



Evaluation de l'IRM multiparamétrique comme indicateur de l'effet de thérapies anti-angiogéniques sur des modèles de gliomes implantés chez le rat

Benjamin Lemasson

► To cite this version:

Benjamin Lemasson. Evaluation de l'IRM multiparamétrique comme indicateur de l'effet de thérapies anti-angiogéniques sur des modèles de gliomes implantés chez le rat. Imagerie. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00908915

HAL Id: tel-00908915

<https://theses.hal.science/tel-00908915>

Submitted on 25 Nov 2013

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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Pharmacologie, physiologie et physiopathologie

Présentée par

Benjamin Lemasson

**Evaluation de l'IRM multiparamétrique comme indicateur
de l'effet de thérapies anti-angiogéniques sur des modèles
de gliomes implantés chez le rat**

Soutenue le 8 janvier 2010

Directeur de thèse :

Dr Chantal Rémy

JURY

Rapporteur & Examineur :

Président du jury	Xavier Lerverve	(Grenoble)
Rapporteurs	Jérôme Honnorat	(Lyon)
	Jean-Michel Franconi	(Bordeaux)
Examineurs	Philippe Genne	(Dijon)
	Jean Bénard	(Paris)
Directeur de thèse	Chantal Rémy	(Grenoble)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les deux partenaires qui ont permis la réalisation de cette thèse, à savoir d'une part *Oncodesign* Biotechnology et son directeur général Philippe Genne et d'autre part, l'équipe 5 de l'unité U836 et son directeur Christoph Segebarth. C'est grâce à ce partenariat que ma thèse a pu avoir lieu dans le cadre d'une convention CIFRE.

Je remercie les rapporteurs de cette thèse Jérôme Honnorat et Jean Michel Franconi pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Merci également aux autres membres du jury qui ont accepté de juger ce travail : Philippe Genne, Jean Bénard et Xavier Leverage.

Je tiens à remercier tout particulièrement Chantal qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mon stage de Master 2. Tout au long de ces trois années, sa grande disponibilité et sa patience m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions. Durant ces 3 ans, elle a su m'enseigner tant bien que mal sa rigueur scientifique qui je le pense, enfin je l'espère, ne me quittera plus tout au long de ma carrière. Je souhaite aussi la remercier pour m'avoir donné autant de liberté dans mes travaux, ce qui m'a donné confiance en moi et permis de mieux appréhender les différentes facettes du métier de chercheur. Pour finir, je voulais lui dire un grand MERCI pour ses nombreuses lectures, relectures, corrections et modifications de tous mes écrits et spécialement lors de la rédaction de ce manuscrit!

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans l'active participation d'Emmanuel. Il a énormément contribué à la réalisation de ce projet de par ses larges connaissances, sa réactivité et son enthousiasme de tous les jours. Je pense sincèrement qu'il fera un très bon directeur de laboratoire.

Je tenais à remercier toutes les personnes qui ont travaillé sur ce projet à *Oncodesign* et en particulier Olivier et Xavier. Ils ont su m'enseigner les pratiques et les rigueurs d'entreprises, domaines qui m'étaient totalement inconnus. Je tenais aussi à les remercier pour m'avoir donné une grande liberté dans mes travaux de recherche, ce qui m'a permis de développer et d'approfondir mes idées.

Je ne peux pas oublier Samuel qui m'a fait découvrir le monde de la recherche. Il a su me transmettre son enthousiasme pour la recherche et m'a ainsi donné l'envie de poursuivre mon travail entrepris en Master II.

Bien entendu, mon travail n'aurait pas eu lieu sans la contribution de nombreux

stagiaires à savoir Nadège, Pierre, Ariana, Cécile et Audrey (pas vraiment ma stagiaire... mais pas loin).

Je voulais porter une attention particulière à Régine et Marie-Claude. Merci à toi Régine d'avoir toujours été présente, volontaire et motivée pour participer à tous mes projets. Tu as su aussi me montrer et m'enseigner les « bonnes pratiques de laboratoire » qui, je l'espère, pourront être appliquées dans mon futur labo. Marie Claude, ça a toujours été un plaisir de venir dans ton bureau. Que serait le labo sans toi...? Sans doute un navire qui prendrait l'eau ! Un grand merci à toi pour avoir pris en main extrêmement rapidement, toutes mes demandes (pas toujours réalisées selon les procédures...)

Un grand merci à tous les collègues thésards de l'équipe ! Bien entendu les anciens du pavillon B comme Marine et Raphaël qui m'ont permis de découvrir le laboratoire. Je ne vais surtout pas oublier tous les autres thésards du GIN : Nico (dit « le Matlabreur »), Franck (dit « le boggleur »), Seb (dit « le fou du clavier ») et Tom (dit « Mr Oxygène »). L'avenir me fera peut-être mentir, mais je ne pense pas retrouver ailleurs une aussi bonne ambiance que celle de ces 3 dernières années. Un grand merci à vous tous !!!

Je remercie mes parents, en particulier mon père, qui a contribué à la relecture de la version finale de ma thèse.

Pour finir, tout ce travail n'aurait pas pu avoir lieu sans le soutien inconditionnel de ma femme. Elle m'a suivi et soutenu depuis le 1^{er} jour de cette thèse jusqu'à la lecture et la correction de la dernière page de ce manuscrit. Elle a toujours été derrière moi à me pousser et ce, malgré les nombreux week-ends passés au labo, une grossesse et l'accouchement d'Ethan un mois avant de rendre ce manuscrit !

Préface

Avant tout, je tiens à resituer le contexte qui a conduit à la réalisation de ces travaux. Je suis arrivé, en janvier 2006, en stage de Master II spécialité Biologie Cellulaire et Intégrative dans l'unité INSERM U594 (qui est devenue par la suite l'équipe 5 du Grenoble Institut des Neurosciences, GIN) sous la direction du Dr Samuel Valable. Il est important de noter que, bien avant mon arrivée dans le laboratoire, il existait une étroite collaboration entre l'unité INSERM U594 de Grenoble et l'entreprise *Oncodesign* Biotechnology située à Dijon.

L'équipe 5 du GIN, dirigée par Dr Christoph Segebarth, est composée principalement de physiciens. Cette équipe a pour principal objectif de développer de nouvelles méthodologies d'imagerie par résonance magnétique (IRM) chez le petit animal et chez l'homme. Au sein de cette grosse équipe, les Drs Chantal Rémy et Emmanuel Barbier se sont spécialisés dans le développement et l'évaluation de nouvelles cartographies de la microvascularisation cérébrale par IRM. Ces nouveaux développements méthodologiques sont appliqués à différentes pathologies dont les tumeurs cérébrales chez le rongeur.

Oncodesign Biotechnology, présidée par Dr Philippe Genne, est une entreprise composée principalement de biologistes et de pharmacologues. Cette entreprise est spécialisée entre autre dans la découverte et l'évaluation de nouvelles molécules anti-tumorales. Parmi tous les types de tumeurs étudiées, *Oncodesign*, avec entre autres Oliver Duchamp et Dr Xavier Tizon, est spécialisée dans l'étude des tumeurs cérébrales. L'entreprise était intéressée par l'utilisation de l'IRM, en tant qu'outil non invasif, pour suivre des thérapies chez le petit animal porteur de tumeur. Elle a donc acquis une IRM, peu de temps avant le début de cette thèse.

C'est grâce à cette complémentarité des spécialités (physiciens et pharmacologues) regroupées autour d'une même pathologie, les tumeurs cérébrales, qu'est né ce partenariat. Cette collaboration a permis la réalisation de plusieurs projets scientifiques, bien avant mon arrivée en stage de Master II.

C'est dans ce contexte que j'ai pu réaliser ma thèse dans le cadre d'une convention CIFRE entre d'une part un laboratoire public, l'équipe 5 du GIN, et d'autre part une entreprise privée *Oncodesign* Biotechnology.

LISTE DES ACRONYMES ET ABREVIATIONS

ADC	<i>Apparent Diffusion Coefficient of water</i>
AIF	<i>Arterial input function</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Ang-2	Angopoiétine-2
BHE	Barrière hémato-encéphalique
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BSA	Albumine sérique de bœuf
BVf	<i>Blood Volume fraction</i>
CBTRUS	<i>Central Brain Tumor Registry of the United States</i>
ColIV	<i>Collagen type IV</i>
DAB	DiAminoBenzidine
(D)CE	<i>(Dynamic) Contrast Enhancement</i>
EPI	<i>Echo Planar Imaging</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
Ev	électron volt
FOV	<i>Field Of View</i> (champ de vue)
GIN	Grenoble Institut des Neurosciences
GBMs	Glioblastome Multiforme
INCa	Institut National du Cancer
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
ISO ₂	Saturation local du sang en oxygène
MRT	<i>Microbeam Radiation Therapy</i>
PFA	ParaFormAldéhyde
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
Rec-A	<i>Rat endothelial cell – Antigen</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumor</i>
ROI	<i>Region Of Interest</i>
SNC	Système Nerveux Central
SRM	Spectroscopie par Résonance Magnétique
T	Tesla
USPIO	<i>Ultra Small SuperParamagnetic Iron Oxide</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Facteur</i>
VSI	<i>Vessel Size Index</i>

I INTRODUCTION 13

I.1 Introduction générale.....14

I.1.1 Coûts économiques du cancer 15

I.2 Les tumeurs cérébrales.....16

I.2.1 Introduction..... 16

I.2.2 Les gliomes 17

I.2.3 Les glioblastomes 20

I.2.3.1 Caractéristiques générales 20

I.2.3.2 Les traitements..... 21

I.2.3.2.1 La chirurgie 21

I.2.3.2.2 La radiothérapie 22

I.2.3.2.3 La chimiothérapie..... 24

I.2.3.2.4 Les nouvelles pistes thérapeutiques 25

I.3 L'angiogenèse.....26

I.3.1 Les différents types d'angiogenèse 26

I.3.2 L'angiogenèse tumorale 28

I.3.3 Les stratégies anti-angiogéniques 31

I.3.3.1 Mode d'action des anti-angiogéniques 31

I.3.3.2 Concept de normalisation de la vascularisation tumorale..... 32

I.4 Méthodes pour suivre l'effet de thérapies.....33

I.4.1 RECIST 34

I.4.2 Nouveaux biomarqueurs 35

I.4.2.1 Méthodes invasives (biopsies / implantation d'électrodes) 35

I.4.2.2 Méthodes non ou peu invasives..... 36

I.4.2.2.1 Biomarqueurs périphériques 36

I.4.2.2.2 L'imagerie médicale 37

I.5 L'IRM multiparamétrique38

I.5.1 Coefficient de diffusion apparent de l'eau..... 38

I.5.2 Volume sanguin 39

I.5.3 Index de taille des vaisseaux 41

I.5.4 Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique 43

I.5.5 Saturation locale du sang en oxygène..... 45

II OBJECTIFS DE L'ETUDE 47

III METHODOLOGIE..... 51

III.1 Méthodologie *in vivo*.....52

III.1.1 Lignées cellulaires et modèles animaux 53

III.1.1.1 Lignées cellulaires.....	53
III.1.1.1.1 Lignées syngéniques	53
III.1.1.1.2 Lignées xénogéniques.....	54
III.1.1.2 Modèles animaux	54
III.1.2 Traitements des animaux	56
III.1.2.1 Anti-angiogénique : Le Sorafenib	56
III.1.2.2 Chimiothérapies : Carmustine	57
III.1.2.3 La radiothérapie par microfaisceaux synchrotron	57
III.1.2.4 Evaluation de l'efficacité anti-tumorale	58
III.1.3 Techniques IRM mises en œuvre	58
III.1.3.1 Préparation des animaux.....	59
III.1.3.2 Agents de contraste utilisés	59
III.1.3.2.1 Sinerem®	59
III.1.3.2.2 Les chélates de gadolinium : P846 et Gd-DOTA	60
III.1.3.3 Séquences IRM	61
III.1.3.3.1 Imagerie anatomique pondérée T ₂	61
III.1.3.3.2 Coefficient de diffusion apparent.....	61
III.1.3.3.3 Volume sanguin et index de taille des vaisseaux	62
III.1.3.3.4 Saturation locale en oxygène	62
III.1.3.3.5 Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique	62
III.1.3.4 Traitement des données IRM	63
III.1.3.4.1 Régions d'intérêt	63
III.1.3.4.2 Coefficient de diffusion apparent.....	64
III.1.3.4.3 Volume sanguin et index de taille des vaisseaux	64
III.1.3.4.4 Saturation locale en oxygène	65
III.1.3.4.5 Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique	65
III.1.3.4.6 Détermination du volume tumoral.....	66
III.1.3.4.7 Analyse quantitative des paramètres IRM	66
III.2 Méthodologie <i>ex vivo</i>	67
III.2.1 Prélèvement et préparation des échantillons.....	67
III.2.1 Histologie et Immunohistologie	68
III.2.1.1 Coloration de Perls	68
III.2.1.2 Coloration Hématoxyline-Erythrosine.....	69
III.2.1.3 Caractérisation de la vascularisation.....	69
III.2.1.3.1 Protocole immunohistochimique	69
III.2.1.3.2 Analyse d'images (immunohistologie quantitative).....	70
III.2.1.4 Caractérisation de l'hypoxie	71
III.2.1.4.1 Protocole immunohistochimique	71

III.2.1.4.2 Analyse quantitative des données.....	72
III.2.1.1 Caractérisation de la prolifération cellulaire.....	72
III.2.2 Etude protéique.....	72
III.2.2.1 Immunoblot.....	73
III.2.2.2 Zymogramme	74
III.3 Analyse statistique	74
IV Etude I : Caractérisation de 6 modèles de gliomes – lien avec la réponse à la Carmustine.....	75
IV.1 Objectif de l'étude I.....	76
IV.2 Protocole expérimental.....	77
IV.2.1 Lignées cellulaires	77
IV.2.2 Etude <i>in vitro</i>	77
IV.2.3 Modèles animaux.....	78
IV.2.4 Etude <i>in vivo</i>	78
IV.2.5 Expérience IRM	79
IV.2.6 Histologie	79
IV.3 Résultats	80
IV.3.1 Caractéristiques IRM et histologiques de chaque modèle	80
IV.3.1.1 Modèle GV1A1	82
IV.3.1.2 Modèle 9L.....	83
IV.3.1.3 Modèle C6	84
IV.3.1.4 Modèle CGL3	85
IV.3.1.5 Modèle CGL9	87
IV.3.1.6 Modèle U-87 MG.....	88
IV.3.2 Activité anti-tumorale du BCNU.....	88
IV.3.2.1 Cytotoxicité <i>in vitro</i> du BCNU.....	89
IV.3.2.2 Activité anti-tumorale <i>in vivo</i> du BCNU	89
IV.4 Discussion	89
IV.4.1 Hétérogénéité morphologique évaluée par histologie.....	91
IV.4.2 L'hétérogénéité structurelle et microvasculaire évaluée par IRM	91
IV.4.2.1 Caractéristiques structurelles	93
IV.4.2.2 Caractéristiques microvasculaires.....	93
IV.4.3 Sensibilité au BCNU <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	95
IV.5 Conclusion.....	96
V Etude II : Suivi longitudinal de la vascularisation de 2 modèles de gliome : C6 et RG2.....	99

V.1 Objectifs de l'étude II	100
V.2 Protocoles expérimentaux	101
V.2.1 Suivi longitudinal	101
V.2.1.1 Expérience IRM <i>in vivo</i>	101
V.2.1.2 Détermination de la concentration de fer dans le plasma	102
V.2.1.3 Expériences <i>ex vivo</i>	102
V.2.1.3.1 Histologie et immunohistologie.....	102
V.2.1.3.2 Etudes protéiques.....	103
V.2.2 Etude de l'extravasation du Sinerem®	103
V.3 Résultats	104
V.3.1 Validation des mesures de BVf et VSI	104
V.3.2 Faisabilité d'un suivi longitudinal par IRM	105
V.3.3 Résultats du suivi IRM	106
V.3.3.1 Données controlatérales	107
V.3.3.2 Données tumorales.	107
V.3.4 Résultats du suivi <i>ex vivo</i>	109
V.3.4.1 Histologie.....	110
V.3.4.2 Immunohistologie	110
V.3.4.3 Expression des facteurs angiogéniques	112
V.4 Discussion	113
V.5 Conclusion.....	117
VI Etude III : Impact d'une chimiothérapie et d'un anti-angiogénique sur un gliome : U-87 MG	119
VI.1 Objectifs de l'étude III	120
VI.2 Protocole expérimental.....	121
VI.2.1 Expériences IRM <i>in vivo</i>	122
VI.2.2 Expériences <i>ex vivo</i>	123
VI.2.3 Extravasation du Sinerem®	124
VI.3 Résultats	124
VI.3.1 Validité des mesures de BVf et VSI	124
VI.3.2 Faisabilité d'un suivi longitudinal par IRM	125
VI.3.3 Activité anti-tumorale <i>in vivo</i> des traitements	125
VI.3.3.1 Données IRM dans le striatum controlatéral	125
VI.3.3.2 Evolution du gliome U-87 MG	126
VI.3.3.3 Effet du BCNU sur le gliome U-87 MG	126
VI.3.3.4 Effet du Sorafenib sur le gliome U-87 MG	127

VI.3.3.5 Coloration H&E.....	129
VI.3.3.6 Marquages vasculaires.....	129
VI.4 Discussion	131
VI.5 Conclusion.....	135
VII Etude IV : Impact d'une radiothérapie synchrotron et/ou d'un anti-angiogénique sur un gliome 9L.....	137
VII.1 Objectifs de l'étude IV.....	138
VII.2 Protocole expérimental.....	139
VII.2.1 Expériences IRM <i>in vivo</i>	140
VII.2.2 Expériences <i>ex vivo</i>	141
VII.2.2.1 Histologie et immunohistologie	141
VII.2.2.2 Etudes protéiques	144
VII.3 Résultats	144
VII.3.1 Impact des différents traitements sur la survie et croissance tumorale	145
VII.3.1.1 Impact des traitements sur la survie des animaux	145
VII.3.1.2 Impact des traitements sur la croissance tumorale.....	146
VII.3.2 Résultat 1 : Caractériser l'impact des différents traitements sur le modèle 9L à l'aide de l'IRM multiparamétrique.....	147
VII.3.2.1 Caractérisation du tissu controlatéral du groupe non traité	149
VII.3.2.2 Caractérisation de la croissance 9L	149
VII.3.2.3 Effet de la MRT sur les paramètres IRM	149
VII.3.2.4 Effet du Sorafenib sur les paramètres IRM	149
VII.3.2.5 Effet du double traitement sur les paramètres IRM	150
VII.3.2.6 Discussion / conclusion	151
VII.3.3 Résultat 2 : Impact de la MRT sur la vascularisation saine et tumorale	153
VII.3.3.1 Effets de la MRT sur la prolifération cellulaire.....	153
VII.3.3.2 Effets de la MRT sur les vaisseaux sains et tumoraux.....	154
VII.3.3.2.1 Effets de la MRT sur les paramètres IRM	154
VII.3.3.2.1.1 Effets de la MRT sur le BVf	154
VII.3.3.2.1.2 Effets de la MRT sur le VSI	155
VII.3.3.2.1.3 Effet de la MRT sur l'ADC	156
VII.3.3.2.1.4 Effets de la MRT sur la perméabilité vasculaire	156
VII.3.3.2.2 Effets de la MRT sur les paramètres histologiques et protéiques	157
VII.3.3.2.2.1 Effet de la MRT sur le réseau vasculaire	157
VII.3.3.2.2.2 Effets de la MRT sur l'expression du VEGF.....	159
VII.3.3.3 Discussion	161
VII.3.3.4 Conclusion	163

VII.3.4 Résultat 3 : Apport de la caractérisation de la perméabilité avec 2 agents de contraste	164
VII.3.4.1 Au niveau des tumeurs.....	164
VII.3.4.1 Au niveau de l'hémisphère ipsilatéral.....	166
VII.3.4.2 Discussion.....	167
VII.3.4.3 Conclusion	169
VII.3.5 Résultat 4 : Evaluation du paramètre ISO ₂	169
VII.3.5.1 Corrélation entre ISO ₂ vs BVf et ISO ₂ vs hypoxie.....	170
VII.3.5.2 Discussion.....	173
VII.3.5.3 Conclusion	174
VII.3.6 Réflexion sur le traitement de données.....	174
VII.3.6.1 Résultats.....	176
VII.3.6.1.1 Le coefficient de diffusion apparent (ADC).....	176
VII.3.6.1.2 Le volume sanguin (BVf).....	177
VII.3.6.2 Discussion.....	178
VII.3.6.3 Conclusion	179
VII.4 Conclusions	180
VIII CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	183
IX BIBLIOGRAPHIE	189
X PUBLICATIONS.....	211
XI ANNEXES	217

INTRODUCTION

I.1 Introduction générale

Le Cancer dit « malin » est une maladie caractérisée par une *croissance cellulaire incontrôlée* (division au-delà des limites de la normale), une *invasion* (intrusion et destruction des tissus adjacents), et parfois *des métastases* (propagation à d'autres organes du corps via la lymphe ou le sang). Ces trois propriétés propres aux cancers malins les différencient des tumeurs bénignes, qui ne sont pas invasives, et n'évoluent pas en métastases. La plupart des cancers forment des tumeurs (masses solides), mais certaines, comme les leucémies, n'en forment pas.

Durant toute la vie cellulaire, notre patrimoine génétique, l'ADN (l'acide désoxyribonucléique) est soumis à des mutations. Dans la majeure partie des cas, ces modifications de l'ADN passent inaperçues car des mécanismes réparateurs corrigent ces défauts. Pourtant, dans de rares cas, une mutation peut atteindre et modifier la structure d'un gène codant pour un facteur contrôlant la multiplication cellulaire (oncogène ou gène suppresseur de tumeur). Dans ce cas, la cellule peut acquérir un avantage sélectif qui lui permettra de donner naissance à un premier clone de cellules anormales (hyperplasie ; Figure I.1-1). Dans ces cellules (ayant un avantage sélectif), la probabilité qu'une seconde mutation apparaisse et soit sélectionnée est plus importante. Dans ce cas, une seconde population sera générée, plus anormale que la première et se développera à ses dépens (dysplasie ; Figure I.1-1). On peut ainsi, par diverses étapes successives, accumuler plusieurs mutations, chacune d'entre elles permettant la sélection d'un clone de plus en plus malin pour finir par une cellule hautement cancéreuse (cellules cancéreuses ; Figure I.1-1) et ayant acquis la capacité de se propager dans d'autres organes (cancer envahissant ; Figure I.1-1). La progression tumorale correspond donc à un processus dynamique qui, à chaque étape, sélectionne une nouvelle cellule ayant subi une ou plusieurs altérations.

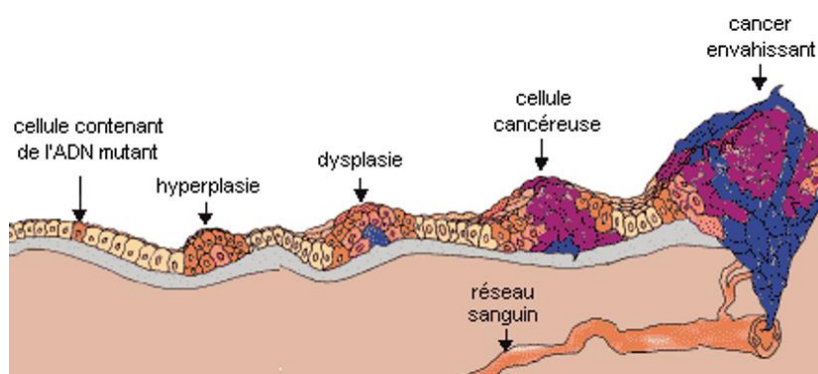


Figure I.1-1 Les différentes étapes de l'évolution d'une tumeur maligne à la surface de la peau. Source: adapté d'après BSCS and Videodiscovery, Inc ; 1999.

Le cancer peut affecter des personnes de tous âges, même les fœtus, mais le risque de contracter un cancer augmente avec l'âge. En l'espace de 25 ans (entre 1980 et 2005) le nombre de nouveaux cas de cancer diagnostiqués par an en France a doublé passant de 168 850 à 319 380 (Figure I.1-2). Cette augmentation est à la fois due à l'augmentation de l'espérance de vie des Français mais aussi à l'amélioration des outils de dépistage des cancers. Dans ce même laps de temps, la prise en charge et le soin des patients atteints de cancer ont été grandement améliorés. Cela se traduit par une stabilisation de la mortalité par cancer en France (Figure I.1-2). Malgré tout, pour la première fois en 2004, le cancer devient la cause de décès la plus fréquente en France, dépassant la fréquence des pathologies cardiovasculaires (source : « *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* » du 18 septembre 2007 de l'Institut de veille sanitaire).

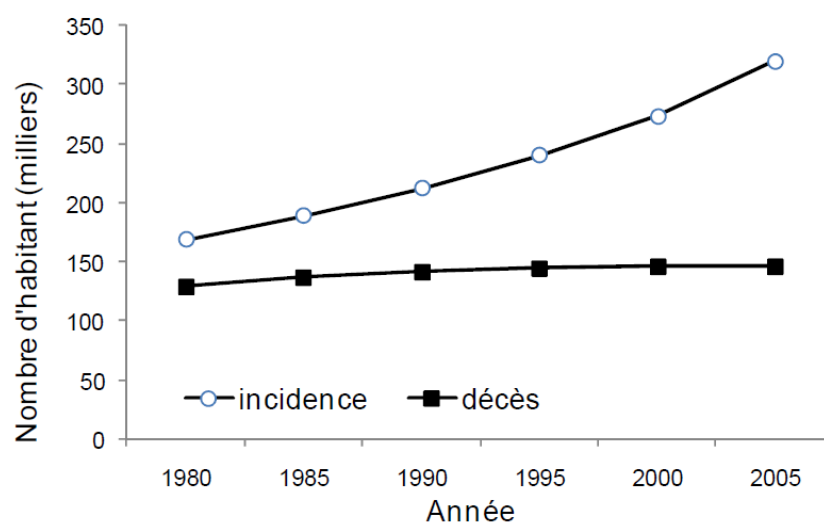


Figure I.1-2 Evolution de l'incidence et de la mortalité des cancers en France entre 1980 et 2005. Source : adapté du rapport de l'Institut de veille sanitaire : « Estimation de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1980 à 2005 »

I.1.1 Coûts économiques du cancer

Les chiffres et les données de ce paragraphe sont tirés d'un des rares rapports regroupant l'ensemble des coûts de la lutte contre le cancer en France. Ce rapport intitulé « Analyse économique des coûts du cancer en France » a été rédigé par l'Institut National du Cancer (INCa) et est basé sur l'année de référence de 2004.

