4$ -1 en fin de survie : présence d'une tumeur de taille moyenne nécrotique et qui infiltre le tissu sain adjacent.**

## VI.2.4. Comparaison des modèles dans les conditions expérimentales

Ce chapitre analyse en détail les conséquences des deux modalités d'implantation utilisées en routine dans le laboratoire de la Bio Medical Facility de l'ESRF (F98 :  $10^3$  cellules dans  $5 \mu\text{l}$  et 9L :  $10^4$  cellules dans  $1 \mu\text{l}$ ). Des données sur l'imagerie, la survie et l'histologie ont été rassemblées dans ce paragraphe, pour ces deux protocoles particuliers.

### VI.2.4.1. Imagerie

Deux types d'imagerie ont été réalisés sur des rats porteurs de tumeur F98 et 9L : un protocole d'IRM en  $T_2$  sans produit de contraste et un protocole de SRCT<sup>▲</sup> avec injection de 2 ml d'iode en intraveineux. Dans ce cas, la taille tumorale est surestimée puisque l'agent de contraste s'extravase par les ruptures de la BHE.

Pour l'IRM, 537 rats porteurs du gliosarcome 9L ont été imagés dont 495 entre 11 et 13 jours après l'implantation. Les 42 autres rats ont été imagés entre 9 et 10 jours après l'implantation. De même, 132 rats porteurs de gliome F98 ont été imagés dont 81 entre 11 et 13 jours après l'implantation, les autres (41) ont été imagés soit entre J15 et J17, soit entre J10 et J9. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau suivant.

		J11 à J13 (à J17)			J9 à J10			Tous		
		Tumeur visible	doute	Tumeur non visible	Tumeur visible	doute	Tumeur non visible	Tumeur visible	doute	Tumeur non visible
9L	N =	458	16	22	36	3	3	494	19	25
	%	92,5	3,2	4,4	85,7	7,15	7,15	92	3,5	4,5
F98	N =	25 (50)	20 (29)	36 (43)	2	7	1	52	36	44
	%	31 (41)	24,7 (23,8)	44,4 (35,2)	20	70	10	39,4	27,3	33,3

Tableau 20 : étude des images IRM obtenues sur des rats porteurs de tumeur 9L ou F98.

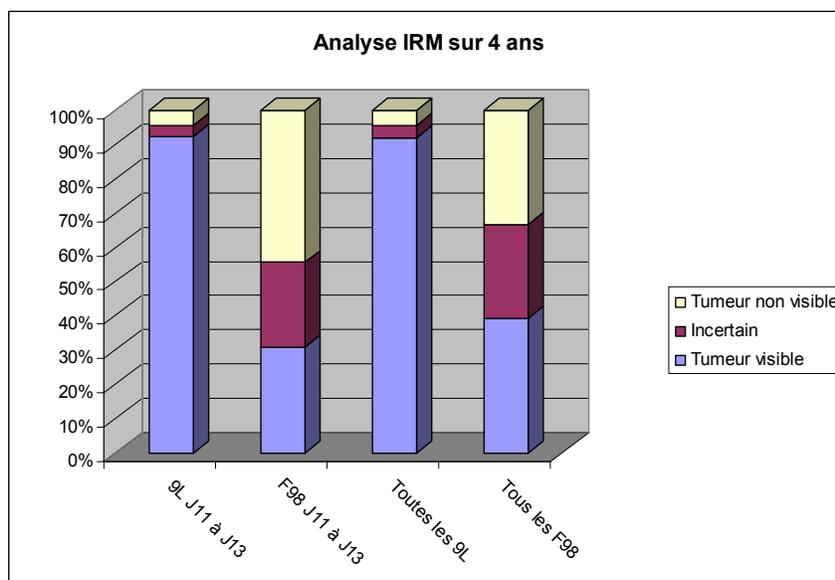
La Figure 95 présente les pourcentages des différents diagnostics obtenus. Pour nos protocoles d'implantation, les tumeurs 9L sont visibles dans plus de 90% des cas à partir de 11 jours après l'implantation alors qu'à la même date, seules 31% des tumeurs F98 sont visibles. Même entre J15 et J17, seules 61% des tumeurs F98 sont vues avec certitude. Les

▲ Rappelons que : SRCT = Synchrotron Radiation Computed Tomography

SSRT = Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy

Ces deux techniques d'imagerie et de thérapie sont réalisées dans la même cabine cf II.7.2.

tumeurs 9L sont de tailles plus importantes et de fait, plus œdémateuses et à un stade plus avancé que les tumeurs F98 à un temps égal après implantation, c'est-à-dire au moment de l'irradiation.

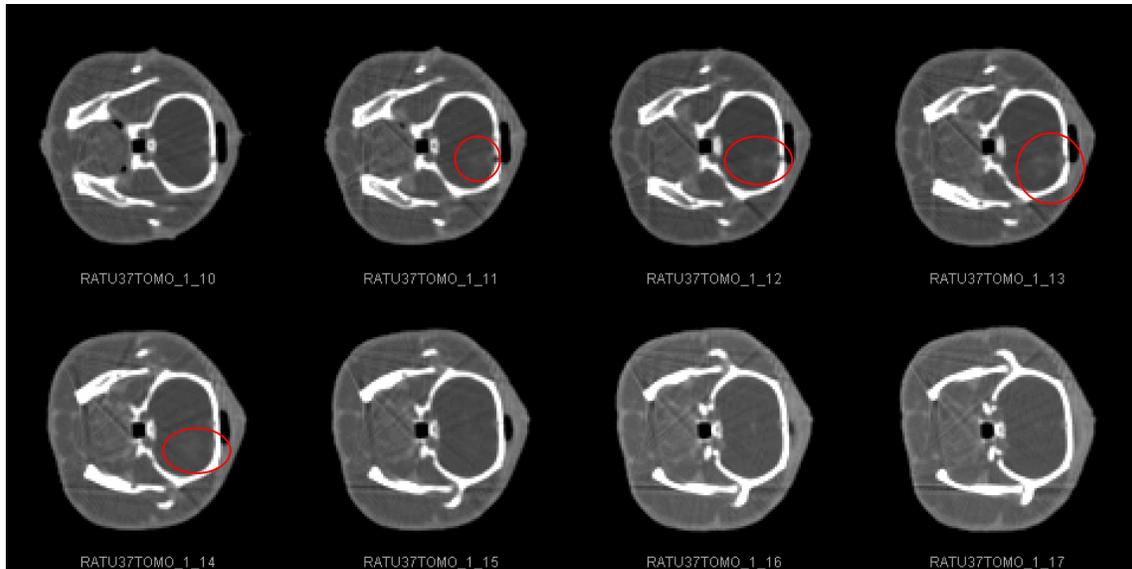


**Figure 95 : Pourcentages des diagnostics obtenus en IRM selon les tumeurs implantées.**

Lors des expériences de SSRT, 23 rats porteurs d'une tumeur F98 et 25 rats porteurs d'une tumeur 9L ont été imagés par SRCT 14 jours après l'implantation.

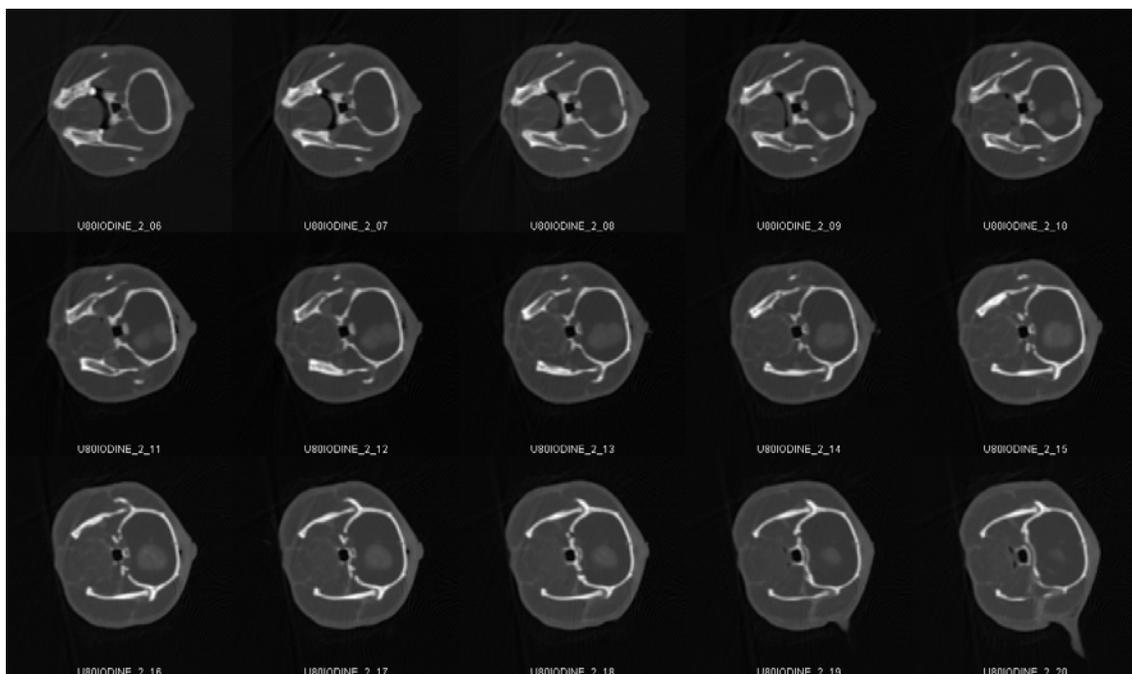
Sur les 23 rats F98, 4 tumeurs n'étaient pas visibles mais les rats sont morts assez rapidement, 9 tumeurs sont très faiblement visibles (dont 7 non mesurables car trop peu contrastées). La taille moyenne des 12 tumeurs qui ont pu être mesurées est de 1,8 ( $\pm$  0,9) mm x 4,5 ( $\pm$  1) mm x 2,6 ( $\pm$  1,1) mm soit un volume<sup>^</sup> moyen de 15,3 ( $\pm$  11,2) mm<sup>3</sup> avec des valeurs allant de 1,7 mm<sup>3</sup> à 34,6 mm<sup>3</sup>. La Figure 96 représente des images obtenues à partir d'un rat porteur d'une tumeur F98 dont la tumeur est visible et mesurable.

<sup>^</sup> Volume d'un ellipsoïde



**Figure 96 : Coupes SRCT du cerveau d'un rat porteur d'une tumeur F98 après injection d'iode**

Sur les 24 rats 9L, toutes les tumeurs étaient bien contrastées, donc bien visibles. La taille moyenne des tumeurs est de  $5,6 (\pm 1,2)$  mm x  $7,5 (\pm 0,9)$  mm x  $4,8 (\pm 0,9)$  mm soit un volume moyen de  $109,3 (\pm 48,7)$  mm<sup>3</sup> avec des valeurs allant de 17,5 mm<sup>3</sup> à 191,9 mm<sup>3</sup>. La Figure 97 représente un montage des images obtenues à partir d'un rat porteur d'une tumeur 9L.



**Figure 97 : Coupes SRCT du cerveau d'un rat porteur d'une tumeur 9L après injection d'iode**

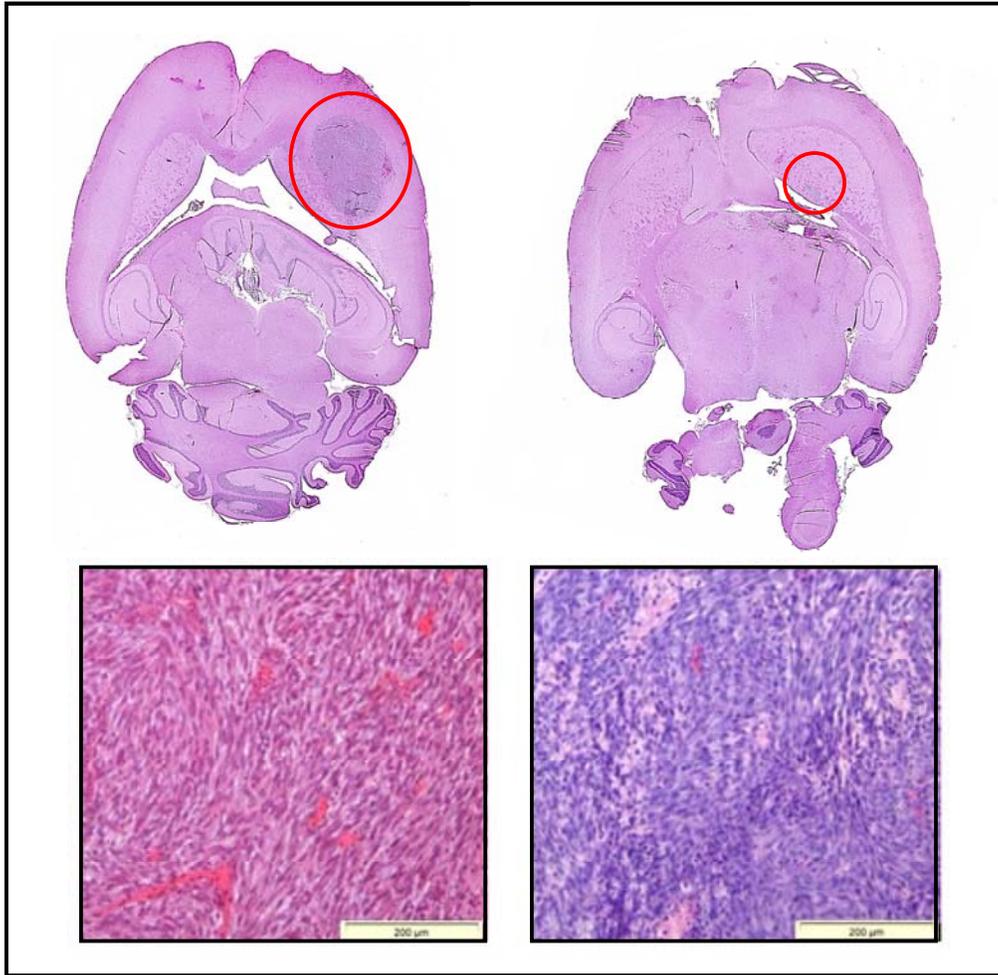
En conclusion, à un même temps post implantation (J14) et dans les conditions d'implantation classiques, des différences significatives apparaissent à l'imagerie entre les tumeurs F98 et 9L : les tumeurs 9L sont caractérisées par des tailles plus importantes que les tumeurs F98 (109 mm<sup>3</sup> en moyenne contre 15 mm<sup>3</sup>). De plus, toutes les tumeurs 9L, à l'exception d'une, apparaissent plus développées que la plus développée des tumeurs F98 visibles. Enfin, puisque le produit de contraste se concentre dans la vascularisation de la tumeur, il est raisonnable de supposer qu'à cette date les tumeurs 9L, bien contrastées, sont bien plus vascularisées que les tumeurs F98, peu contrastées (quand elles sont visibles).

#### **VI.2.4.2. Histologie**

D'après le Tableau 19, les tumeurs 9L et F98 présentent des différences notables 14 jours après avoir été implantées de la manière conventionnelle<sup>♦</sup>. Les tumeurs 9L sont beaucoup plus développées : 3,1 (± 0,1) x 4,4 (±0,9) mm<sup>2</sup> que les tumeurs F98 : 0,6 (± 1,2) x 1 (± 1,4) mm<sup>2</sup>. En imagerie tout comme en histologie, les tumeurs 9L semblent plus vascularisées que les tumeurs F98 qui sont par contre nécrotiques plus tôt (Figure 98).

---

<sup>♦</sup> C'est à dire 10<sup>3</sup> cellules dans 5 µl pour les cellules F98 et 10<sup>4</sup> cellules dans 1 µl pour les cellules 9L



**Figure 98** : Scan de coupes de cerveaux porteur d'une tumeur 9L (en haut à gauche) et F98 (en haut à droite) et euthanasiés à J14. Des agrandissements d'une tumeur 9L (G x100 en bas à gauche) et d'une tumeur F98 (G x100 en bas à droite) permettent de voir la différence de nécrose et de vascularisation entre les deux types tumoraux. L'image en bas à droite est issue du cerveau d'un rat implanté avec  $10^4$  cellules F98 dans  $5 \mu\text{l}$  et euthanasié à J14. Les trois autres images sont issues de rats implantés avec les protocoles conventionnels pour la thérapie.

Pour 2/4 rats de la série J14 F98- $10^3$ -5, la tumeur n'a pas été vue en histologie car sans doute trop petite alors que les 5 tumeurs J14 9L- $10^4$ -1 étaient bien visibles. A l'analyse des cerveaux des rats en fin de survie, les observations mentionnées à J14 sont confirmées, tant en ce qui concerne la taille de la tumeur que la nécrose et la vascularisation. De plus 3/5 cerveaux de rats en fin de survie porteurs de tumeur F98 présentent des foyers tumoraux multiples. Ceci peut expliquer la taille plus réduite du foyer principal lors du décès de l'animal. Cette constatation est très gênante pour les protocoles de radiothérapies puisque les foyers secondaires déjà présents à J14 ne seront pas irradiés.

De plus, pour confirmer les données vues dans le chapitre VI.2.3.1., la comparaison de tous les rats CTRL implantés avec  $10^4$  cellules 9L d'une part et de tous les rats CTRL implantés avec  $10^3$  cellules F98 indique que les courbes de survie sont significativement différentes ( $p < 0,0001$ ). Cette différence est également très nette lors de la comparaison de leurs médianes de survie (19 jours pour les rats implantés avec des tumeurs 9L et 24 jours pour les rats implantés avec des tumeurs F98).

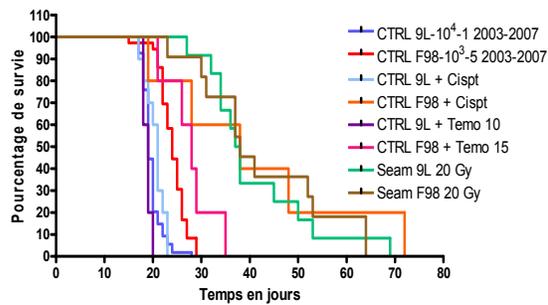
En conclusion, les tumeurs issues de l'implantation de  $10^4$  cellules 9L [Laissue, 1998] et celles issues de l'implantation de  $10^3$  cellules F98 [Biston, 2004b] ont une vascularisation, une taille et une vitesse de croissance très différentes. Les tumeurs F98 se développent en différents endroits du cerveau car elles sont implantées dans 5  $\mu$ l de milieu. Les tumeurs 9L sont très, voire trop développées. Toutes les comparaisons ayant été effectuées entre la technique de SSRT et la technique de MRT à partir de résultats obtenus sur ces deux modèles si différents paraissent bien fragiles voire dangereuses au vu de ces résultats.