En termes de chiffrage, les dépenses globales, en France, atteignent environ 12 milliards d'euros dont 10 milliards pour les soins (780 millions d'euros ont été investis pour la recherche). Il est intéressant de constater qu'en l'espace de 5 ans (entre 1999 et 2002), les coûts imputés à la chimiothérapie ont augmenté de près de 48% passant de 1 140 millions d'euros à 1 687 millions d'euros. Cette augmentation du coût de la chimiothérapie a été faite aux dépens de la radiothérapie et de la chirurgie (Figure I.1-3). Les antinéoplasiques

(traitements anticancéreux) représentent 20% des dépenses de médicaments en 2004. Sur ces 20%, on peut constater qu'un peu plus de la moitié concerne l'achat de nouvelles molécules dites « molécules onéreuses ». La part de marché des nouveaux médicaments antinéoplasiques est en constante augmentation depuis le début des années 90, avec par exemple une augmentation d'environ 40% entre 2003 et 2004 (ce qui a représenté cette année-là 37% de l'augmentation totale des dépenses en médicaments de l'hôpital) (*Source rapport de l'INCa intitulé « analyse économique des coûts du cancer en France »*). Le coût de développement d'une nouvelle molécule est de 802 millions de dollars, incluant les coûts d'échecs, les coûts financiers et avant impôts (DiMasi et al. 2003). Bien que ce chiffre soit impressionnant et remis en cause par de nombreux spécialistes, il est à mettre en relation avec le marché mondial du médicament qui est estimé à 820 milliards de dollars en 2009 (*source : rapport de la compagnie IMS health, Norwalk, Connecticut ; réalisé le 29 octobre 2008*).

Types de traitement	PMSI 1999		PMSI 2004		Évolution
Chimiothérapie	1 140	19%	1 687	23%	47,98%
Chirurgie	2 100	35%	2 156	30%	2,67%
Radiothérapie	700	12%	746	10%	6,57%
Chimioradiothérapie	59	1%	-		
Autres prises en charge médicales	2 070	34%	2 597	36%	25,46%
Total	6 069	100%	7 186	100%	18,41%

En millions d'euros - Source PMSI 1999 : Borella, Finkel et al (2002)

Figure I.1-3 Répartition des coûts par type de traitement : comparaison de 2 études entre 1999 (Borella, Finkel et al) et 2002 (institut national du cancer). Le PMSI étant le système d'information utilisé pour suivre l'activité hospitalière en France. Source : rapport de l'INCa intitulé « analyse économique des coûts du cancer en France »

I.2 Les tumeurs cérébrales

I.2.1 Introduction

L'incidence des tumeurs cérébrales primitives du système nerveux central (SNC), regroupant les tumeurs bénignes et malignes, est de 18 nouveaux cas par an sur 100 000 personnes aux Etats-Unis entre 2004 et 2005, selon le CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States). La Figure I.2-1 représente la répartition des tumeurs cérébrales

primaires du SNC selon l'âge des patients (0-14 ; 0-19 ; 20 et + ; tous âges). Aux États-Unis, les cancers sont la 2^{ème} cause de mortalité chez les enfants de moins de 14 ans ; les tumeurs cérébrales représentent la 2^{ème} cause de mortalité due à un cancer chez les enfants de moins de 20 ans ainsi que chez les hommes âgés de 20 à 30 ans [aux États-Unis] (Jemal et al. 2008).

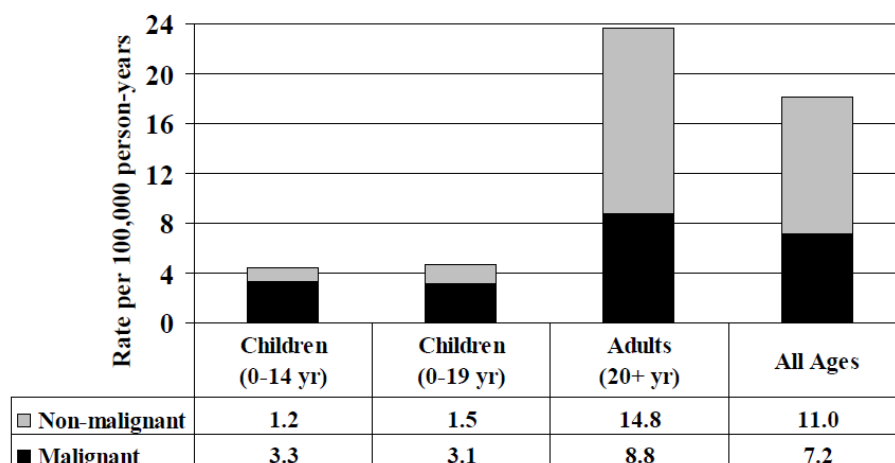


Figure 1.2-1 Incidence annuelle des tumeurs primaires du SNC par classe d'âge entre 2004 et 2005 aux États-Unis. Source: «Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004» provenant du CBTRUS.

1.2.2 Les gliomes

Le terme gliome englobe toutes les tumeurs primitives du SNC d'origine gliale, qu'elles soient bénignes ou malignes. Les gliomes englobent les astrocytomes, épendymomes, oligodendrogliomes ou encore les glioblastomes (Figure 1.2-2A). Les gliomes constituent « seulement » 33% des tumeurs cérébrales primitives du SNC mais représentent 80% des tumeurs malignes du système nerveux central. La répartition de ces différentes sous-classes de la famille des gliomes est représentée dans la Figure 1.2-2B.

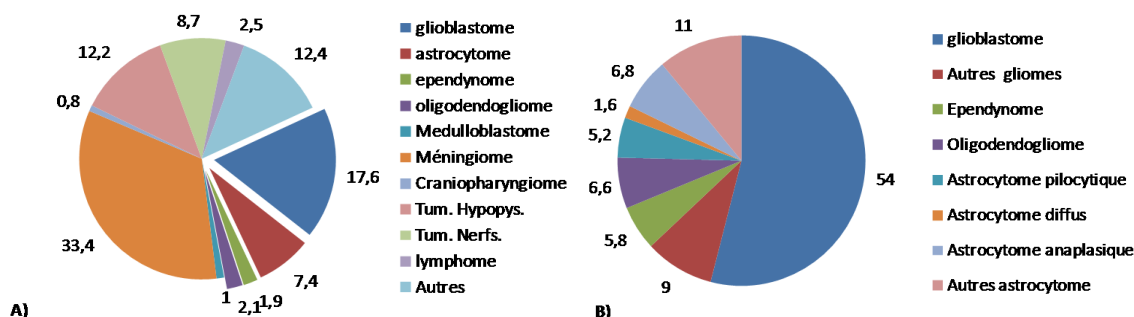


Figure 1.2-2 Incidence des tumeurs cérébrales primaires aux États-Unis entre 2000 et 2004. (A) Distribution (%) des tumeurs du système nerveux central. (B) Distribution des tumeurs d'origine gliales (astrocytome, glioblastome, épendymome, gliome mixte, gliome malin et tumeur neuroépithéliale) qui représentent 33% de toutes les tumeurs cérébrales et 80% des tumeurs malignes du système nerveux central. Source: «Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 17 2004» provenant du CBTRUS.

La classification (ou stratification) des gliomes est une étape clé dans le processus d'hospitalisation qui permet une prise en charge la plus adaptée possible pour le patient. Cette classification peut être réalisée selon différents critères de regroupement :

- **Le type cellulaire** majoritaire du gliome. On peut distinguer les épendymomes (cellules épendymaires), les astrocytomes (cellules astrocytaires) ou encore les oligodendrogliomes (cellules oligodendrocytaires).
- **La localisation** du gliome. Les gliomes peuvent être classés selon qu'ils se situent au dessus (sus-tentorielle) ou en dessous (sous-tentorielle) d'une membrane dans le cerveau appelée la tente du cervelet (Figure I.2-3). La majorité des gliomes (+ de 60%) chez les enfants de moins de 18 ans se situe dans la région sous-tentorielle. En revanche, cette tendance s'inverse totalement sur les gliomes de l'adulte, car 90% de ceux-ci se situent dans la région sus-tentorielle (Aznar et al. 2004).

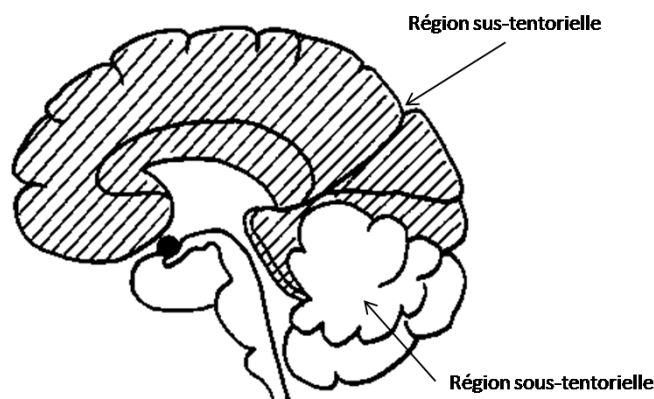


Figure I.2-3 Division du cerveau en deux grandes zones appelées région sus-tentorielle et sous-tentorielle

- **Le grade** du gliome. Dans ce domaine, la classification la plus répandue et définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (l'OMS) est dénommée classification WHO (pour World Health Organization). Il s'agit d'une classification purement histologique se basant sur le type cellulaire prédominant (oligodendrogliale, astrocytaire ou mixte). Un grade est attribué à chaque tumeur en fonction des critères suivants : densité cellulaire, atypies nucléaires, mitoses, prolifération microvasculaire et nécrose. Par définition, plus le grade d'un gliome est élevé, plus le pronostic du patient est défavorable (Figure I.2-4). Bien qu'adopté au niveau international, le critère de classification de l'OMS ne fait pas l'unanimité au sein de la communauté scientifique. Certaines études mettent en cause la non reproductibilité des diagnostics réalisés par les anatomopathologistes,

ce qui pourrait induire des biais, notamment dans les études randomisées de nouveaux médicaments. C'est dans ce contexte-là que des chercheurs de l'Hôpital Sainte-Anne à Paris ont proposé une nouvelle classification qui se ne base plus seulement sur des données histopathologiques mais aussi sur des examens d'imagerie scanner X ou d'imagerie par résonance magnétique (IRM). En intégrant les données cliniques à l'imagerie et à l'histopathologie traditionnelle, l'Hôpital Sainte-Anne distingue ainsi quatre classes de gliomes (Aznar et al. 2004, Daumas-Duport et al. 2000):

- les oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A (absence d'hyperplasies endothéliales et de prise de contraste en IRM).
- les oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes de grade B (hyperplasies endothéliales et/ou prise de contraste).
- les glioblastomes (GBM).
- tumeurs glioneurales malignes (TGNM).

L'astrocytome diffus ou encore l'astrocytome anaplasique ne sont pas reconnus dans cette classification.

Tableau 1 – Principaux types de gliomes selon la classification de l'OMS 2007
WHO 2007 classification of gliomas

Tumeurs astrocytaires	
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire	Grade I
Astrocytome pilocytaire	Grade I
Astrocytome pilocytaire, variant pilomyxoïde	Grade II
Astrocytome diffus	Grade II
Fibrillaire	
Protoplasmique	
Gémistocytaire	
Astrocytome anaplasique	Grade III
Xanthoastrocytome pléiomorphe	Grade II
Glioblastome	Grade IV
Glioblastome à cellules géantes	Grade IV
Gliosarcome	Grade IV
Gliomatose	Grade III
Tumeurs oligodendrogiales	
Oligodendrogliome	Grade II
Oligodendrogliome anaplasique	Grade III
Tumeurs oligoastrocytaires	
Oligoastrocytome	Grade II
Oligoastrocytome anaplasique	Grade III

Figure I.2-4 Classification des principaux types de tumeurs selon la classification WHO de l'OMS 2007.
Source : Figarella-Branger et al. 2008 (Figarella-Branger et al. 2008)

I.2.3 Les glioblastomes

I.2.3.1 Caractéristiques générales

Les glioblastomes multiformes (GBMs), aussi connus sous le nom d'astrocytomes de grade IV, représentent entre 15 et 20% des tumeurs cérébrales et environ la moitié de tous les gliomes. Les GBMs sont aussi reconnus comme étant les tumeurs cérébrales les plus agressives (Black et al. 1991). Les GBMs peuvent soit survenir de 'novo' (dit GBMs primaires) ou après progression d'un astrocytome de bas grade (WHO grade II) ou d'un astrocytome anaplasique (WHO grade III) (dit GBMs secondaires). Les GBMs primaires (60% des cas) sont plus fortement représentés chez les patients de plus de 50 ans. En revanche, les GBMs secondaires (40% des cas) se retrouvent plus fréquemment chez les patients de moins de 45 ans. Des analyses génétiques sur des GBMs ont montré des altérations moléculaires différentes entre des glioblastomes primaires et secondaires. Une liste, non exhaustive, de ces modifications est présentée à la Figure I.2-5. Nous reviendrons sur ces altérations génétiques dans le chapitre 'nouvelles pistes thérapeutiques' à la page 25.

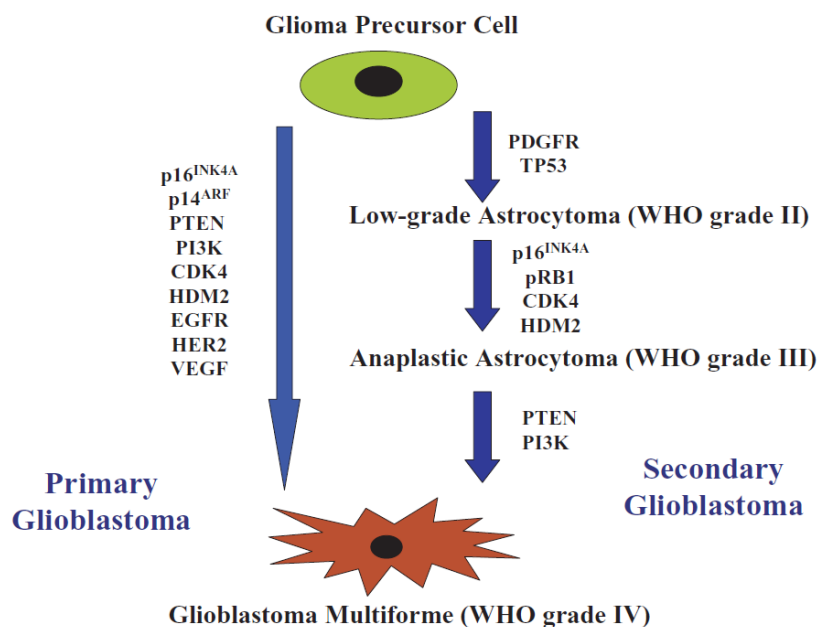


Figure I.2-5 Altérations génétiques des GBMs primaires et secondaires.
Source : Sathornsumetee et al 2008 (Sathornsumetee et al. 2008)

Entre 2004 et 2005, l'incidence des GBM était de 3,18 cas pour 100 000 personnes, les hommes sont environ 1,4 fois plus touchés que les femmes (source CBTRUS). Les GBMs peuvent apparaître à tous les âges, mais les personnes les plus touchées sont les adultes entre 45 et 70 ans. Une étude portant sur près de 1000 patients a montré que les GBMs se situent à

94% dans les différents lobes de la matière blanche sous corticale (temporale (31%), pariétale (24%), frontale (23%) et occipitale (16%)) (Kleihues et al. 2000).

I.2.3.2 Les traitements

I.2.3.2.1 La chirurgie

L'intervention chirurgicale est le traitement de première intention des tumeurs cérébrales primitives. Le traitement chirurgical peut être indiqué pour : réduire la masse tumorale, diminuer un déficit neurologique dû à la pression exercée par la masse tumorale, confirmer le diagnostic (par réalisation d'une biopsie) et pour introduire des agents anti-tumoraux directement au contact de la tumeur (Dunn et al. 2003, Newton et al. 1994, Salcman et al. 1990). Les dernières avancées des techniques de neurochirurgie reposent sur l'utilisation de cadre stéréotaxique de biopsie, l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique (IRM), la cartographie corticale peropératoire, la neuronavigation, la résection de la tumeur patient éveillé, ou encore de l'utilisation de l'IRM peropératoire (Enchev et al. 2008, Matz et al. 1999, Nimsky et al. 2001). Toutes ces techniques permettent aux chirurgiens de délimiter plus précisément les bords de la tumeur. La résection tumorale sera donc plus agressive et plus précise, tout en préservant les régions cérébrales fonctionnelles ou encore les structures vasculaires importantes bordant la tumeur. Une chirurgie est souvent curative lorsqu'elle est réalisée sur des tumeurs cérébrales bénignes comme les méningiomes de bas grade (Norden et al. 2009).

En ce qui concerne les tumeurs cérébrales malignes (comme les glioblastomes), la plupart des neurochirurgiens recommande la résection de la tumeur. Cependant, l'exérèse pour ces types de tumeurs n'est pas curative. Néanmoins il a été prouvé qu'elle induit une augmentation de la survie globale et de la survie sans progression ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie des patients (Devaux et al. 1993, Lacroix et al. 2001). Pour les tumeurs très infiltrantes ou multifocales, une biopsie stéréotaxique est préférée à une exérèse afin de préserver les fonctions neuronales. Dans la plupart des cas, la biopsie permet un diagnostic histologique qui guidera un futur traitement. La précision des biopsies stéréotaxiques et des exérèses est grandement améliorée lorsque le chirurgien a pu, au préalable, bien délimiter les bords de la tumeur à l'aide d'une IRM (de type anatomique, prise de contraste ou « fluid attenuated inversion-recovery (FLAIR)»), d'une spectroscopie par résonance magnétique (SRM) ou encore d'une tomographie par émission de positron réalisées en préopératoire.

I.2.3.2.2 La radiothérapie

En France, la radiothérapie est utilisée chez plus de la moitié des patients ayant un cancer. Elle est, avec la chirurgie, le traitement le plus fréquent des cancers et peut entraîner une guérison à elle seule (par exemple dans le cas de cancer du rectum et la prostate) (Gerard et al. 2003, Pisansky et al. 2005). Dans le traitement des glioblastomes, le bénéfice de la radiothérapie conventionnelle a clairement été démontré par plusieurs études randomisées (Laperriere et al. 2002, Walker et al. 1980). D'autres études ont aussi révélé que des patients porteurs de gliome de haut grade présentaient une meilleure médiane de survie lorsque qu'une radiothérapie venait en complément d'une chirurgie.

Le mécanisme de mort cellulaire induit par radiothérapie, est en partie dû à la production de cassures sur l'ADN causées directement par les rayonnements ionisants. Mais la cause principale de ce mécanisme repose sur la création de radicaux libres hautement réactifs qui induisent d'importants dommages à l'ADN et perturbent les processus cellulaires. La formation des radicaux libres va fortement dépendre de la concentration en oxygène du milieu. Ainsi, les dommages causés sur les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux peuvent avoir leur importance dans la destruction de la tumeur. En radiothérapie, l'objectif est d'induire le plus de dégâts possibles sur l'ADN des cellules tumorales tout en limitant les effets délétères sur le tissu cérébral sain environnant. En effet le système nerveux est particulièrement sensible à la dose par séance, comme en témoigne la dose maximale de tolérance du chiasma optique (partie du cerveau où les deux nerfs optiques se croisent), fixée à 8 Gy délivrée en 1 séance, et à 56 Gy délivrée en 30 séances. Pour aller au-delà de cette dose maximale tolérée du tissu sain, les radiobiologistes ont recours au fractionnement et à l'étalement de la radiothérapie. Le fractionnement du traitement en séances espacées de 6 à 24 heures permet la réparation des radiolésions au niveau de chaque cellule. Il assure donc la survie des tissus sains qui ont un renouvellement lent tel que le tissu conjonctif et le tissu nerveux. L'étalement du traitement sur plusieurs semaines permet, quant à lui, la réparation tissulaire par la repopulation cellulaire. Cet étalement assure donc la survie des tissus à renouvellement rapide, comme les muqueuses ou la moelle hématopoïétique et permet aux patients de mieux supporter l'irradiation. Aujourd'hui, pour optimiser au mieux cet effet différentiel (dégât des tissus tumoraux et préservation des tissus sains), le fractionnement classique d'une radiothérapie est de 1,8 à 2 Gy par séance et de 5 séances par semaine. La dose totale déposée dépendra du type et du volume de la lésion (par exemple l'ordre de grandeur est de 45-50 Gy pour le cancer du sein et 65 Gy pour des tumeurs pulmonaire).

Afin d'augmenter la dose déposée au sein de la tumeur, différentes méthodes ont été développées. Une liste, non exhaustive, de ces différentes techniques est présentée ci-dessous :

- **La radiothérapie externe**, qui consiste à traiter une lésion interne à l'aide d'une source extérieure de rayons, qui traverse les plans superficiels avec une faible énergie pour aller se concentrer sur la cible. Dans la radiothérapie externe on distingue 3 techniques distinctes :

- **la radiothérapie conventionnelle**
- **La radiothérapie conformationnelle 3D** constitue une étape importante dans l'évolution de la radiothérapie externe puisqu'elle permet une meilleure adaptation du faisceau au volume tumoral et une limitation de l'exposition des organes sains (Figure I.2-6A). Le volume d'irradiation étant mieux défini, il est possible d'augmenter la dose délivrée à l'intérieur de celui-ci et ainsi d'accroître l'efficacité de la radiothérapie (Figure I.2-6B).
- **La radiothérapie par microfaisceaux** (ou MRT pour Microbeam Radiation Therapy) est une nouvelle technique très prometteuse qui utilise le rayonnement synchrotron comme source de rayonnement X d'énergie moyenne (de 10 à 150 keV) avec une très grande brillance (mille fois supérieure à celle d'un générateur classique de rayons X). Les propriétés d'une telle source d'énergie permettent de fractionner spatialement l'irradiation afin de préserver le tissu sain tout en appliquant des doses d'irradiation plus élevées que les doses conventionnellement tolérées (de l'ordre du KGy). Cette technique n'en est encore qu'au stade expérimental, mais elle s'est révélée d'une très grande efficacité sur des modèles de glioblastomes implantés chez des rongeurs (Serduc et al. 2009, Serduc et al. 2008).

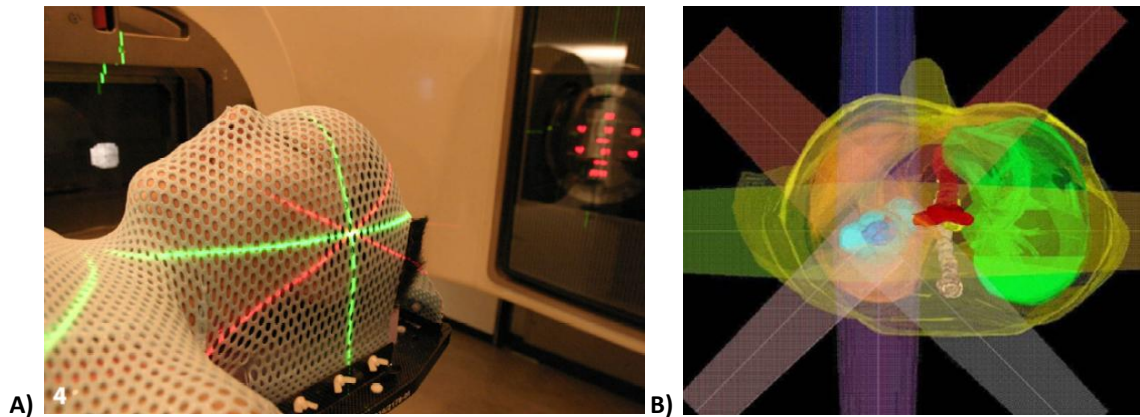


Figure 1.2-6 (A) Séance de radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité. Le masque de contention assure un positionnement identique d'une séance à l'autre. (B) Visualisation tridimensionnelle des différents faisceaux d'irradiation. Source : Institut Curie Paris.

- **La curiethérapie**, consiste en l'implantation d'éléments radioactifs directement au contact de la tumeur. Cette technique permet de délivrer des doses importantes de radiation dans le volume tumoral, tout en préservant au maximum les tissus sains environnants. Du fait de l'acte chirurgical obligatoire pour l'implantation d'éléments radioactifs au sein de la tumeur, cette méthode n'est pas applicable à toutes les tumeurs (comme par exemple les tumeurs cérébrales profondes). Bien que cette technique apporte d'excellents résultats dans de nombreux cancers (col de l'utérus, prostate...) il n'a pas été démontré de réel bénéfice dans le cas des glioblastomes (Chauveinc et al. 2002, Haie-Meder et al. 2000, Selker et al. 2002).

I.2.3.2.3 La chimiothérapie

Le terme « chimiothérapie » en cancérologie désigne une classe de médicaments capables de bloquer la division cellulaire. Ces substances ont aussi la capacité d'endommager les cellules, elles sont dites « cytotoxiques ». Mises à part de rares et récentes exceptions ces molécules ne sont pas capables de « cibler » spécifiquement les cellules tumorales. Ce traitement touche indifféremment toutes les cellules à division rapide de l'organisme, ce qui induit des effets secondaires comme la perte des cheveux, infections (destruction des globules blancs), anémies (destruction des globules rouges) ou encore hémorragies (destruction des plaquettes). Malgré tous ces effets secondaires, les chimiothérapies se sont montrées très efficaces, notamment dans le traitement de certains types de tumeurs cérébrales comme les oligodendrogliomes, les médulloblastomes ou encore les lymphomes du système nerveux central (Bredel et al. 2001, Soffietti et al. 2004). En ce qui concerne le traitement des glioblastomes, toutes les études cliniques utilisant des agents chimiotoxiques seuls ou en

combinaison n'ont pas montré de gain d'efficacité thérapeutique en terme d'augmentation significative de survie.