## **VI.2.5. Réaction a des protocoles simples de radiothérapie et de chimiothérapie**

Dans le paragraphe précédent, il a été montré que les deux modèles cellulaires présentent des différences macroscopiques et microscopiques. De plus, leur sensibilité à la radiothérapie et à la chimiothérapie qui ont été testées tout au long de ce travail peuvent être représentées comme suit :

Des rats porteurs de tumeur 9L et F98, implantés de manière conventionnelle ont été exposés à (Figure 99) :

- une irradiation unidirectionnelle en faisceau blanc à une dose de 20 Gy avec une zone d'irradiation de 1 cm sur 1cm.
- une injection de 3  $\mu$ g de cisplatine dans un volume de 5  $\mu$ l par voie intratumorale
- une injection de 10  $\mu$ l de témozolomide par voie intratumorale pour les tumeurs 9L et de 15  $\mu$ l pour les tumeurs F98 (soit 31 et 46,5  $\mu$ g de témozolomide, respectivement).



Séries	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	N=
<b>CTRL 9L</b>	19	19,7	0,27	54
<b>9L + 20 Gy</b>	37,5	41,1	3,32	12
<b>9L + Temo 10</b>	19	18,8	0,37	5
<b>9L + Cispt</b>	21	20,5	0,64	10

Séries	Médiane (j)	Moyenne (j)	SEM	N=
<b>CTRL F98</b>	24	24	0,47	36
<b>F98 + 20 Gy</b>	38	42,7	4,13	11
<b>F98 + Temo 15</b>	28	27,8	5	5
<b>F98 + Cispt</b>	38	41	9,14	5

**Figure 99 : A gauche : courbes de survie des rats porteurs de tumeur 9L et F98 soumis à des protocoles simples de radiothérapie et chimiothérapie. A droite : Informations statistiques sur la survie des rats porteurs de tumeur 9L et F98 soumis à des protocoles simples de radiothérapie et chimiothérapie.**

L'injection de drogues 14 jours après l'implantation de cellules 9L n'entraîne aucune augmentation significative de la survie des rats par rapport aux rats CTRL ( $p = 0,2826$  et  $0,1998$  pour le cisplatine et le témozolomide, respectivement). Au contraire, la différence entre les courbes de survie des rats CTRL F98 et des rats porteurs de tumeur F98 injectés avec du cisplatine est significative ( $p = 0,0035$ ). C'est également le cas avec les rats injectés avec du témozolomide ( $p = 0,0341$ ). L'irradiation à 20 Gy, 14 jours après implantation, par un faisceau blanc synchrotron entraîne une augmentation de survie tant chez les rats porteurs de tumeur 9L que chez les rats porteurs de tumeur F98 ( $p < 0,0001$  pour les deux lignées cellulaires).

La radiothérapie a donc un effet important tant sur les 9L que sur les F98 en augmentant fortement leurs médianes et moyennes de survie. Cependant aucun survivant à long terme n'apparaît. La chimiothérapie quant à elle est beaucoup plus efficace sur le modèle F98 que sur le modèle 9L. En effet, aucune des deux drogues testées n'augmente véritablement la survie des rats implantés avec des tumeurs 9L. Au contraire, la survie des rats porteurs de tumeur F98 est fortement augmentée lors d'injection de cisplatine en intratumoral. L'effet du témozolomide reste mitigé.

En conclusion, les tumeurs 9L et les F98 répondent d'une façon très proche à un même protocole de radiothérapie *in vivo*, mais les F98 sont beaucoup plus sensibles à la chimiothérapie, notamment par le cisplatine. Il faut également rappeler que chez les 4 rats F98 traités avec du cisplatine et analysés en histologie (sur 5 rats), 3 d'entre eux présentaient des foyers secondaires de tumeurs mais pas de tumeur dans l'hémisphère. Ce phénomène peut donc diminuer les médianes de survie des rats porteurs de tumeur F98 qu'ils soient traités par chimiothérapie ou par radiothérapie, si ce phénomène se produit avant le traitement.

## VI.2.6. Influence de l'intervalle implantation/irradiation sur les résultats de MRT

Modifier l'intervalle implantation/irradiation signifie modifier la taille et le développement physiologique de la tumeur au moment de l'irradiation. Comme cela a été observé dans les chapitres précédents, les tumeurs F98 telles qu'elles sont implantées habituellement ont une taille et un développement inférieurs à ceux des tumeurs 9L. La différence de survie des contrôles étant de 4 à 5 jours, une série d'irradiation en mode faisceaux croisés 460/200/25 a été réalisée 10 jours après l'implantation de  $10^4$  cellules 9L. Lors de cette session expérimentale, la zone d'irradiation a été augmentée en profondeur de 3 mm, car pour d'autres séries (à J14) la taille des tumeurs a semblé plus importante que d'habitude à l'IRM. L'IRM a été réalisée la veille de l'irradiation soit à J13 et à J9. Pour les deux séries présentées, toutes les tumeurs ont été diagnostiquées.

En irradiant avec un même protocole des tumeurs moins développées et moins grosses (mais déjà nettement visible à l'IRM pour 8/10 rats), le gain de survie obtenu est significatif ( $p = 0,0337$  en comparant les deux courbes de survie). L'ILS est triplé et 30 % de survivants à long terme font leur apparition (Figure 100). La courbe de poids des rats irradiés à J10 présente des fluctuations et les 3 survivants à long terme présentent ou ont présenté des symptômes nerveux. Ceci peut s'expliquer par une taille de champ d'irradiation trop grande (10 mm x 13 mm) qui va affecter plus de tissu sain que lors d'irradiation de tumeurs à J14.

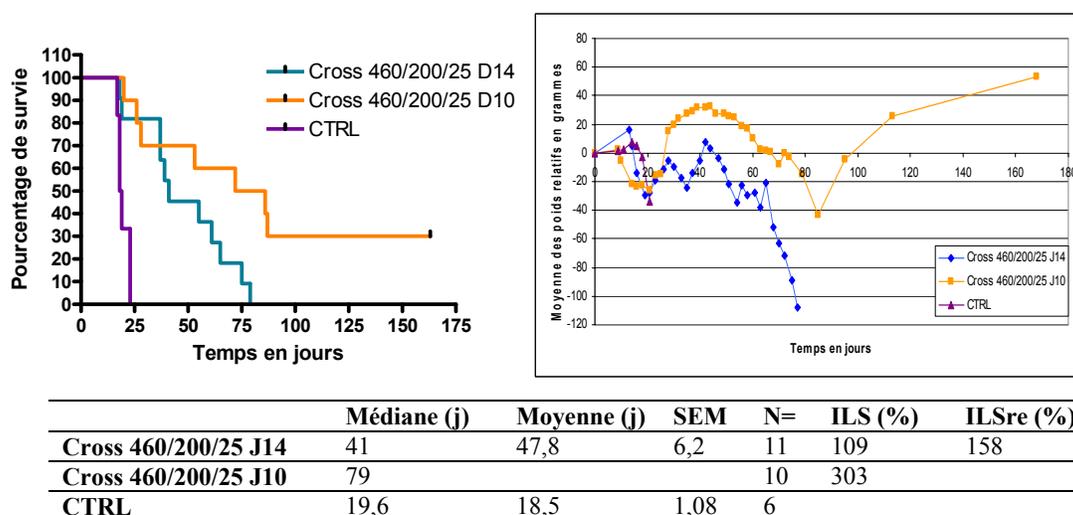


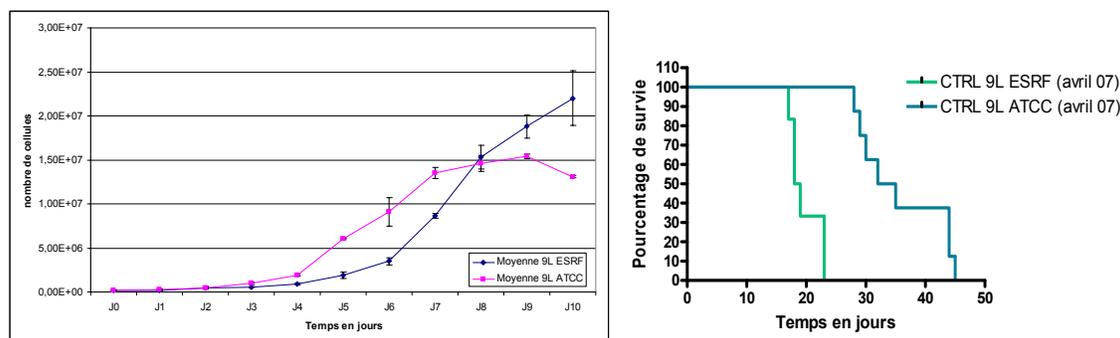
Figure 100 : En haut à gauche : courbes de survie des rats CTRL et des rats irradiés en MRT faisceaux croisés à 460/200/25 avec un champ de 10 mm x 13 mm, 14 et 10 jours après l'implantation de gliosarcome 9L en intracérébral. En haut à droite : moyenne des courbes de poids relatif de ces mêmes rats. En bas : tableau des valeurs statistiques sur la survie de ces rats.

## VI.2.7. Variation intra-modèle : cas de nouvelles cellules 9L

Les tumeurs 9L utilisées lors de ces études semblent sur de nombreux points plus agressives que celles décrites dans certains articles de la littérature tant au niveau de la survie des rats implantés sans traitement [Smilowitz, 2006] qu'au niveau de leur réaction face à une radiothérapie classique [Coderre, 1994a]. De nouvelles cellules 9L ont donc été achetées à ATCC afin de voir si des différences apparaissaient avec notre modèle quand les cellules sont cultivées et implantées à des animaux dans les mêmes conditions.

Les différences relevées entre ces deux échantillons de cellules différentes, mais de même lignées, lors de leur culture peuvent être ainsi résumées (Figure 101) :

- la multiplication intensive des cellules débute à J4 dans la lignée ATCC alors qu'elle est plus tardive dans la lignée ESRF<sup>▲</sup>
- Le phase de plateau commence à J8 dans la lignée ATCC alors qu'elle n'est toujours pas présente à J10 pour la lignée ESRF
- les temps de doublement sont de 20h (entre J4 et J7) pour la lignée ATCC et 22h (entre J6 et J8) dans la lignée ESRF.



**Figure 101 : A gauche : courbes de croissances des cellules 9L utilisées à l'ESRF et celle reçue d'ATCC. A droite : courbes de survie des rats implantés avec les cellules 9L utilisées à l'ESRF et celle reçue d'ATCC**

Les courbes de survie de rats implantés avec des cellules 9L ESRF ( $n = 6$ ) et ATCC ( $n = 8$ ) selon le même protocole ( $10^4$  cellules dans  $1 \mu\text{l}$ ) sont significativement différentes ( $p < 0,0001$ ). La médiane de survie est de 18,5 jours pour les CTRL 9L ESRF alors qu'elle atteint 33,5 jours chez les CTRL 9L ATCC. De même leurs moyennes sont de 19,7 jours ( $\text{SEM} = 1$ ) et 35,9 jours ( $\text{SEM} = 2,6$ ), respectivement.

<sup>▲</sup> Cellules utilisée à l'ESRF depuis le début des expérimentations.

Il peut donc exister de fortes variations entre des cellules d'une même lignée, qui se reflètent à travers la survie des rats contrôle, qu'il est important de prendre en compte lors de comparaisons entre des résultats venant de laboratoires différents.

## **VI.3. Discussion**

### **VI.3.1. Validation des modèles tumoraux**

D'après Mathieu et *al.* [Mathieu, 2007], certains caractères déterminants doivent être recherchés sur les modèles de gliomes animaux et lors de leur implantation, afin d'imiter au mieux le comportement de leurs homologues humains. Ces critères sont :

**Une faible morbidité et pas de mortalité lors de l'implantation.** La chirurgie ne doit pas interférer avec le développement du modèle tumoral. Ceci permet également de juger en partie de la pertinence du site d'implantation. Les protocoles d'implantation utilisés lors de cette étude (à 10 mm en avant des barres d'oreilles, 3,5 mm de la ligne de suture sagittale et à 5,5 mm de profondeur depuis la partie extérieur du crâne) sont responsables d'une faible morbidité (légère chute de poids dans les jours suivant la chirurgie). La mortalité observée lors des protocoles d'implantation est due à l'anesthésie des animaux (toujours délicate chez les rongeurs) et non pas à la chirurgie.

**Un taux de tumeurs apparaissant à la suite de l'injection qui doit être proche de 100%.** Au cours des expériences menés pour ce travail, aucun rat implanté avec des cellules F98 et n'ayant pas reçu de traitement n'a survécu. Tous les rats témoins analysés après leurs morts étaient bien porteurs d'une tumeur. Dans le cas des rats implantés avec des cellules 9L au cours de cette étude, moins de 10 rats (tous détectés à l'IRM et retirés de l'étude) n'ont jamais montré de trace de développement de tumeur dont plus de la moitié à cause d'erreur de manipulations notées ou soupçonnées sur les registres.

**Un développement des tumeurs présentant un taux de croissance constant et reproductible.** Que ce soit pour les rats porteurs de tumeur 9L ou F98, le SEM de survie des rats contrôle est toujours faible que ce soit dans chaque série de CTRL (SEM<sup>♦</sup> compris entre 0,2 et 2,03 pour les 9L et 0,67 et 1,69 pour les F98) ou en groupant tous les rats contrôle (0,27 pour les 9L et 0,47 pour les F98). De plus, lors de la caractérisation du modèle 9L par IRM, une progression constante de la zone tumorale a bien été relevée. Les modèles utilisés ont donc bien un taux de croissance constant. De plus les survies des rats CTRL et l'imagerie IRM (en pondération T<sub>2</sub>) sont reproductibles au cours du temps (médianes de survies comprises entre 18 et 20 jours pour les rats porteurs de tumeur 9L entre 2003 et 2007, et entre 23 et 25 jours pour les rats porteurs de tumeur F98 entre 2003 et 2007). Pourtant, il faut noter qu'au sein d'une même série il existe une hétérogénéité de la taille des tumeurs visibles à l'imagerie autant pour les tumeurs F98 (tailles mesurées en SRCT de 1,7 à 34,6 mm<sup>3</sup>) que pour les tumeurs 9L (tailles mesurées en SRCT de 17,5 à 191,9 mm<sup>3</sup>). Bien entendu ces mesures sont celles des cas extrêmes et les survies des rats contrôle restant proches, l'incidence en est peu élevée, mais il est difficile même avec un protocole d'implantation rigoureux et reproductif de s'affranchir de cette variabilité biologique.

**Une lignée animale adaptée. Comme la plupart des tumeurs cérébrales se développent chez des patients immunocompétents, et étant donné que les modulations immunes sont une approche thérapeutique possible des tumeurs cérébrales, les cellules néoplasiques doivent être implantées dans un hôte immunocompétent plutôt que dans un animal « nude ».** De plus, afin d'éviter une réaction immunitaire indésirable, entraînant un rejet de la tumeur, il est essentiel que les cellules et les animaux dans lesquels elles sont implantées soient syngéniques [Barth, 1998]. Les lignées cellulaires 9L et F98 sont toutes les deux issues des rats Fischer [Benda, 1971 ; Koestner, 1971 ; Schmidek, 1971], souche de rats immunocompétents, utilisée lors de cette étude.

**Une certaine résistance des tumeurs aux traitements courants, comme le sont les gliomes humains.** L'irradiation avec une dose unique de 20 Gy sur des rats porteurs de tumeur 9L et F98 permet d'augmenter leur médiane de survie de 14 à 18 jours mais ne permet pas l'apparition de survivants à long terme. Les protocoles de chimiothérapie qui ont été testés durant ce travail de thèse n'ont pas permis d'augmenter la survie des rats porteurs de tumeur

---

<sup>♦</sup> Il faut rappeler que SEM = Ecart type/ $\sqrt{N}$ , avec N= le nombre de rats dans la série.

9L mais ont permis une augmentation maximum de 14 jours de la survie médiane des rats porteurs de tumeur F98, sans permettre l'apparition de survivants à long terme.

**Une localisation tumorale permettant de réaliser des protocoles d'imagerie non invasifs *in vivo*.** Les tumeurs 9L et F98 implantées lors de cette étude ont pu être imagées par IRM et SRCT, sans rencontrer de problèmes dus à la localisation de l'implantation. Il faut rappeler que les tumeurs F98 ont été difficilement observables lors de cette étude. L'utilisation d'une pompe micrométrique avec un débit de 2,5 µl/min semble permettre de pallier à ce problème [Rousseau, 2007a].

### **VI.3.2. Principales caractéristiques des modèles tumoraux utilisés**

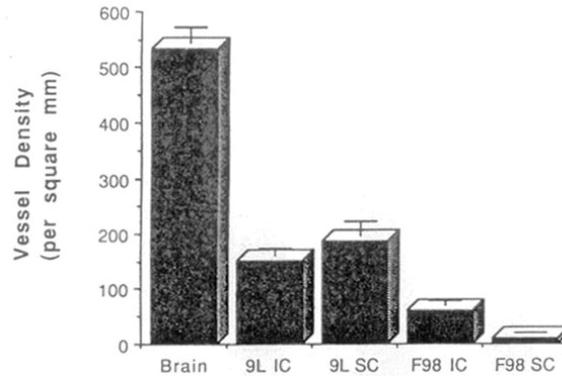
#### **Histologie :**

Les observations menées durant ce chapitre sont en accord avec la bibliographie :

Les tumeurs 9L sont décrites comme formant une masse tumorale bien définie avec des extensions microscopiques qui envahissent le tissu sain [Arosarena, 1994] et présentant une augmentation de la densité vasculaire et une prolifération marquée de l'endothélium [Schmidek, 1971]. Les tumeurs F98 ont un schéma de croissance infiltrant à l'intérieur du cerveau [Barth, 2003], les infiltrations néoplasiques périvasculaires sont évidentes tout comme les infiltrations du parenchyme cérébral adjacent par des cellules tumorales individuelles. Elles présentent un noyau central nécrotique et de nombreuses figures mitotiques [Mathieu, 2007].

Atypies cellulaires, pleïomorphisme nucléaire ainsi que la présence d'un large nombre de cellules tumorales géantes sont caractéristiques des tumeurs 9L intracérébrales. Des atypies cellulaires sont également présentes dans le modèle F98 [Arosarena, 1994].

La présence d'une vascularisation bien développée dans les tumeurs 9L a été notée à plusieurs reprises dans ce travail de thèse. Arosarena et al. [Arosarena, 1994] ont mesuré la densité vasculaire des tumeurs 9L et F98 à l'aide d'un immunomarqueur de la laminine, marqueur vasculaire dans le cerveau sain et tumoral. Il apparaît que les tumeurs F98 ont une densité vasculaire inférieure à celle des tumeurs 9L (Figure 102).



**Figure 102 : densité vasculaire dans le cerveau sain et dans les tumeurs 9L et F98 intracrâniennes (IC) et sous cutanées (SC). Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type. D'après [Arosarena, 1994].**

De façon surprenante, elles ont toutes les deux une densité vasculaire inférieure au tissu sain qui peut être expliquée par une répartition peu homogène de la vascularisation (centre de la tumeur peu vascularisé) et une taille des vaisseaux plus importante dans les tumeurs.

### **Radiosensibilité et chimiosensibilité**

Bencokova et al. ont étudié la réponse des modèles tumoraux 9L, C6 et F98 aux radiations et au cisplatine. De manière intéressante, ils montrent que le modèle 9L apparaît comme étant le plus radio-résistant des 3. Il est également le seul de ces modèles à montrer une activité normale de la protéine BRCA1, protéine impliquée dans la réponse aux rayons X et à de nombreux agents alkylants comme le cisplatine. Le modèle 9L apparaît donc comme le seul des modèles de gliomes de rongeurs testés à avoir une réponse normale aux rayons X et au cisplatine [Bencokova, 2007].

Ces constatations permettent d'expliquer la différence de réaction face à une exposition au cisplatine intratumoral entre les rats porteurs de tumeur 9L (médiane de survie de 19 jours et 21 jours pour les rats CTRL et CTRL + Cispt, respectivement) et les rats porteurs de tumeur F98 (médiane de survie de 24 jours et 38 jours pour les rats CTRL et CTRL + Cispt, respectivement). Il faut également prendre en compte la taille beaucoup plus importante des tumeurs 9L par rapport aux tumeurs F98 au moment de leur exposition au cisplatine. Cette différence de taille doit également influencer la différence de réponse à la chimiothérapie et le sparing du tissu sain.

Par contre, il n'est pas apparu de différence de survie entre les rats porteurs de tumeur 9L et ceux porteurs de tumeurs F98 lors d'une irradiation en faisceau large unidirectionnelle à 20 Gy (médiane de survie de 37,5 et 38 jours, respectivement). Il est alors important de noter

que même si les résultats obtenus sur les animaux ne sont pas forcément transposables à l'homme, ces expériences sont une étape nécessaire dans la compréhension des phénomènes biologiques. En effet les résultats obtenus en biologie cellulaire ne s'appliquent pas forcément aux cellules dans leur contexte physiologique.

### **Conclusion**

Les rats porteurs des tumeurs 9L et F98 ont des survies équivalentes avec des protocoles d'implantation identiques (cf VI.2.3.1.) mais les caractéristiques biologiques des tumeurs et leurs sensibilités aux techniques de thérapie courantes varient. Il faut ajouter à cela la différence de modalité d'implantation lors des protocoles de thérapie qui entraîne non seulement une différence importante de la taille des tumeurs au moment de l'irradiation ( $15,3 \text{ mm}^3$  en moyenne pour les F98 et  $109,3 \text{ mm}^3$  en moyenne pour les tumeurs 9L en SRCT), mais également dans le cas des tumeurs F98 une dissémination des cellules tumorales, probablement à travers le ventricule, vers d'autres sites du cerveau. Ce phénomène apparaît lors de l'injection manuelle de  $5 \mu\text{l}$  de milieu contenant les cellules et nuit très probablement aux expériences de radiothérapie qui ciblent un site donné (le site d'injection), notamment les résultats présentés dans les chapitres précédents. Toutes ces différences rappellent une fois de plus qu'il est dangereux de comparer des résultats obtenus avec des techniques différentes sur de modèles tumoraux différents sans prendre en compte ces variabilités. Il est très intéressant de noter que ces différences entre les modèles peuvent par contre servir à élire des cibles tumorales préférentielles pour une technique donnée.

### **VI.3.3. Variation intra-modèles, les différences entre les rats contrôle de différentes études publiées**

Il est également très important de vérifier les survies des rats contrôle même entre des études utilisant le même modèle tumoral, car des échantillons différents de cellules d'un même modèle peuvent avoir un impact très différent sur la survie des rats (médiane de survie des rats CTRL 9L ESRF : 18,5 jours, médiane de survie des rats CTRL 9L ATCC : 33,5 jours). En effet le diamètre des tumeurs 9L ( $10^4$  cellules dans  $1 \mu\text{l}$ ) décrit dans la bibliographie est de 4 mm à J14 [Dilmanian, 2002 ; Laissue, 1998], or la taille de ces tumeurs mesurées en SRCT est de  $109 \text{ mm}^3$  soit 6 mm de diamètre. Les médianes de survie définies dans les différentes publications sont très proches : entre 18 et 22 jours [Coderre, 1994b ; Dilmanian, 2002 ;

*Laissue, 1998 ; Smilowitz, 2006*]. Cependant, une comparaison attentive des survies des rats contrôle de ces études avec les survies des rats contrôle obtenues durant ce travail de thèse apportent des résultats frappants : 3/4 de ces études ont des survies de rats contrôle significativement différentes des notres (Tableau 21).

	P =	N =
Coderre <i>et al.</i> * [ <i>Coderre, 1994b</i> ]	0,0003	18
Laissue <i>et al.</i> # [ <i>Laissue, 1998</i> ]	0,0167	9
Smilowitz <i>et al.</i> * [ <i>Smilowitz, 2006</i> ]	0,0055	14
Dilmanian <i>et al.</i> # [ <i>Dilmanian, 2002</i> ]	Non significatif	11/17

**Tableau 21 : Différences des rats contrôle de différentes études de survie utilisant le modèle de tumeur 9L par rapport aux rats contrôle de ce travail de thèse. \* les données ont été reconstituées à partir des données de la publication (courbes, médiane, nombre de rats...). # Données obtenues à partir de communications personnelles d'un des auteurs.**

Avec le modèle F98 ( $10^3$  cellules dans 5  $\mu$ l), la taille des tumeurs obtenues (15,3 mm<sup>3</sup> soit  $\approx$  3 mm de diamètre) est proche de ce qui est décrit dans la littérature [*Barth, 2000 ; Yang, 1997*]. La médiane de survie correspond bien à celles des autres études faites notamment à l'ESRF, qui sont comprises entre 24 et 28 jours [*Adam, 2006 ; Biston, 2004b ; Rousseau, 2007a*] et pourtant il existe une différence significative avec la courbe de survies des rats contrôle de l'étude publiée par Biston *et al.* ( $p = 0,0153$  ;  $N = 9$ , communication personnelle d'un des auteurs).

La différence peut sembler faible dans tous les cas, néanmoins, le stade de la tumeur influence de manière importante sa réaction au traitement : avec un même protocole d'irradiation MRT (faisceaux croisés 460/200/25) l'ILS est triplé et 30% de survivants à long terme apparaissent si l'irradiation à lieu 10 jours après l'implantation plutôt que 14 jours après. C'est donc la courbe de survie des rats contrôle qui va donner les informations nécessaires à l'interprétation de la survie des rats irradiés et à la comparaison des différentes études entre elles. Une différence de médiane de survie et/ou de l'intervalle de survie des rats contrôle entre certaines études, notamment celles de Biston *et al.* [*Biston, 2004b*] dans le paragraphe V.3.1. ou bien celle de Coderre *et al.* [*Coderre, 1994a*] dans le paragraphe III.2.1. (comparaison de la survie des rats irradiés en faisceau larges), peut expliquer en partie les différences de survie qui peuvent apparaître entre les rats traités. Bien entendu, il est nécessaire de ne donner dans les résultats que les survies des rats contrôle obtenues au cours de l'expérience présentée, alors que généralement les survies obtenues au cours de plusieurs expériences sont regroupées.

Pour conclure, il a été montré au cours de cette partie que le modèle 9L utilisé dans cette étude était bien adapté à la recherche préclinique de radiothérapie expérimentale sur les gliomes. Le modèle F98, bien qu'ayant les caractéristiques requises, développe des foyers de tumeurs secondaires lorsqu'il est injecté dans 5  $\mu$ l manuellement, entraînant un biais négatif sur les résultats. De plus, il a été prouvé que les comparaisons intermodèles sont hasardeuses voire dangereuses. Les comparaisons de résultats au sein d'un même modèle doivent être également réalisées avec précaution en prenant en compte les données apportées par les rats contrôle propres aux différentes expériences.



## VII. Conclusions et Perspectives

D'abord considérée comme marginale, la recherche médicale au sein des installations de rayonnement synchrotron est en train de se répandre dans le monde entier. Suite aux premières expériences précliniques menées au synchrotron de Brookhaven (NSLS), l'European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) a mis en place une ligne dédiée à la recherche biomédicale couplée à une structure biologique de soutien comprenant une animalerie et des laboratoires de biologie (BMF) et permettant de suivre les expérimentations en amont et en aval. L'intérêt porté aux deux techniques développées au sein de ces structures, la Microbeam Radiation Therapy (MRT) et la Stereotactic Synchrotron Radiation Therapy (SSRT), entraîne l'apparition de nouvelles lignes biomédicales à travers le monde et notamment dans les autres synchrotrons de 3<sup>ème</sup> génération (Spring 8 au Japon, Canadian Light Source au Canada et Australian Synchrotron en Australie). Les caractéristiques si particulières de la lumière synchrotron (notamment la faible divergence du faisceau, le grand débit de dose et la possibilité d'obtenir un faisceau monochromatique avec un flux photonique élevé) en font un outil de choix pour la radiothérapie mais également pour l'imagerie.

Depuis la première publication d'essais précliniques en MRT, 10 ans se sont écoulés et seules 4 nouvelles publications ont vu le jour, toutes traitant de modèles ou de configurations différentes. Quant à la SSRT, les résultats publiés ont tous été réalisés par une même équipe. Des deux techniques ressortaient des résultats encourageants mais hétérogènes. De plus, leurs efficacités ne pouvaient être confrontées puisque chacune était testée sur un modèle tumoral différent. Le but de ce travail était donc à la fois de développer les essais précliniques en MRT à l'ESRF mais également d'acquérir l'expertise et de répéter les expériences de SSRT afin de pouvoir mettre en relation les résultats obtenus avec ces deux techniques et de commencer à déterminer leurs spécificités.

Une grande partie de ce travail de thèse a été consacré à l'optimisation des protocoles de MRT préclinique sur des modèles de tumeurs cérébrales chez le rat. Il a ainsi été démontré que la médiane de survie des rats augmente lorsque l'espacement entre les microfaisceaux diminue lors d'irradiations unidirectionnelles, mais que l'utilisation d'un espacement trop étroit (100  $\mu\text{m}$ ) entraîne des lésions importantes du tissu sain conduisant à la mort des individus libérés de leur tumeur. Pour trouver un compromis entre la préservation efficace des tissus sains et la destruction de la tumeur, d'autres doses pic ont été testées, mais il s'est avéré

qu'aucune amélioration significative n'en résultait. La configuration de 625 Gy avec des microfaisceaux de 25  $\mu\text{m}$  et un espacement de 200  $\mu\text{m}$  a été retenue car même si son efficacité anti-tumorale n'est pas optimale, elle permet une bonne préservation du tissu sain [Regnard, Soumis-b].

Afin d'en potentialiser l'effet anti-tumoral, différentes géométries d'irradiations ont été testées en irradiant les animaux avec des faisceaux croisés orthogonalement au site de la tumeur, les deux irradiations (antéropostérieure et latérale) étant réalisées soit le même jour soit à une semaine d'intervalle. Ces expériences ont permis d'augmenter la médiane ou la moyenne de survie des rats mais pas les deux à la fois. Il s'est avéré que le tissu doublement irradié subissait de graves dommages et qu'en l'absence d'un protocole d'imagerie permettant de cibler correctement la tumeur, ces protocoles ne peuvent être utilisés de façon optimale. Une étude de faisabilité a également été réalisée sur une géométrie d'irradiation innovante mais dont la mise en place nécessite obligatoirement la localisation exacte de la tumeur juste avant l'irradiation [Brauer-Krisch, 2005]. Lors de ces expériences, il a également été découvert que le nouveau collimateur Tecomet ne permettait pas d'obtenir des résultats équivalents à ceux obtenus avec le collimateur Archer qui était devenu obsolète à la suite des détériorations causées par le faisceau blanc.

L'utilisation de drogues aux propriétés différentes a été évaluée en combinaison avec la MRT en irradiation unidirectionnelle [Regnard, Soumis-a]. L'utilisation de cisplatine en injection intratumorale avant l'irradiation n'a pas permis d'obtenir de gain de survie. L'injection intratumorale de témozolomide avant l'irradiation n'a pas permis d'augmenter la médiane de survie des animaux. Cependant la faible quantité de témozolomide injectée et l'apparition d'un survivant à long terme empêche l'exclusion de ce protocole des essais précliniques, et des expériences supplémentaires seront nécessaires pour se prononcer sur l'efficacité combinée du témozolomide avec la MRT. L'injection de Gd-DTPA par voie intratumorale avant l'irradiation a permis à la fois l'augmentation de la médiane de survie des rats et l'apparition d'un survivant à long terme. Des investigations supplémentaires ont permis de déterminer que :

- le Gd-DTPA permettait d'augmenter la survie des rats en MRT (unidirectionnelle et faisceaux croisés) et avec un faisceau large issu du faisceau blanc de l'ESRF
- L'irradiation en faisceau large couplée au Gd-DTPA bien que permettant une survie identique à celle obtenue en MRT présente un taux d'ablation tumoral plus faible

- La dose de 20 Gy à la tumeur en faisceaux larges croisés semble être optimale alors que les résultats obtenus en MRT avec une dose de 460 Gy en faisceaux croisés sont encore susceptibles d'être améliorés
- L'utilisation d'une pompe micrométrique pour l'injection de gadolinium n'entraîne pas d'augmentation de la survie des rats mais permet la reproductibilité des résultats en homogénéisant la diffusion de la drogue.

Enfin, au vu de la taille importante des tumeurs 9L irradiées jusqu'ici, il a été réalisé une expérience sur des animaux porteurs de tumeurs moins développées (J10 à la place de J14) permettant une augmentation de la médiane de survie et l'apparition de 30% de survivants à long terme.

Les futures expériences de MRT devraient donc combiner à la fois (i) une géométrie permettant de tirer parti au maximum de la singularité de l'irradiation MRT et (ii) l'utilisation du gadolinium sur des tumeurs un peu moins développées, et plus proches de celles décrites dans la littérature. Des investigations supplémentaires seront bien sûr nécessaires avant d'en arriver là. Particulièrement pour le gadolinium, de nombreuses questions restent irrésolues : quel serait l'effet d'une irradiation à l'aide d'un faisceau X conventionnel ? Quelle est la meilleure méthode de délivrance de la drogue : micro-pompes osmotiques, CED, gaufrettes ? Quelle est la concentration optimale de gadolinium pour obtenir une survie maximale avec la MRT ? Quelle est la dose optimale à utiliser en MRT avec le gadolinium ? Quel serait l'effet d'une délivrance de gadolinium en intranucléaire ?

Cependant pour pouvoir obtenir les résultats escomptés et permettre à cette technique de révéler son véritable potentiel, trois points essentiels au niveau instrumental doivent être améliorés :

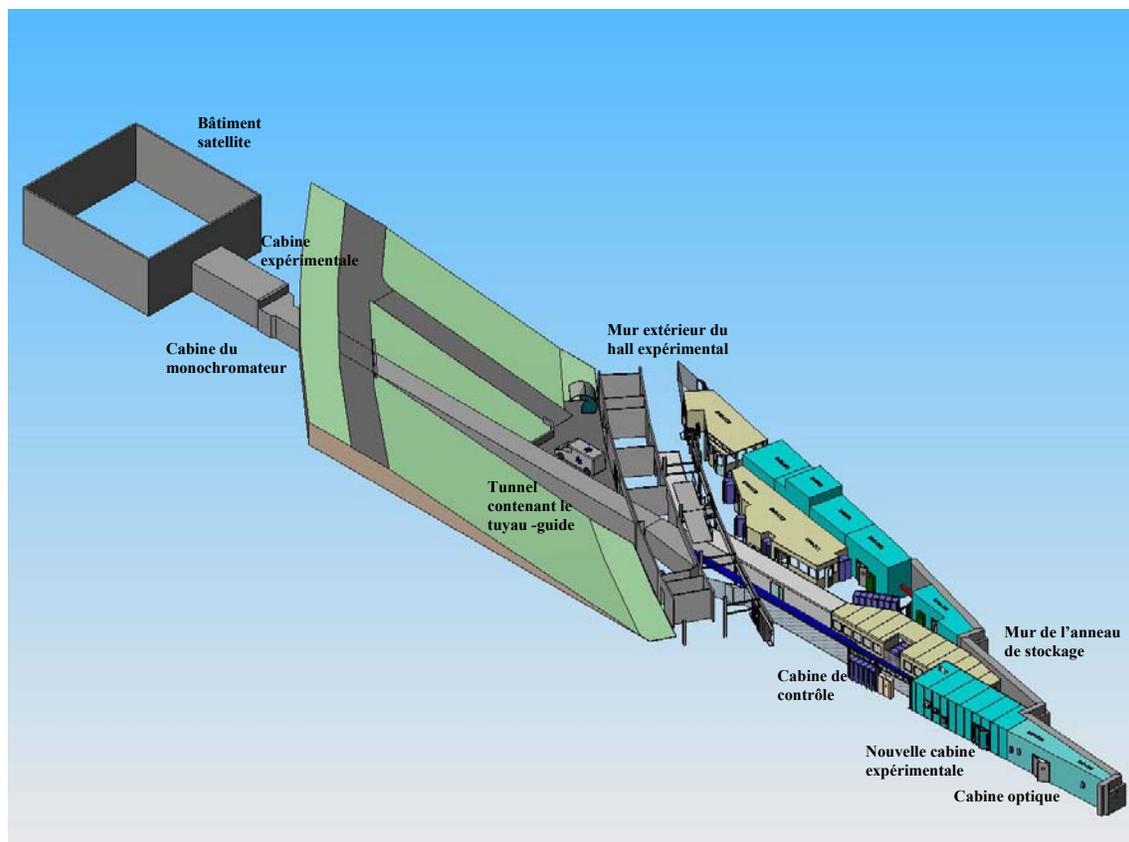
- **Le collimateur** utilisé doit toujours être en parfait état de marche. C'est la pièce maîtresse de la MRT. Un, voire des collimateurs dédiés aux essais précliniques doivent être mis en place. De plus, il serait peut être intéressant de supprimer (par des filtres) la partie du spectre inférieure à 50 keV (seuil K du gadolinium).