I.2.3.2.4 Les nouvelles pistes thérapeutiques

Les traitements 'conventionnels' (chirurgie, chimio- et radiothérapie) n'ont que peu d'effet sur la survie des patients porteurs de glioblastomes (WHO grade IV) : de 12 à 15 mois après le diagnostic avec une médiane de survie à 5 ans qui ne dépasse pas les 2% (Wen et al. 2008). A l'heure actuelle, tous les traitements de patients porteurs de GBMs consistent en des traitements symptomatiques (soulageant la douleur des patients) et palliatifs (augmentant la qualité de vie des patients).

C'est dans ce contexte que de nouvelles pistes thérapeutiques ont été explorées. La mise en évidence récente d'anomalies moléculaires sous-jacentes aux GBMs a conduit à la mise en place de nouvelles approches thérapeutiques de ciblage spécifique de la signalisation oncogénique par des thérapies moléculaires dites « ciblée », l'immunothérapie ou encore la thérapie génique (Sathornsumetee et al. 2008). Ces nouvelles thérapies peuvent être regroupées en 4 grandes classes de drogues selon la cible moléculaire visée (de Groot et al. 2007) :

- Les inhibiteurs de l'angiogénèse
- Les inhibiteurs de facteurs de croissance
- Les inhibiteurs de récepteur de facteur de croissance
- Les inhibiteurs multikinases

Ils existent, à l'heure actuelle, de nombreux essais précliniques et cliniques de ces nouvelles thérapies dites « ciblées ». La Figure I.2-7 présente une liste non exhaustive d'essais cliniques incluant ces nouvelles drogues.

Class of drugs	Target	Agent	Clinical phase in glioma
Angiogenesis inhibitors	VEGF	Bevacizumab	II
	VEGF/PIGF	VEGF Trap	I
	VEGFR	Vatalanib	I/II
		SU5416	I/II
		Pazopanib	I/II
Growth factor receptors	EGFR	CT-322	I/II
		Gefitinib	II
		Erlotinib	II
		Cetuximab	II
		AEE788	I/II
Growth factor effectors	PDGFR	Imatinib mesylate	II/III
	Ras (FTI)	Tipifamib	I/II
	mTOR	Lonafarnib	I/II
		Rapamycin	I/II
		Sirolimus	I/II
Temsirolimus		I/II	
Multitargeted kinase inhibitors	PKC	Enzastaurin	II/III
	EGFR, VEGFR	Vandetanib	I/II
	EGFR, Her2/neu	Lapatinib	I/II
	Raf, VEGFR	Sorafenib	I/II
	PDGFR, VEGFR	Sunitinib	I/II
	Src, PDGFR, ephrin receptors	Dasatinib	II
	FLT-3, PDGFR, c-kit	Tandutinib	I/II

VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; PIGF, placental growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; FTI, farnesyltransferase inhibitor; mTOR, mammalian target of rapamycin; PKC, protein kinase C; Her-2/neu, human epidermal growth factor receptor-2; FLT-3, FMS-related tyrosine kinase 3.

Figure I.2-7 Nouvelles thérapies dites « ciblées » dans le traitement des tumeurs cérébrales en cours d'essais cliniques. Source : De Groot et al. (de Groot et al. 2007)

I.3 L'angiogenèse

Il existe deux grands processus de développement de nouveaux vaisseaux sanguins : la vasculogenèse (formation de novo) et l'angiogenèse. La vasculogenèse étant un phénomène très limité chez l'adulte même en conditions pathologiques, nous allons nous focaliser sur le phénomène de l'angiogenèse. L'angiogenèse décrit le processus de création de nouveaux vaisseaux sanguins (néo-vaisseaux) à partir de vaisseaux préexistant. C'est un processus physiologique indispensable au développement de l'organisme. Ce processus intervient notamment au cours de l'implantation du placenta et du développement embryonnaire. Chez l'adulte, en condition non pathologique, le processus angiogénique n'intervient que dans des processus très limités comme au cours du cycle menstruel chez la femme ou encore lors d'un processus de cicatrisation.

Ce chapitre a pour objectif de détailler les différentes étapes de l'angiogenèse en condition non pathologique. Puis on verra comment ce phénomène peut être détourné au cours d'un développement tumoral. Enfin, nous aborderons le potentiel anti-tumoral de thérapies ayant pour but de bloquer l'angiogenèse tumorale.

I.3.1 Les différents types d'angiogenèse

Chez l'adulte, quand on parle d'angiogenèse en condition non pathologique, on peut distinguer 2 principaux mécanismes :

- **l'angiogenèse intussusceptive** consiste à diviser en deux un capillaire existant par extension de tissu matriciel formant ainsi un pont transluminal entre les deux parois opposées du capillaire. Après réorganisation des jonctions inter-endothéliales suivi d'un recrutement de péricytes et de myofibroblastes (précurseurs des cellules musculaires lisses), il y a formation d'une matrice extracellulaire qui conduit à la création de deux vaisseaux fils (Figure I.3-1). L'avantage de ce mécanisme de croissance, est que les vaisseaux sanguins sont générés plus rapidement pour un coût énergétique moindre pour l'organisme car il ne nécessite pas de prolifération cellulaire (Djonov et al. 2003).

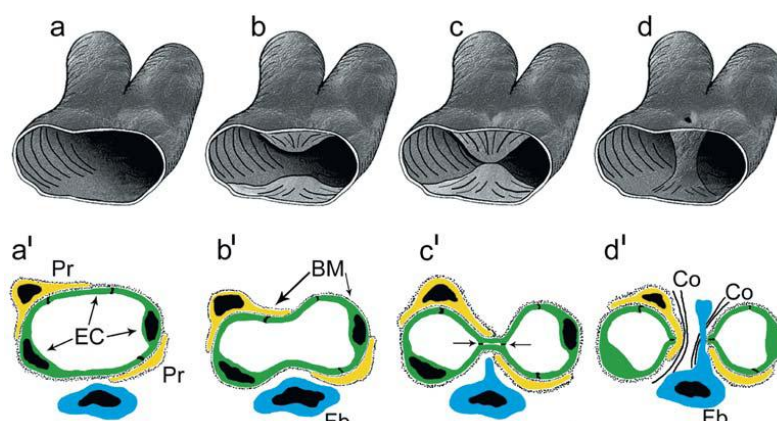


Figure I.3-1 (a, b, c et d) représentation 3D et (a', b', c' et d') 2D des 4 étapes nécessaires à l'angiogenèse intussusceptive. Pr : péricyte ; EC : cellules endothéliales ; BM : membrane basale ; Fb : fibroblaste et Co : collagène. Source : Djonov et al. 2003 (Djonov et al. 2003)

- **l'angiogenèse bourgeonnante** est caractérisée pour une vasodilatation locale, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une prolifération cellulaire. Elle est initiée par la dégradation protéolytique de la membrane basale, après quoi les cellules endothéliales prolifèrent et migrent dans la matrice extracellulaire. Il s'ensuit une réorganisation interne du bourgeon en vue de former une lumière vasculaire qui va se relier à d'autres capillaires. Enfin, il existe une étape « d'élagage » et de maturation. L'élagage est aussi appelé « pruning » en anglais. La définition du mot *élagage* : *Retrancher ce qui est inutile, marginal ou accessoire, pour ne conserver que l'essentiel* (source dictionnaire www.larousse.fr) définit à elle seule cette étape de l'angiogenèse. Ce processus d'élagage peut intervenir si les néo-vaisseaux, ne parviennent pas à entrer en contact avec d'autres vaisseaux existants (formant un réseau) ou s'ils n'arrivent pas à maturité. La maturité de l'arbre vasculaire implique nécessairement le recrutement, de la part des néo-vaisseaux, de péricytes et de cellules musculaires lisses. Lors de cette étape, il y a aussi création d'une lame

basale entourant les vaisseaux. Toutes les étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement sont représentées dans la Figure I.3-2. Ce processus est un processus relativement lent à se mettre en place *in vivo*, au minimum 24 h et il faut attendre au moins 3 à 5 jours avant qu'un nouveau capillaire intègre le système vasculaire et devienne perfusé.

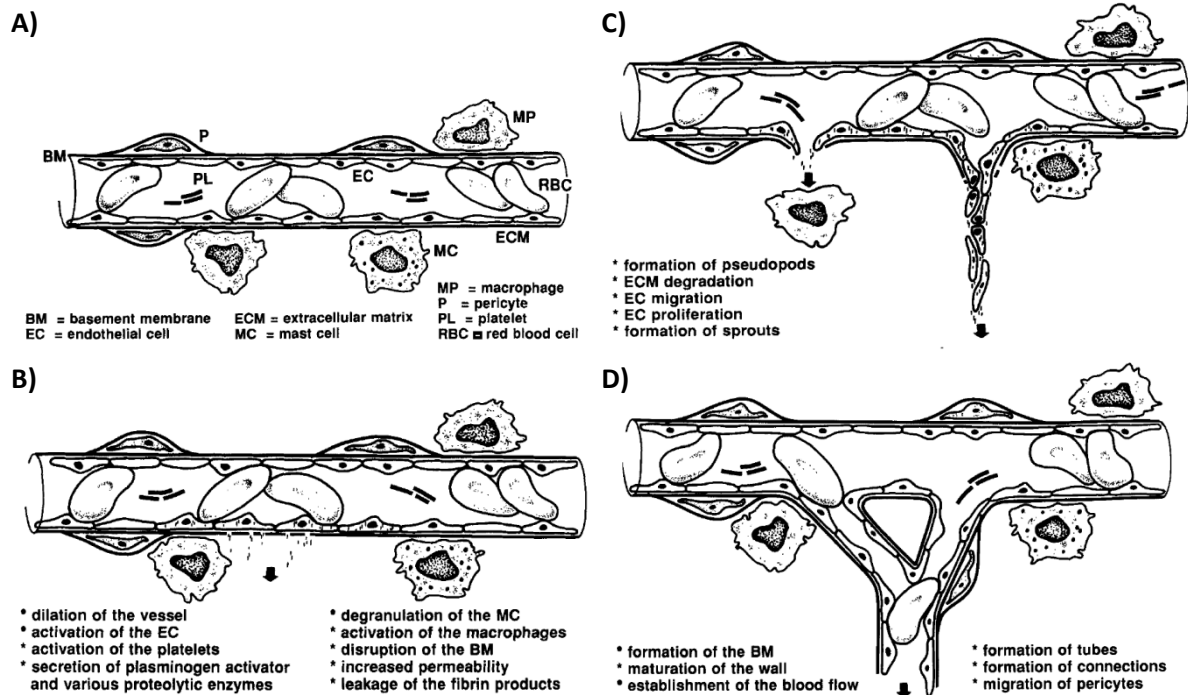


Figure I.3-2 Représentation des différentes étapes de l'angiogenèse bourgeonnante. Source Rakusan 1995 (Rakusan et al. 1995). Etape de l'angiogenèse :

- A) Etape 0 de l'angiogenèse : les vaisseaux sont stables et quiescents.
B) Etape 1 : modification au sein d'un vaisseau préexistant.
C) Etape 2 : formation d'une nouvelle lumière.
D) Etape 3 : maturation et perfusion du vaisseau nouvellement formé.

I.3.2 L'angiogenèse tumorale

De nombreuses pathologies ont pour conséquence un dysfonctionnement de l'angiogenèse que ce soit à cause d'une angiogenèse insuffisante ou au contraire excessive. Le Tableau I.3-1, regroupe les principales maladies caractérisées par un dysfonctionnement de l'angiogenèse (liste non exhaustive) (Carmeliet et al. 2005). Comme on a pu le détailler dans le chapitre I.2.1, il existe une multitude de tumeurs primitives du système nerveux central. Toutes ces tumeurs ont besoin de vaisseaux sanguins pour survivre et pour se développer. Ce rôle essentiel de l'angiogenèse en cancérologie a été initialement défini il y a plus de 30 ans

par Folkman (Folkman et al. 1971). L'angiogenèse est indispensable à la croissance tumorale au-delà de 1-2mm³ et facilite également l'entrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine ou lymphatique, entraînant la formation de métastases à distance (Folkman et al. 2000). L'angiogenèse a aussi été identifiée comme un facteur pronostique péjoratif, fréquemment associé à la progression tumorale et au risque métastatique.

Angiogenèse insuffisante	Angiogenèse excessive
Maladie d'Alzheimer ischémie (cérébrale, cardiaque) diabète hypertension athérosclérose ulcération gastrique maladie de Crohn perte des cheveux ...	cancers malformations vasculaires obésité psoriasis rétinopathie hypertension pulmonaire primaire fibrose cystique cirrhose du foie kyste ovarien ...

Tableau I.3-1 : Maladies liées à un dysfonctionnement de l'angiogenèse. Source adapté de Carmeliet 2005 (Carmeliet et al. 2005)

Dans le cadre d'un cancer et donc d'une sur-activation de l'angiogenèse, les différents mécanismes physiologiques de l'angiogenèse (intussusceptive ou bourgeonnante) vont être stimulés par la tumeur afin de subvenir à ses besoins métaboliques sans cesse croissants au cours de sa progression. Pendant le développement tumoral, d'autres mécanismes alternatifs permettant la création de nouveaux vaisseaux sanguins peuvent être mis en place, on peut citer par exemple la cooptation vasculaire ou encore la vasculloogenèse (Figure I.3-3).

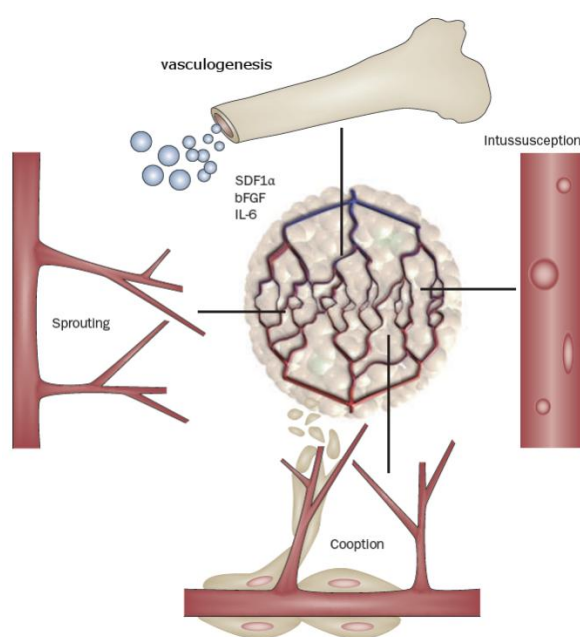


Figure I.3-3
Les principaux mécanismes de recrutement des nouveaux vaisseaux sanguins lors d'une angiogenèse tumorale.

Source : adapté de Jain et al. 2009 (Jain et al. 2009)

D'un point de vue moléculaire, en condition non pathologique, il existe un équilibre très fin entre les molécules pro et anti-angiogéniques, qui permet de maintenir une organisation toujours fonctionnelle au sein de l'organisme. De nombreuses études ont permis de démontrer que les cellules tumorales sont capables de produire des facteurs pro-angiogéniques. Ces facteurs ont pour but de venir stimuler les mécanismes naturellement utilisés par l'organisme pour réparer le réseau vasculaire en cas de traumatisme (angiogenèse bourgeonnante, intussusceptive, cooptation ou encore la vasculogenèse). Cette angiogenèse tumorale se révèle indispensable à la croissance tumorale et au développement des métastases. Cette phase est appelée « switch angiogénique ». Bien que très active et très productive, l'angiogenèse tumorale conduit le plus souvent à un réseau vasculaire immature, très perméable, mal perfusé, mal oxygéné et avec une forte pression interstitielle, en somme peu fonctionnel (Figure I.3-4A-B).

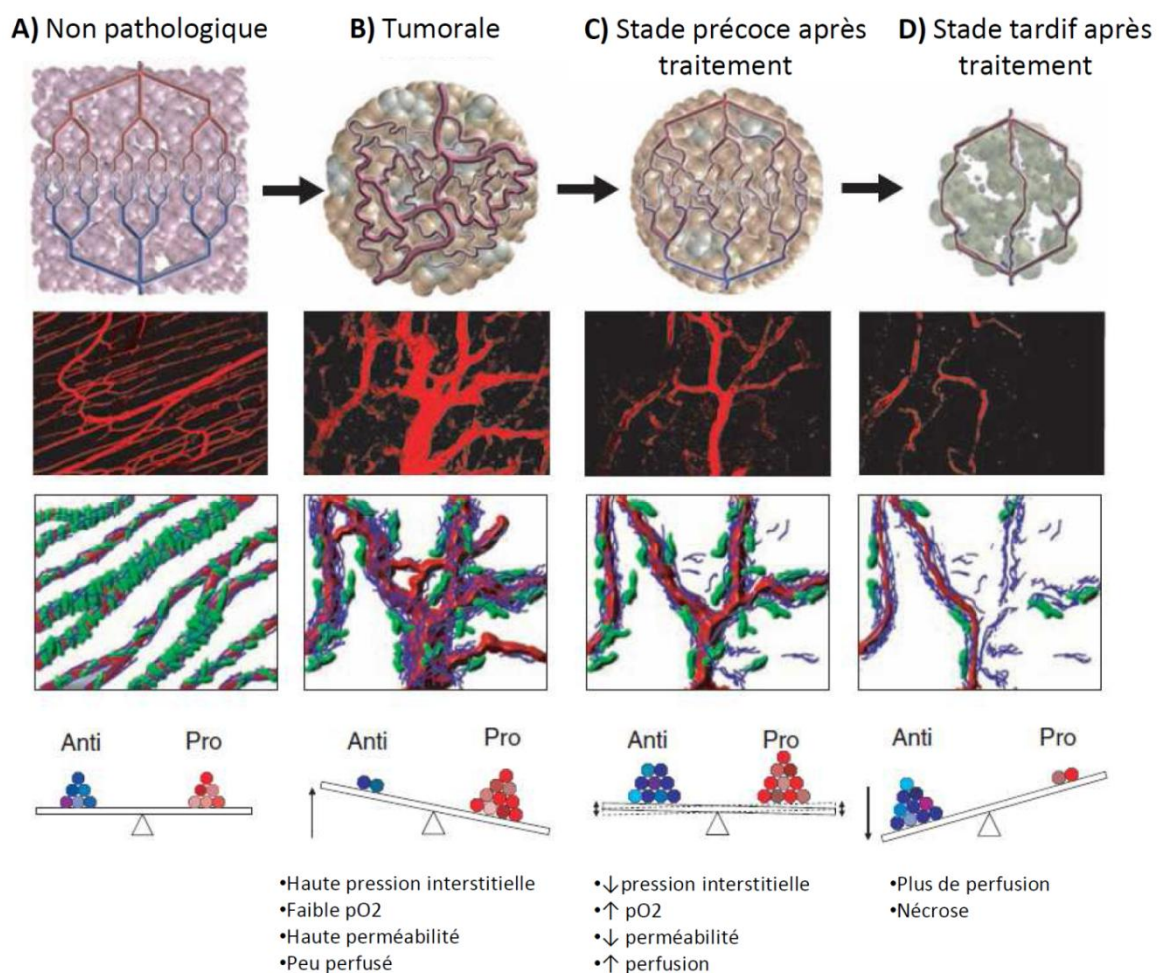


Figure I.3-4 Etat de la vascularisation en condition (A) non pathologique ; (B) tumorale ; (C) tumorale à un stade précoce après traitement anti-angiogénique et (D) tumorale à un stade tardif après traitement anti-angiogénique. *Source : d'après Jain et al. 2005 (Jain et al. 2005) et Jain et al. 2007 (Jain et al. 2007)*

I.3.3 Les stratégies anti-angiogéniques

I.3.3.1 Mode d'action des anti-angiogéniques

Comme on a pu le constater, le processus angiogénique est un phénomène complexe qui doit être finement régulé. En conditions pathologiques, comme c'est le cas lors d'une croissance tumorale, il existe un dérèglement entre molécules pro et anti-angiogéniques. C'est dans ce contexte-là que l'idée est venue de développer des stratégies anti-tumorales appelées stratégies anti-angiogéniques. Cette nouvelle approche ne consiste plus à s'attaquer à la tumeur directement comme le font les traitements habituels (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) mais l'objectif est de réduire, voire de détruire le réseau vasculaire tumoral afin « d'asphyxier » la tumeur et donc indirectement de réduire la masse tumorale. Ces nouvelles molécules ont donc vocation d'inverser le déséquilibre qui existe au sein des tumeurs entre les molécules pro et anti-angiogéniques. Sous anti-angiogénique, la microvascularisation intratumorale va alors passer dans un état d'équilibre transitoire durant lequel elle sera plus oxygénée, mieux perfusée, moins perméable avec une diminution de la pression interstitielle (Figure I.3-4D). En revanche, si le traitement anti-angiogénique continue, la microvascularisation intratumorale se verra alors détruite, induisant un arrêt de la perfusion et donc une nécrose au sein de la tumeur (Figure I.3-4C). L'angiogenèse tumorale fait intervenir une multitude de molécules (protéines, cytokines, récepteurs ...) pro- ou anti- angiogéniques qui peuvent être potentiellement des cibles thérapeutiques. En effet pour un même problème, qui est de bloquer l'angiogenèse tumorale, il existe différentes cibles thérapeutiques possibles (Gagner et al. 2005). Parmi ces cibles on peut notamment citer les agents anti-angiogéniques et les agents anti-vasculaires (Figure I.3-5). Ces dernières années d'importants moyens ont été mis en œuvre par les laboratoires pharmaceutiques pour découvrir et tester ces nouvelles molécules. En 2005, nous pouvions répertorier (Gagner et al. 2005):

- 70 drogues testées individuellement sur des gliomes
- 30 traitements testés en combinaison sur des gliomes.

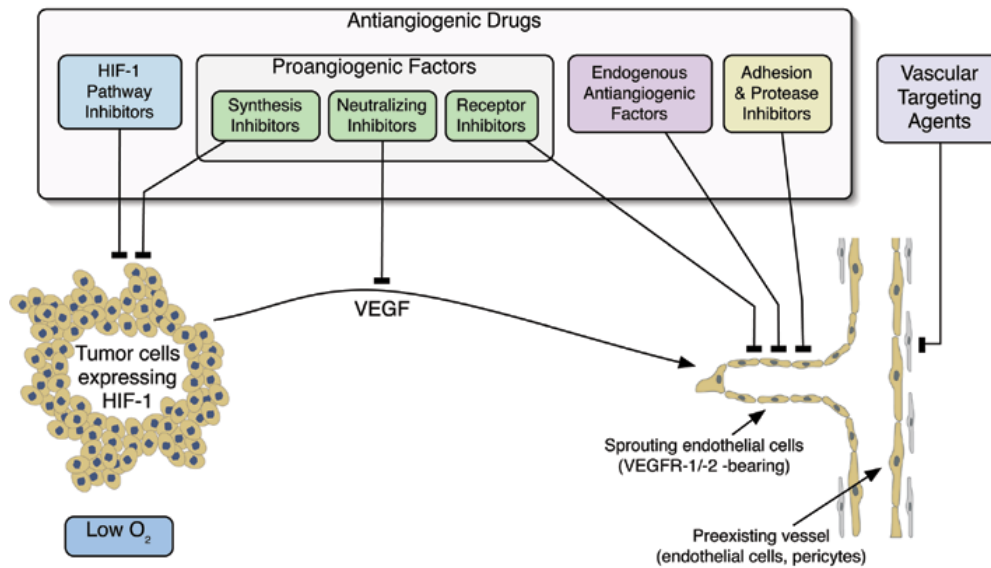


Figure I.3-5 Les différentes cibles thérapeutiques pour inhiber l'angiogenèse tumorale. HIF = *hypoxia Inducible factor*. Source : Gagner et al. 2005 (Gagner et al. 2005)

I.3.3.2 Concept de normalisation de la vascularisation tumorale

Le but premier des anti-angiogéniques est d'asphyxier la tumeur afin d'en réduire sa masse. Mais au cours des premiers suivis d'effets de ces nouvelles molécules sur la microvascularisation tumorale, des études ont démontré que l'état transitoire de la vascularisation tumorale après le début d'un traitement anti-angiogénique pouvait être un moment propice pour injecter une 2^{ème} drogue au patient (Claes et al. 2008, Jain et al. 2005). Cette période est aussi appelée « fenêtre thérapeutique » (Figure I.3-4C). Pendant cette période après le début du traitement (qui reste encore à bien définir), les vaisseaux tumoraux sont mieux oxygénés, mieux perfusés, moins perméables avec aussi une diminution de la pression interstitielle. Une meilleure oxygénation de la tumeur peut se révéler extrêmement importante dans le cadre d'une radiothérapie, en augmentant l'impact des dégâts provoqués par les rayons sur la tumeur par l'intermédiaire des radicaux libres. D'autre part, une amélioration de la perfusion de la tumeur pourrait en théorie augmenter l'apport d'une drogue.

L'utilisation d'agents anti-angiogéniques peut donc avoir une double action sur la progression tumorale :

- D'une part, un effet synergique s'il est utilisé en combinaison avec un agent cytotoxique ou une radiothérapie, à condition de pouvoir suivre très précisément les modifications de la microvascularisation tumorale induites

par la molécule anti-angiogénique.

- D'autre part, à plus long terme, un effet destructeur de la microvascularisation tumorale et par conséquent un effet délétère sur la tumeur.