- **La dosimétrie** doit permettre une approche plus précise et plus fiable de la dose déposée expérimentalement. Les simulations Monte-Carlo doivent prendre en compte l'impact du collimateur sur les doses déposées.

- **Un protocole d'imagerie** fiable et convivial doit être mis en place en MRT, afin de pouvoir cibler les tumeurs irradiées tout en ménageant une marge d'irradiation, bien

entendu. Selon le protocole de délivrance de gadolinium choisi, il pourrait être possible de l'utiliser à la fois comme agent de contraste pour l'imagerie puis comme agent augmentant le dépôt de dose lors de l'irradiation.

Dans ce but, et afin de préparer de futurs essais cliniques, la zone expérimentale de MRT est en train d'être totalement reconstruite avec notamment une cabine dédiée à l'irradiation découplée de la cabine optique (Figure 103).



**Figure 103 : Vue générale de la future ligne médicale de l'ESRF (ID17) actuellement la cabine expérimentale n'existe pas et les expérimentations se font directement dans la cabine optique.**

La seconde partie de ce travail de thèse a permis de mettre en perspective les deux techniques de thérapie développées à l'ESRF. Des expériences de MRT et de SSRT ont été réalisées sur les deux modèles tumoraux 9L et F98. La technique d'implantation du modèle F98 tel que décrit par *Biston et al.* [Biston, 2004b] a entraîné l'apparition de foyers tumoraux secondaires à des sites inhabituels, et cela probablement avant même l'irradiation.

Dans ces conditions, aucune différence d'efficacité thérapeutique n'a pu être démontrée entre la SSRT et la MRT avec le modèle tumoral F98. Cependant, en prenant en compte les

résultats de la littérature [Biston, 2004b ; Rousseau, 2007a], la SSRT permet d'obtenir de biens meilleurs résultats de survie que ceux obtenus avec la MRT sur ce modèle. La déficience des cellules F98 en BRCA1 [Bencokova, 2007] le rend particulièrement sensible à une combinaison cisplatine + radiation, combinaison caractéristique de la SSRT.

Au contraire, la MRT montre une meilleure efficacité thérapeutique contre le modèle cellulaire 9L, lorsqu'elle est combinée à du gadolinium. Le modèle 9L étant plus radiorésistant que le modèle F98 [Bencokova, 2007], il est nécessaire de coupler le dépôt de dose occasionné par la géométrie bien particulière de la MRT à l'effet du gadolinium augmentant encore cette dose pour lutter efficacement contre ce gliosarcome.

Il sera cependant nécessaire de trouver les protocoles les plus adaptés à chacun des modèles tumoraux avec ces deux techniques avant de pouvoir conclure définitivement sur ce point et d'extrapoler aux essais cliniques. Il est également important d'être prudent lors de la comparaison de deux techniques réalisées dans des laboratoires différents même avec un même modèle cellulaire car des différences importantes peuvent apparaître et la comparaison des animaux contrôle permettra de pondérer les résultats.

Quoiqu'il en soit, les phénomènes régissant chacune de ces techniques sont encore en partie méconnus. Dernièrement, les hypothèses principales soutenues quant à l'origine thérapeutique de ces deux techniques ont été remises en questions [Bencokova, Accepted ; Rousseau, 2007a ; Serduc, 2006a]. Des expériences doivent encore être menées pour comprendre les effets fondamentaux de ces techniques et notamment de la MRT qui met en jeu de nombreux paramètres dont l'influence est encore inconnue. En parallèle, les essais précliniques doivent se poursuivre pour atteindre les paramètres optimaux afin de prolonger la survie des animaux au maximum et si possible détruire la tumeur. Des essais cliniques sur des chats et des chiens malades sont prévus en MRT. Cette technique sera d'abord testée sur des tumeurs externes puis sur des tumeurs cérébrales et les résultats obtenus permettront encore aux chercheurs d'approfondir leur connaissance sur cette technique innovante.

Au-delà des essais cliniques, il est primordial de laisser un espace (i) aux essais précliniques et notamment à l'optimisation de protocole de chimio-radiothérapie, (ii) aux études plus fondamentales visant à comprendre les phénomènes sous-jacents régissant les interactions du faisceau avec les tissus biologique.



# **Annexes**



## VIII. Annexes

### Annexe 1 : Etude d'un protocole d'analgésie pour les rats en fin de vie<sup>♠</sup>

#### Matériel et méthodes

##### Animaux utilisés

Les rats Fischer 344 utilisés pour la mise au point du protocole d'analgésie ont subi l'implantation de  $10^4$  cellules 9L. Ils n'ont pas été irradiés. Les études précédentes montrent que dans un lot de rats implantés mais non traités, la mortalité augmente brutalement dès le 18<sup>ème</sup> jour, et au 22<sup>ème</sup> jour, il ne reste aucun survivant.

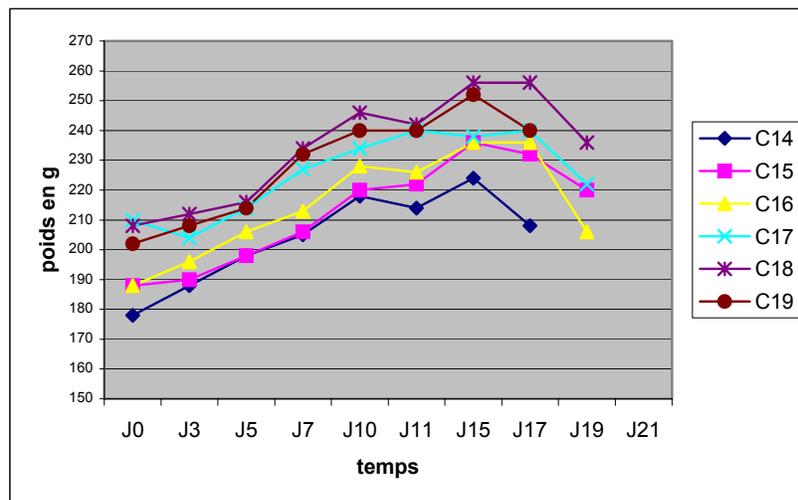


Figure 1 : Evolution pondérale de rats implantés avec des cellules 9L en 2003

Onze rats ont été utilisés, répartis trois par trois dans quatre cages. La pièce d'hébergement est en légère dépression (différentielle avec la pression atmosphérique  $-15\text{Pa}$ ), à une température moyenne de  $20,5^\circ\text{C}$ , avec un taux d'hygrométrie de 50 à 65% et un renouvellement de l'air de 17 volumes par heure. La pièce est éclairée en alternance par tranches de douze heures.

<sup>♠</sup> Protocole réalisé avec l'aide d'Anne Cécile Morin, étudiante vétérinaire

Les rats disposent à volonté d'eau et d'un aliment de maintenance présenté sous forme de grosses croquettes.

### **L'analgésique**

La molécule retenue est la buprénorphine, commercialisée sous les noms de SUBUTEX® et TEMGESIC®. La forme retenue est le TEMGESIC® 0,2mg comprimé sublingual, indiqué en médecine humaine pour l'analgésie de douleurs intenses, en particulier les douleurs postopératoires et néoplasiques. Chez le rat, la buprénorphine est un analgésique efficace dans le traitement de douleurs neuropathologiques chroniques (Christoph *et al.*, 2005).

La buprénorphine, dérivé N-cyclopropylméthyl de l'oripavine est un analgésique opioïde, puissant et à longue durée d'action. Chez l'homme le pic plasmatique est atteint deux à trois heures après administration de deux comprimés ; la biodisponibilité de la substance est de l'ordre de 75%. La buprénorphine est biotransformée au niveau du rein et éliminée principalement dans la bile et les matières fécales.

La posologie recommandée est de 0,6 à 1,2 mg par jour pour un homme de 70 kg. Des études menées sur le rat semblent indiquer qu'une dose de 5 mg/kg par jour est nécessaire par voie orale (Martin *et al.*, 2001). La littérature recommande des doses de 0,5 mg/kg. Il semblerait qu'un surdosage diminue l'efficacité de l'analgésie, et provoque d'autre part l'apparition d'effets secondaires, tels que des troubles gastro-intestinaux (Thompson *et al.*, 2004 ; Christoph *et al.*, 2005)

La dose choisie est de 0,25 mg/kg. Sachant que le poids des rats au début de l'expérience est d'environ 200 g, il faut donc donner un comprimé pour quatre rats. A l'avenir, l'utilisation d'un gélulier est prévue pour cette étape, afin de répartir la poudre de comprimés de façon plus rigoureuse.

### **Administration de l'analgésique**

L'une des quatre cages testées est une cage contrôle : les rats ne reçoivent aucun traitement pendant toute la durée de l'expérience.

Dans chacune des trois autres cages, seuls deux rats sont traités, le troisième servant de témoin. Suivant la cage, la buprénorphine est distribuée mélangée à différents aliments.

Cage 1: cage témoin

Cage 2: buprénorphine + confiture de framboises

Cage 3: buprénorphine + confiture de mûres

#### Cage 4: buprénorphine + Vache-qui-rit

Les rats ont été habitués à ces aliments nouveaux pendant trois jours avant le début du traitement.

Au moment de la distribution de buprénorphine, les rats sont séparés les uns des autres au moyen de cloisons amovibles en plastique transparent. La buprénorphine mélangée aux appâts est distribuée à chaque rat. Si les rats sont trop faibles pour ingérer eux-mêmes le mélange, l'opérateur le leur place directement dans la bouche au moyen d'une spatule. Au bout d'une demi-heure, les coupelles contenant le mélange sont retirées, ainsi que les cloisons. Des croquettes humidifiées sont alors distribuées aux rats. Les rats sont pesés tous les jours.

## Résultats

Un rat témoin a été retiré de l'expérience. La tumeur s'est développée anormalement lentement. Il a été supposé que cette lenteur était due à une mauvaise implantation, d'où l'utilité de l'IRM avant l'irradiation.

Un lot de cinq rats traités (Q46, Q50, Q52, Q54, Q55) et un lot de six rats témoins (Q48, Q51, Q56, Q57, Q58) ont donc été constitués.

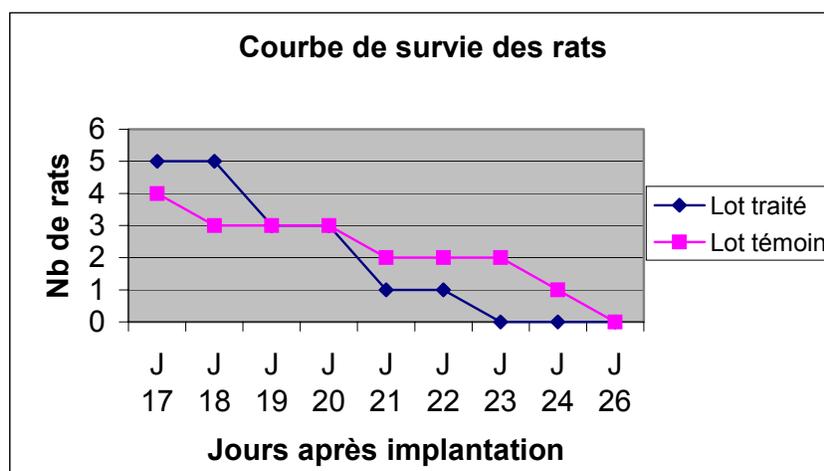


Figure 2 : Courbe de survie des rats ayant reçu de la buprénorphine (traités) ou non (témoins)

Au 24<sup>ème</sup> jour, tous les rats traités sont morts (figure 2), ce qui correspond bien aux résultats des expériences précédentes. La buprénorphine n'a pas allongé la durée de vie des rats. On peut donc l'utiliser sans interférer avec les traitements testés.

En moyenne, les rats du lot traité maintiennent mieux leur poids que ceux du lot témoin (figure 3). Les lots utilisés ne comprennent pas assez d'individus pour que ces résultats soient statistiquement significatifs. Cependant, l'efficacité de la buprénorphine chez le rat a déjà été démontrée (Christoph *et al.*, 2005). Il est donc raisonnable de penser que la buprénorphine, administrée à la dose testée, permet effectivement de soulager les rats en fin de vie.

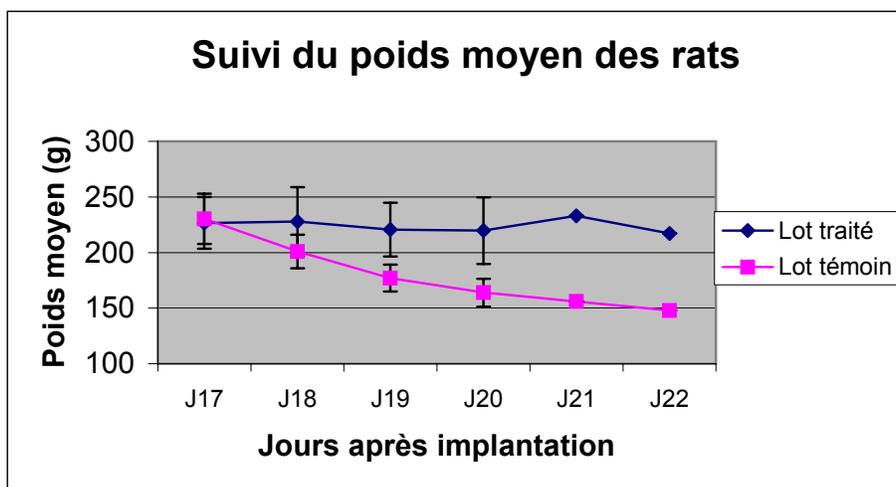


Figure 3 : Suivi du poids moyen des rats ayant reçu de la buprénorphine en fin de vie (traité) ou non (témoins)

Enfin, les rats consomment plus volontiers la confiture plutôt que la Vache-qui-rit. D'un point de vue pratique, il est plus facile de manipuler la confiture, qui est moins visqueuse.

## Conclusion

Le meilleur protocole d'analgésie serait donc le suivant : administration par voie orale de 0,05 mg de buprénorphine par jour, mélangée à de la confiture. Les rats ont été habitués à cet aliment nouveau un ou deux jours avant le début du traitement.

La généralisation de ce traitement analgésique permettra de soulager les rats, et rendre ainsi plus acceptables des expériences indispensables pour l'avancée de la recherche médicale dans le domaine de la cancérologie.

La thérapie par microfaisceaux est en effet porteuse de l'espoir de nouveaux traitements, non seulement pour des tumeurs cérébrales, mais peut-être aussi pour des tumeurs plus courantes.

## **Bibliographie**

**Christoph T., Kögel B. et al.**, 2005. Broad analgesic profile of buprenorphine in rodent models of acute and chronic pain. *European Journal of Pharmacology* 507 : 87-98.

**Martin L.B.E., Thompson A. et al.**, 2001. Analgesic efficacy of orally administered buprenorphine in rats. *Comp. Med.* 51(1) : 43-48.

**Thompson A., Kristal M.B. et al.**, 2004. Analgesic efficacy of orally administered buprenorphine in rats : methodologic considerations. *Comp. Med.* 54 (3) : 293-300.



## **Annexe 2 : Protocoles d'histologie**

### **Protocole de préparation des cerveaux pour la mise en agarose (PBS 1x)**

*Rappel : d'après le protocole de préparation des cerveaux, il est stipulé que les cerveaux doivent baigner dans du PBS 1x, 24 heures avant la mise en agarose.*

#### **Matériels :**

Blouses  
Cerveaux baignant dans du formol  
Gants  
Hotte à flux laminaire  
PBS 1x  
Pince  
Poubelle spécifique pour formol

#### **Manipulations :**

Après mise en marche de la hotte, et la mise en place de la poubelle à formol et du PBS 1x, enlever le cerveau du pot avec une pince et le placer dans le couvercle de celui ci.  
Vider le formol contenu dans le pot dans la poubelle à formol.  
Remettre le cerveau dans le pot et le remplir de PBS. Le cerveau doit être immergé.  
Chaque cerveau est traité un par un.  
Nettoyer la hotte et remettre la poubelle à formol à sa place.  
Bien refermer chaque pot afin d'éviter toute fuite du PBS.

## Protocole de préparation des cerveaux

➔ *Avant toutes manipulations, allumer le processeur à tissus pour plus tard.*

### Etape 1 : Mise en agarose

#### Matériels :

Agarose  
Balance  
Bâton de pyrex  
Blouse  
Crayon de papier  
Cuves rectangulaires histologiques en plastique  
Eau distillée  
Eprouvette de 250ml  
Erlenmeyer de 250ml  
Etiquettes  
Feutre permanent  
Folios vierges  
Frigo  
Gants  
Micro onde  
Papier aluminium  
Thermomètre de 50-100°

#### Mode opératoire :

➔ *Mettre les cerveaux dans du PBS 1 jour avant de manipuler.*

Sortir les cerveaux du PBS, les déposer sur du papier absorbant et les sécher en les manipulant doucement. Préparer les étiquettes avec le nom des rats et les mettre face aux cerveaux correspondant pour les identifier. Ecrire au crayon papier.