I.4 Méthodes pour suivre l'effet de thérapies

Du fait du manque d'efficacité des thérapies conventionnelles sur les glioblastomes (chirurgie, chimio- et radiothérapie) de nombreux laboratoires privés ou publics travaillent au développement de nouvelles cibles thérapeutiques dont les molécules anti-angiogéniques. Le nombre de molécules, pouvant potentiellement être des cibles thérapeutiques pour une action anti-angiogénique, augmente de façon exponentielle depuis le milieu des années 90. Ces nouvelles molécules se distinguent des chimiothérapies conventionnelles sur deux grands points : leur effet sur la masse tumorale est relativement lent car indirect, et leur efficacité maximale se situe bien en-dessous de la dose maximale tolérée. Ces deux grandes caractéristiques nécessitent donc de développer de nouveaux marqueurs biologiques (biomarqueurs) spécifiques de ces nouvelles molécules. Le terme biomarqueur définit un indicateur biologique ou d'origine biologique (comme un métabolite biochimique) d'un processus, d'un événement ou d'une condition comme une maladie, ou encore de l'exposition à un traitement. La notion de biomarqueur en oncologie englobe plusieurs sous-catégories listées ci-dessous (Jain et al. 2009) :

- **Les biomarqueurs diagnostiques** permettent d'établir précisément le type et le stade de développement d'un cancer.
- **Les biomarqueurs pronostiques** fournissent des informations sur la finalité globale du cancer du patient, indépendamment de toutes thérapies (Oldenhuis et al. 2008).
- **Les biomarqueurs prédictifs** peuvent être utilisés avant ou après le début d'une thérapie pour estimer la réponse ou la survie d'un patient à un traitement spécifique (McShane et al. 2005).
- **Les biomarqueurs pharmacodynamiques** sont modifiés après le début du traitement et sont associés à l'action spécifique de la molécule étudiée.

Comme nous avons pu l'apercevoir dans le chapitre I.1.1, le développement de nouvelles drogues par les laboratoires pharmaceutiques coûte excessivement cher, c'est pourquoi toutes les compagnies pharmaceutiques n'hésitent pas à investir de grosses sommes d'argent dans le développement de nouveaux biomarqueurs prédictifs et pharmacodynamiques. Les oncologues, eux aussi, ont besoin de nouveaux biomarqueurs susceptibles de suivre l'effet et / ou l'efficacité de ces nouvelles thérapies anti-angiogéniques. En effet, avec un meilleur suivi de l'impact de la drogue sur la tumeur, ils pourront ajuster au mieux les schémas et doses de traitement, changer au besoin de traitement d'un patient non répondeur et optimiser les combinaisons de traitement. L'objectif final étant de pouvoir individualiser les traitements au cas par cas.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord expliqué rapidement ce qu'est le critère de réponse morphologique classiquement utilisé en clinique de type RECIST (« *response evaluation criteria in solid tumor* ») et en quoi ce critère est limitant dans le suivi des thérapies anti-angiogéniques. Dans une deuxième partie nous allons détailler les différents biomarqueurs en cours de développement qui pourront permettre à terme, de suivre directement ou indirectement, l'effet de traitements anti-angiogéniques sur des tumeurs cérébrales.

I.4.1 RECIST

L'un des paradoxes caractérisant les résultats obtenus grâce aux traitements anti-angiogéniques est qu'on peut à la fois observer une amélioration significative de la survie (ou de la qualité de vie) des patients sans pour autant que ces mêmes patients répondent aux critères de réponse morphologiques classiques de type RECIST. Les critères d'évaluations radiologiques RECIST, classiquement utilisés pour évaluer la réponse tumorale, reposent sur la comparaison de la somme des plus grands diamètres des tumeurs mesurée avant et après traitement. Une certaine proportion de patients sous traitement anti-angiogéniques, n'ont que peu ou pas de modification de la taille de leur lésion. Ce paradoxe peut rendre les critères RECIST parfois inadaptés à l'évaluation de l'activité anti-tumorale de ces nouvelles molécules. Ceci pose donc un problème méthodologique important qu'est de définir des critères d'évaluation plus adaptés pour quantifier précocement l'activité des anti-angiogéniques en pratique clinique.

I.4.2 Nouveaux biomarqueurs

Dans le cadre du développement de nouveaux biomarqueurs capables d'évaluer l'effet ou l'efficacité de thérapie anti-angiogénique sur des tumeurs cérébrales, on retrouve 2 grands domaines bien distincts, les méthodes dites invasives et les non invasives (Figure I.4-1). Les 2 chapitres suivants vont exposer chacune de ces approches alors que la 3^{ème} partie résumera, dans un tableau comparatif, les avantages et les limites de ces techniques.

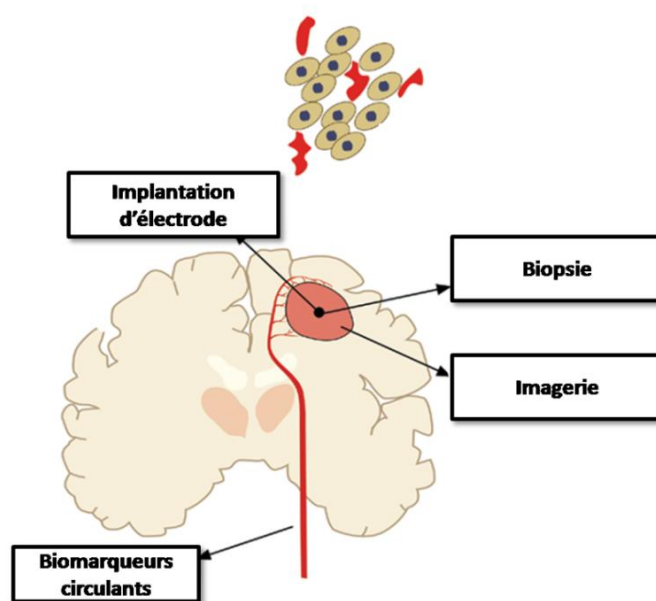


Figure I.4-1 Méthodes, invasives ou non, permettant d'évaluer l'effet d'un traitement anti-angiogénique *in vivo*. Source d'après Gagner et al. 2005 (Gagner et al. 2005)

I.4.2.1 Méthodes invasives (biopsies / implantation d'électrodes)

La biopsie est une technique qui consiste à prélever une partie du tissu d'intérêt, par exemple une fraction de tumeur cérébrale, afin d'en analyser le contenu *ex vivo*. Les échantillons ainsi prélevés peuvent être analysés par des techniques d'histologie (analyse de la densité cellulaire, vasculaire, pouvoir mitotique...), de protéomique ou encore de génétique. Dans le cadre de tumeurs cérébrales, deux types de biopsie peuvent être mises en œuvre : un prélèvement à l'aide d'une aiguille ou un prélèvement par aspiration. Dans les deux cas, une imagerie du cerveau est réalisée (IRM ou scanner X) avant de procéder à l'acte chirurgical dans le but de délimiter la tumeur et de sélectionner la zone à biopsier. L'acte chirurgical de la biopsie est spécialement invasif dans le cas des tumeurs cérébrales, avec l'ouverture de la boîte crânienne et le passage de l'aiguille à travers des zones fonctionnelles du cerveau. De par son caractère local, la biopsie ne peut pas refléter l'intégralité de la tumeur. La région à

biopsier influence donc grandement les conclusions que peut apporter la biopsie en termes de diagnostique et / ou de pronostique. Du fait de son caractère hautement invasif, la biopsie ne peut pas être utilisée pour un suivi longitudinal de l'effet d'une thérapie sur un patient porteur d'une tumeur cérébrale.

D'autres techniques invasives comme l'implantation d'électrodes mesurant soit la pression en oxygène soit la pression interstitielle permettent de suivre l'impact de traitements anti-angiogéniques sur des tumeurs. L'implantation d'électrodes induit les mêmes contraintes que la biopsie. En effet, cette technique nécessite aussi de localiser précisément la tumeur et la zone à étudier, les résultats sont fortement dépendants de la localisation de la mesure (zone nécrotique versus zone périphérique). C'est une technique fortement invasive ne permettant donc pas la réalisation d'un suivi longitudinal de l'effet d'une thérapie sur un patient porteur d'une tumeur cérébrale.

Dans le domaine des méthodes invasives, il existe aussi le prélèvement du liquide céphalo-rachidien (LCR). Plusieurs études ont montré qu'une quantité élevée de VEGF (Peles et al. 2004, Sampath et al. 2004) et bFGF (Peles et al. 2004) dans le LCR, reflète le degré de vascularisation de la tumeur cérébrale et est donc négativement associée à la survie des patients. Le suivi de ces mêmes marqueurs pourrait donc, en théorie, permettre d'observer indirectement l'efficacité de traitement anti-angiogéniques sur des tumeurs cérébrales. Bien que moins invasif qu'une biopsie, le prélèvement de LCR reste un acte chirurgical à risque limitant donc sa répétition dans un but de suivi thérapeutique.

I.4.2.2 Méthodes non ou peu invasives

I.4.2.2.1 Biomarqueurs périphériques

Afin de limiter le caractère invasif pour le patient, des équipes se sont spécialisées dans la recherche de marqueurs sanguins permettant de suivre l'angiogenèse tumorale. Des études ont montré par exemple que lors du processus d'angiogenèse tumorale il y avait recrutement de progéniteurs endothéliaux (du type « angioblast-like ») dérivés de la moelle osseuse servant à la maturation des néo-vaisseaux (ce processus, ici détourné par la tumeur, intervient au cours du développement normal et est appelé vasculogenèse post-natale) (Jansen et al. 2004). Toutefois, seule une contribution mineure (<1%) de ces cellules progénitrices de la vascularisation tumorale a pu être mise en évidence dans des modèles murins (Machein et al. 2003). La présence en faible quantité de marqueurs de l'angiogenèse tumorale dans la

circulation sanguine nécessite la mise en place de nouvelles techniques de détections protéomiques fiables, très sensibles, quantitatives, reproductibles et aussi et surtout moins onéreuses. Dans ce domaine là beaucoup de développement en terme de screening est nécessaire afin de sélectionner et de valider les marqueurs les plus pertinents.

I.4.2.2.2 L'imagerie médicale

De nos jours la neuro-imagerie en neuro-oncologie joue un rôle essentiel dans le diagnostic, l'assistance opératoire mais aussi dans l'évaluation de l'efficacité de thérapies. Parmi toutes les modalités d'imageries existantes, les plus utilisées dans le cadre du suivi thérapeutique, sont la tomodensitométrie (TDM ou scanner X), la spectroscopie par résonance magnétique (SRM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Nous ne rentrerons pas dans les détails des différentes mesures pouvant être réalisées en TDM et en SRM. Dans la majorité des cas, les patients suspectés d'être atteints de tumeur cérébrale passeront une imagerie type TDM avec ou sans injection d'un agent de contraste. En effet, en clinique, l'accessibilité au scanner X est généralement plus importante qu'à l'IRM. De plus, le temps effectif d'une TDM est beaucoup plus rapide qu'une IRM. Toutefois, malgré ses avantages, le scanner X souffre de plusieurs limites dans le cadre de l'imagerie des tumeurs cérébrales. Tout d'abord, la TDM n'est pas très bien adaptée pour détecter de faibles altérations du parenchyme cérébral (en raison de son faible contraste dans les tissus mous), comme c'est le cas de tumeurs qui ne prennent pas le contraste ou les tumeurs dites « infiltrantes » (Ricci et al. 1999). Même avec l'ajout d'agent de contraste intraveineux (à base d'iode) la TDM reste essentiellement une imagerie anatomique et reste inférieure à l'IRM en terme de contraste des tissus mous. De plus la TDM implique l'utilisation de rayonnements ionisants et de produits de contraste iodés pouvant entraîner des réactions allergiques graves. Pour ces raisons, la TDM est principalement employée comme une méthode de dépistage initiale des tumeurs cérébrales.

L'IRM, en revanche, est la modalité d'imagerie principale pour le suivi thérapeutique de patients porteurs de tumeurs cérébrales. En IRM, l'injection intraveineuse de produit de contraste, à base de gadolinium, est une condition presque toujours nécessaire à l'imagerie des tumeurs cérébrales. Mais contrairement aux agents de contraste iodés utilisés en TDM, les agents de contraste à base de gadolinium sont mieux tolérés par les patients. L'utilisation d'agent de contraste permet à la fois une meilleure délimitation de la tumeur mais aussi d'affiner le diagnostic (généralement les tumeurs cérébrales de bas grade ne prennent pas le

contraste contrairement à celles de hauts grade). Les détails anatomiques obtenus par l'IRM de contraste d'une part et son caractère non invasif d'autre part, font de l'IRM l'outil principal pour le suivi thérapeutique de patients atteints de tumeur cérébrale.

I.5 L'IRM multiparamétrique

L'IRM est un outil qui permet d'obtenir une multitude d'informations différentes qui vont de l'imagerie anatomique haute résolution à l'imagerie fonctionnelle reflétant l'activité neuronale. Le principe de l'IRM consiste à réaliser des images des tissus *in vivo* grâce aux nombreux atomes d'hydrogène qu'ils contiennent. Une aimantation émerge des noyaux des atomes d'hydrogène (proton) lorsqu'ils sont placés dans un puissant champ magnétique. Les protons sont alors excités par des ondes radio durant une très courte période (à la fréquence de résonance des protons). A l'arrêt de cette stimulation, les atomes restituent l'énergie reçue sous forme d'un champ magnétique qui est enregistré et reconstruit sous forme d'image par un système informatique. Parmi toutes les applications possibles de l'IRM, ne seront développées que celles utilisées lors des différentes études présentées dans cette thèse : le coefficient de diffusion apparent de l'eau (*apparent diffusion coefficient* : ADC), l'index de taille des vaisseaux (*vessel size index* : VSI), le volume sanguin (*blood volume fraction* : BVf), la perméabilité des vaisseaux et la saturation locale en oxygène sanguine (ISO₂).

I.5.1 Coefficient de diffusion apparent de l'eau

L'ADC caractérise la diffusion des molécules d'eau dans un environnement donné (exprimé en millimètres carré par seconde). L'ADC est essentiellement sensible à l'hétérogénéité des structures au voisinage des molécules d'eau. Des valeurs élevées d'ADC correspondent à un mouvement relativement libre des molécules d'eau. En revanche, des valeurs faibles correspondent à des mouvements plus restreints. En neuro-oncologie, l'IRM de diffusion est utilisée depuis le milieu des années 90 en préclinique pour suivre l'efficacité d'agents cytotoxiques (Chenevert et al. 1997, Kim et al. 1995). Suite à ces premières études, une relation entre le changement de cellularité tumorale induit par un traitement cytotoxique et la mobilité des molécules d'eau estimée par l'IRM de diffusion a été proposée. En effet, l'augmentation de l'espace extracellulaire et de la perméabilité des membranes (dans le cas de nécrose induite par un traitement cytotoxique) permet une plus grande mobilité de l'eau, ce

qui implique une augmentation des valeurs d'ADC (Figure I.5-1). A la suite de ces premières études précliniques, de nombreuses études cliniques ont démontré que l'IRM de diffusion peut être considérée comme un biomarqueur non invasif de suivi de la réponse d'une tumeur à un traitement induisant de la nécrose cellulaire (Galbán et al. 2009, Padhani et al. 2009).

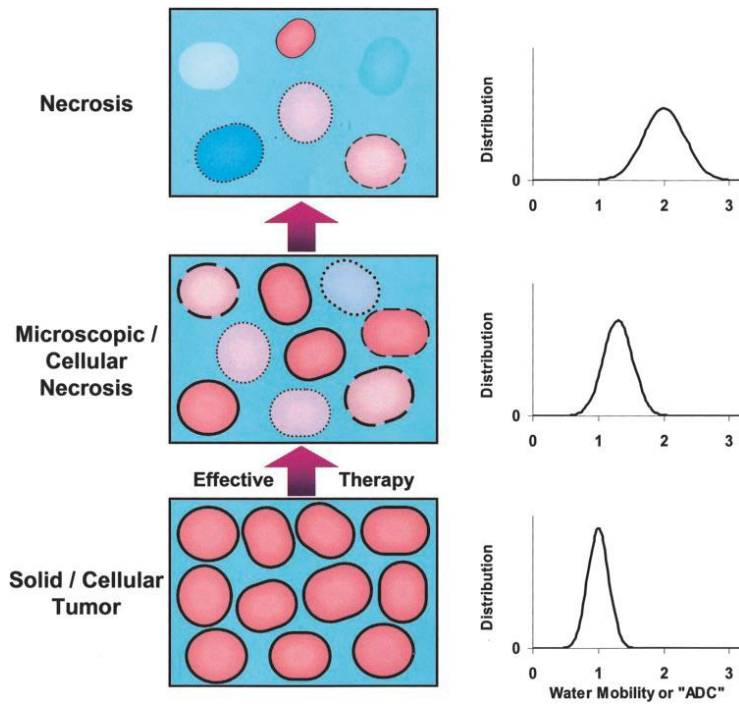


Figure I.5-1 Représentation schématique de la relation entre le changement de la cellularité des tissus et la mobilité de l'eau moléculaire mesurée par l'ADC. À gauche est représentée l'évolution des cellules tumorales après une thérapie cytotoxique efficace. À droite est représentée l'évolution de la distribution des valeurs d'ADC correspondant à chaque étape de la nécrose cellulaire. Source : adapté de Ross et al. 2003 (Ross et al. 2003)

I.5.2 Volume sanguin

Le BVf mesuré par IRM, est un paramètre qui exprime la quantité de sang présente dans un volume donné. Il est en général exprimé en ml.mg^{-1} ou en pourcentage de volume occupé par le sang dans un voxel.

Historiquement, les premières mesures de BVf ont été réalisées en suivant par IRM les effets de susceptibilité magnétique induits par le premier passage d'un agent de contraste dans le sang. En effet, la différence de susceptibilité magnétique entre les milieux intra- et extra-vasculaires (induite par l'agent de contraste) induit des variations locales de champ magnétique et perturbent les temps de relaxation T_2 , T_2^* et T_1 (Figure I.5-2). L'acquisition de séquences pondérées T_2^* permettent donc de suivre le passage du bolus de l'agent de contraste. Le calcul de l'aire sous la courbe de ce suivi dynamique permet de calculer le BVf (Meier et al. 1954). Dans ce type de mesure, le volume sanguin estimé n'est pas absolu. En effet les mesures réalisées dans une région d'intérêt donnée (ROI) sont normalisées avec une ROI dite contrôle. Ce type de mesure nécessite une forte résolution temporelle au détriment

de la résolution spatiale. Les agents de contraste utilisés sont en général des agents de petite taille (≈ 1 kDa pour le Gd-DOTA ; molécule possédant l'autorisation de mise sur le marché;

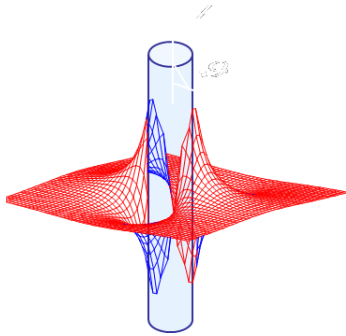


Figure I.5-2 Perturbation du champ magnétique B_0 par un cylindre « magnétique », représentant un vaisseau sanguin rempli d'agent de contraste

AMM). Il est important de noter que les agents de contraste de petite taille peuvent s'extravaser quand la BHE est lésée (particularité utilisée pour des mesures de perméabilité §I.5.4 page 42). Ce phénomène induit donc une sous estimation du BVf dans le cadre BHE lésée (comme dans le cas de GBMs) (Paulson et al. 2008).

Une autre technique est utilisée pour réaliser des mesures de BVf : l'approche à l'équilibre. Cette technique est toujours basée sur les effets de susceptibilité magnétique induit par l'ajout d'un agent de contraste dans le sang. Le choix de l'agent de contraste utilisé est très important pour réaliser des mesures de types BVf à l'équilibre. En effet, dans ce type d'approche l'agent de contraste doit absolument rester dans le compartiment intra-vasculaire et sa concentration ne doit pas varier pendant la durée de la mesure. Dans le cas de tumeurs cérébrales, la BHE est lésée, ce qui ne permet pas d'utiliser des agents de contraste de type gadolinium. Pour toutes nos études, nous avons donc utilisé un agent de contraste dit *ultra small superparamagnetic iron oxide* (USPIO) appelé Sinerem[®] (Guerbet, France) qui a l'avantage de par sa taille (20 nm), de rester en théorie, intra-vasculaire même en cas de BHE lésée. Sa $\frac{1}{2}$ vie plasmatique est plus longue que celle des agents de contraste de petite taille (4,5 h versus environ 26 min pour le Gd-DOTA). Cette condition doit néanmoins être vérifiée lors de chaque nouvelle expérience. En effet, nous avons montré au laboratoire que selon le type de gliome étudié, le Sinerem[®] pouvait s'extravaser dans des temps comparables à ceux de la durée d'une mesure (Beaumont et al. 2009). Les perturbations, induites pas la présence de l'USPIO dans le sang, s'étendent aux tissus adjacents, et induisent une augmentation de la vitesse de relaxation transversale R_2^* ($R_2^* = 1/T_2^*$). Des mesures de R_2^* avant et après injection d'un agent de contraste vont donc permettre de calculer la variation ΔR_2^* . Le BVf est estimé à partir du ΔR_2^* et de la concentration en agent de contraste intra-vasculaire selon

l'Équation 1. Par rapport à des techniques dynamiques de suivi de bolus, les mesures à l'équilibre utilisant des USPIOs offrent un meilleur rapport signal sur bruit et donc une meilleure résolution spatiale tout en s'affranchissant des contraintes causées par des modifications de l'état de la BHE. Cette technique a aussi l'avantage d'être robuste et quantitative, sans avoir besoin de déterminer la fonction d'entrée artérielle (*arterial input function* : AIF), au détriment du temps passé pour les mesures de T_2 et T_2^* .

Différentes études ont montré qu'il existe une corrélation entre des mesures de volume sanguin et le grade des tumeurs cérébrales estimé par histologie (Aronen et al. 1994, Lee et al. 2001). De plus, il a été plus récemment montré, tant en clinique (Galbán et al. 2009, Sorensen et al. 2009) qu'en préclinique (Robinson et al. 2007, Varallyay et al. 2009), que le BVf pouvait être modifié sous l'action d'une drogue anti-angiogénique dans une tumeur cérébrale.

$$BVf = \frac{3}{4\pi} \frac{\Delta R_2^*}{\gamma \Delta \chi B_0}$$

γ = rapport gyromagnétique du proton
 $\Delta \chi$ = différence de susceptibilité intra- extra vasculaire après injection de l'agent de contraste (cgs)
 B_0 = valeur du champ magnétique statique (T)

Équation 1 équation permettant de calculer le volume sanguin. Source Tropres et al. 2001

I.5.3 Index de taille des vaisseaux

Le VSI tel qu'il est mesuré par IRM correspond à un diamètre moyen des vaisseaux sanguins pondéré par le nombre de vaisseaux qui possèdent le même diamètre. Il reflète en fait, non seulement un diamètre moyen mais aussi la variabilité de distribution des diamètres des vaisseaux au sein d'un voxel (exprimé en μm). La mesure du VSI est, comme le BVf, basée sur la différence de susceptibilité magnétique induit par la présence (ou le passage) d'un agent de contraste dans le sang. En effet, la présence d'un agent de contraste intra-vasculaire induit, en plus d'une augmentation de la vitesse de relaxation transversale R_2^* , une augmentation du R_2 ($R_2 = 1/T_2$). L'augmentation du R_2 (réduction du T_2) est principalement due aux effets de diffusion des molécules d'eau au voisinage des vaisseaux sanguins. En effet, les molécules d'eau « explorent » des paysages magnétiques différents en fonction de la taille des vaisseaux qui les entourent (remplis d'agents de contraste). Des mesures de R_2^* et R_2 , peuvent soit être réalisées pendant le passage de l'agent de contraste (méthode dynamique) (Kiselev et al. 2005) soit avant et après l'injection de l'agent de contraste (méthode à l'équilibre) (Tropres et al. 2001). Ces mesures permettent de calculer les variations ΔR_2^* et

ΔR_2 . Le VSI peut être estimé à partir du rapport $(\Delta R_2^*/\Delta R_2)^{3/2}$, du coefficient de diffusion de l'eau et de la concentration en agent de contraste intra-vasculaire selon l'Équation 2.

La méthode dynamique, surtout employée en clinique, utilise un agent de contraste à base de gadolinium de petite taille (les seuls à avoir l'AMM) (Kiselev et al. 2005). Cette approche fait l'hypothèse que l'agent de contraste (injecté en bolus) ne s'extravase pas durant son 1^{er} passage dans la circulation sanguine. Bien que cette méthode de mesure du VSI soit rapide, elle n'a pas une très bonne résolution spatiale. De plus, comme toute mesure dynamique, elle est sensible à la fonction d'entrée artérielle (AIF). A cause des difficultés à quantifier l'extravasation de l'agent de contraste et donc d'estimer la concentration précise de l'agent de contraste au moment du bolus, la méthode dynamique de mesure du VSI est non quantitative. La 2^{ème} méthode permettant de calculer le VSI est la méthode dite à l'équilibre. Dans ce cas là, des mesures de R_2 et R_2^* sont réalisées avant et après injection de l'agent de contraste (Tropres et al. 2004). Comme dans le cas des mesures à l'équilibre du BVf, cette méthode nécessite l'utilisation d'agent de contraste qui doit absolument rester dans le compartiment intra-vasculaire durant la durée des acquisitions. Pour toutes nos études, nous avons donc utilisé un USPIO appelé Sinerem[®] (Guerbet, France ; 20 nm). Cette méthode prend plus de temps par rapport à la méthode dynamique, néanmoins elle s'affranchi de l'extravasation de l'agent de contraste (car plus gros), de l'AIF et permet donc d'obtenir une quantification absolue du VSI avec une meilleure résolution spatiale que la méthode dynamique.