Préparer un folio transparent pour chaque cerveau en notant le nom du rat et la date de décès de celui-ci avec un feutre permanent. Ne pas oublier de noter le nom du rat dessus.

Peser 5 g d'agarose (agar-agar) et prendre 250mL d'eau distillée avec une éprouvette. Mélanger le tout dans un erlenmeyer de 250mL si possible (plus pratique pour la suite).

Mettre l'erlenmeyer au micro onde, à température moyenne. Chauffage par petites touches progressives pour atteindre une température de 80-90°C (point de solubilité de l'agarose.) : vérifier avec le thermomètre.

Bien homogénéiser la solution pendant les temps de chauffages.

A la sortie du micro onde, recouvrir l'orifice de l'erlenmeyer avec du papier d'aluminium, dans lequel passe un thermomètre. Attention trop chauffer, l'agarose peut déborder.

Passer la préparation sous l'eau froide du robinet pour faire descendre la température à 48-50°C, ceci progressivement.

Rincer le matériel au fur et à mesure de la manipulation quand il est encore chaud car l'agar-agar froid est collant.

Disposer les cuves en plastiques dans la glace.

Verser 1cm d'agarose encore chaud le long d'un bâton de pyrex dans la cuve en plastiques.

Quand l'agarose a pris suffisamment en masse, déposer les cerveaux très délicatement, de sorte à ce que ceux-ci puissent s'encreur dedans (Face ventrale vers le bas).

Mettre les étiquettes face aux cerveaux correspondants pour pouvoir les identifier par la suite.

Recouvrir d'agar-agar (à peine).

S'il y a un restant d'agarose, il peut être conservé dans un petit pot jusqu'à 1 semaine.

Laisser refroidir dans la glace et quand une couche se forme sur le dessus de l'agarose, mettre les cuves dans le congélateur environ 10-15 min pour accélérer la manipulation.

## **Etape 2 : Utilisation du coupe-tranche**

### **Matériels :**

Blouse

Coupe tranches.

Folios remplis préalablement.

Gants

Lame de rasoirs. (trimming blades NO 260 Type (L) par paquet de 50, marque Feather, faether safety razer co, itd.)

Planche à découper en résine.

Raclette tapissier de petite taille.

Transparents vierges (autant que de folios)

**Mode opératoire :**

Passer la raclette tapissier sur le pourtour intérieur de la cuve pour démouler le bloc d'agar-agar contenant les cerveaux.

Démouler à l'envers sur la planche à découper.

Couper le bloc d'agarose en 2 parties, séparant les cerveaux, avec une lame de rasoir.

Faire attention à ne pas déchirer les étiquettes.

Prendre l'empreinte du coupe-tranches en positionnant l'une de ses lames sur le bloc d'agarose. Ajuster celui-ci au format du coupe-tranches enlevant le surplus d'agarose avec la lame rasoir. (Vaut mieux couper moins que trop).

Les débris d'agarose vont dans la poubelle bio.

Mettre le bloc dans le coupe-tranches, face ventrale vers soi.

Mettre le nombre de lames requis du coupe-tranches en place (toutes dans le même sens), mettre la seconde plaque de plexiglas puis remettre les lames inutiles mais permettant de visser le dispositif dans son ensemble.

Serrer à fond puis desserrer ¼ de tour.

Vérifier qu'un espace suffisant est aménagé pour passer la lame de rasoir.

Couper le cerveau en tranches en passant la lame dans les espaces. Eviter de la faire coulisser de droite à gauche (pour ne pas disloquer l'agarose et effriter le cerveau). Couper lentement, ne pas se presser sinon les tranches coupées remontent avec la lame.

Une fois toutes les tranches coupées, démouler délicatement le bloc et le poser sur la planche à découper (face ventrale sur la planche).

Prendre les tranches de cerveaux (avec l'agarose) une à une et les poser sur le folio en adoptant toujours la même convention (voir sur les folios).

Enlever le surplus autour des cerveaux.

Recouvrir le folio d'un transparent vierge.

Aller le photocopier en jouant sur les contrastes. Ne pas oublier le transparent vierge dessus (sinon les cerveaux se collent sur le volet du photocopieur).

Ranger les folios dans le classeur prévu à cet effet, par ordre alphabétique pour permettre de les retrouver plus rapidement.

### **Etape 3 : Mise en cassette**

#### **Matériels :**

Blouse

Cassettes et couvercles.

Crayon de papier.

Gants

#### **Mode opératoire :**

Mettre chaque tranche dans une cassette, sans la retourner.

Mettre le couvercle.

Bien noter le nom de l'animal d'origine ainsi que le numéro de la partie concernée, sur la cassette au crayon papier.

Mettre les cassettes dans la machine.

# Protocole d'utilisation du processeur de tissus STP-121

## Etape 1 : Mise en marche de l'appareil

L'appareil a dut être allumé préalablement.

Soulever le couvercle de la machine (bouton  $\uparrow\downarrow$ ) (plage de réglage de gauche). Ne jamais soulever le couvercle manuellement.

Placer les cassettes dans le panier à cassettes (environ 80 cassettes en vrac), et ne pas oublier de placer la masse sur le panier. Enclencher le panier sur le pivotteur.

Remplir sous hôte chimique les cuves jusqu'au trait de jauge, soit environ 1.8L. Ne pas dépasser le niveau de remplissage. Vérifier que chaque pots soit bien enclenché, afin qu'il ne puisse plus bouger.

Changer le premier bain d'Ottix shaper à chaque fois et mettre le deuxième bain en première position. Changer à chaque fois les deux premiers bains d'Ottix et décaler le bain numéro 3 en position 1 et le bain 4 en position 2, etc, et mettre les deux bacs renouvelés à la fin de la chaîne avant la paraffine.

## Etape 2 : Programmation et lancement

Programme 1 (P1)=programme de routine :

- Cuve 1 : Formol : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 2 : Ottix shaper : 1h à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 3 : Ottix shaper : 30 min à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 4 : Ottix : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 5 : Ottix : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 6 : Ottix : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 7 : Ottix : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 8 : Ottix : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 9 : Ottix : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 10 : Ottix : 1h30 à A=2 (70 tours/min)
- Cuve 11 : Paraffine : 1h30 à A=1 (60 tours/min)
- Cuve 12 : Paraffine : 1h30 à A=1 (60 tours/min)

Nouvelle programmation : plage de réglage de droite.

-Touche programme,

-Enter,

-Edit,

-Programme,

-Sélection programme, P02 enter,

-C01 HH : MM A (Cuve 01, Temps 01:30, Vitesse d'agitation 2), entrer les paramètres pour toutes les cuves,

-Fin : menu principale.

Lancement et arrêt d'un programme (plage de réglage centrale), appuyer

sur ← pour faire pivoter la tête de la machine en position sur la cuve 1. « Prête ». Choisir le programme (P01) et appuyer sur « Start ». « tr » indique le temps restant dans la cuve en cours de trempage. En appuyant sur « stop » il est possible d'interrompre le programme, mais ceci est dangereux pour le prélèvement en cours de déshydratation.

Une fois que l'appareil indique « fin », on peut prendre les échantillons du panier, puis retourner au pot de départ.

### **Remarques :**

Une fois un programme lancé, l'appareil met 10 secondes pour transférer le panier d'un pot à l'autre, ce qui fait un total de 2 minutes sur le programme en entier, les échantillons sont mis à l'aire libre, donc l'appareil dispose d'un système de ventilation et de filtres pour les vapeurs possibles.

L'essorage du panier après chaque trempage se fait 15 secondes dans un sens et 15 secondes dans l'autre et ceci 4 fois.

Le bouton « \*2 » de la plage de réglage centrale, est à ne pas toucher dans nos conditions.

Le bouton « lock », de la plage de réglage centrale, permet de verrouiller tout le clavier de l'appareil, pour le déverrouiller, il faut maintenir ce même bouton 1 à 2 secondes.

Le bouton « timer » peut permettre un départ différé.

En cas de panne, l'appareil dispose d'une batterie de secours qui lui permettra de finir son mouvement de cuve en cuve. Les pannes électroniques sont possibles. La société Microm fait une révision (sur demande) tous les 2 ans de l'appareil et il faut à ce moment demander à graisser la colonne centrale. Il existe également un danger mécanique. Si l'alarme se déclenche, il peut y avoir un défaut d'alimentation. Si une coupure d'électricité est supérieure

à 5 minutes, l'appareil dispose d'un programme de sécurité. Si le courant est rétabli, la cuve ne retourne pas dans les pots de paraffine avant 4 h après la remise en marche.

## **Protocole d'utilisation de la station d'enrobage : centre d'inclusion EC 350 (fontaine à paraffine)**

### **Matériel**

Blouse

Gants

### **Mise en marche de l'appareil**

Allumer les boutons arrière de la plaque froide et de la fontaine à paraffine. Presser « esc. », pour que l'appareil commence à chauffer. (environ ½ heure avant).

Les boutons « cool » (plaque froide) et « heat » (plaque chaude) doivent être en vert pour commencer l'enrobage. Le bouton « light » permet d'allumer le plan de travail.

Placer les cassettes sorties du processeur de tissus, dans le bac de droite contenant un peu de paraffine sur le fond..

Retirer le couvercle de la cassette et placer un moule de taille approprié (bac gauche) sous la fontaine en le remplissant à moitié, en poussant le clapet.

Utiliser la petite plaque froide (0°C) pour faire durcir la paraffine dans le fond et placer l'échantillon dessus à l'aide d'une pince chaude. Maintenir l'échantillon avec une pince (voire deux) pour le mettre bien à plat dans la paraffine. Une fois l'échantillon bien placé, le recouvrir complètement de paraffine.

Une fois l'échantillon recouvert, il faut rajouter le couvercle de la cassette sur le moule et recouvrir celui-ci de paraffine chaude.

Placer le tout sur la plaque froide de droite jusqu'au durcissement total (environ ¼ heure).

Une fois la paraffine refroidie, démouler et racler le trop de paraffine sur les bords du couvercle (de la cassette).

# **Protocole d'utilisation du Microtome HM 340 E**

## **Etape 1 : mise en marche de l'appareil**

Allumer l'interrupteur sur l'arrière de l'appareil.

S'assurer que le frein est bien enclenché.

Mettre une lame de rasoir dans le porte lame. Attention de ne pas se couper.

Placer un bloc dans la pince à cassette prévu à cet effet.

Régler l'angle d'inclinaison à 10°C.

Ajuster la position du bloc par rapport au rasoir, de façon à être parallèle.

## **Etape 2 : Les différents paramètres de coupes**

Il y a 7 boutons sur le boîtier.

Le bouton en haut à gauche permet une remise à zéro du bloc. C'est à dire que tous les réglages faits avant sont effacés pour pouvoir en refaire d'autres.

Le bouton en dessous est un retour automatique du bloc à sa position initiale. C'est à dire qu'il fait juste régler un bloc et avec cette touche tout les autres seront réglés de la même façon.

Les trois flèches du bas permettent de déplacer la pièce d'avant en arrière à des vitesses différentes.

La première flèche permet de faire avancer le bloc assez vite vers le rasoir. (pour dégrossir)

Les deux autres flèches font avancer et reculer le bloc à une petite vitesse : un mouvement par pression sur la touche.

Le bouton au-dessus permet de modifier la vitesse.

Le bouton en haut à droite permet de connaître des informations concernant les coupes telles que le nombre de tranches, le cumul, ...

*Remarques : nettoyer le microtome à l'aide d'Ottix shaper et de paragard (enlève la paraffine).*

# Protocole de coupe au microtome

## Étape 1 : préparation de la paillasse

### Matériels

Blouse  
Eau distillée  
Eprouvette de 100ml  
Etuve  
Gants  
Glycérine albumine pure  
Passe-tête  
Pisette  
Plaque chauffante

### Manipulation

Mettre en marche l'étuve et la régler pour qu'elle atteigne 60°C.  
Mettre en marche la plaque chauffante, attendre que celle ci monte jusqu'à 50°C.  
Prélever 2ml de glycérine albumine pure avec un passe-tête, prendre 48ml d'eau distillée avec une éprouvette de 100ml et mélanger le tout dans une pisette de 250ml. Ce mélange peut être gardé 3 jours au maximum.

## Étape 2 : couper les échantillons

### Matériels

Blouse  
Cassettes contenant l'organe  
Crayon papier  
Eau albuminée  
Etuve à 60°C, déjà chaude.  
Gants

Lames

Pinceau

Pinces

Plaque chauffante chaude (50°C).

Porte lames de la coloration

### **Manipulation**

Régler le microtome : pour dégrossir = 30µm et pour l'épaisseur = 8µm.

Fixer le porte objet sur le microtome.

Recouvrir une lame d'eau albuminée.

Réaliser des coupes en rubans de paraffine.

Etaler une coupe sur une lame préalablement préparée (avec de l'albumine), et les mettre sur la platine. Les coupes se déplissent d'elle-même avec la chaleur. Ne laisser les lames sur la platine que le temps qu'elles se déplissent, vite les retirer ensuite sinon à la sortie de la coloration les cerveaux ne seront plus fixés sur les lames.

Ecrire le nom des cerveaux correspondant au crayon papier sur l'espace prévu à cet effet.

Une fois enlever de la platine, laisser s'égoutter les lames en les posant verticalement sur du papier absorbant.

Une fois sèches, les mettre sur le porte lame de la coloration et les laisser 45min à l'étuve à 60°C (maximum 1h30).

Nettoyer le microtome à l'aide du pinceau, d'Ottix shaper et de paragard (enlève la paraffine).

## Protocole de coloration histologique

Rappel : après passage à l'étuve 1h à 60°C (ou 24h à température ambiante), le panier de lames est placé dans les différents bains du banc de coloration. Aller doucement pendant la coloration.

### Etape 1 préparation des colorants et autres produits + entretien

Carbonate de lithium : 0.5g pour 100ml.

Penser à filtrer tous les bains 1 fois par semaine et les changer régulièrement.

### Etape 2 : coloration en HES

Ottix (déparaffinage des coupes)	10min
Ottix (déparaffinage des coupes)	10min
Alcool absolu (rend miscible les coupes aux solutions aqueuses de la coloration)	4 min
Eau	2 x 1 min
Eau + carbonate de lithium (40ml)	2 min
Eau	1 min
Hémalun	2 min
Eau	3 x 1 min
Eau + carbonate de lithium (4ml)	2 min
Eau	1 min
Eosine 1%	2 min
Eau	3 x 1 min
Alcool absolu	4 min
Alcool absolu	4 min
Ottix	2 min
Ottix (permet le montage des lames)	2 min

Les lames peuvent rester 24h dans ce bain. Ne pas les laisser à l'air libre.

## **Protocole de montage des lames**

### **Matériels**

Boîte de rangement à lames

Papier absorbant

Dépose lames

Lamelles

Ottix

Passer tôte 2ml

Pertex

### **Méthodes**

*Le travail s'effectue sous la hotte.*

Au dernier bain de coloration HES (Ottix), ne pas sortir les lames de la cuve.

Déposer une goutte de pertex sur une lamelle à l'aide d'un passer tôte de 2ml.

Rapprocher délicatement la lame de la lamelle sans la poser. Laisser la colle diffuser sur les cotés.

Prendre l'ensemble et tapoter la lame sur les cotés sur le papier absorbant pour bien faire diffuser la colle sous toute la lamelle.

Déposer l'ensemble sur le dépose-lames, et laisser sécher sous la hotte.

Ranger les lames et numéroter leur ordre dans la boîte de rangement.

# **Références bibliographiques**



## IX. Références bibliographiques

**Adam JF, Joubert A, Biston MC, Charvet AM, Peoc'h M, Le Bas JF, Balosso J, Esteve F, and Elleaume H.**

Prolonged survival of Fischer rats bearing F98 glioma after iodine-enhanced synchrotron stereotactic radiotherapy.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006. 64: 603-611.

**Aghi M, and Rabkin S.**

Viral vectors as therapeutic agents for glioblastoma.

*Curr Opin Mol Ther.* 2005. 7: 419-430.

**Almaric F.**

Analyse économique des coûts du cancer en France.

Institut National du Cancer, 2007.

**Aouba A, Péquignot F, Le Toullec A, and Jouglu E.**

Les causes médicales de décès en France en 2004 et leur évolution 1980-2004.

*Bulletin épidémiologique hebdomadaire.* 2007. 35-36: 308-314.

**Inventeurs: Archer W; Cessionaire: The United State of America.**

Collimator for producing an array of Microbeams.

5771270. 23 of June 1998.

**Arosarena O, Guerin C, Brem H, and Laterra J.**

Endothelial differentiation in intracerebral and subcutaneous experimental gliomas.

*Brain Res.* 1994. 640: 98-104.

**Athanassiou H, Synodinou M, Maragoudakis E, Paraskevidis M, Verigos C, Misailidou D, Antonadou D, Saris G, Beroukas K, and Karageorgis P.**

Randomized phase II study of temozolomide and radiotherapy compared with radiotherapy alone in newly diagnosed glioblastoma multiforme.

*J Clin Oncol.* 2005. 23: 2372-2377.

**Barth RF.**

Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas.

*J Neurooncol.* 1998. 36: 91-102.

**Barth RF, Yang W, and Coderre JA.**

Rat brain tumor models to assess the efficacy of boron neutron capture therapy: a critical evaluation.

*J Neurooncol.* 2003. 62: 61-74.

**Barth RF, Yang W, Rotaru JH, Moeschberger ML, Boesel CP, Soloway AH, Joel DD, Nawrocky MM, Ono K, and Goodman JH.**

Boron neutron capture therapy of brain tumors: enhanced survival and cure following blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of sodium borocaptate and boronophenylalanine.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000. 47: 209-218.

**Bencokova Z, Balosso J, and Foray N.**

Radiobiological features of the anti-cancer strategies involving synchrotron X-rays.

*Journal of Synchrotron Radiation.* Accepted.

**Bencokova Z, Pauron L, Devic C, Joubert A, Gastaldo J, Massart C, Balosso J, and Foray N.**

Molecular and cellular response of the most extensively used rodent glioma models to radiation and/or cisplatin.