Plusieurs études ont montré que le VSI, estimé par une méthode dynamique ou à l'équilibre, pouvait permettre de caractériser la taille des vaisseaux chez l'homme (Kiselev et al. 2005, Schmainda et al. 2004) et chez l'animal (Tropres et al. 2004, Valable et al. 2008) (l'étude II de cette thèse). D'autres études sont allées plus loin et ont montré, en clinique (Batchelor et al. 2007) et préclinique (Robinson et al. 2003, Wade et al. 2007, Zwick et al. 2009), que le VSI était sensible à un traitement anti-angiogénique.

$$VSI = 0,425 \left(\frac{ADC}{\gamma \Delta \chi B_0} \right)^{1/2} \left(\frac{\Delta R_2^*}{\Delta R_2} \right)^{3/2}$$

γ = rapport gyromagnétique du proton
 $\Delta \chi$ = différence de susceptibilité intra- extra vasculaire après injection de l'agent de contraste (cgs)
 B_0 = valeur du champ magnétique statique (T)

Équation 2 : équation permettant de calculer l'index de taille des vaisseaux ou VSI. Source Tropres et al. 2001

I.5.4 Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

Les altérations de la BHE jouent un rôle clé dans le développement, l'infiltration et la propagation des GBMs (Lefranc et al. 2005, Tate et al. 2009). La mesure de la perméabilité de la BHE, en IRM, repose sur l'utilisation d'agents de contraste paramagnétiques à base de gadolinium. Ces agents de contraste induisent un gradient de champ magnétique local et modifie le processus de la relaxation T_1 et T_2 dans une moindre mesure. Une augmentation significative du T_1 est produite si la molécule traverse la BHE (les modifications du T_1 induites par les protons intra-vasculaires sont très faibles). Or, ces agents de contraste ne s'extravasent que si la BHE est lésée, comme c'est le cas en présence de GBMs. Récemment, des études ont montré que l'augmentation de signal pondéré T_1 était dépendante de la taille des agents de contraste utilisés (0,5 à 92 KDa ; (Turetschek et al. 2004)) et était directement reliée à l'état de la BHE. Autrement dit, deux molécules de taille différente ne passeront pas de la même manière une BHE lésée. Il existe deux grandes techniques permettant d'estimer l'intégrité de la BHE : la technique statique (qualitative) et la technique dynamique (semi-quantitative ou quantitative).

La méthode statique consiste à réaliser simplement une image pondérée T_1 (T_{1w}) avant et quelques minutes après l'injection de l'agent de contraste (appelée *contrast enhancement MRI* ; CE). Cette technique est utilisée en routine clinique afin de diagnostiquer une rupture de la BHE (GBMs, accidents vasculaires cérébraux...). Cette méthode est essentiellement qualitative et est dépendante du temps entre l'injection et l'acquisition de la 2^{nde} image (Figure I.5-3 'Méthode statique').

La méthode dynamique (DCE) consiste à réaliser des acquisitions de type T_{1w} toutes les 5-15 sec pendant une période de 15 minutes environ. Au bout d'environ 5 répétitions, l'agent de contraste à base de gadolinium est injecté en i.v. à l'animal. Ce type d'acquisition permet d'obtenir des profils de rehaussement de signal dans les zones où la BHE est lésée (Figure I.5-3 'Méthode dynamique').

La quantification la plus répandue de ces courbes de variation de signal est réalisée à l'aide du modèle de Tofts étendu (Tofts et al. 1995, Tofts et al. 1991). Ce modèle a pour objectif de quantifier, entre autre, les paramètres K_{trans} (constante de transfert vasculaire, regroupant la perméabilité et la perfusion), V_e (volume extra-vasculaire et extra-cellulaire) et V_p (volume plasmatique). Ce modèle nécessite d'acquérir en plus de la séquence DCE, une cartographie T_1 pré-injection ainsi que la fonction d'entrée artérielle (AIF) de l'agent de contraste.

Le problème récurrent de ce type de quantification est l'obtention de l'AIF animal par animal (van Osch et al. 2001). Pour palier ce problème, il existe un autre type d'analyse de données de perméabilité qui ne nécessite pas de cartographie T_1 ni d'AIF. C'est une analyse semi-quantitative qui détermine directement à partir de la courbe de rehaussement de signal (induit par l'injection de l'agent de contraste) des paramètres tels que le pourcentage de rehaussement, le temps au pic ou encore l'aire sous la courbe (AUC). Bien que l'AUC soit

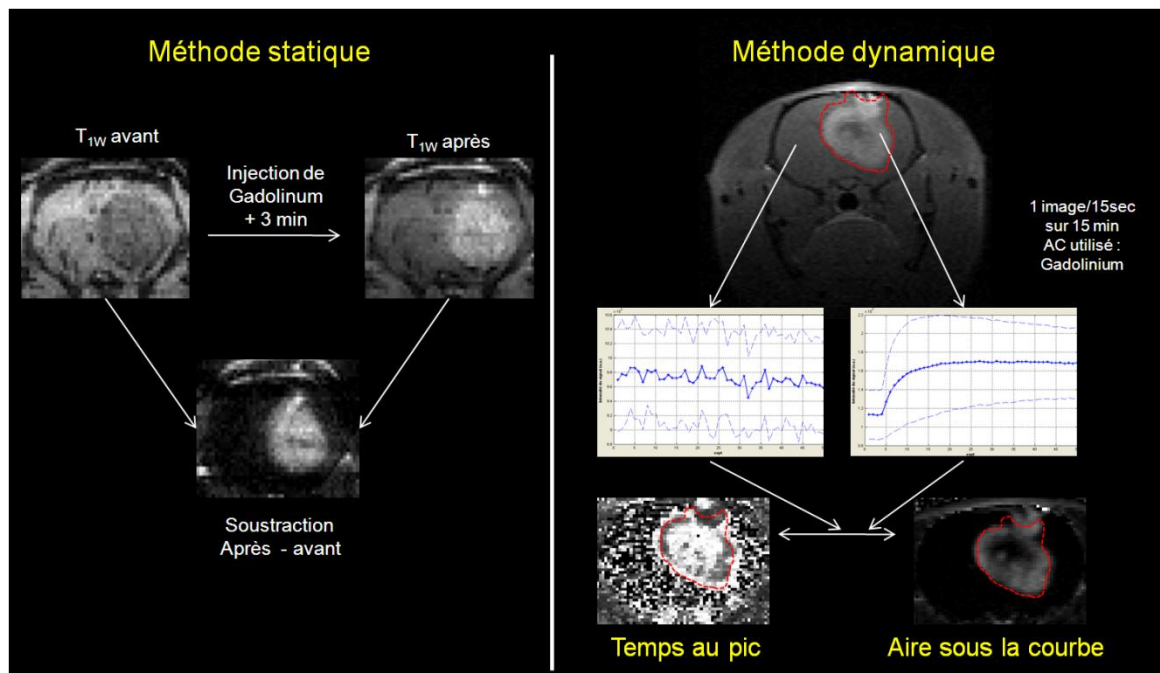


Figure I.5-3 Principe des deux techniques permettant d'estimer l'intégrité de la BHE. A gauche est présentée la méthode statique de rehaussement de contraste (CE) et à droite la méthode dynamique (DCE).

couramment utilisée en préclinique (Robinson et al. 2003) et en clinique (Liu et al. 2005), la compréhension des phénomènes biologiques sous-jacents à ce type d'analyse n'est pas encore très bien définie. En 2006, l'étude de Walker-Samuel et al. a montré que l'AUC était un paramètre représentatif des trois paramètres : Ktrans, Ve et Vp (Walker-Samuel et al. 2006). Cette étude a montré que les mesures d'AUCs n'étaient pas significativement modifiées par l'AIF. En 2009, les travaux de Cheng (Cheng et al. 2009), basés sur des simulations informatiques ont permis de raffiner le calcul de l'AUC et de le scinder en deux paramètres distincts l'AUC_{Ktrans} (Équation 3) et l'AUC_{ve} (Équation 4) corrélés avec respectivement le Ktrans (p = 0,97) et le Ve (p = 0,95).

$$AUC_{Ktrans} = \left\{ \left[\frac{(AUC_{60}/AUC_{REF60})^{1,15}}{AUC_{60-180}/2} \right] x (AUC_{180-300}/2)^{0,49} - 0,9 \frac{AUC_{20}}{AUC_{REF20}} \right\}^{1,9}$$

Équation 3 équation permettant de l'AUC_{Ktrans}. *Source : Cheng 2009 (Cheng et al. 2009)*

AUC₆₀ = l'aire sous la courbe entre l'injection et la 60^{ème} seconde après l'injection

REF = organe de référence (par exemple le muscle)

$$AUC_{ve} = \frac{AUC_{Tstart-Tend}}{Tstart - Tend}$$

Équation 4 équation permettant de l'AUC_{ve}. *Source : Cheng 2009 (Cheng et al. 2009)*

Tstart = injection de l'agent de contraste

Tend = fin de la séquence

Des études ont montré que des agents anti-angiogéniques dirigés contre le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) induisent une réduction de la perméabilité des vaisseaux tumoraux (Batchelor et al. 2007, Gossman et al. 2002, Zwick et al. 2009). Inversement, des VDA (*vascular disrupting agents*), ou encore des radiothérapies induisent une augmentation de la perméabilité des vaisseaux tumoraux (Leach et al. 2005, Seshadri et al. 2009). L'étude la perméabilité des vaisseaux par IRM, permet donc d'évaluer l'impact de différentes thérapies sur des tumeurs cérébrales (Barrett et al. 2007, Sorensen et al. 2009).

1.5.5 Saturation locale du sang en oxygène

Les GBM ont une microvascularisation très hétérogène avec des zones très vascularisées mais paradoxalement la plupart des cellules tumorales sont en hypoxie (Tatum et al. 2006, Vaupel et al. 2001). En effet, les néo-vaisseaux présentent une structure anormale. Ils sont dilatés et tortueux, aboutissant à un flux sanguin chaotique. L'existence de vaisseaux ne garantit donc pas une bonne oxygénation du tissu tumoral. Une sous-population de cellules cancéreuses peut devenir capable de survivre sans métabolisme oxydatif et de proliférer malgré ces conditions. L'hypoxie est donc associée à un phénotype agressif qui favorise la

progression tumorale et le pouvoir métastatique (Brahimi-Horn et al. 2007, Tatum et al. 2006). De plus, l'hypoxie rend la tumeur chimio- et radiorésistante. La mesure de saturation locale en oxygène dans le sang ISO_2 , présentée ci-dessous, est une nouvelle technique qui pourrait permettre de mesurer indirectement l'hypoxie tissulaire.

La mesure de la ISO_2 par IRM est basée sur des mesures de susceptibilité magnétique (T_2^*). L'agent de contraste utilisé ici est endogène : l'hémoglobine. En effet, l'hémoglobine liée à l'oxygène (oxyhémoglobine) est moins paramagnétique que l'hémoglobine désoxygénée (désoxyhémoglobine). C'est cette différence de susceptibilité magnétique entre l'oxy et la désoxyhémoglobine qui perturbe le champ magnétique autour des vaisseaux et donc le signal RMN. Cette propriété, utilisée pour réaliser des IRM fonctionnelles, est appelée contraste BOLD (blood oxygen level-dependent). La méthode, développée au laboratoire, pour estimer la ISO_2 est basée sur une méthode quantitative du signal BOLD (qBOLD) (He et al. 2007, He et al. 2008). L'idée générale de cette technique est que si on s'affranchit des effets macroscopiques du champ magnétique sur les cartes de T_2^* (en corrigeant le T_2^* par une carte du champ magnétique B_0 ($T_{2^*_{corr}}$)) ; la différence entre le T_2 et le $T_{2^*_{corr}}$ est principalement due à la présence de sang désoxygéné (Christen et al. 2009 en soumission). En réalisant des mesures de volume sanguin (par exemple grâce à la technique présentée au chapitre I.5.2 page 39), d'hématocrite (à l'aide des gaz du sang), de T_2 , T_2^* et B_0 on peut parvenir à calculer le paramètre ISO_2 (Équation 5).

$$s(t) = Cte.F(t). \exp (-R_{2t}.t - BVf.\gamma \frac{4}{3} . \pi . \Delta\chi_0 . Hct. (1 - ISO_2) . B_0 . t)$$

Équation 5 : équation permettant d'estimer le paramètre ISO_2 . Source : Christen et al 2009 (en soumission)

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Bases rationnelles

Afin de palier au manque d'efficacité des thérapies traditionnelles sur les GBMs (chirurgie, chimio- et radiothérapie), de nombreux laboratoires développent de nouvelles thérapies ciblées comme les thérapies anti-angiogéniques. Cette approche a des effets indirects sur les tumeurs puisqu'elle a pour cible principale la néo-vascularisation. Il existe donc un délai entre l'effet du médicament sur sa cible vasculaire et son impact sur la masse tumorale. RECIST, seul critère utilisé en routine clinique, n'est donc plus un critère pertinent pour évaluer précocement l'effet de ces nouveaux traitements. Il semble alors nécessaire de développer et d'évaluer de nouveaux indicateurs objectifs et quantitatifs, non invasifs, de la réponse tumorale à un traitement anti-angiogénique.

Puisque les traitements anti-angiogéniques ont pour cible la microvascularisation tumorale, on s'est donc demandé si l'IRM de la microvascularisation pouvait permettre, ou non, de suivre, de façon non invasive, la réponse de la tumeur à ces traitements. Un des derniers développements méthodologiques du laboratoire, avant le début de cette thèse, était la mise en place d'une nouvelle méthode permettant de cartographier le volume sanguin cérébral (BVf) et l'index de taille des vaisseaux (VSI). Cette méthode avait été validée sur des cerveaux d'animaux sains (Tropres et al. 2001) et porteurs de gliome C6 à un stade avancé de développement (Tropres et al. 2004). Ces deux articles ont constitué le point de départ de cette thèse.

Objectifs

L'objectif principal de cette thèse est de déterminer si ces nouveaux paramètres IRM, caractérisant la vascularisation tumorale (BVf et VSI), peuvent être utilisés comme indicateurs thérapeutiques (diagnostiques, prédictifs, pronostiques ou pharmacodynamiques) pour les glioblastomes traités ou non avec un agent anti-angiogénique. Au cours des différentes études réalisées, le nombre de paramètres IRM a augmenté. En effet, des paramètres de la microvascularisation tels que la perméabilité des vaisseaux ou encore la saturation sanguine locale en oxygène (ISO₂) ont été évalués puis ajoutés au protocole d'imagerie.

Mon travail a donc comporté quatre études, chacune avec des objectifs spécifiques :

Etude 1 : elle a consisté d'abord à caractériser 6 modèles de gliomes, au même stade

de développement tumoral, en s'aidant de 3 paramètres IRM (BVf, VSI et ADC) puis à corrélérer ces résultats avec des données histologiques.

Les objectifs de ce travail étaient :

- Caractériser de la vascularisation de 6 modèles de gliome par IRM et histologie.
- Evaluer la capacité de l'IRM à différencier les tumeurs du tissu sain et/ou de discriminer les 6 modèles entre eux.
- Evaluer si l'IRM peut être prédictive de la réponse tumorale à une chimiothérapie.

Etude 2 : elle s'est proposée de vérifier la faisabilité d'un suivi longitudinal (4 temps) des 3 paramètres IRM cités précédemment (BVf, VSI et ADC) sur 2 modèles de GBMs et de corrélérer ces résultats avec des données biologiques (histologie + étude protéique).

Les objectifs spécifiques de ce travail étaient :

- Etudier la faisabilité d'une mesure répétée par IRM des paramètres BVf et VSI sur le même animal.
- Comparer les mesures IRM *in vivo* de BVf et de VSI avec les mesures histologiques *ex vivo* correspondantes, à savoir le BVf_{histo} et le VSI_{histo}.
- Caractériser l'évolution des paramètres cellulaires (ADC) et vasculaires (BVf et VSI) durant la croissance des deux modèles de gliomes C6 et RG2.
- Confronter les observations de la micro-vascularisation par IRM avec des études protéiques et enzymatiques.

Etude 3 : elle s'est appliquée à suivre (4 temps) l'effet de deux traitements (cytotoxique ou anti-angiogénique) sur 4 paramètres IRM (BVf, VSI, ADC + étude qualitative de la perméabilité des vaisseaux) dans un modèle de gliome humain et de corrélérer ces résultats avec des données histologiques.

L'objectif de ce travail était :

- Evaluer si les paramètres estimés par IRM peuvent être modifiés par des thérapies anti-tumorales. Le but étant de déterminer si un ou plusieurs de ces

paramètres IRM sont sensibles à un traitement donné.

Etude 4 : elle a consisté à suivre (7 temps) l'effet d'une radiothérapie synchrotron (MRT) couplée ou non avec une thérapie anti-angiogénique dans un modèle de gliosarcome de rat. Le protocole d'imagerie de cette étude s'est enrichi, par rapport aux 3 études précédentes, par un suivi de 6 paramètres IRM (BVf, VSI, ADC, perméabilité des vaisseaux à deux agents de contraste et ISO_2). Dans cette étude nous avons aussi corrélé les résultats IRM avec différentes données biologiques (histologie + étude protéique).

Les objectifs de ce travail étaient :

- Evaluer la sensibilité de tous les paramètres IRM à un traitement anti-angiogénique et une radiothérapie seuls ou combinés.
- Evaluer l'effet de la MRT sur la vascularisation saine et tumorale.
- Evaluer l'intérêt de l'utilisation d'une injection séquentielle de deux agents de contraste de taille différente (P846 *versus* Gd-DOTA) pour mesurer l'impact de traitements anti-tumoraux.
- Evaluer la robustesse et la signification d'un nouveau paramètre IRM développé au laboratoire : la ISO_2 .

METHODOLOGIE

III.1 Méthodologie *in vivo*

Les expériences réalisées au cours de cette thèse ont obtenu l'accord (n°081) du comité local d'éthique (de l'institut des neurosciences). Les expériences ont été réalisées en vertu des autorisations à expérimenter n°380321, 380820, 380325, 380508 et des autorisations des laboratoires A3851610004, A3818510002 et B3851610003 délivrées par le ministère français de l'agriculture. Les animaux ont été notamment euthanasiés selon des points limites connus pour être révélateur d'une souffrance de l'animal. Les critères qui définissent les points limites varient selon que l'animal est sous traitement ou non :

- Points limites pour des rats non traités

Les animaux sont observés et pesés tous les 3 jours en début de croissance tumorale, puis tous les jours, à environ 1 semaine de la médiane de survie. Les médianes de survie de tous les modèles de gliome du laboratoire sont connues. Les rats sont euthanasiés dès qu'un des critères suivants est observé :

- Baisse du poids supérieure à 20% du poids maximal
- Hémorragie per-orbitale
- Poils mal entretenus
- Trouble de la locomotion (hypokinésie ou akynésie)
- Prostration
- Hémorragie nasale

- Points limites pour les rats traités

Les animaux sont suivis et pesés tous les jours si nécessaire les premiers jours post-traitement, sinon tous les 3 jours puis tous les jours pendant la durée du traitement. Les traitements effectués peuvent occasionner comme chez l'homme un affaiblissement transitoire entraînant une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids pouvant aller jusqu'à 30%. Dans ce cas, de la nourriture humidifiée est disposée dans des coupelles placées au fond de la cage pour faciliter la prise alimentaire des rats affaiblis. Si malgré ce dispositif, les rats ne s'alimentent pas, ils sont immédiatement euthanasiés. Si en présence de ce dispositif, les rats reprennent du poids sans séquelles avérées, les rats sont suivis tous les 3 jours. Ils sont immédiatement euthanasiés dès qu'un des critères suivants est observé :

- Baisse du poids supérieure à 20% du poids maximal
- Hémorragie per-orbitale

- Poils mal entretenus
- Trouble de la locomotion (hypokinésie ou akynésie)
- Prostration
- Hémorragie nasale

III.1.1 Lignées cellulaires et modèles animaux

III.1.1.1 Lignées cellulaires

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé 7 lignées des cellules tumorales gliales. Quatre lignées GV1A1, 9L, C6 et RG2 sont des cellules tumorales provenant de rats (modèles syngéniques), les trois autres CGL3, CGL9 et U-87 MG, étant des cellules tumorales humaines (modèles xénogéniques). Toutes les lignées cellulaires, exceptées GV1A1, CGL3 et CGL9, ont été achetées chez ‘American Type Culture Collection (ATCC)’. Les cellules tumorales ont été utilisées entre le 5^{ème} et le 15^{ème} passage *in vitro*. Toutes les lignées cellulaires ont été mises en culture dans du milieu RPMI1640 contenant 10% de sérum de veau fœtale, 2mM de L-glutamine et 1% d’antibiotique (streptomycine / pénicilline) à 37°C en atmosphère humide (5% CO₂ et 95% air).

III.1.1.1.1 Lignées syngéniques

La lignée GV1A1 a été établie à partir d’un gliome mixte obtenu par injection de N-ethyl-N-nitrosurée à des rats BD-IX.

La lignée 9L a été établie par Benda et al. en 1971 par injections répétées par voie intraveineuse de N-nitrosométhylurée (5 mg.kg⁻¹) pendant 26 semaines à des rats Fisher (Barth et al. 1998). L’histopathologie des cellules tumorales 9L a montré que c’était des cellules de type gliosarcome.

La lignée C6 est issue d’une tumeur gliale chimio-induite par injection de N-nitrosométhylurée chez le rat Wistar (Barth et al. 1998). Le modèle C6 est le plus couramment utilisé pour la caractérisation biologique des tumeurs cérébrales, y compris l’angiogenèse (Barth et al. 1998, Grobбен et al. 2002). La durée moyenne de survie après l’implantation intracérébrale de 10⁵ cellules est de 28 ± 5 jours. Les gliomes C6 de rat ont été classés comme astrocytome (Barth et al. 1998).

La lignée RG2 est obtenue par injection de N-éthyl-N-nitroso-urée à des rats Fischer

344 femelles en cours de gestation (Swenberg et al. 1972). La durée moyenne de survie après l'implantation intracérébrale de 5.10^3 cellules est de 22 ± 3 jours. Ces tumeurs présentent un profil de croissance très invasive, résistant à toutes les modalités thérapeutiques, et non immunogène chez un hôte syngénique. Le gliome RG2 chez le rat est considéré comme un bon modèle de glioblastome (Barth et al. 1998).

III.1.1.1.2 Lignées xénogéniques

Les lignées cellulaires CGL3 et CGL9 ont été générées à Oncodesign par dissociation mécanique de fragments de tumeurs prélevés sur des souris « *nude* » porteuses de glioblastomes humains implantés en sous-cutané. Deux glioblastomes humains TG-8 et SNB-19 (obtenus grâce au Dr MF Poupon, Institut Curie, Paris, France), ont été utilisés respectivement pour obtenir les lignées CGL3 et CGL9.

La lignée cellulaire U-87 MG a été obtenue à partir d'un glioblastome humain prélevé en 1968 chez une patiente de type caucasienne de 44 ans (source ATCC)(Fogh et al. 1977).

III.1.1.2 Modèles animaux

Des rats mâles BDIX, Wistar et Fisher F344 (200-250g ; Charles River, l'arbresle, France) ont été utilisés comme hôtes pour les 3 modèles syngéniques GV1A1, C6, 9L* et RG2*, respectivement (* ces deux modèles ont été implantés chez des rats Fisher 344).

Les 3 modèles xénogéniques CGL3, CGL9 et U87-MG ont été implantés sur des rats mâles *nude* RH-rnu/rnu (180-220g, Harlan Sprague Dowley, Indianapolis, USA). Avant d'effectuer la xénogreffe, les rats '*nude*' ont subi une irradiation corps entier avec une source γ Co⁶⁰ (7 Gy), 24 à 48h avant l'inoculation des cellules tumorales. Tous les modèles syngéniques ont été implantés à Oncodesign grâce à Olivier Duchamp, Xavier Tizon, Peggy Provent et tous les techniciens qui ont participé aux différents projets de cette thèse.

Tous les animaux ont été anesthésiés à l'aide d'un mélange Kétamine/Xylaxine (75/5 mg.kg⁻¹ ; Ketamine500[®] et Rompun[®], Centravet, France) dans du sérum physiologique (0,9 % NaCl) injecté par voie intrapéritonéale. Les animaux ont été placés sur un cadre stéréotaxique et une incision a été réalisée le long de la ligne médiane. Un trou de 1 mm de diamètre a été percé dans le crâne à 3 mm latéralement du bregma. Pour toutes les lignées cellulaires, 10^5 cellules (10^4 pour le modèle 9L et 3.10^4 pour le modèle RG2) contenues dans

5 μ l de milieu de culture (1 μ l pour le modèle 9L) ont été injectées en 5 min à l'aide d'une seringue Hamilton dans le noyau caudé droit, à une profondeur de 6 mm sous la dure mère. L'aiguille a été remontée lentement 5 min après l'injection et le trou comblé avec de la cire de Horsley (Figure III.1-1). Le jour de l'implantation tumorale est noté J0 (ou D0). Le Tableau III.1-1 regroupe les modèles de gliome utilisés étude par étude.

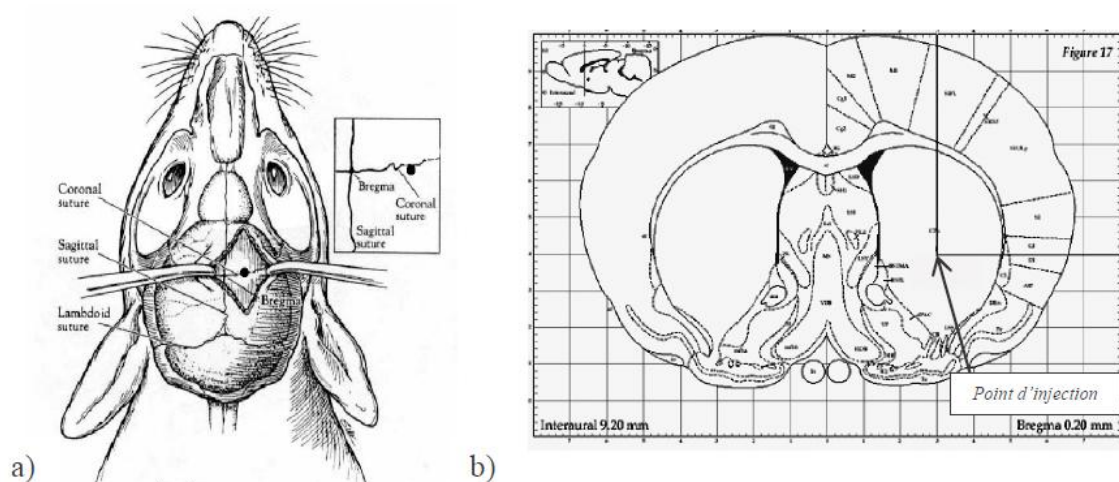


Figure III.1-1 Technique d'implantation des modèles de tumeurs intracérébrales chez le rat. A) dessin représentatif de la chirurgie effectuée chez les rats. B) Localisation du point d'implantation des cellules tumorales

Etude	Lignée cellulaire	Souche des Rats
Etude 1	GV1A1	BDIX
	C6	Wistar
	9L	Fisher 344
	CGL3	'nude'
	CGL9	'nude'
	U-87 MG	'nude'
Etude 2	C6	Wistar
	RG2	Fisher 344
Etude 3	U-87 MG	'nude'
Etude 4	9L	Fisher 344

Tableau III.1-1 Tableau récapitulatif des modèles de gliomes utilisés étude par étude

III.1.2 Traitements des animaux

III.1.2.1 Anti-angiogénique : Le Sorafenib

Le Sorafenib (Nexavar[®] ; Bayer) est une molécule de petite taille qui inhibe plusieurs protéines kinases Tyrosine (Figure III.1-2A). Les protéines kinases ciblées par le Sorafenib sont connues dans la littérature pour être suractivées dans de nombreux processus de carcinogénèse. Parmi ces cibles, on peut notamment citer : les RAF kinases, le PDGF (*platelet-derived growth factor*), les récepteurs 2 et 3 du VEGF et C Kit qui est le récepteur de facteur de cellules souches (Figure III.1-2B). Le Sorafenib est un médicament approuvé pour le traitement primaire du cancer du rein (carcinome rénal avancé) et le cancer primitif du foie dans un stade avancé (carcinome hépatocellulaire). Il est en cours d'évaluation dans de nombreux autres cancers, notamment les tumeurs primaires du SNC.

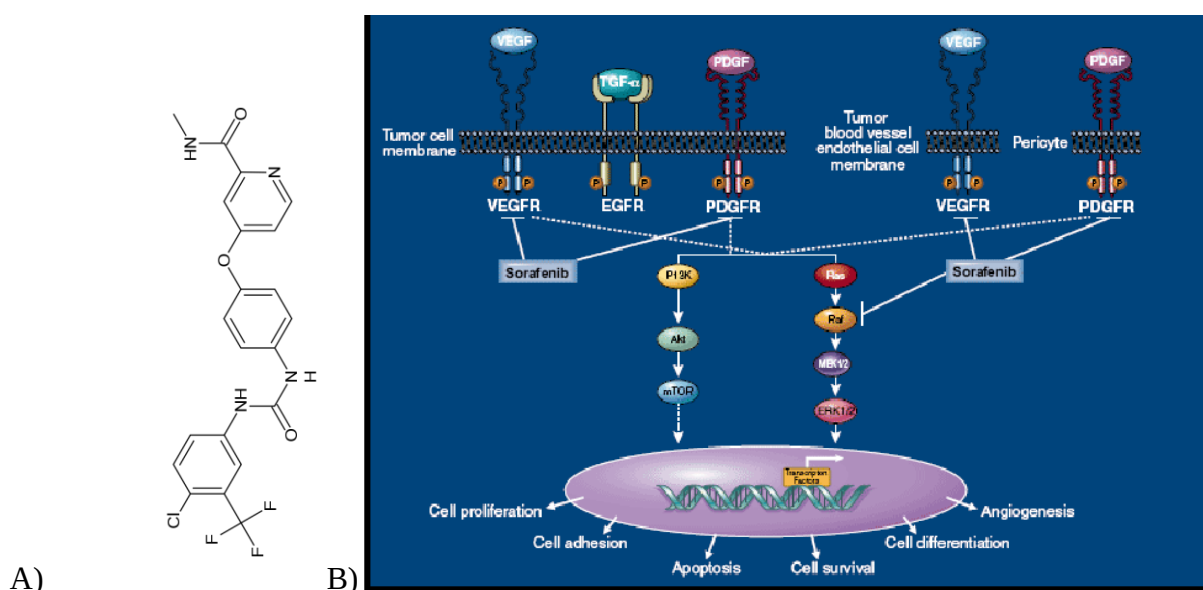


Figure III.1-2 le Sorafenib. (A) représentation chimique de la molécule de Sorafenib. (B) Schéma représentatif du mécanisme d'action du Sorafenib, avec toutes les cibles de la molécule.

Les animaux traités au Sorafenib ont reçu des administrations journalières par voie orale. La posologie du traitement (jour du début de traitement, nombre d'administrations) sera décrit étude par étude. Le médicament se présente sous forme de comprimés qui sont broyés puis repris dans 5% de DMSO, 5% de Tween-20 et 90% de sérum physiologique. Cette préparation est réalisée juste avant l'administration aux animaux. La dose utilisée est de 100 mg.kg⁻¹. La posologie du Sorafenib a été réalisée en accord avec la littérature (Liu et al.

2006).

III.1.2.2 Chimiothérapies : Carmustine

Le BCNU (Carmustine; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) est un agent alkylant de la famille des nitroso-urées de très petite taille, ce qui lui permet de traverser la BHE lésée. La formule chimique est : 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitroso-urée (Figure III.1-3). Il empêche le développement des cellules en prolifération en s'intercalant dans leur ADN au cours de leur cycle cellulaire. Il crée des ponts intramoléculaires entre les chaînes d'ADN qui vont gêner le dédoublement des deux brins d'ADN et arrêter la transcription. Son action est donc antimitotique. Par ce processus, il induit la mort de toutes cellules en prolifération et n'a aucun effet sur les cellules en G0. Le BCNU est utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancer du cerveau (y compris le gliome, glioblastome multiforme, médulloblastome et l'astrocytome), le myélome multiple et les lymphomes (hodgkiniens et non hodgkiniens).

Au cours de nos études, nous avons procédé à deux injections de 10 mg.kg^{-1} de BCNU par voie intraveineuse à 2 semaines d'intervalle. Le BCNU se présente sous forme de poudre qui est dissoute dans 30 % d'éthanol pur et 70 % de sérum physiologique (0,9 % de NaCl). La mise en solution du médicament est réalisée juste avant son administration. Le 1^{er} jour de traitement est précisé étude par étude.

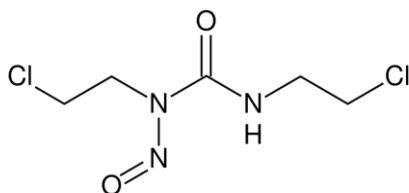


Figure III.1-3 Représentation chimique de la molécule de BCNU

III.1.2.3 La radiothérapie par microfaisceaux synchrotron

La radiothérapie par microfaisceaux synchrotron (MRT : microbeam radiation therapy) est réalisée sur la ligne de lumière médicale ID17 de l'ESRF. La MRT utilise des rayons X émis par des paquets d'électrons relativistes circulant dans l'anneau de stockage lorsque leur trajectoire est modifiée. Les photons produits en sortie du wiggler (élément du synchrotron permettant de dévier les électrons) sont filtrés pour obtenir un spectre compris entre 50 et 350 keV. Le débit de dose est d'environ $17\,000 \text{ Gy.s}^{-1}$ (contre 120 à 240 Gy.sec^{-1} pour une source conventionnelle). Le faisceau est fractionné spatialement en un ensemble de

microfaisceaux parallèles grâce à un collimateur multifentes (Bräuer-Krisch et al. 2009) positionné 33 mètres après la source de lumière et 80 cm en amont des animaux. Les rats sont anesthésiés à l'aide d'un mélange de 5 % d'isoflurane dans 95 % d'air (pour l'induction) puis maintenus endormis par une injection en intrapéritonéale d'un mélange Kétamine à 64,5 mg.kg⁻¹ (Ketamine500[®], Centravet, France) et Xylazine à 5,4 mg.kg⁻¹ (Rompun[®], Centravet, France) dans du sérum physiologique (0.9 % NaCl). Les animaux anesthésiés sont ensuite positionnés face à la source de rayons X sur un goniomètre motorisé. Chaque rat subit 2 irradiations successives qui se croisent orthogonalement au niveau de la tumeur (Figure III.1-4). Chaque champ d'irradiation (8x10 mm) est composé de 40 microfaisceaux (50 µm de largeur) espacés de 200 µm. La dose déposée dans le passage des microfaisceaux, appelée dose au pic, est de 400 Gy.

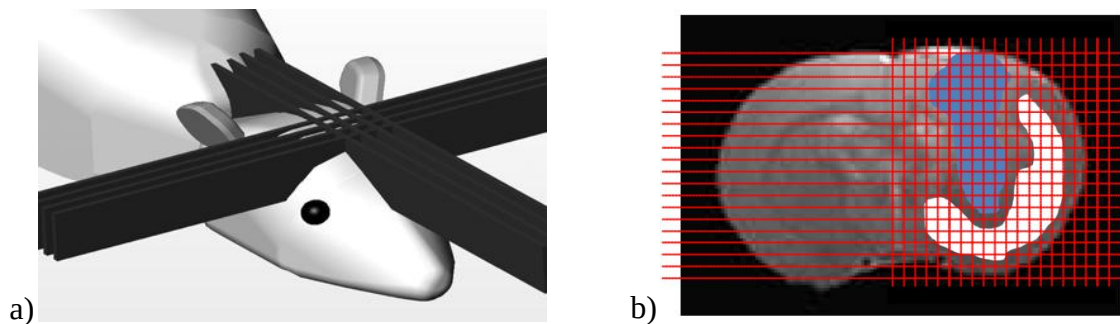


Figure III.1-4 Représentation 3D (a) et sur une image anatomique T_{2w} (b), de la configuration d'irradiation croisée par MRT pour le traitement des tumeurs 9L chez le rat (lignes noires (a) et rouges (b) ; 400 Gy/50 µm/200 µm). En bleue est représentée la ROI tumeur et en blanc la ROI hémisphère ipsilatérale (sans la tumeur) doublement irradiée. Source de l'image a) : Serduc et al. 2009(Serduc et al. 2009).

III.1.2.4 Evaluation de l'efficacité anti-tumorale

Le jour de la mort de chaque rat ou le jour de l'euthanasie selon les critères éthiques, a été noté. L'efficacité du traitement a été évaluée par le calcul de l'augmentation de la durée de vie par rapport à la médiane de survie des animaux contrôles (ILS). Le pourcentage d'ILS a été déterminé à l'aide de la formule décrite ci-dessous :

$$ILS = \left(\frac{MST_{contrôle} - MST_{traité}}{MST_{contrôle}} \right) \times 100 \quad \text{MST} = \text{temps de survie médian.}$$

III.1.3 Techniques IRM mises en œuvre

Les études présentées ont été réalisées sur 2 aimants différents. Les études 1, 2 et 3 ont

été réalisées sur un aimant horizontal Bruker à 2,35 T (Magnex Scientific Ltd, Oxford, UK). Le diamètre interne de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient est de 200 mm et l'amplitude maximale du système de gradients est de 96 mT.m^{-1} . Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation SMIS/MRRS (SMIS Ltd, Guildford, UK).

L'étude 4 a été réalisée sur un aimant horizontal 4.7 T, Bruker Biospec 47/40 USR AV III system. Le diamètre interne de l'aimant est de 400 mm. Le diamètre interne du fourreau de gradient est de 120 mm et l'amplitude maximale du système de gradients est de 600 mT.m^{-1} . Le spectromètre est équipé d'un système d'exploitation Bruker Avance III. Cette IRM est aussi équipée d'un système de monitoring physiologique permettant de suivre la respiration des animaux durant les acquisitions.

III.1.3.1 Préparation des animaux

Toutes les acquisitions par IRM ont été réalisées sous anesthésie générale. L'induction de l'anesthésie est réalisée sous 5 % d'isoflurane dans un mélange de 70 % d'air + 30 % d'oxygène (excepté pour l'expérience 4 où il n'y a pas d'ajout d'oxygène) puis maintenue à 2 % d'isoflurane tout au long de l'expérimentation. Un cathéter, rempli de sérum physiologique, est placé dans la veine de la queue de l'animal pour permettre à la fois l'injection d'agents de contraste dans l'IRM et éventuellement le prélèvement d'échantillons de sang. Les animaux sont placés au centre de l'aimant à l'aide d'un berceau, qui contient un circuit d'eau chaude (38°C) permettant de maintenir une bonne température corporelle des animaux pendant les acquisitions. La tête de l'animal est maintenue avec une barre à dents et des barres d'oreilles permettant de parfaitement immobiliser l'animal.

III.1.3.2 Agents de contraste utilisés

Tous les agents de contraste utilisés au cours de cette thèse ont été fournis par la société Guerbet (Aulnay-sous-bois, France).

III.1.3.2.1 Sinerem®

Le Sinerem® est un agent de contraste à base d'oxyde de fer de très petite taille dit super-paramagnétique (USPIO : Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide). Les USPIO entraînent une chute du signal en pondération T_2^* . Bien que considéré comme un agent

d'oxyde de fer de très petite taille, il n'en reste pas moins beaucoup plus gros (20 nm) qu'un chélate de gadolinium (environ 1 nm pour les agents utilisés en clinique). C'est pourquoi il a été utilisé au cours de nos études comme un agent purement intravasculaire (ce fait a été vérifié étude par étude). Les caractéristiques générales du Sinerem[®] sont présentées dans le Tableau III.1-2.

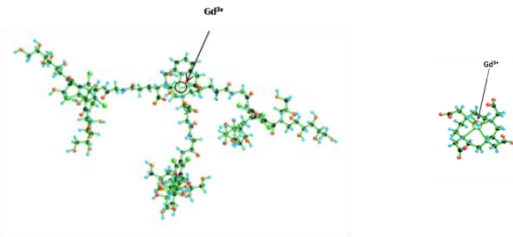
	P846	Gd-DOTA	Sinerem
Type	chélates de gadolinium (diffusible)	chélates de gadolinium (diffusible)	USPIO (intravasculaire*)
Poids moléculaire (KDa)	3,5	0,56	
Taille hydraté (nm)	≈ 4	≈ 1	30
Atome (gado / fer).mol ⁻¹	1	1	> 3000
Représentation 3D			
r_1 (s ⁻¹ .mM ⁻¹)		3,3	3
r_2 (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	31	4,1	92
Doses utilisées lors des expériences μmol (gado/fer).kg ⁻¹	25	200	200
Clairance plasmatique chez le rat (min)	51	26	270
Charge	Neutre	Négative	/
Statut	Etude préclinique	AMM en Europe et Australie	Etude préclinique

Tableau III.1-2 : Propriétés des agents de contraste utilisés. Les relaxivités du P846, du Gd-DOTA et du Sinerem[®] ont été mesurées à 4,7T à 37°C dans du sérum albumine humain. Source Guerbet

* Le fait que l'agent reste dans le compartiment vasculaire a été vérifié pour chacune des études

III.1.3.2.2 Les chélates de gadolinium : P846 et Gd-DOTA

Le P846 et le Gd-DOTA sont deux agents de contraste à base de gadolinium. Contrairement au P846, le Gd-DOTA est une molécule qui a reçu il y a déjà plusieurs années l'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les caractéristiques de ces deux molécules ainsi que leur structure en 3D sont représentées dans le Tableau III.1-2. Le P846 a été synthétisé en ajoutant des molécules hydrophiles à un complexe macromoléculaire de gadolinium. Ce nouveau chélate de gadolinium est considéré comme un composé de taille moyenne (3,5 KDa), qui a un pouvoir de diffusion à travers la paroi vasculaire plus faible que des agents plus petits. Le poids moléculaire du P846 est environ 6 fois plus grand que celui du

Gd-DOTA (3,5 versus 0,5 KDa). Cette augmentation de taille et de volume induit un ralentissement de la rotation du P846 par rapport au Gd-DOTA. Ce ralentissement permet d'augmenter les interactions entre le P846 et les protons contenus dans l'eau. Le P846 possède donc une relaxivité plus grande que le Gd-DOTA. A cause de cette grande relaxivité, la dose de P846 injectée aux animaux peut être divisée par 4 par rapport au Gd-DOTA (25 versus 200 $\mu\text{mol.kg}^{-1}$, respectivement) pour obtenir un niveau de signal équivalent (Vautier et al. 2007).

III.1.3.3 Séquences IRM

III.1.3.3.1 Imagerie anatomique pondérée T_2

Les images anatomiques ont été réalisées à l'aide de 2 séquences différentes selon l'IRM utilisée et donc l'étude réalisée :

- **Etudes 1 à 3** : ces études ont été réalisées sur l'IRM 2,35T. Une séquence spin-écho a été utilisée avec les paramètres suivants : TR/TE = 2000/80 ms, 19 coupes de 1 mm avec un champ de vue (FOV) de 30 mm et une taille des voxels à l'acquisition = $234 \times 234 \times 1000 \mu\text{m}^3$. La durée d'acquisition était de 4 min et 17 secs.

- **Etude 4** : cette étude a été réalisée sur l'IRM 4,7T. Une séquence « turbo-RARE » a été utilisée avec les paramètres suivants : TR/TE = 4000/33 ms, 19 coupes de 1 mm avec un FOV de 30 mm et une taille des voxels à l'acquisition = $117 \times 117 \times 1000 \mu\text{m}^3$. La durée d'acquisition était de 4 min et 16 secs.

III.1.3.3.2 Coefficient de diffusion apparent

Les cartes d'ADC de l'eau ont été calculées à partir de 3 images en écho de spin pondérées en diffusion (dans 3 directions orthogonales) avec un facteur de gradient de diffusion $b = 900 \text{ s.mm}^{-2}$ (à 2,35T) et $b = 800 \text{ s.mm}^{-2}$ (à 4,7T) et d'une image de référence ($b \sim 0 \text{ s.mm}^{-2}$). La taille des voxels à l'acquisition était de $243 \times 454 \times 1000 \mu\text{m}$ pour les images réalisées à 2,35T et de $234 \times 234 \times 1000 \mu\text{m}$ pour celles réalisées à 4,7T. L'aimant 4,7T qui possédait une technologie plus évoluée a permis d'utiliser une séquence d'acquisition plus rapide que sur l'aimant 2,35T, appelée Echo Planar Imaging (EPI). La durée d'acquisition d'une carte d'ADC était de 17 min sur l'aimant 2,35T et de 5 min et 20 secs sur l'aimant 4,7T.

III.1.3.3.3 Volume sanguin et index de taille des vaisseaux

Les mesures du volume sanguin (BVf : fractional blood volume) de l'index de taille des vaisseaux (VSI : vessel size index) ont été réalisées par la technique de mesure à l'équilibre. Pour réaliser ces cartographies nous avons utilisé une séquence *multi gradient echo spin echo* (MGESE) avant et 3 min après injection de Sinerem®. Le Sinerem® a été injecté en 5 secondes à une dose de 200 μmol de fer.kg^{-1} , soit un volume de 140 μl pour un rat de 250 g. Les détails de la séquence MGESE sur l'aimant 2,35T sont les suivants : 7 coupes de 1 mm, TR = 6 s, 7 échos de gradient = [6-42] ms, 1 écho de spin = 102 ms, taille de voxel à l'acquisition = $234 \times 454 \times 1000 \mu\text{m}^3$. Voici les caractéristiques de la séquence MGESE utilisée sur l'aimant 4,7T : 7 coupes de 1 mm, TR = 6 s, 8 échos de gradient = [3-21] ms, 1 écho de spin = 60 ms, taille de voxel à l'acquisition = $234 \times 234 \times 1000 \mu\text{m}^3$. La durée d'acquisition d'une séquence MGESE a été de 13 min et 40 secs sur l'aimant 2,35T et de 7 min et 48 secs sur l'aimant 4,7T.

III.1.3.3.4 Saturation locale en oxygène

La mesure de la ISO_2 par IRM est une nouvelle technique développée au laboratoire. Ce paragraphe présentera succinctement les différentes séquences nécessaires au calcul de ce nouveau paramètre (cartes de BVf, T_2 et T_2^*) (cf. introduction chapitre I.5.5 page 45).

- **Carte de BVf** : la mesure de volume sanguin a été réalisée comme décrit dans le chapitre III.1.3.3.3 page 62.

- **Carte T_2** : afin d'estimer la carte de T_2 ; une séquence « mutli-slice multi echo 2D » (MSME) a été réalisée avec les paramètres suivants : 7 coupes de 1 mm, FOV = $30 \times 30 \text{ mm}^2$, matrice = 128×128 , taille du voxel à l'acquisition = $234 \times 234 \times 1000 \mu\text{m}^3$, TR 2300 ms, 20 échos de spin = [12-228] ms, $\Delta\text{TE} = 12 \text{ ms}$). La durée d'acquisition a été de 3 min et 40 secs.

- **Carte T_2^*** : afin d'estimer la carte de T_2^* , une séquence « mutli-gradient echo 3D » (MGE3D) à haute résolution a été réalisée avec les paramètres suivants : FOV = $30 \times 40 \times 4 \text{ mm}^3$, matrice = $256 \times 256 \times 20$, taille du voxel à l'acquisition = $117 \times 117 \times 200 \mu\text{m}^3$, TR = 100 ms, 15 échos de gradients = [4-60] ms, $\Delta\text{TE} = 4 \text{ ms}$). La durée d'acquisition a été de 12 min et 48 secs.

III.1.3.3.5 Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

Deux protocoles IRM différents ont été mis en œuvre pour évaluer l'état de la BHE, un pour l'étude 3 et un pour l'étude 4. Ces 2 protocoles sont détaillés ci-dessous :

- **Etude 3** : Au cours de cette étude, réalisée sur l'IRM 2,35T, l'évaluation de l'impact des traitements sur l'état de la BHE a été effectuée en utilisant une technique statique de rehaussement de contraste appelée CE (*contrast enhancement*). Pour réaliser cette mesure, nous avons effectué deux acquisitions anatomiques pondérées T_1 avec une séquence MDEFT 3D (taille du voxel à l'acquisition = $333 \times 333 \times 333 \mu\text{m}^3$, $TI = 605 \text{ ms}$, $\alpha = 22^\circ$, $TR/TE = 15/5 \text{ ms}$). Une image a été réalisée avant l'injection du P846 et une autre 3 min après l'injection. La durée de chaque acquisition a été de 3 min et 15 sec.

- **Etude 4** : Cette étude a été réalisée sur la nouvelle IRM 4,7T. Cette IRM était plus performante que l'IRM 2,35T, le temps total d'acquisition par rat a été raccourci. De ce fait nous avons pu faire évoluer notre méthode d'évaluation de l'état de la BHE au cours de traitements anti-tumoraux. Nous sommes passés d'une technique statique (CE) à une technique dynamique appelée DCE. Cette méthode a l'avantage d'être quantitative et aussi plus sensible que le CE. Au cours de cette étude nous avons utilisé non plus 1 mais 2 agents de contraste (de différente taille) afin de caractériser la perméabilité de la BHE. Une séquence de type RARE ($TR/TE = 800/4,2 \text{ ms}$, 7 coupes de 1 mm, avec un FOV de 30 mm et une taille de voxel à l'acquisition = $234 \times 234 \times 1000 \mu\text{m}^3$) d'une durée de 15,6 sec a été répétée 60 fois. Après la 4^{ème} acquisition (à 1 min et 1 sec) l'agent de contraste P846 a été administré dans la veine caudale en environ 5 secondes ($25 \mu\text{mol.kg}^{-1}$). Après la 50^{ème} acquisition (à 12 min et 40 sec) le Gd-DOTA a été injecté comme décrit ci-dessus ($200 \mu\text{mol.kg}^{-1}$). Les injections des 2 agents de contraste ont été suivies d'une injection de 250 μl de sérum physiologique afin de rincer de cathéter.

III.1.3.4 Traitement des données IRM

Toutes les cartes paramétriques ont été calculées pixel par pixel en utilisant des programmes informatiques développés au laboratoire sous le logiciel Matlab R2008a (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA).

III.1.3.4.1 Régions d'intérêt

En fonction des études réalisées, différentes régions d'intérêt (ROIs) (tissu « sain » ipsilatéral à la tumeur, centre et périphérie de la tumeur et enfin striatum controlatéral à la

tumeur) ont été définies manuellement sur les images anatomiques T_{2w} . Les ROIs ont été tracées sur toutes les coupes où la tumeur était visible. La ROI « tumeur » couvre l'ensemble de la tumeur. La ROI « périphérie » a été définie automatiquement comme la bande large d'environ 250 μm entourant la ROI « tumeur ». Les quatre ROIs utilisées ont été représentées sur le schéma ci-dessous (Figure III.1-5) :

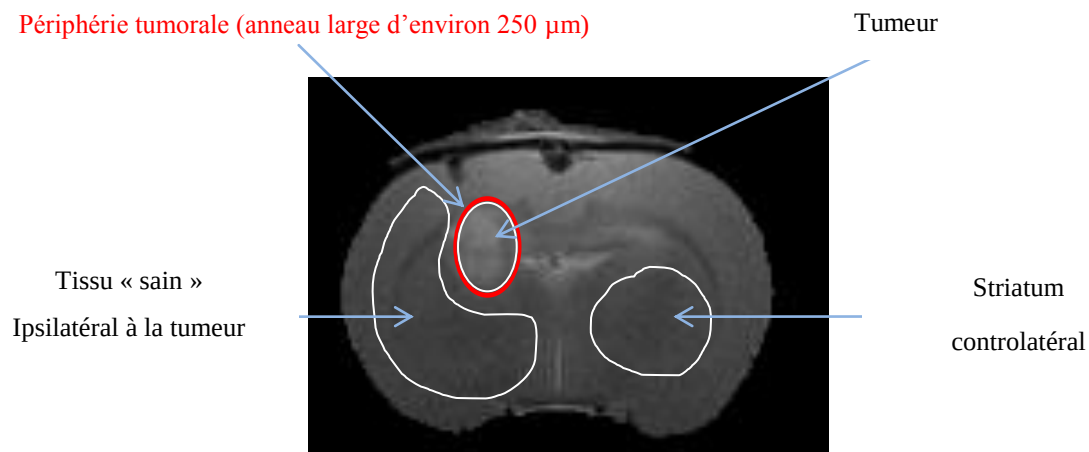


Figure III.1-5 Localisation des 4 régions d'intérêt réalisées sur les images IRM T_{2w} .

III.1.3.4.2 Coefficient de diffusion apparent

L'ADC est calculé à partir de la moyenne des ADC dans les trois directions orthogonales, pixel par pixel.