*J Neurooncol.* 2007.

**Benda P, Someda K, Messer J, and Sweet WH.**

Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture.

*J Neurosurg.* 1971. 34: 310-323.

**Benouaich-Amiel A, and Delattre JY.**

[Update on cerebral tumors].

*Bull Cancer.* 2006. 93: 73-81.

**Benouaich-Amiel A, Simon JM, and Delattre JY.**

[Concomitant radiotherapy with chemotherapy in patients with glioblastoma].

*Bull Cancer.* 2005. 92: 1065-1072.

**Biston MC.**

Radio-chimiothérapie par photoactivation synchrotron de drogues platinées anticancéreuses.

In: *Génie biologique et médical.* Grenoble: Université Joseph Fourier - Grenoble 1, 2004a.

**Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM, Esteve F, Foray N, and Balosso J.**

Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays.

*Cancer Res.* 2004b. 64: 2317-2323.

**Brada M, and Stenning SP.**

Radiotherapy for malignant gliomas in the elderly.

*Semin Oncol.* 2003a. 30: 63-67.

**Brada M, Viviers L, Abson C, Hines F, Britton J, Ashley S, Sardell S, Traish D, Gonsalves A, Wilkins P, and Westbury C.**

Phase II study of primary temozolomide chemotherapy in patients with WHO grade II gliomas.

*Ann Oncol.* 2003b. 14: 1715-1721.

**Brauer-Krisch E, Bravin A, Lerch M, Rosenfeld A, Stepanek J, Di Michiel M, and Laissue JA.**

MOSFET dosimetry for microbeam radiation therapy at the European Synchrotron Radiation Facility.

*Medical Physics*. 2003. 30: 583-589.

**Bräuer-Krisch E, Bravin A, Zhang L, Siegbahn E, Stepanek J, Blattmann H, Slatkin DN, Gebbers J-O, Jasmin M, and Laissue JA.**

Characterization of a tungsten/gas multislit collimator for microbeam radiation therapy at the European Synchrotron Radiation Facility.

*Review of scientific instruments*. 2005. 76: -.

**Brauer-Krisch E, Requardt H, Regnard P, Corde S, Siegbahn E, LeDuc G, Brochard T, Blattmann H, Laissue J, and Bravin A.**

New irradiation geometry for microbeam radiation therapy.

*Phys Med Biol*. 2005. 50: 3103-3111.

**Brem S, Tyler B, Li K, Pradilla G, Legnani F, Caplan J, and Brem H.**

Local delivery of temozolomide by biodegradable polymers is superior to oral administration in a rodent glioma model.

*Cancer Chemother Pharmacol*. 2007. 60: 643-650.

**Bridot JL, Faure AC, Laurent S, Riviere C, Billotey C, Hiba B, Janier M, Josserand V, Coll JL, Elst LV, Muller R, Roux S, Perriat P, and Tillement O.**

Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for in vivo imaging.

*J Am Chem Soc*. 2007. 129: 5076-5084.

**Butson MJ, Cheung T, and Yu PK.**

Corresponding dose response of radiographic film with layered gafchromic film.

*Phys Med Biol*. 2002. 47: N285-289.

**Cadirola S, and Dutrillaux B.**

Study of chromosome lesions induced by gamma-rays during the G2 and mitotic phases of the cell cycle.

*Ann Genet*. 1984. 27: 154-157.

**Cairncross JG, and Macdonald DR.**

Successful chemotherapy for recurrent malignant oligodendroglioma.

*Ann Neurol*. 1988. 23: 360-364.

**Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, and Louis DN.**

Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas.

*J Natl Cancer Inst*. 1998. 90: 1473-1479.

**Carpentier AC, Lehericy S, Duffau H, Cornu P, Krainik A, Hertz-Pannier L, Le Bihan D, and Marsault C.**

Méthodes modernes d'aide à la chirurgie tumorale.

In: *Tumeurs cérébrales du diagnostic au traitement*, edited by Masson. Paris: 2004, p. 51-64.

**CBTRUS.**

Statistical report: Primary brain tumors in the United States, 1998-2002.  
Central Brain Tumor Registry of the United States, 2005.

**Chan MF, Schupak K, Burman C, Chui CS, and Ling CC.**

Comparison of intensity-modulated radiotherapy with three-dimensional conformal radiation therapy planning for glioblastoma multiforme.  
*Med Dosim.* 2003. 28: 261-265.

**Chan TA, Weingart JD, Parisi M, Hughes MA, Olivi A, Borzillary S, Alahakone D, Detorie NA, Wharam MD, and Kleinberg L.**

Treatment of recurrent glioblastoma multiforme with GliaSite brachytherapy.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005. 62: 1133-1139.

**Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS, and Tsukada Y.**

Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. A joint Radiation Therapy Oncology Group and Eastern Cooperative Oncology Group study.  
*Cancer.* 1983. 52: 997-1007.

**Chinot OL.**

Should radiotherapy be standard therapy for brain tumors in the elderly? Cons.  
*Semin Oncol.* 2003. 30: 68-71.

**Coderre J, Rubin P, Freedman A, Hansen J, Wooding TS, Jr., Joel D, and Gash D.**

Selective ablation of rat brain tumors by boron neutron capture therapy.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994a. 28: 1067-1077.

**Coderre JA, Button TM, Micca PL, Fisher CD, Nawrocky MM, and Liu HB.**

Neutron capture therapy of the 9L rat gliosarcoma using the p-boronophenylalanine-fructose complex.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994b. 30: 643-652.

**Corde S.**

Développement méthodologique de l'application d'agents pharmacologiques renforceurs de l'effet photoélectrique pour l'utilisation du rayonnement synchrotron en radiothérapie anticancéreuse.  
In: *Science et géographie.* Grenoble: Joseph Fourier, 2002a.

**Corde S, Balosso J, Elleaume H, Renier M, Joubert A, Biston MC, Adam JF, Charvet AM, Brochard T, Le Bas JF, Esteve F, and Foray N.**

Synchrotron photoactivation of cisplatin elicits an extra number of DNA breaks that stimulate RAD51-mediated repair pathways.  
*Cancer Res.* 2003. 63: 3221-3227.

**Corde S, Biston MC, Elleaume H, Esteve F, Charvet AM, Joubert A, Ducros V, Bohic S, Simionovici A, Brochard T, Nemoz C, Renier M, Tropres I, Fiedler S, Bravin A, Thomlinson W, Le Bas JF, and Balosso J.**

Lack of cell death enhancement after irradiation with monochromatic synchrotron X rays at the K-shell edge of platinum incorporated in living SQ20B human cells as cis-diamminedichloroplatinum (II).

*Radiat Res.* 2002b. 158: 763-770.

**Cordoliani Y.**

Interaction des rayonnements ionisants avec la matière.

*Feuillets de Radiobiologie.* 2002. 42: 437-441.

**Curtis HJ.**

The interpretation of microbeam experiments for manned space flight.

*Radiat Res Suppl.* 1967a. 7: 258-264.

**Curtis HJ.**

The use of deuteron microbeam for simulating the biological effects of heavy cosmic-ray particles.

*Radiat Res Suppl.* 1967b. 7: 250-257.

**De Stasio G, Rajesh D, Casalbore P, Daniels MJ, Erhardt RJ, Frazer BH, Wiese LM, Richter KL, Sonderegger BR, Gilbert B, Schaub S, Cannara RJ, Crawford JF, Gilles MK, Tyliczszak T, Fowler JF, Larocca LM, Howard SP, Mercanti D, Mehta MP, and Pallini R.**

Are gadolinium contrast agents suitable for gadolinium neutron capture therapy?

*Neurol Res.* 2005. 27: 387-398.

**DeAngelis LM.**

Brain tumors.

*N Engl J Med.* 2001. 344: 114-123.

**Desoize B, and Madoulet C.**

Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment.

*Crit Rev Oncol Hematol.* 2002. 42: 317-325.

**Dilmanian FA, Button TM, Le Duc G, Zhong N, Pena LA, Smith JA, Martinez SR, Bacarian T, Tammam J, Ren B, Farmer PM, Kalef-Ezra J, Micca PL, Nawrocky MM, Niederer JA, Recksiek FP, Fuchs A, and Rosen EM.**

Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy.

*Neuro Oncol.* 2002. 4: 26-38.

**Dilmanian FA, Morris GM, Le Duc G, Huang X, Ren B, Bacarian T, Allen JC, Kalef Ezra J, Orion I, Rosen EM, Sandhu T, Sathe P, Wu XY, Zhong Z, and Shivaprasad HL.**

Response of avian embryonic brain to spatially segmented x-ray microbeams.

*Cell Mol Biol.* 2001. 47: 485-493.

**Dilmanian FA, Morris GM, Zhong N, Bacarian T, Hainfeld JF, Kalef-Ezra J, Brewington LJ, Tammam J, and Rosen EM.**

Murine EMT-6 carcinoma: high therapeutic efficacy of microbeam radiation therapy.  
*Radiat Res.* 2003. 159: 632-641.

**Dilmanian FA, Qu Y, Liu S, Cool CD, Gilbert J, Hainfeld JF, Kruse CA, Laterra J, Lenihan D, Nawrocky MM, Pappas G, Sze CI, Yuasa T, Zhong N, Zhong Z, and McDonald JW.**

X-ray microbeams: Tumor therapy and central nervous system research.  
*Nucl Instrum Methods Phys Res A.* 2005. 548: 30-37.

**Dilmanian FA, Zhong Z, Bacarian T, Benveniste H, Romanelli P, Wang R, Welwart J, Yuasa T, Rosen EM, and Anshel DJ.**

Interlaced x-ray microplanar beams: a radiosurgery approach with clinical potential.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. 103: 9709-9714. Epub 2006 Jun 9707.

**Elleaume H, Charvet AM, Berkvens P, Berruyer G, Brochard T, Dabin Y, Dominguez MC, Draperi A, Fiedler S, Goujon G, Le Duc G, Mattenet M, Nemoz C, Perez M, Renier M, Schulze C, Spanne P, Suortti P, Thomlinson W, Esteve F, Bertrand B, and Le Bas JF.**

Instrumentation of the ESRF medical imaging facility.  
*Nucl Instrum Meth A.* 1999. 428: 513-527.

**Elleaume H, Corde S, Adam JF, Joubert A, Charvet AM, Balosso J, Le Bas JF, and Estève F.**

Radiation dose enhancement in tumors loaded with iodine: potential advantages of synchrotron radiation.  
In: *Workshop on medical Applications of synchrotron radiation.* Grenoble, France: 2001, p. 33 (Abstract).

**Eyre HJ, Crowley JJ, Townsend JJ, Eltringham JR, Morantz RA, Schulman SF, Quagliana JM, and al-Sarraf M.**

A randomized trial of radiotherapy versus radiotherapy plus CCNU for incompletely resected low-grade gliomas: a Southwest Oncology Group study.  
*J Neurosurg.* 1993. 78: 909-914.

**Fairchild RG, and Bond VP.**

Photon activation therapy.  
*Strahlentherapie.* 1984. 160: 758-763.

**Fiedler S, Elleaume H, Le Duc G, Nemoz C, Brochard T, Renier M, Bertrand B, Esteve F, Le Bas J, Suortti P, and Thomlinson W.**

Dual-energy coronary angiography in pigs using a Gd contrast agent.  
In: *Proceedings of SPIE*, edited by Dobbins JT BJ. San Diego: 2000, p. 96-103.

**Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, and Canellos GP.**

Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults.  
*Cancer.* 1993. 71: 2585-2597.

**Fiveash JB, and Spencer SA.**

Role of radiation therapy and radiosurgery in glioblastoma multiforme.  
*Cancer J.* 2003. 9: 222-229.

**Flecknell PA, Roughan JV, and Stewart R.**

Use of oral buprenorphine ('buprenorphine jello') for postoperative analgesia in rats--a clinical trial.  
*Lab Anim.* 1999. 33: 169-174.

**Geiser M, Cruz-Orive LM, Im Hof V, and Gehr P.**

Assessment of particle retention and clearance in the intrapulmonary conducting airways of hamster lungs with the fractionator.  
*J Microsc.* 1990. 160: 75-88.

**Grand S, Lai ES, Esteve F, Rubin C, Hoffmann D, Remy C, and Segebarth C.**

In vivo 1H MRS of brain abscesses versus necrotic brain tumors.  
*Neurology.* 1996. 47: 846-848.

**Grossman SA, and Batara JF.**

Current management of glioblastoma multiforme.  
*Semin Oncol.* 2004. 31: 635-644.

**Gupta T, and Dinshaw K.**

Modified optimal fractionation for poor prognosis malignant gliomas: an elusive search.  
*Acta Oncol.* 2005. 44: 105-113.

**Gutman RL, Peacock G, and Lu DR.**

Targeted drug delivery for brain cancer treatment.  
*J Control Release.* 2000. 65: 31-41.

**Hall WA.**

The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions.  
*Cancer.* 1998. 82: 1749-1755.

**Halpern A, and Mutze B.**

Irradiation of micro-organisms with mono-energetic X-rays; biological consequences of the Auger effect.  
*Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1978. 34: 67-72.

**Halpern A, and Stocklin G.**

Radiation Chemical Resonance Effect in Solid 5-Bromodeoxyuridine - Chemical Consequences of Auger Effect.  
*Radiation Research.* 1974. 58: 329-337.

**Heimberger AB, Archer GE, McLendon RE, Hulette C, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, and Sampson JH.**

Temozolomide delivered by intracerebral microinfusion is safe and efficacious against malignant gliomas in rats.  
*Clin Cancer Res.* 2000. 6: 4148-4153.

**Henson JW.**

Treatment of glioblastoma multiforme: a new standard.  
*Arch Neurol.* 2006. 63: 337-341.

**Henson JW, Gaviani P, and Gonzalez RG.**

MRI in treatment of adult gliomas.  
*Lancet Oncol.* 2005. 6: 167-175.

**Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, and Nister M.**

Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops.  
*Cancer Res.* 1992. 52: 3213-3219.

**Hildebrand J, Sahmoud T, Mignolet F, Brucher JM, and Afra D.**

Adjuvant therapy with dibromodulcitol and BCNU increases survival of adults with malignant gliomas. EORTC Brain Tumor Group.  
*Neurology.* 1994. 44: 1479-1483.

**Hirose Y, Berger MS, and Pieper RO.**

p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells.  
*Cancer Res.* 2001. 61: 1957-1963.

**Hochberg FH, and Pruitt A.**

Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma.  
*Neurology.* 1980. 30: 907-911.

**Hofer KG.**

Biophysical aspects of Auger processes.  
*Acta Oncol.* 2000. 39: 651-657.

**Hofer S, and Merlo A.**

Options thérapeutiques pour les gliomes malins de degré III et IV OMS.  
*Forum Medical Suisse.* 2002. 32/33.

**Hoffman S, Propp JM, and McCarthy BJ.**

Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999.  
*Neuro Oncol.* 2006. 8: 27-37.

**Humm J.**

Cancer. Therapy by photon activation?  
*Nature.* 1988a. 336: 710-711.

**Humm JL, and Charlton DE.**

Double strand breakage in DNA produced by the photoelectric interaction with incorporated 'cold' murine.  
In: *DNA damage by Auger electron emitters*, edited by Baverstock K, and Charlton D. London: Taylor & Francis, 1988b, p. 11-122.

**Iwamoto KS, Norman A, Kagan AR, Wollin M, Olch A, Bellotti J, Ingram M, and Skillen RG.**

The CT scanner as a therapy machine.

*Radiother Oncol.* 1990. 19: 337-343.

**Jackson RJ, Fuller GN, Abi-Said D, Lang FF, Gokaslan ZL, Shi WM, Wildrick DM, and Sawaya R.**

Limitations of stereotactic biopsy in the initial management of gliomas.

*Neuro Oncol.* 2001. 3: 193-200.

**Jaecle KA, Ballman KV, Rao RD, Jenkins RB, and Buckner JC.**

Current strategies in treatment of oligodendroglioma: evolution of molecular signatures of response.

*J Clin Oncol.* 2006. 24: 1246-1252.

**Joel DD, Fairchild RG, Laissue JA, Saraf SK, Kalef-Ezra JA, and Slatkin DN.**

Boron neutron capture therapy of intracerebral rat gliosarcomas.

*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990. 87: 9808-9812.

**Jonsson AC, Jonsson BA, Strand SE, Grafstrom G, and Spanne P.**

Cell survival after Auger electron emission from stable intracellular indium exposed to monochromatic synchrotron radiation.

*Acta Oncol.* 1996. 35: 947-952.

**Kageji T, Nagahiro S, Uyama S, Mizobuchi Y, Toi H, Nakamura M, and Nakagawa Y.**

Histopathological findings in autopsied glioblastoma patients treated by mixed neutron beam BNCT.

*J Neurooncol.* 2004. 68: 25-32.

**Kaiser MG, Parsa AT, Fine RL, Hall JS, Chakrabarti I, and Bruce JN.**

Tissue distribution and antitumor activity of topotecan delivered by intracerebral clysis in a rat glioma model.

*Neurosurgery.* 2000. 47: 1391-1398; discussion 1398-1399.

**Karim AB, Afra D, Cornu P, Bleehan N, Schraub S, De Witte O, Darcel F, Stenning S, Pierart M, and Van Glabbeke M.**

Randomized trial on the efficacy of radiotherapy for cerebral low-grade glioma in the adult: European Organization for Research and Treatment of Cancer Study 22845 with the Medical Research Council study BRO4: an interim analysis.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002. 52: 316-324.

**Karim AB, Maat B, Hatlevoll R, Menten J, Rutten EH, Thomas DG, Mascarenhas F, Horiot JC, Parvinen LM, van Reijn M, Jager JJ, Fabrini MG, van Alphen AM, Hamers HP, Gaspar L, Noordman E, Pierart M, and van Glabbeke M.**

A randomized trial on dose-response in radiation therapy of low-grade cerebral glioma: European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Study 22844.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996. 36: 549-556.

**Karnas SJ, Yu E, McGarry RC, and Battista JJ.**

Optimal photon energies for IUdR K-edge radiosensitization with filtered x-ray and radioisotope sources.

*Phys Med Biol.* 1999. 44: 2537-2549.