III.1.3.4.3 Volume sanguin et index de taille des vaisseaux

Les variations de vitesse de relaxation transversales (ΔR_2 et ΔR_2^*) ont été obtenues à partir des signaux en écho de gradient et en écho de spin mesurés avant et après injection de Sinerem[®], comme décrit dans l'étude Tropres et al. de 2004 (Tropres et al. 2004). L'augmentation de la différence de susceptibilité entre sang et tissu (*i.e.* $\Delta\chi$) a été calculée (uniquement pour l'étude 2) à partir de la différence entre les concentrations plasmatiques en Fe mesurées après et avant injection de Sinerem[®]. Pour les études 1 et 3, cette différence de susceptibilité a été fixée à 0,56 dans le système GCS (gramme – centimètre – seconde) pour les mesures réalisées à 2,35 T. La valeur de 0,56 a été obtenue à partir de la moyenne des données de l'étude 2 réalisée à 2,35 T. Puisque que le paramètre $\Delta\chi$ est inversement proportionnel au champ B_0 il a été fixé, pour l'étude 4 (réalisée à 4,7 T), à 0,28. Les cartes de

BVf ont été obtenues, pixel par pixel, à partir de la carte de ΔR_2^* et de la valeur de $\Delta\chi$ comme décrit dans le §I.5.2 page 39. Les cartes de VSI ont été calculées, pixel par pixel, à partir des cartes de ΔR_2^* , ΔR_2 , ADC et de la valeur de $\Delta\chi$ comme décrit dans le §I.5.3 page 41.

III.1.3.4.4 Saturation locale en oxygène

Les cartes de ISO₂ ont été calculées, pixel par pixel, à partir de différentes cartes paramétriques IRM (T₂, T₂*, BVf) selon le diagramme présenté à la Figure III.1-6. Pour plus de détails concernant cette nouvelle technique d'évaluation de la saturation locale en oxygène, le lecteur pourra se reporter à la publication de Christen et al. 2009 (en soumission).

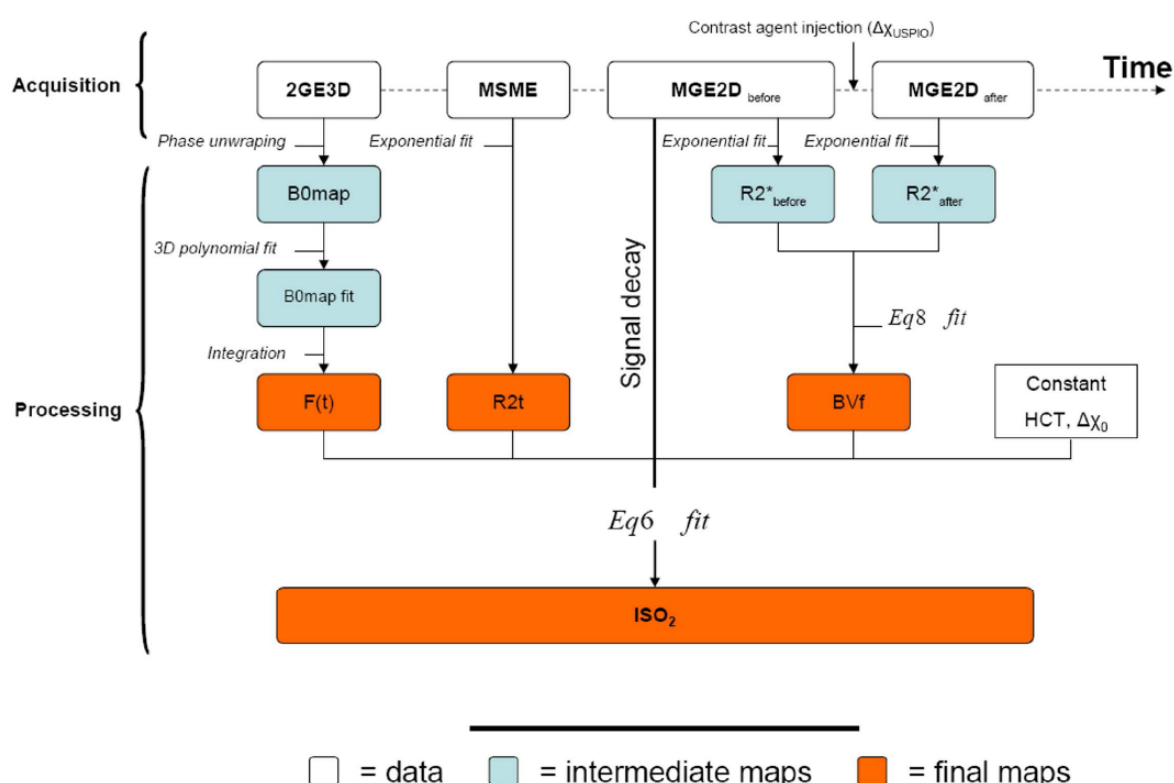


Figure III.1-6 diagramme de la méthode utilisée pour le calcul des cartes de ISO₂ à partir des données de T₂, T₂*, BVf. Source Christen et al. en soumission

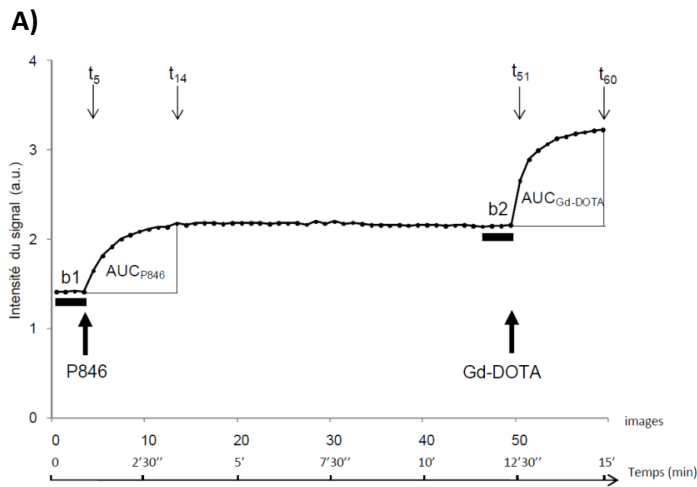
III.1.3.4.5 Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

- **Etude 3** : lors de cette expérience, l'état de la BHE a été estimé par une méthode statique. Deux images T_{1w} ont été réalisées avant (T_{1w(avant)}) et 3 min après l'injection de l'agent de contraste (T_{1w(après)}). Cette technique est appelée « *contrast enhancement* » (CE). Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme de pourcentage de rehaussement du signal à l'aide de l'Équation 6.

$$CE = \frac{T_{1w(\text{après})} - T_{1w(\text{avant})}}{T_{1w(\text{avant})}}$$

Équation 6 : équation permettant de calculer le pourcentage de rehaussement du signal induit par l'extravasation de l'agent de contraste.

- **Etude 4** : Au cours de cette 4^{ème} étude, le suivi de l'état de la BHE au cours des différents traitements a été réalisé en utilisant une méthode dynamique. Cette méthode est appelée « *dynamic contrast enhancement* » (DCE). La perméabilité des vaisseaux a été estimée, pixel par pixel, en mesurant l'aire sous la courbe de l'intensité du signal (AUC : « *area under curve* »). Puisque 2 agents de contraste ont été utilisés lors d'une acquisition, 2 AUCs ont été calculées (AUC_{P846} et $AUC_{Gd-DOTA}$) comme décrit par la Figure III.1-7.



IS: intensité du signal

t_5 , t_{14} , t_{51} and t_{60} : correspond aux images 4, 14, 50 and 60.

b1: ligne de base 1 correspondant à l'intensité moyenne du signal entre les images 1 et 4.

b2: ligne de base 2 correspondant à l'intensité moyenne du signal entre les images 47 et 50.

Figure III.1-7 Procédure expérimentale du traitement de données de la perméabilité des vaisseaux à partir d'une acquisition DCE obtenue avec l'injection des 2 agents de contraste (P846 et Gd-DOTA).

(A) courbe représentative de l'évolution de l'intensité du signal dans la tumeur au cours du temps.

(B) Equations permettant de calculer l' AUC_{P846} .

(C) Equations permettant de calculer l' $AUC_{Gd-DOTA}$.

III.1.3.4.6 Détermination du volume tumoral

Les volumes tumoraux ont été obtenus en comptant le nombre de pixels à l'intérieur du volume de la ROI tumeur sur les images anatomiques T_{2w} et en multipliant le tout par le volume d'un pixel.

III.1.3.4.7 Analyse quantitative des paramètres IRM

L'approche utilisée au cours de cette thèse est utilisée en routine, que ce soit au cours d'étude préclinique ou clinique. Chaque ROI manuellement tracée sur les images anatomiques pondérées T₂ (III.1.3.4.1 page 63) a été transférée sur les différentes cartes paramétriques. Les paramètres IRM étudiés varient selon les études et seront précisés étude par étude. Ensuite, à l'intérieur de chaque ROI, de chaque coupe et de chacun des paramètres, les voxels pour lesquels l'analyse ne pouvait pas être réalisée ont été identifiés et exclus des calculs. Ces pixels correspondent à des défauts d'ajustement du modèle mathématique (propre à chacun des paramètres IRM) ou à des pixels qui ne peuvent pas exister d'un point de vue physiologique. Le Tableau III.1-3 regroupe les valeurs des voxels, paramètre par paramètre, qui seront gardées. Afin de pouvoir comparer les paramètres IRM entre eux, sur un même animal, tout pixel exclu par l'un des critères sera alors exclu des calculs de tous les autres paramètres. Pour chacune des études présentées, nous avons calculé le pourcentage de pixels exclus des calculs selon les critères du Tableau III.1-3.

Pour chaque ROI et pour chacun des animaux, on a calculé la moyenne et l'écart-type paramètre par paramètre. Dans un 2^{ème} temps, nous avons moyenné les données des animaux groupe par groupe.

Paramètres IRM	Valeur min	Valeur max
ADC ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	0	3500
BVf (%)	0	13,5
VSI (μm)	0	50
SO ₂ (%)	0	100

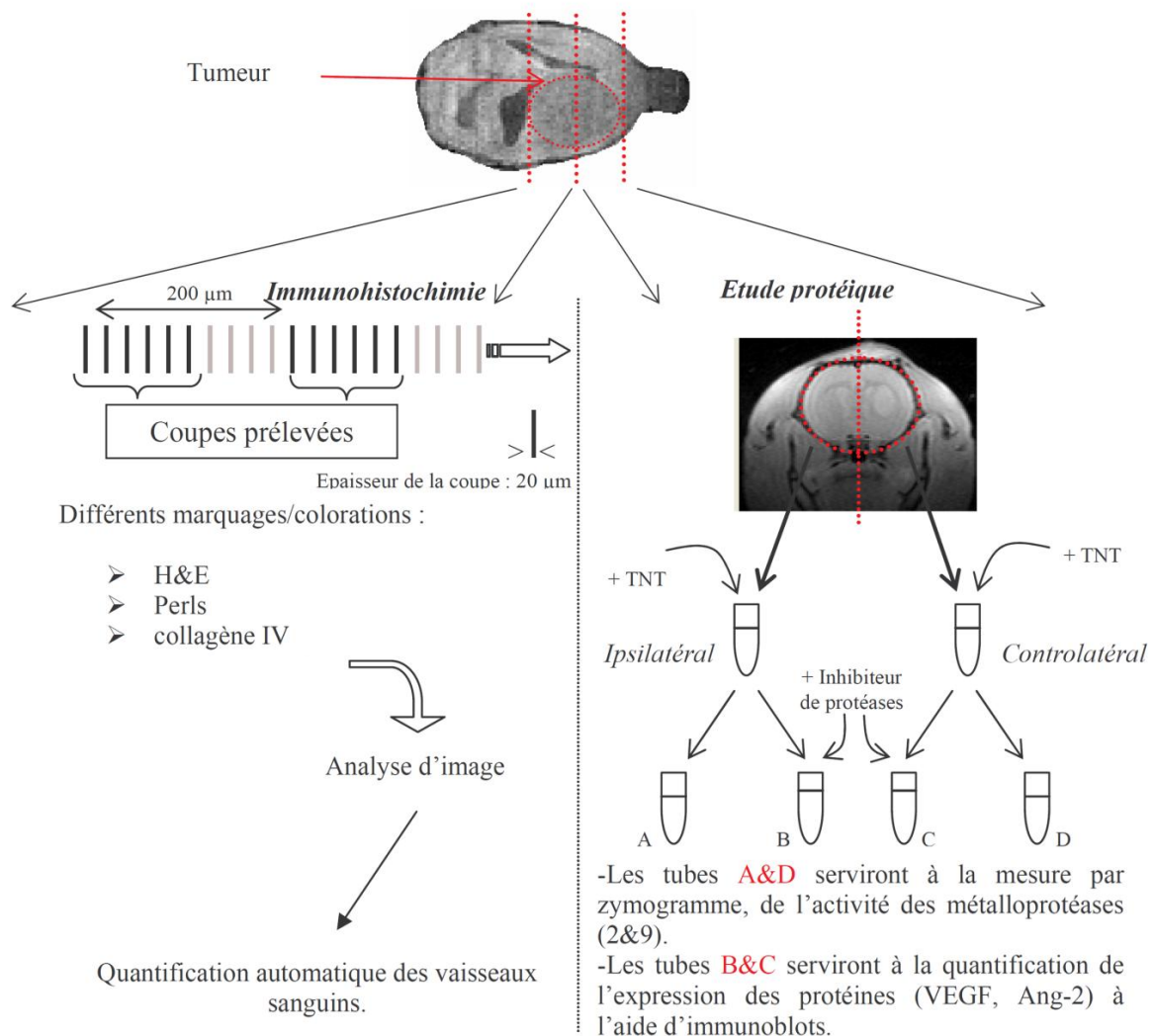
Tableau III.1-3 : critère de validité des voxels paramètre par paramètre

III.2 Méthodologie ex vivo

III.2.1 Prélèvement et préparation des échantillons

Les animaux sont sacrifiés, après leur passage dans l'IRM, à différents temps après implantation des cellules tumorales (les jours de sacrifices sont décrits dans les protocoles expérimentaux de chacune des études réalisées). Les cerveaux sont prélevés, congelés dans de l'isopentane puis conservés au congélateur à -80°C. Par la suite, chaque cerveau est préparé selon le protocole présenté ci-dessous (Figure III.2-1). L'objectif de ce type de protocole expérimental est d'obtenir pour chacun des animaux étudiés des données histologiques,

immunohistologiques (marquages vasculaires par exemple) et protéiques (à l'aide d'immunoblot) et enzymatiques (à l'aide de zymogramme) à chaque temps d'étude.



TNT = tampon de lyse (TRIS 50mM, NaCl 150mM, Triton 0.5%, CaCl₂ 2mM).

Figure III.2-1 Présentation du protocole expérimental des études *ex vivo*.

III.2.1 Histologie et Immunohistologie

III.2.1.1 Coloration de Perls

La coloration de Perls permet de mettre en évidence la présence de fer dans les tissus. Après fixation des coupes à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde à 4%, les lames sont plongées dans un bain composé d'HCL (2%) et de ferrocyanure de potassium (2%) (vol/vol). Une contre coloration est ensuite effectuée en plongeant les lames dans un bain

d'hématoxyline, puis 3 passages dans de l'éthanol à 100% et 3 passages dans du toluène. Le montage s'effectue avec du Pertex. Le fer est détecté par un dépôt bleu.

III.2.1.2 Coloration Hématoxyline-Erythrosine

Grâce à la coloration H&E, on peut observer les différentes structures présentes sur les coupes. En effet, l'hématoxyline de Harris permet de colorer les noyaux en violet; quant à l'érythrosine, elle colore les cytoplasmes en rose. Ce marquage est réalisé en plongeant les lames successivement dans différents bains (avec un rinçage à l'eau entre chaque) : hématoxyline de Harris, HCl (0,5%), eau ammoniacquée (2,5 mL.l⁻¹), érythrosine et enfin 3 passages dans l'éthanol (100%) directement suivi de 3 passages dans du toluène. Les lames sont ensuite montées avec du Pertex.

III.2.1.3 Caractérisation de la vascularisation

III.2.1.3.1 Protocole immunohistochimique

Afin de caractériser la microvascularisation sanguine, nous avons réalisé un immunomarquage de la lame basale qui entoure les vaisseaux sanguins et/ou (selon les études) des cellules endothéliales des vaisseaux en marquant respectivement le collagène de type IV (coll IV) et un antigène appelé *Rat Endothelial Cell Antigen-type 1* (RecA-1).

Voici le protocole expérimental des immunomarquages réalisé :

- Les coupes sont réhydratées dans un tampon salin phosphaté (PBS : phosphate-buffered saline ; 0,01 M) et fixées dans du paraformaldéhyde 4 % pendant 10 min à température ambiante
- Ensuite, les coupes ont été saturées dans du PBS contenant du tween (0,01 %) et de l'albumine sérique de bœuf (BSA 3 %) pendant 30 min à température ambiante
- Après cette étape de saturation, les anticorps primaires (un anti-Coll IV, fait chez la chèvre (Southern Biotech, ref 1340-01), dilué au 1/2000^{ème} et/ou un anti-RecA-1 fait chez la souris (AbD Serotec ref. MCA9070R) dilué au 1/200^{ème}) ont été incubés sur la nuit à 4°C dans du PBS-tween (0,01 %) -BSA (1 %).
- Après plusieurs rinçages au PBS, les anticorps secondaires (un anti IgG de

chèvre couplé à un Alexa 546 (Invitrogen, ref A11030) dilué au 1/200^{ème} et/ou un anti IgG de souris couplé à un Alexa 488 (Invitrogen, ref A21202) dilué au 1/200^{ème}) sont incubés pendant 30 min à température ambiante

- Après plusieurs rinçages au PBS, le montage entre lame et lamelle est réalisé à l'aide d'un milieu de montage aqueux contenant du Hoechst afin de marquer les noyaux cellulaires.

III.2.1.3.2 Analyse d'images (immunohistologie quantitative)

Les images obtenues avec un marquage immunohistologique du réseau vasculaire comme le marquage du collagène IV sont ensuite analysées à l'aide d'une macro développée sous le logiciel ImageJ (développement réalisé au cours de mon master II). Cette macro permet, après binarisation de l'image, d'accéder à différents paramètres comme le nombre, la densité, le diamètre et la longueur des vaisseaux, la surface vasculaire et le graphique de distribution des vaisseaux présents sur l'image. Son principe est décrit Figure III.2-2.

Afin de permettre la comparaison entre les paramètres mesurés par IRM qui sont des mesures en 3 dimensions (index de taille des vaisseaux et volume sanguin) et les données d'immunohistologie quantitative qui sont des mesures en 2 dimensions, nous avons calculé l'index de taille des vaisseaux histologiques (VSI_{histo} ; Équation 7) et le volume sanguin histologique (BV_{histo} ; Équation 8) à l'aide des formules décrites dans les publications (Tropres et al. 2004) et (Pathak et al. 2001) respectivement.

$$VSI_{histo} = \left(\frac{\sum_i n(d_i) \cdot d_i^{4/3}}{\sum_i n(d_i) \cdot d_i^2} \right)^{-3/2}$$

n(d) = nombre de vaisseaux de même diamètre
d = diamètre

Équation 7 : équation permettant de calculer le VSI_{histo} à partir des marquages immunohistologiques du collagène IV. Source Tropres et al. 2004 (Tropres et al. 2004).

$$BV_{histo} = \left(\frac{rl}{rl + (r + l)e} \right) [-2\ln(1 - Sv)] \times 100$$

e = épaisseur de coupe
r = rayon moyen des vaisseaux
l = longueur moyen des vaisseaux
Sv = surface vasculaire

Équation 8 : équation permettant de calculer le BV_{histo} à partir des images immunohistologiques du collagène IV. Source Pathak et al 2001 (Pathak et al. 2001).

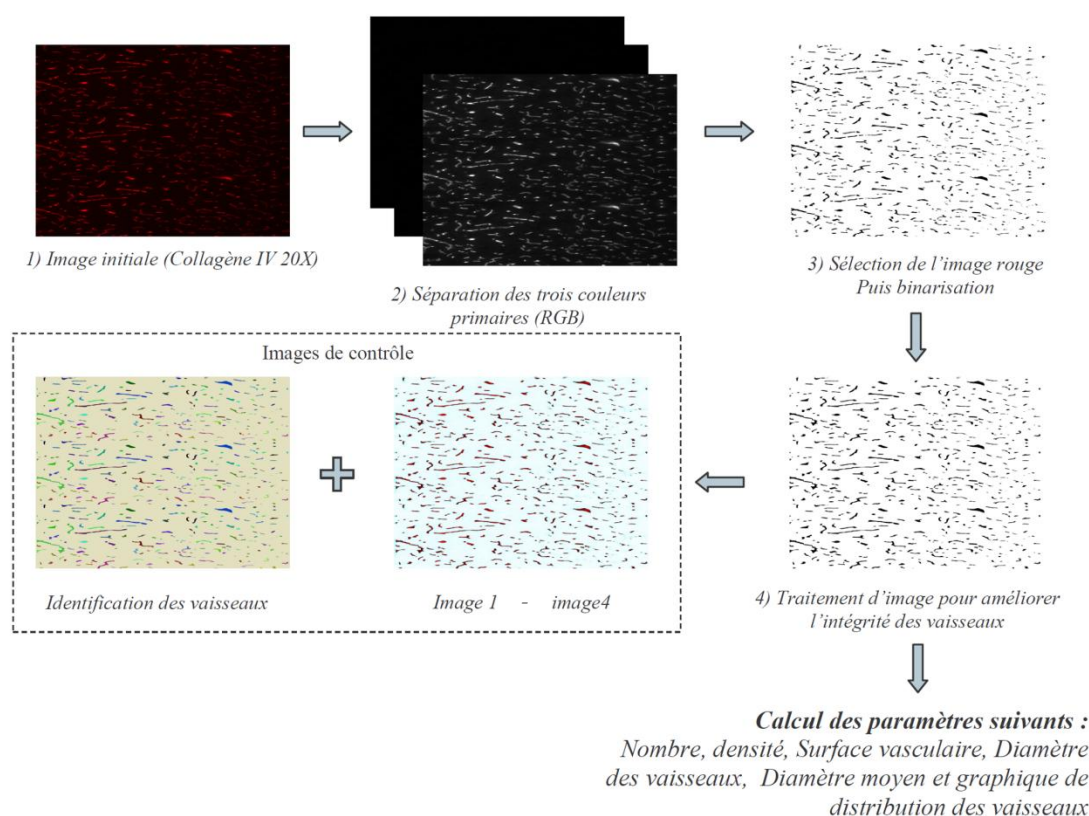


Figure III.2-2 Principe de la macro, développé sous le logiciel ImageJ de quantification des vaisseaux sanguins à partir de photo d'immunohistochimie prise au microscope à fluorescence.

III.2.1.4 Caractérisation de l'hypoxie

III.2.1.4.1 Protocole immunohistochimique

Le marquage de l'hypoxie par immunohistochimie est réalisé à l'aide d'un kit commercial appelé Hypoxyprob-1 vendu par Chemicon. Ce marquage nécessite au préalable l'injection, d'une dose de 1 mg.kg⁻¹ de pimonidazole en intraveineux, 1h avant le sacrifice de l'animal. Le pimonidazole est un composé qui pénètre à l'intérieur de toutes les cellules viables de l'organisme. Toute cellule en condition hypoxique (avec une pression partielle en oxygène inférieure à 10 mm de mercure) va réduire le pimonidazole, ce qui va permettre à ce dernier de former des liaisons covalentes avec les protéines cellulaires et ainsi l'empêcher de ressortir de la cellule. Les zones en hypoxie vont donc être détectées à l'aide d'une immunohistochimie dirigée contre le pimonidazole (qui sera « piégé » dans les cellules viables hypoxiques).

Brièvement, les coupes sont fixées 10 min dans de l'acétone froid, puis incubées avec

l'anticorps anti-pimonidazole (hypoxyprobe-1, chemicon) au 1/10^{ème} dans du PBS-BSA (3%). Les coupes sont ensuite incubées avec un anticorps secondaire : anti-souris biotinylé (B7151, Sigma) dilué au 1/200^{ème}, puis avec une extravidine peroxidase au 1/500^{ème}. Le signal est révélé par de la diaminobenzidine (DAB) en présence d'H₂O₂ à 1%. Une contre coloration est ensuite effectuée en plongeant les lames dans un bain d'hématoxyline, puis 3 passages dans de l'éthanol à 100% et 3 passages dans du toluène. Le montage s'effectue avec du Pertex.

III.2.1.4.2 Analyse quantitative des données

Les coupes marquées au pimonidazole sont scannées. A l'aide du logiciel ImageJ, deux ROI sont tracées en délimitant d'une part la zone tumorale et d'autre part la zone marquée au pimonidazole et/ou nécrotique. A partir de ces 2 régions d'intérêt, on calcule le pourcentage de surface hypoxique/nécrotique dans chaque tumeur. Cette surface est ensuite comparée au pourcentage de surface de la tumeur dont la ISO₂ est inférieure à 40% déterminée sur la carte paramétrique IRM correspondante à la coupe histologique (les valeurs négatives sont aussi prises en comptes). Les résultats obtenus pour les différentes coupes d'un même rat sont moyennés.

III.2.1.1 Caractérisation de la prolifération cellulaire

Le marquage de la prolifération cellulaire a été réalisé en utilisant le marqueur Ki-67. Cet antigène nucléaire est seulement présent dans les cellules en division cellulaire (G1, S, G2, M). Il n'est pas présent dans les cellules quiescentes (stade G0) (Key et al. 1993). Le marquage du Ki-67 produit une coloration plus importante et précise des cellules en prolifération que ne le fait le marquage obtenu par l'anticorps PCNA (couramment utilisé).

Le protocole de l'immunomarquage du Ki-67 est identique à l'immunomarquage du réseau vasculaire en utilisant comme anticorps (§III.2.1.3.1 page 69) :

- **Primaire** : un Ki-67, fait chez la souris (Invitrogen, ref 08-1192) au 1/50^{ème}.
- **Secondaire** : un anticorps anti-souris, fait chez l'âne (Invitrogen, ref A11056) au 1/1000^{ème}.