**Katori H, Baba Y, Imagawa Y, Nishimura G, Kagesato Y, Takagi E, Ishii A, Yanoma S, Maekawa R, Yoshioka T, Nagashima Y, Kato Y, and Tsukuda M.**

Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck.

*Cancer Lett.* 2002. 178: 151-159.

**Kawabata S, Miyatake S, Kajimoto Y, Kuroda Y, Kuroiwa T, Imahori Y, Kirihata M, Sakurai Y, Kobayashi T, and Ono K.**

The early successful treatment of glioblastoma patients with modified boron neutron capture therapy. Report of two cases.

*J Neurooncol.* 2003. 65: 159-165.

**Keles GE, Lamborn KR, and Berger MS.**

Low-grade hemispheric gliomas in adults: a critical review of extent of resection as a factor influencing outcome.

*J Neurosurg.* 2001. 95: 735-745.

**Keles GE, Lamborn KR, Chang SM, Prados MD, and Berger MS.**

Volume of residual disease as a predictor of outcome in adult patients with recurrent supratentorial glioblastomas multiforme who are undergoing chemotherapy.

*J Neurosurg.* 2004. 100: 41-46.

**Kelland LR.**

Overcoming resistance to platinum therapy in patients with advanced cancer.

*Am J Cancer.* 2002. 1: 247-255.

**Kesari S, Ramakrishna N, Sauvageot C, Stiles CD, and Wen PY.**

Targeted molecular therapy of malignant gliomas.

*Curr Neurol Neurosci Rep.* 2005. 5: 186-197.

**Kiger WS, 3rd, Lu XQ, Harling OK, Riley KJ, Binns PJ, Kaplan J, Patel H, Zamenhof RG, Shibata Y, Kaplan ID, Busse PM, and Palmer MR.**

Preliminary treatment planning and dosimetry for a clinical trial of neutron capture therapy using a fission converter epithermal neutron beam.

*Appl Radiat Isot.* 2004. 61: 1075-1081.

**Kimler BF, Liu C, Evans RG, and Morantz RA.**

Combination of aziridinybenzoquinone and cis-platinum with radiation therapy in the 9L rat brain tumor model.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993. 26: 445-450.

**Kleihues P, Burger PC, and Scheithauer BW.**

The new WHO classification of brain tumours.

*Brain Pathol.* 1993. 3: 255-268.

**Kleihues P, and Ohgaki H.**

Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis.  
*Neuro Oncol.* 1999. 1: 44-51.

**Klein JP, and Moeschberger ML.**

*Survival analysis techniques for censored and truncated data. 2nd ed.*  
New York: Springer, 2003.

**Koestner A, Swenberg JA, and Wechsler W.**

Transplacental production with ethylnitrosourea of neoplasms of the nervous system in Sprague-Dawley rats.  
*Am J Pathol.* 1971. 63: 37-56.

**Krex D, Klink B, Hartmann C, Deimling AV, Pietsch T, Simon M, Sabel M, Steinbach JP, Heese O, Reifenberger G, Weller M, and Schackert G.**

Long-term survival with glioblastoma multiforme.  
*Brain.* 2007.

**Kusak A.**

Microdosimétrie 3D pour la Thérapie par Micro- Faisceaux.  
Toulouse: Université Toulouse III Paul Sabatier, 2005.

**Kuznetsov YE, Caramanos Z, Antel SB, Preul MC, Leblanc R, Villemure JG, Pokrupa R, Olivier A, Sadikot A, and Arnold DL.**

Proton magnetic resonance spectroscopic imaging can predict length of survival in patients with supratentorial gliomas.  
*Neurosurgery.* 2003. 53: 565-574; discussion 574-566.

**Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, and Sawaya R.**

A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival.  
*J Neurosurg.* 2001. 95: 190-198.

**Laigle-Donadey F, and Sanson M.**

[Pattern of care of high-grade gliomas].  
*Rev Prat.* 2006. 56: 1779-1786.

**Laisue JA, Blattmann H, Di Michiel M, Slatkin DN, Lyubimova N, Guzman R, Werner Zimmermann W, Jaggy A, Smilowitz HM, Stettler R, Kircher P, Bley T, Brauer E, Stepanek J, Bravin A, Renier R, Le Duc G, Nemoz C, Thomlinson WC, and Wagner HP.**

The weanling piglet cerebellum: a surrogate for tolerance to MRT (Microbeam Radiation Therapy) in pediatric neuro-oncology.  
In: *SPIE's 46th annual meeting*, edited by *Roehrig HBBaH*. San Diego, California, USA: 2001, p. 65-73.

**Laissue JA, Geiser G, Spanne PO, Dilmanian FA, Gebbers JO, Geiser M, Wu XY, Makar MS, Micca PL, Nawrocky MM, Joel DD, and Slatkin DN.**

Neuropathology of ablation of rat gliosarcomas and contiguous brain tissues using a microplanar beam of synchrotron-wiggler-generated X rays.

*Int J Cancer*. 1998. 78: 654-660.

**Laissue JA, Lyubimova N, Wagner HP, Archer W, Slatkin DN, Di Michiel M, Nemoz C, Renier M, Brauer E, Spanne PO, Gebbers J-O, Dixon K, and Blattmann H.**

Microbeam radiation therapy.

In: *Part of the SPIE Conference on Medical Applications of Penetrating Radiation*. Denver: 1999, p. 38-45.

**Lanzetta G, Campanella C, Rozzi A, Nappa M, Costa A, Fedele F, Innocenzi G, Gagliardi FM, Salvati M, Minniti G, Frati A, Frati L, and Vecchione A.**

Temozolomide in radio-chemotherapy combined treatment for newly-diagnosed glioblastoma multiforme: phase II clinical trial.

*Anticancer Res*. 2003. 23: 5159-5164.

**Laperriere NJ, Leung PM, McKenzie S, Milosevic M, Wong S, Glen J, Pintilie M, and Bernstein M.**

Randomized study of brachytherapy in the initial management of patients with malignant astrocytoma.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998. 41: 1005-1011.

**Larson D, Bodell WJ, Ling C, Phillips TL, Schell M, Shrieve D, and Troxel T.**

Auger electron contribution to bromodeoxyuridine cellular radiosensitization.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989. 16: 171-176.

**Laster BH, Thomlinson WC, and Fairchild RG.**

Photon activation of iododeoxyuridine: biological efficacy of Auger electrons.

*Radiat Res*. 1993. 133: 219-224.

**Laster BH, Thomlinson WC, Kalef-Ezra J, Benary V, Popenoe EA, Bond VP, Gordon C, Warkentien L, Gmür N, Lazarz N, and Fairchild RG.**

The biological efficacy of induced Auger cascades: comparison of iodine and bromine as target atoms.

In: *Biophysical aspects of Auger processes*, edited by Howell RW, Narra VR, Sastry KSR, and Rao DV. Woodbury, NY: American Institute of physics, 1992, p. 91-105.

**Le Bas JF, Grand S, Kremer S, Tropres I, Jiang Z, Krainik A, Remy C, Berger F, and Benabid AL.**

[Perfusion MR imaging for initial diagnosis and follow-up of brain tumors].

*Neurochirurgie*. 2005. 51: 287-298.

**Le Duc G, Coan P, and Bravin A.**

Biomedical research at the ESRF : From DNA to human.

*Synchrotron radiation News*. 2007. 20: 25-31.

- Le Duc G, Corde S, Charvet AM, Elleaume H, Farion R, Le Bas JF, and Esteve F.**  
In vivo measurement of gadolinium concentration in a rat glioma model by monochromatic quantitative computed tomography: comparison between gadopentetate dimeglumine and gadobutrol.  
*Invest Radiol.* 2004. 39: 385-393.
- Le Sech C, Frohlich H, Saint-Marc C, and Charlier M.**  
DNA breakage upon K-shell excitation of phosphorus as a model for direct effects in radiation biology.  
*Radiat Res.* 1996. 145: 632-635.
- Le Sech C, Takakura K, Saint-Marc C, Frohlich H, Charlier M, Usami N, and Kobayashi K.**  
Enhanced strand break induction of DNA by resonant metal-innershell photoabsorption.  
*Can J Physiol Pharmacol.* 2001. 79: 196-200.
- Leighton C, Fisher B, Bauman G, Depiero S, Stitt L, MacDonald D, and Cairncross G.**  
Supratentorial low-grade glioma in adults: an analysis of prognostic factors and timing of radiation.  
*J Clin Oncol.* 1997. 15: 1294-1301.
- Lonardi S, Tosoni A, and Brandes AA.**  
Adjuvant chemotherapy in the treatment of high grade gliomas.  
*Cancer Treat Rev.* 2005. 31: 79-89.
- Louis D.**  
Molecular pathology of malignant gliomas.  
*Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2006. 1: 97-117.
- Maezawa H, Hieda K, Kobayashi K, Furusawa Y, Mori T, Suzuki K, and Ito T.**  
Effects of monoenergetic X-rays with resonance energy of bromine K-absorption edge on bromouracil-labelled E. coli cells.  
*Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1988. 53: 301-308.
- Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, Rowitch DH, Louis DN, Cavenee WK, and DePinho RA.**  
Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter.  
*Genes Dev.* 2001. 15: 1311-1333.
- Mathieu D, Lecomte R, Tsanaclis AM, Larouche A, and Fortin D.**  
Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model.  
*Can J Neurol Sci.* 2007. 34: 296-306.
- McDermott MW, Berger MS, Kunwar S, Parsa AT, Sneed PK, and Larson DA.**  
Stereotactic radiosurgery and interstitial brachytherapy for glial neoplasms.  
*J Neurooncol.* 2004. 69: 83-100.

**McGirt MJ, Woodworth GF, Coon AL, Frazier JM, Amundson E, Garonzik I, Olivi A, and Weingart JD.**

Independent predictors of morbidity after image-guided stereotactic brain biopsy: a risk assessment of 270 cases.

*J Neurosurg.* 2005. 102: 897-901.

**Mclaughlin WL, Yundong C, Soares CG, Miller A, Vandyk G, and Lewis DF.**

Sensitometry of the Response of a New Radiochromic Film Dosimeter to Gamma-Radiation and Electron-Beams.

*Nucl Instrum Meth A.* 1991. 302: 165-176.

**Mehta MP, and Suh JH.**

Novel radiosensitizers for tumors of the central nervous system.

*Curr Opin Investig Drugs.* 2004. 5: 1284-1291.

**Metcalf SE, and Grant R.**

Biopsy versus resection for malignant glioma.

*Cochrane Database Syst Rev.* 2001. CD002034.

**Meyer FB, Bates LM, Goerss SJ, Friedman JA, Windschitl WL, Duffy JR, Perkins WJ, and O'Neill BP.**

Awake craniotomy for aggressive resection of primary gliomas located in eloquent brain.

*Mayo Clin Proc.* 2001. 76: 677-687.

**Miller RA, Woodburn K, Fan Q, Renschler MF, Sessler JL, and Koutcher JA.**

In vivo animal studies with gadolinium (III) texaphyrin as a radiation enhancer.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999. 45: 981-989.

**Miller RW, DeGraff W, Kinsella TJ, and Mitchell JB.**

Evaluation of incorporated iododeoxyuridine cellular radiosensitization by photon activation therapy.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987a. 13: 1193-1197.

**Miller RW, DeGraff W, Mitchell JB, and Kinsella TJ.**

Photon activation therapy (PAT).

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987b. 13: 1429.

**Mittler MA, Walters BC, and Stopa EG.**

Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies.

*J Neurosurg.* 1996. 85: 1091-1094.

**Miura M, Blattmann H, Brauer-Krisch E, Bravin A, Hanson AL, Nawrocky MM, Micca PL, Slatkin DN, and Laissue JA.**

Radiosurgical palliation of aggressive murine SCCVII squamous cell carcinomas using synchrotron-generated X-ray microbeams.

*Br J Radiol.* 2006. 79: 71-75.

**Morrison PF, Laske DW, Bobo H, Oldfield EH, and Dedrick RL.**

High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics.

*Am J Physiol.* 1994. 266: R292-305.

**Murphy PS, Viviers L, Abson C, Rowland IJ, Brada M, Leach MO, and Dzik-Jurasz AS.**

Monitoring temozolomide treatment of low-grade glioma with proton magnetic resonance spectroscopy.

*Br J Cancer.* 2004. 90: 781-786.

**Nath R, Bongiorno P, and Rockwell S.**

Enhancement of IUdR radiosensitization by low energy photons.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1987. 13: 1071-1079.

**Nath R, Bongiorno P, Rossi PI, and Rockwell S.**

Enhanced Iudr Radiosensitization by Am-241 Photons Relative to Ra-226 and I-125 Photons at 0.72 Gy/Hr.

*Int J Radiat Oncol.* 1990. 18: 1377-1385.

**Nimsky C, Ganslandt O, Von Keller B, Romstock J, and Fahlbusch R.**

Intraoperative high-field-strength MR imaging: implementation and experience in 200 patients.

*Radiology.* 2004. 233: 67-78.

**Ning S, Yu N, Brown DM, Kanekal S, and Knox SJ.**

Radiosensitization by intratumoral administration of cisplatin in a sustained-release drug delivery system.

*Radiother Oncol.* 1999. 50: 215-223.

**Norden AD, and Wen PY.**

Glioma therapy in adults.

*Neurologist.* 2006. 12: 279-292.

**Norman D, Stevens EA, Wing SD, Levin V, and Newton TH.**

Quantitative aspects of contrast enhancement in cranial computed tomography.

*Radiology.* 1978. 129: 683-688.

**O'Donoghue JA, and Wheldon TE.**

Targeted radiotherapy using Auger electron emitters.

*Phys Med Biol.* 1996. 41: 1973-1992.

**Oh J, Henry RG, Pirzkall A, Lu Y, Li X, Catalaa I, Chang S, Dillon WP, and Nelson SJ.**

Survival analysis in patients with glioblastoma multiforme: predictive value of choline-to-N-acetylaspartate index, apparent diffusion coefficient, and relative cerebral blood volume.

*J Magn Reson Imaging.* 2004. 19: 546-554.

**Okamoto Y, Di Patre PL, Burkhard C, Horstmann S, Jourde B, Fahey M, Schuler D, Probst-Hensch NM, Yasargil MG, Yonekawa Y, Lutolf UM, Kleihues P, and Ohgaki H.**

Population-based study on incidence, survival rates, and genetic alterations of low-grade diffuse astrocytomas and oligodendrogliomas.

*Acta Neuropathol (Berl).* 2004. 108: 49-56.

**Orion I, Rosenfeld AB, Dilmanian FA, Telang F, Ren B, and Namito Y.**

Monte Carlo simulation of dose distributions from a synchrotron-produced microplanar beam array using the EGS4 code system.

*Physics in Medicine and Biology*. 2000. 45: 2497-2508.

**Pace A, Vidiri A, Galie E, Carosi M, Telera S, Cianciulli AM, Canalini P, Giannarelli D, Jandolo B, and Carapella CM.**

Temozolomide chemotherapy for progressive low-grade glioma: clinical benefits and radiological response.

*Ann Oncol*. 2003. 14: 1722-1726.

**Patel GR.**

An investigation into the feasibility of Bismuth, Z=83 as an agent for Synchrotron based Photon Activation Therapy.

Grenoble: 2006.

**Paxinos G, and Watson C.**

*The rat brain in stereotaxic coordinates*.

New York: Academic Press, 1986.

**Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R, Therasse P, Afra D, Cornu P, Bolla M, Vecht C, and Karim AB.**

Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma.

*J Clin Oncol*. 2002. 20: 2076-2084.

**Pirzkall A, Li X, Oh J, Chang S, Berger MS, Larson DA, Verhey LJ, Dillon WP, and Nelson SJ.**

3D MRSI for resected high-grade gliomas before RT: tumor extent according to metabolic activity in relation to MRI.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004. 59: 126-137.

**Pirzkall A, McKnight TR, Graves EE, Carol MP, Sneed PK, Wara WW, Nelson SJ, Verhey LJ, and Larson DA.**

MR-spectroscopy guided target delineation for high-grade gliomas.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001. 50: 915-928.

**Pirzkall A, Nelson SJ, McKnight TR, Takahashi MM, Li X, Graves EE, Verhey LJ, Wara WW, Larson DA, and Sneed PK.**

Metabolic imaging of low-grade gliomas with three-dimensional magnetic resonance spectroscopy.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002. 53: 1254-1264.

**Pontvert D, Gaboriaud G, and Gouders D.**

Radiothérapie des tumeurs cérébrales.

In: *Tumeurs cérébrales : Du diagnostic au traitement*, edited by Masson. Paris: Jacques Philippon, 2004.

**Prasad G, Wang H, Hill DL, and Zhang R.**

Recent advances in experimental molecular therapeutics for malignant gliomas.

*Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2004. 4: 347-361.

**Quinn JA, Reardon DA, Friedman AH, Rich JN, Sampson JH, Provenzale JM, McLendon RE, Gururangan S, Bigner DD, Herndon JE, 2nd, Avgeropoulos N, Finlay J, Tourt-Uhlig S, Affronti ML, Evans B, Stafford-Fox V, Zaknoen S, and Friedman HS.**  
Phase II trial of temozolomide in patients with progressive low-grade glioma.  
*J Clin Oncol.* 2003. 21: 646-651.

**Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, 2nd, Cokgor I, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Regalado LV, Sampson JH, Shafman TD, Wikstrand CJ, Wong TZ, Zhao XG, Zalutsky MR, and Bigner DD.**  
Phase II trial of murine (131)I-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 administered into surgically created resection cavities of patients with newly diagnosed malignant gliomas.  
*J Clin Oncol.* 2002. 20: 1389-1397.

**Reardon DA, Akabani G, Coleman RE, Friedman AH, Friedman HS, Herndon JE, 2nd, McLendon RE, Pegram CN, Provenzale JM, Quinn JA, Rich JN, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Gururangan S, Badruddoja M, Dowell JM, Wong TZ, Zhao XG, Zalutsky MR, and Bigner DD.**  
Salvage radioimmunotherapy with murine iodine-131-labeled antitenascin monoclonal antibody 81C6 for patients with recurrent primary and metastatic malignant brain tumors: phase II study results.  
*J Clin Oncol.* 2006. 24: 115-122.

**Reardon DA, Egorin MJ, Quinn JA, Rich JN, Gururangan S, Vredenburgh JJ, Desjardins A, Sathornsumetee S, Provenzale JM, Herndon JE, 2nd, Dowell JM, Badruddoja MA, McLendon RE, Lagattuta TF, Kicielinski KP, Dresemann G, Sampson JH, Friedman AH, Salvado AJ, and Friedman HS.**  
Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme.  
*J Clin Oncol.* 2005. 23: 9359-9368.

**Redgate ES, Deutsch M, and Boggs SS.**  
Time of death of CNS tumor-bearing rats can be reliably predicted by body weight-loss patterns.  
*Lab Anim Sci.* 1991. 41: 269-273.

**Regnard P, Bräuer-Krisch E, Troprès I, Keyrilainen J, Bravin A, and Le Duc G.**  
Enhancement of survival of 9L gliosarcoma bearing rats following intracerebral delivery of drugs in combination with Microbeam Radiation Therapy.  
*European Journal of Radiology.* Soumis-a.

**Regnard P, Le Duc G, Bräuer-Krisch E, Troprès I, Siegbahn EA, Kusak A, Clair C, Bernard H, Dallery D, Laissue JA, and Bravin A.**  
Irradiation of intracerebral 9L gliosarcoma by a single array of microplanar X-ray beams from a synchrotron : balance between curing and sparing.  
*Phys Med Biol.,* Soumis-b.

**Reidy MA, and Schwartz SM.**

Endothelial regeneration. III. Time course of intimal changes after small defined injury to rat aortic endothelium.

*Lab Invest.* 1981. 44: 301-308.

**Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancy JE, McLendon RE, Kao JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Uhlig SE, Herndon JE, 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, and Friedman HS.**

Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma.

*J Clin Oncol.* 2004. 22: 133-142.

**Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, Fisher B, Fulton D, Gulavita S, Hao C, Husain S, Murtha A, Petruk K, Stewart D, Tai P, Urtasun R, Cairncross JG, and Forsyth P.**

Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial.

*J Clin Oncol.* 2004. 22: 1583-1588.

**Rose JH, Norman A, Ingram M, Aoki C, Solberg T, and Mesa A.**

First radiotherapy of human metastatic brain tumors delivered by a computerized tomography scanner (CTRx).

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999. 45: 1127-1132.

**Rousseau J, Boudou C, Barth RF, Balosso J, Esteve F, and Elleaume H.**

Enhanced survival and cure of F98 glioma-bearing rats following intracerebral delivery of carboplatin in combination with photon irradiation.

*Clin Cancer Res.* 2007a. 13: 5195-5201.

**Rousseau J, Boudou C, Esteve F, and Elleaume H.**

Convection-enhanced delivery of an iodine tracer into rat brain for synchrotron stereotactic radiotherapy.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007b. 68: 943-951.

**Sanai N, Alvarez-Buylla A, and Berger MS.**

Neural stem cells and the origin of gliomas.

*N Engl J Med.* 2005. 353: 811-822.

**Sanson M, Cartalat-Carel S, Taillibert S, Napolitano M, Djafari L, Cougnard J, Gervais H, Laigle F, Carpentier A, Mokhtari K, Taillandier L, Chinot O, Duffau H, Honnorat J, Hoang-Xuan K, and Delattre JY.**

Initial chemotherapy in gliomatosis cerebri.

*Neurology.* 2004. 63: 270-275.

**Santos Mello R, Callisen H, Winter J, Kagan AR, and Norman A.**

Radiation dose enhancement in tumors with iodine.

*Med Phys.* 1983. 10: 75-78.

**Schmiddek HH, Nielsen SL, Schiller AL, and Messer J.**

Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea.  
*J Neurosurg.* 1971. 34: 335-340.

**Schweizer PM, Spanne P, Di Michiel M, Jauch U, Blattmann H, and Laissue JA.**

Tissue lesions caused by microplanar beams of synchrotron-generated X-rays in *Drosophila melanogaster*.  
*Int J Radiat Biol.* 2000. 76: 567-574.

**Screnci D, and McKeage MJ.**

Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches.  
*J Inorg Biochem.* 1999. 77: 105-110.

**Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, Malkin MG, Mealey JJ, Jr., Neal JH, Olson J, Robertson JT, Barnett GH, Bloomfield S, Albright R, Hochberg FH, Hiesiger E, and Green S.**

The Brain Tumor Cooperative Group NIH Trial 87-01: a randomized comparison of surgery, external radiotherapy, and carmustine versus surgery, interstitial radiotherapy boost, external radiation therapy, and carmustine.  
*Neurosurgery.* 2002. 51: 343-355; discussion 355-347.

**Senger D, Cairncross JG, and Forsyth PA.**

Long-term survivors of glioblastoma: statistical aberration or important unrecognized molecular subtype?  
*Cancer J.* 2003. 9: 214-221.

**Serduc R.**

Effets de la radiothérapie par microfaisceaux synchrotron sur la microvascularisation cérébrale saine et tumorale chez la souris.  
In: *Génie Biologique et Médical*. Grenoble: Université Joseph Fourier Grenoble 1, 2006a.

**Serduc R, Verant P, Vial JC, Farion R, Rocas L, Remy C, Fadlallah T, Brauer E, Bravin A, Laissue J, Blattmann H, and van der Sanden B.**

In vivo two-photon microscopy study of short-term effects of microbeam irradiation on normal mouse brain microvasculature.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006b. 64: 1519-1527.

**Shapiro WR, Green SB, Burger PC, Mahaley MS, Jr., Selker RG, VanGilder JC, Robertson JT, Ransohoff J, Mealey J, Jr. and Strike TA.**

Randomized trial of three chemotherapy regimens and two radiotherapy regimens and two radiotherapy regimens in postoperative treatment of malignant glioma. Brain Tumor Cooperative Group Trial 8001.  
*J Neurosurg.* 1989. 71: 1-9.

**Shaw E, Arusell R, Scheithauer B, O'Fallon J, O'Neill B, Dinapoli R, Nelson D, Earle J, Jones C, Cascino T, Nichols D, Ivnik R, Hellman R, Curran W, and Abrams R.**

Prospective randomized trial of low- versus high-dose radiation therapy in adults with supratentorial low-grade glioma: initial report of a North Central Cancer Treatment Group/Radiation Therapy Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study.  
*J Clin Oncol.* 2002. 20: 2267-2276.

**Shinohara K, Ito T, Ito A, Hieda K, Kobayashi K, and Okada S.**

An approach to the use of synchrotron radiation for investigating radiation effects on cultured mammalian cells in the range from 160 to 254 nm.  
*Radiat Res.* 1984. 97: 211-215.

**Shinohara K, Ohara H, Kobayashi K, Maezawa H, Hieda K, Okada S, and Ito T.**

Enhanced killing of HeLa cells pre-labeled with 5-bromodeoxyuridine by monochromatic synchrotron radiation at 0.9 Å: an evidence for Auger enhancement in mammalian cells.  
*J Radiat Res (Tokyo).* 1985. 26: 334-338.

**Siegbahn E.**

Dosimetric measurements and calculations for synchrotron x-ray microbeam radiation therapy.  
In: *Physique*. Munich: Technische Universität München, 2007.

**Siegbahn EA, Stepanek J, Brauer-Krisch E, and Bravin A.**

Determination of dosimetric quantities used in microbeam radiation therapy (MRT) with Monte Carlo simulations.  
*Med Phys.* 2006. 33: 3248-3259.

**Sikorski CW, and Lesniak MS.**

Immunotherapy for malignant glioma: current approaches and future directions.  
*Neurol Res.* 2005. 27: 703-716.

**Slatkin DN.**

Uniaxial and biaxial irradiation protocols for microbeam radiation therapy.  
*Phys Med Biol.* 2004. 49: N203-204.

**Slatkin DN.**

Tetrahedral irradiation protocol for microbeam radiation therapy.  
*Phys Med Biol.* 2006. 51: N295-297.

**Inventeurs: Slatkin DN, Dilmanian FA, and Spanne PO; Cessionaire: The United States of America represented by the United States Department of the Energy, Washington, D.C.**

Method for microbeam radiation therapy.  
United States patent US 005339347. 1994 Aug 16.

**Slatkin DN, Spanne P, Dilmanian FA, Gebbers JO, and Laissue JA.**

Subacute neuropathological effects of microplanar beams of x-rays from a synchrotron wiggler.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995. 92: 8783-8787.

**Slatkin DN, Spanne P, Dilmanian FA, and Sandborg M.**

Microbeam radiation therapy.

*Med Phys.* 1992. 19: 1395-1400.

**Smilowitz HM, Blattmann H, Brauer-Krisch E, Bravin A, Di Michiel M, Gebbers JO, Hanson AL, Lyubimova N, Slatkin DN, Stepanek J, and Laissue JA.**

Synergy of gene-mediated immunoprophylaxis and microbeam radiation therapy for advanced intracerebral rat 9L gliosarcomas.

*J Neurooncol.* 2006. 78: 135-143.

**Solberg TD, Iwamoto KS, and Norman A.**

Calculation of radiation dose enhancement factors for dose enhancement therapy of brain tumours.

*Phys Med Biol.* 1992a. 37: 439-443.

**Solberg TD, and Norman A.**

Monoenergetic X-rays phototherapy of brain tumors.

In: *Workshop on medical Applications of synchrotron radiation.* Grenoble, France: 2001, p. 29-31 (Abstract).

**Solberg TD, Wallace RE, Norman A, and Iwamoto KS.**

Synchrotron Radiation for dose enhancement therapy of brain tumors.

In: *40<sup>th</sup> ann meeting of the radiation research society:* 1992b, p. 55.

**Sollier A.**

Etude de faisabilité de mesures dosimétriques à l'aide d'une chambre d'ionisation en Microbeam Radiation therapy.

In: *Ingénierie pour la Santé et le Médicament Spécialité Physique Qualité Radioprotection.* Grenoble: Université Joseph Fourier, 2006.

**Souhami L, Seiferheld W, Brachman D, Podgorsak EB, Werner-Wasik M, Lustig R, Schultz CJ, Sause W, Okunieff P, Buckner J, Zamorano L, Mehta MP, and Curran WJ, Jr.**

Randomized comparison of stereotactic radiosurgery followed by conventional radiotherapy with carmustine to conventional radiotherapy with carmustine for patients with glioblastoma multiforme: report of Radiation Therapy Oncology Group 93-05 protocol.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004. 60: 853-860.

**Stark-Vance V.**

Bevacizumab and CPT-11 in the treatment of relapsed malignant glioma.

*Neuro-Oncology.* 2005. 7: 369-369.

**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.

**Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, and Reulen HJ.**  
Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial.  
*Lancet Oncol.* 2006. 7: 392-401.

**Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, and Leyvraz S.**  
Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide.  
*J Clin Oncol.* 2002. 20: 1375-1382.

**Stupp R, Gander M, Leyvraz S, and Newlands E.**  
Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours.  
*Lancet Oncol.* 2001. 2: 552-560.

**Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, and Cairncross JG.**  
Changing paradigms--an update on the multidisciplinary management of malignant glioma.  
*Oncologist.* 2006. 11: 165-180.

**Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, and Mirimanoff RO.**  
Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.  
*N Engl J Med.* 2005. 352: 987-996.

**Suortti P, Fiedler S, Bravin A, Brochard T, Mattenet M, Renier M, Spanne P, Thomlinson W, Charvet AM, Elleaume H, Schulze-Briese C, and Thompson AC.**  
Fixed-exit monochromator for computed tomography with synchrotron radiation at energies 18-90 keV.  
*Journal of Synchrotron Radiation.* 2000. 7: 340-347.

**Suortti P, and Thomlinson W.**  
Medical applications of synchrotron radiation.  
*Physics in Medicine and Biology.* 2003. 48: R1-35.

**Taphoorn MJ.**  
Neurocognitive sequelae in the treatment of low-grade gliomas.  
*Semin Oncol.* 2003. 30: 45-48.

**Thomlinson W, Berkvens P, Berruyer G, Bertrand B, Blattmann H, Brauer-Krisch E, Brochard T, Charvet AM, Corde S, Di Michiel M, Elleaume H, Esteve F, Fiedler S, Laissue JA, Le Bas JF, Le Duc G, Lyubimova N, Nemoz C, Renier M, Slatkin DN, Spanne P, and Suortti P.**  
Research at the European Synchrotron Radiation Facility medical beamline.  
*Cell Mol Biol.* 2000. 46: 1053-1063.

**Tisljar-Lentulis G, and Feinendegen LE.**

The bromine enhancement ratio in mammalian cells in vitro and experimental mouse tumours.  
*Curr Top Radiat Res Q.* 1978. 12: 526-536.

**Tisljar-Lentulis G, Feinendegen LE, and Bond VP.**

[Biological radiation effects of inclusion of moderately heavy nuclei into the tissue and use of soft roentgen rays].  
*Strahlentherapie.* 1973. 145: 656-662.

**Tropres I, Grimault S, Vaeth A, Grillon E, Julien C, Payen JF, Lamalle L, and Decorps M.**

Vessel size imaging.  
*Magn Reson Med.* 2001. 45: 397-408.

**Tsao MN, Mehta MP, Whelan TJ, Morris DE, Hayman JA, Flickinger JC, Mills M, Rogers CL, and Souhami L.**

The American Society for Therapeutic Radiology and Oncology (ASTRO) evidence-based review of the role of radiosurgery for malignant glioma.  
*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005. 63: 47-55.

**Tysnes BB, and Mahesparan R.**

Biological mechanisms of glioma invasion and potential therapeutic targets.  
*J Neurooncol.* 2001. 53: 129-147.

**Usami N, Kobayashi K, Maezawa H, Hieda K, and Ishizaka S.**

Biological effects of Auger processes of bromine on yeast cells induced by monochromatic synchrotron X-rays.  
*Int J Radiat Biol.* 1991. 60: 757-768.

**van den Bent MJ, Afra D, de Witte O, Ben Hassel M, Schraub S, Hoang-Xuan K, Malmstrom PO, Collette L, Pierart M, Mirimanoff R, and Karim AB.**

Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial.  
*Lancet.* 2005. 366: 985-990.

**van den Bent MJ, Kros JM, Heimans JJ, Pronk LC, van Groenigen CJ, Krouwer HG, Taphoorn MJ, Zonnenberg BA, Tijssen CC, Twijnstra A, Punt CJ, and Boogerd W.**

Response rate and prognostic factors of recurrent oligodendroglioma treated with procarbazine, CCNU, and vincristine chemotherapy. Dutch Neuro-oncology Group.  
*Neurology.* 1998. 51: 1140-1145.

**Vogler H, Platzek J, Schuhmann-Giampieri G, Frenzel T, Weinmann HJ, Raduchel B, and Press WR.**

Pre-clinical evaluation of gadobutrol: a new, neutral, extracellular contrast agent for magnetic resonance imaging.  
*Eur J Radiol.* 1995. 21: 1-10.

**Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., Norrell HA, Owens G, Ransohoff J, Wilson CB, Gehan EA, and Strike TA.**

Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial.

*J Neurosurg.* 1978. 49: 333-343.

**Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Jr., Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., Owens G, Ransohoff J, 2nd, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR, Jr., Wilson CB, and Strike TA.**

Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery.

*N Engl J Med.* 1980. 303: 1323-1329.

**Wasserfallen JB, Ostermann S, Pica A, Mirimanoff RO, Leyvraz S, Villemure JG, and Stupp R.**

Can we afford to add chemotherapy to radiotherapy for glioblastoma multiforme? Cost-identification analysis of concomitant and adjuvant treatment with temozolomide until patient death.

*Cancer.* 2004. 101: 2098-2105.

**Wen PY, Kesari S, and Drappatz J.**

Malignant gliomas: strategies to increase the effectiveness of targeted molecular treatment.

*Expert Rev Anticancer Ther.* 2006a. 6: 733-754.

**Wen PY, Yung WK, Lamborn KR, Dahia PL, Wang Y, Peng B, Abrey LE, Raizer J, Cloughesy TF, Fink K, Gilbert M, Chang S, Junck L, Schiff D, Lieberman F, Fine HA, Mehta M, Robins HI, DeAngelis LM, Groves MD, Puduvalli VK, Levin V, Conrad C, Maher EA, Aldape K, Hayes M, Letvak L, Egorin MJ, Capdeville R, Kaplan R, Murgu AJ, Stiles C, and Prados MD.**

Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08.

*Clin Cancer Res.* 2006b. 12: 4899-4907.

**Wilkins DE, Raaphorst GP, Saunders JK, Sutherland GR, and Smith IC.**

Correlation between Gd-enhanced MR imaging and histopathology in treated and untreated 9L rat brain tumors.

*Magn Reson Imaging.* 1995. 13: 89-96.

**Yamanaka R, Homma J, Yajima N, Tsuchiya N, Sano M, Kobayashi T, Yoshida S, Abe T, Narita M, Takahashi M, and Tanaka R.**

Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial.

*Clin Cancer Res.* 2005. 11: 4160-4167.

**Yang W, Barth RF, Rotaru JH, Moeschberger ML, Joel DD, Nawrocky MM, and Goodman JH.**

Enhanced survival of glioma bearing rats following boron neutron capture therapy with blood-brain barrier disruption and intracarotid injection of boronophenylalanine.

*J Neurooncol.* 1997. 33: 59-70.

**Yuan H, Gaber MW, McColgan T, Naimark MD, Kiani MF, and Merchant TE.**  
Radiation-induced permeability and leukocyte adhesion in the rat blood-brain barrier:  
modulation with anti-ICAM-1 antibodies.  
*Brain Res.* 2003. 969: 59-69.

**Zacharoulis S, and Kieran MW.**  
Treatment of low-grade gliomas in children: an update.  
*Expert Rev Neurother.* 2004. 4: 1005-1014.

**Zeitoumy M.**  
Dosimétrie pour la MRT à l'aide d'une chambre d'ionisation.  
Toulouse: Université Toulouse III Paul Sabatier, 2007.

**Zeman W.**  
Radiosensitivities of nervous tissues.  
*Brookhaven Symp Biol.* 1961a. 14: 176-199.

**Zeman W, Curtis HJ, and Baker CP.**  
Histopathologic effect of high-energy-particle microbeams on the visual cortex of the mouse  
brain.  
*Radiat Res.* 1961b. 15: 496-514.