III.2.2 Etude protéique

Les échantillons de protéines sont préparés à partir des broyats de cerveaux de rat et mélangés dans du tampon de lyse contenant 50 mM de Tris, 0,5 % de Triton X-100 (Sigma

Aldrich) et 150 mM de NaCl dans un rapport 2/1, en séparant le coté ipsilateral (hémisphère tumoral) du côté controlatéral (hémisphère non tumoral). On a ajouté un inhibiteur de protéases (Sigma, cocktail de protéases dilué au 1/200^{ème}) dans les échantillons destinés aux immunoblots.

III.2.2.1 Immunoblot

Pour chaque échantillon, 30 µg de protéines sont mélangés avec un tampon de charge dénaturant (3,6 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 30 % de sucrose, 0,1125 % de bleu de bromophénol (p/v) et 7,5 % de beta mercaptoéthanol) dans un rapport ½ et ont migré sur un gel d'électrophorèse SDS-acrylamide (12 % et 7,5 % pour la détection du VEGF et l'Ang-2, respectivement). Après transfert, la membrane est réactivée dans du méthanol, plongée dans du TTBS (10mM de Tris, 0,05 % de Triton et 200 mM d'NaCl), elle est ensuite incubée 1h dans du TTBS + 5 % de lait en poudre puis, durant la nuit, dans le même tampon auquel l'anticorps primaire (Tableau III.2-1) est ajouté. La membrane est lavée trois fois 10 min dans du TTBS, puis incubée 1h dans du TTBS auquel on a ajouté l'anticorps secondaire (Tableau III.2-1). Elle est finalement lavée trois fois 10 min dans du TTBS. Le marquage est alors révélé par le système ECL (Amersham) qui produit de la luminescence en présence de peroxydase. Cette luminescence sera captée par un film photographique.

Après déshybridation, les membranes ont été réhybridées avec un anticorps ciblant une protéine de contrôle à savoir (β -actine ou la glycéraldehyde-3-phosphate déhydrogénase selon les études).

	Anticorps anti	Animal hôte	Fournisseur	Ref.	Couplage	Dilution
primaire	VEGF	Souris	Chemicon	MAB1665	/	1/1000 ^{ème}
	Ang-2	Lapin	Chemicon	AB3121	/	1/1000 ^{ème}
	glycéraldehyde-3-phosphate déhydrogénase	Poulet	Sigma	GW22763	/	1/1000 ^{ème}
	β -actine	Lapin	Sigma	A2668	/	1/1000 ^{ème}
secondaire	Souris	Chèvre	Invitrogen	G21040	Peroxydase	1/1000 ^{ème}
	Lapin	Chèvre	Sigma	A-0545	Peroxydase	1/160000 ^{ème}
	Poulet	Lapin	Sigma	A9046	Peroxydase	1/10000 ^{ème}

Tableau III.2-1 : Liste des anticorps utilisés au cours des immunoblots ainsi que leur dilution

III.2.2.2 Zymogramme

Pour chaque échantillon, 60 µg de protéines sont mélangés avec un tampon de charge non dénaturant (3,6 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 30 % de sucrose et 0,1125 % de bleu de bromophénol (p/v)) dans un rapport ½ et ont migré sur un gel d'électrophorèse SDS-acrylamide à 9 % contenant 2 % de gélatine (p/v) à 4°C pendant 4 h. Les gels sont lavés 2 fois 30 min à 4°C dans une solution à 2,5 % de Triton X-100 et incubés pendant 48 h à 37 °C dans une solution contenant 20 mM de Tris-HCl et 2 mM de CaCl₂. Cette incubation permet aux métalloprotéases (MMPs) de dégrader leurs substrats (ici la gélatine). Après coloration dans une solution de 30 % méthanol, 10 % d'acide acétique et 1 % de bleu de Coomassie sur la nuit à température ambiante, les gels sont décolorés dans une solution à 40 % méthanol et 10 % d'acide acétique. L'activité des MMPs est ainsi observée par des bandes claires sur un fond bleu.

III.3 Analyse statistique

Pour les études 1, 3 et 4, nous avons utilisé un test t (ou *student*) de comparaison des moyennes. Les différents groupes ont été comparés avec un test pour échantillons indépendants alors que pour les comparaisons des ROIs au sein d'un même groupe, nous avons utilisé un test pour échantillons appariés.

L'évaluation des résultats de l'étude 2 a été réalisée par une analyse de la variance bidirectionnelle de type ANOVA *two way* suivi par un test post-hoc de Bonferroni.

Des tests paramétrique de Pearson ont été utilisés pour les analyses de corrélations.

Toutes nos statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS (SPSS Inc, Chicago, Ill, USA).

Les seuils critiques ont été : * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$.

Etude I : Caractérisation de 6
modèles de gliomes – lien avec la
réponse à la Carmustine

IV.1 Objectif de l'étude I

Cette première étude a été réalisée dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire et présentés dans les deux articles de Tropres et al de 2001 et 2004. Ceux-ci avaient montré qu'il était possible de réaliser des mesures de BVf et de VSI sur des cerveaux sains de rat (Tropres et al. 2001) mais aussi sur un modèle de gliome C6 à un stade de développement tardif (Tropres et al. 2004). Cette dernière étude a aussi montré que les mesures de VSI obtenues par IRM étaient très bien corrélées à des mesures d'immunohistologie quantitative du réseau vasculaire (VSI_{histo}).

A la suite de ces résultats, nous avons voulu déterminer si les mesures du BVf et du VSI pouvaient être utilisées pour caractériser 6 modèles de gliomes (syngéniques ou xenogéniques), au même stade de développement. Nous voulions aussi évaluer si au moins un des paramètres mesurés par IRM multiparamétrique (ADC, BVf et VSI) réalisée avant le début d'un traitement par chimiothérapie pouvait être prédictive de la réponse tumorale c.à.d. déterminer s'il existe une relation entre les paramètres cellulaire (ADC) et vasculaire (BVf et VSI) propres à une tumeur et sa sensibilité à un agent cytotoxique.

Pour cette étude, nous avons utilisé 3 modèles de gliomes de rat (GV1A1, 9L et C6) et 3 modèles de xénogreffes humaines implantés chez le rat (CGL3, CGL9 et U-87 MG). Les modèles 9L, C6 et U-87 MG ont été choisis car ce sont des modèles couramment utilisés dans la littérature. En utilisant ces modèles nous pouvions donc corréler nos résultats avec des données de la littérature. Les modèles CGL3 et CGL9 sont en revanche des nouveaux modèles mis au point par *Oncodesign*. Il nous semblait intéressant d'étudier ces modèles car ils présentaient des caractéristiques vasculaires et cellulaires très différentes des autres modèles (données d'*Oncodesign* antérieures à cette étude). De plus, ces 3 modèles montraient des sensibilités vis-à-vis d'agents cytotoxiques très différentes des autres modèles.

Les objectifs de cette étude, résumés ci-dessous, étaient donc multiples:

(i) Caractériser, *in vivo*, grâce à l'IRM, la microstructure (œdème, ADC) et la microvascularisation (BVf, VSI) de 6 modèles de gliomes implantés en orthotopique chez le rat, au même stade de développement tumoral.

(ii) Evaluer le potentiel des paramètres IRM (ADC, BVf et VSI) utilisés seuls ou en combinaison, pour différencier les tumeurs du tissu sain et/ou pour discriminer les 6 modèles

entre eux.

(iii) Evaluer si l'IRM multiparamétrique (ADC, BVf et VSI) peut être prédictive de la réponse tumorale à une chimiothérapie c.à.d. existe-t-il une relation entre les paramètres cellulaire (ADC) et vasculaire (BVf et VSI) et l'apport d'une drogue à la tumeur.

La partie expérimentale de cette étude (acquisition IRM et histologie) a été réalisée avant mon arrivé au laboratoire. Ce travail a été réalisé d'une part par Oncodesign qui a participé à la conception de cette étude et à la réalisation de l'implantation de tous les animaux avec notamment la participation d'Olivier Duchamp, Xavier Tizon, Nicolas Guilbaud, Nathalie Just, Peggy Provent ; et d'autre part, par certains membres de l'unité U594 (nouvellement renommée équipe 5 du GIN) qui ont aussi participé à la conception de ce projet et réalisé les IRM et l'étude immunohistologique, avec Chantal Rémy, Emmanuel Barbier, Marion Gandit et Boudewijn van der Sanden.

Au cours de cette étude, mon travail a consisté à traiter et analyser les données IRM et histologiques (réalisation de l'histologie quantitative du réseau vasculaire) et participer à la rédaction et la soumission d'un article scientifique.

L'épreuve de cet article est présentée en annexe.

IV.2 Protocole expérimental

IV.2.1 Lignées cellulaires

Au cours de cette étude nous avons utilisé 6 lignées tumorales : 3 d'origines murines (GV1A1, 9L et C6) et 3 d'origines humaines (CGL3, CGL9 et U-87 MG). (§III.1.1.1 page 53).

IV.2.2 Etude *in vitro*

Toutes les lignées cellulaires ont été sélectionnées à cause de leur sensibilité au BCNU. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits (5000 cellules / puits, 180 µl de milieu par puits) et incubées à 37 °C pendant 24 h dans un milieu de culture sans drogue. Les cellules tumorales ont ensuite été incubées pendant 96 h à 37°C avec 9

concentrations de BCNU (variant de 6,25 à 1600 μM par palier de $\frac{1}{2}$ dilution). En tant que contrôle négatif, les cellules sont traitées avec un excipient. À la fin du traitement, l'activité cytotoxique de BCNU a été évaluée par un test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) en suivant les indications du fournisseur (Mosmann et al. 1983). La densité optique a été mesurée à 570 nm en utilisant un lecteur de microplaque automatisé (Victor 1420, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). L'expérience a été répétée trois fois et réalisée en quatre exemplaires pour chaque lignée cellulaire et pour chaque concentration de BCNU.

Les courbes dose-réponse ont été tracées en utilisant un logiciel XLFit3 (IDBS, Royaume-Uni). Les indices de cytotoxicité, correspondant à 50 % d'inhibition de la prolifération cellulaire (IC_{50}), ont été calculés à partir des courbes semi-logs en utilisant un logiciel XLFit3.

IV.2.3 Modèles animaux

Toutes les lignées cellulaires ont été implantées en orthotopiques chez des rats. Chaque lignée cellulaire est dépendante d'une souche de rat (§III.1.1.2 page 54).

IV.2.4 Etude *in vivo*

Pour chaque type de tumeur, les rats ont été randomisés en 3 groupes lorsque le volume tumoral moyen (mesuré par imagerie pondérée en T_2) a atteint 75 mm^3 .

- **Un premier groupe** ($n = 4$ à 7) a été utilisé pour l'évaluation, *in vivo*, des paramètres IRM suivi du sacrifice des animaux pour l'analyse histologique. L'IRM a été réalisée le jour de la randomisation et les tumeurs ont été prélevées juste après l'imagerie. Ce groupe permettra de caractériser d'un point de vue IRM et histologique chaque modèle au même stade de développement tumorale avant traitement. Les paramètres IRM seront évalués pour leur caractère prédictif de la réponse tumorale.
- **Un deuxième groupe** ($n = 3$ à 5) a été traité en i.v. avec du BCNU à 10 mg.kg^{-1} (deux administrations séparées d'une période de 14 jours de repos), le premier traitement est effectué le jour de la randomisation (pour plus de détails sur le traitement au BCNU, veuillez vous reporter au §III.1.2.2 page 57).
- **Un troisième groupe** ($n = 3$ à 5) a été utilisé comme témoin (aucun

traitement).

Les animaux traités au BCNU et Contrôle (groupes 2 et 3) ont été surveillés régulièrement (comportement et poids) et été utilisés pour réaliser des courbes de survie. Les rats ont été euthanasiés au premier signe clinique de souffrance ou lorsque leurs poids corporel avait diminué de plus de 20% par rapport au jour de la randomisation. L'augmentation de survie (ILS) des animaux traités au BCNU est calculée pour tous les modèles de tumeur (§III.1.2.4 page 58).

Le nombre de rats dans chaque groupe et les jours d'administration du BCNU sont présentés au Tableau IV.4-1 page 90. Le nombre de rats imagés (rats du 1^{er} groupe) et le jour de randomisation sont indiqués dans le Tableau IV.4-1 page 90.

IV.2.5 Expérience IRM

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées sur une IRM 2,35T. Les rats ont été imagés en imagerie pondérée T₂ et des cartes d'ADC, BVf et VSI. Pour plus de détails concernant la préparation des animaux, l'acquisition des séquences ou encore le traitement de données post-IRM, veuillez vous référer au chapitre III : méthodologie à la page 51.

IV.2.6 Histologie

À la fin de l'IRM, les animaux ont été euthanasiés 1 minute après l'injection en intraveineuse de 0,3 ml d'une solution saline contenant du Hoechst 33342 (11 mg.ml⁻¹, Sigma-Aldrich, Inc.) Le Hoechst 33342 a été utilisé pour la détection des vaisseaux perfusés et la caractérisation de l'intégrité de la BHE. Par la suite, des coupes histologiques ont été réalisées sur les cerveaux à l'aide d'un cryostat (§III.2.1 page 67 histologie uniquement).

Afin d'analyser la morphologie des tumeurs, une coupe histologique a été colorée à l'hématoxyline/éosine (H&E) et observée en microscopie optique (§III.2.1.2 page 69).

Une 2^{ème} coupe, adjacente à la 1^{ère}, a été observée au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse E600 microscope, 346 nm en excitation et 460 nm en émission) pour voir les vaisseaux perfusés (Hoechst). Ensuite le marquage de la lame basale (collagène IV) des vaisseaux a été réalisé sur la même coupe (§III.2.1.3.1 page 69).

Des images en mosaïque (grossissement x10, taille du pixel = 0,76 µm) ont été réalisées à l'aide d'une platine motorisée et reconstruites en utilisant le logiciel analySIS. Des mosaïques ont été produites pour la coloration H&E et pour chacun des marquages

immunohistologiques (Hoechst et collagène IV) (Rijken et al. 1995). Enfin, une analyse quantitative d'images du réseau vasculaire marqué par le collagène IV a été réalisée (§III.2.1.3.2 page 70).

IV.3 Résultats

IV.3.1 Caractéristiques IRM et histologiques de chaque modèle

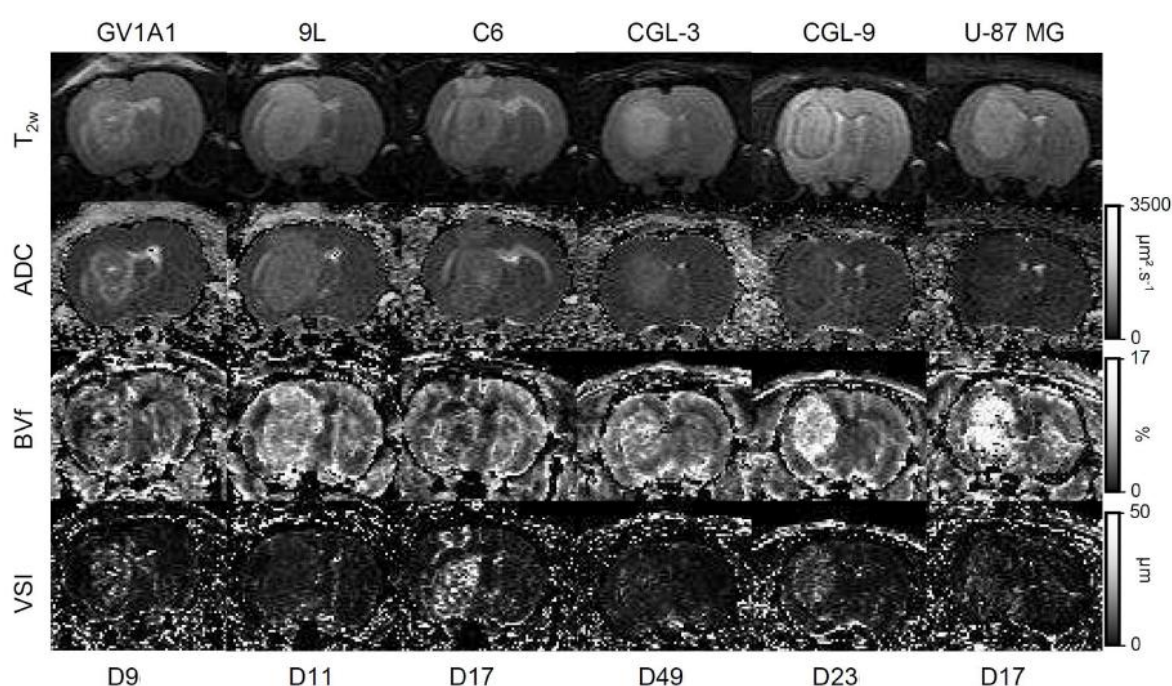


Figure IV.3-1 Hétérogénéité entre les modèles de tumeurs observées par IRM. Exemples d'images anatomiques (T_{2w}) et de cartes paramétriques d'ADC, BVf et VSI d'un rat représentatif pour chaque modèle de gliome.

Au moment de l'analyse, toutes les tumeurs avaient un volume d'environ 75 mm^3 , ce qui a permis de comparer les différents modèles au même stade de développement. En raison de la cinétique de croissance entre les différentes tumeurs, cela correspondait à un nombre de jours différent après l'injection des cellules tumorales (D9-11 pour GV1A1 et 9L, entre les jours D17 et D23 pour les modèles C6, U-87 MG et CGL9 et D49 pour CGL3). La Figure IV.3-1 montre des exemples d'images morphologiques T_{2w} , et des cartes paramétriques d'ADC, BVf et VSI d'un rat représentatif pour chaque modèle de gliome. La Figure IV.3-2 et le Tableau IV.3-1 présentent les valeurs d'ADC, BVf et VSI des différentes tumeurs ainsi que de leur côté controlatéral.

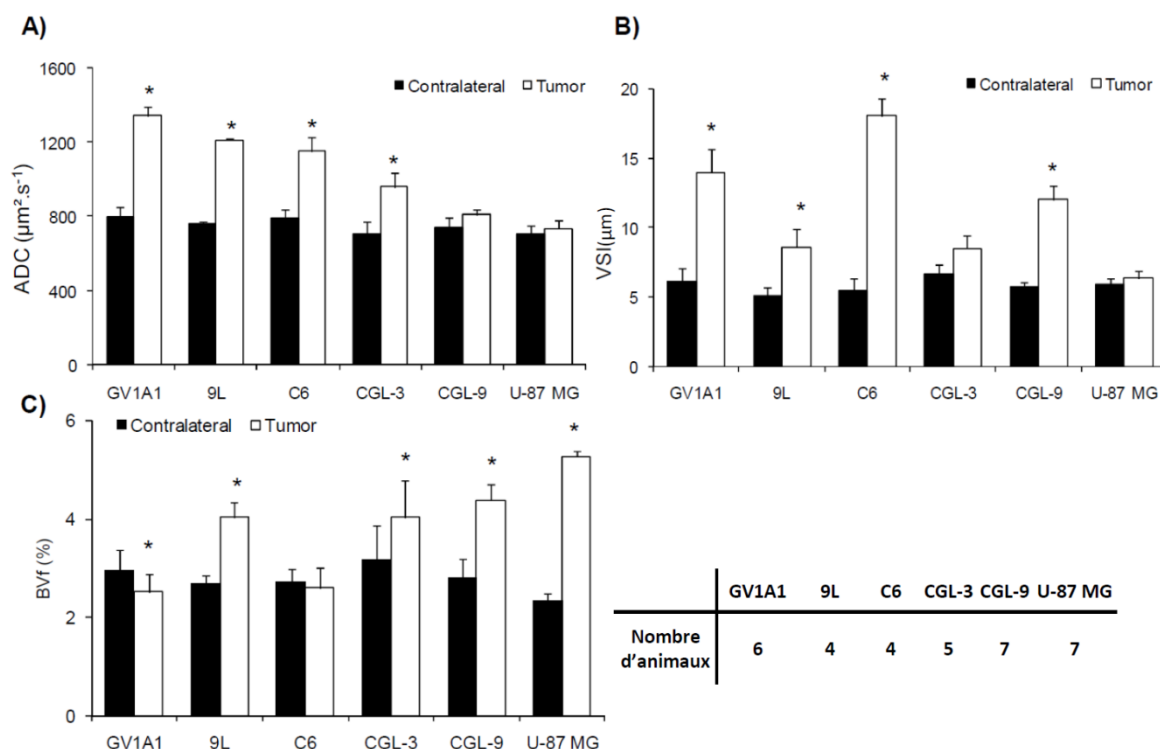


Figure IV.3-2 Comparaison des valeurs moyennes des paramètres IRM estimés (ADC (A), VSI (B) et BVf (C)) pour les ROIs tumeur et controlatérale. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart type pour chaque groupe. Le tableau présente le nombre d'animaux groupe par groupe *: P < 0,05, entre la tumeur et le tissu controlatéral.

De même, la Figure IV.3-3 et le Tableau IV.3-2, représentent les paramètres histologiques qualitatifs et quantitatifs (coloration H&E et marquage du collagène IV et Hoechst) de chaque modèle. L'analyse quantitative de l'immunomarquage du collagène IV n'a pas été possible pour les tumeurs 9L et CGL9 en raison de problèmes techniques et de bruit de fond élevé, respectivement.

Tumors	(n)	ADC ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)		BVf (%)		VSI (μm)	
		Contralateral brain	Tumor	Contralateral brain	Tumor	Contralateral brain	Tumor
GV1A1	(6)	801 $\pm$ 43	1343 $\pm$ 40	3.0 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 1.0	14.0 $\pm$ 1.7
9L	(4)	762 $\pm$ 13	1210 $\pm$ 10	2.7 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.5	8.6 $\pm$ 1.3
C6	(4)	791 $\pm$ 42	1151 $\pm$ 80	2.7 $\pm$ 0.2	2.4 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.8	18.2 $\pm$ 1.7
CGL3	(5)	707 $\pm$ 65	959 $\pm$ 80	3.2 $\pm$ 0.7	4.0 $\pm$ 0.7	6.7 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 0.9
CGL9	(7)	738 $\pm$ 56	809 $\pm$ 30	2.8 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.3	5.7 $\pm$ 0.3	12.0 $\pm$ 1.0
U-87 MG	(7)	706 $\pm$ 43	734 $\pm$ 44	2.3 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.1	5.9 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 0.5

Tableau IV.3-1 : Données quantitatives des paramètres IRM. Le coefficient apparent de diffusion (ADC), le volume sanguin (BVf) et l'index de taille des vaisseaux (VSI) sont présentés pour les ROIs tumeur et controlatérale. n indique le nombre d'animaux dans chaque groupe. Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ écart-type.

Les caractéristiques communes de tous les types de tumeurs, comme le montrent les colorations H&E (Figure IV.3-3), sont une densité cellulaire élevée et la présence d'un œdème. L'œdème à la périphérie des tumeurs apparaît plus marqué pour les tumeurs 9L, CGL9 et U-87 MG.

IV.3.1.1 Modèle GV1A1

Les tumeurs GV1A1 ont une croissance très rapide (durée de survie moyenne = $13,3 \pm 0,6$ jours) et atteignent un volume tumoral moyen de 75 mm^3 , 9 jours après l'implantation des cellules. À ce stade de croissance, le bord de la tumeur GV1A1 est bien délimité sur les images IRM et sur les colorations H&E, avec quelques foyers de cellules tumorales dans le tissu cérébral en périphérie immédiate (observé sur les colorations H&E). Le contraste des tumeurs GV1A1 sur les images pondérées en T_2 et sur les cartes d'ADC est très hétérogène. L'ADC est significativement plus élevé dans la tumeur ($1343 \pm 40 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) que dans le tissu controlatéral ($801 \pm 43 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), et représente la plus grande valeur d'ADC parmi toutes les tumeurs étudiées. L'anneau en hypersignal observé sur les cartes d'ADC est dû au développement de pseudo-kystes, fréquemment observés pour ce type de tumeur à un stade avancé de croissance et bien visible sur la coloration H&E. La valeur élevée d'ADC dans ce type de tumeur peut être en partie due à la présence de ces pseudo-kystes. Des cellules possédant de gros noyaux sont présentes à l'intérieur et autour de ces régions pseudo-kystiques et pourraient correspondre à des cellules inflammatoires. Les tumeurs GV1A1 sont caractérisées par des vaisseaux très larges comme on peut le voir à la fois sur les colorations du collagène IV et sur les cartes de VSI, ce qui conduit à des valeurs plus grandes de $\text{VSI}_{\text{histo}}$ et VSI dans la tumeur que dans le tissu controlatéral ($\text{VSI}_{\text{histo}}$: $6,7 \pm 0,1$ versus $3,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$ et VSI: $14,0 \pm 1,7$ versus $6,1 \pm 1,0 \mu\text{m}$, respectivement). La densité des vaisseaux dans la tumeur est beaucoup plus faible que dans le tissu controlatéral (131 ± 69 versus 280 ± 27 vaisseaux. mm^{-2}) alors que le BVf moyen dans la tumeur ($2,5 \pm 0,4 \%$) est sensiblement plus faible que le tissu controlatéral ($3,0 \pm 0,4\%$). La surface vasculaire affiche la même tendance que le BVf. Les marquages fluorescents du Hoechst et du collagène IV indique que tous les vaisseaux tumoraux sont perfusés et que la plupart d'entre eux, surtout les plus importants, sont perméables (la surface du marquage au Hoechst est supérieure à la surface du marquage au collagène IV). Peu de choses sont connues dans la littérature sur ce modèle de gliome, en particulier concernant ses caractéristiques morphologiques et vasculaires. Ce modèle a été

utilisé principalement pour étudier la réponse immunogène de l'hôte vis-à-vis du gliome (Bonnotte et al. 2001, Cornain et al. 1975).

Tumors	(n ₁ /n ₂)	Vessel density (mm ⁻²)		VSI _{histo} (μm)		Vascular surface (%)	
		Contralateral striatum	Tumor	Contralateral striatum	Tumor	Contralateral striatum	Tumor
GV1A1	(2/2)	280 ± 27	131 ± 69	3.9 ± 0.3	6.7 ± 0.1	5.4 ± 1.4	2.8 ± 1.6
9L	-	-	-	-	-	-	-
C6	(4/4)	282 ± 35	32 ± 13	4.1 ± 0.2	9.5 ± 1.5	4.2 ± 0.9	1.9 ± 0.4
CGL3	(2/5)	280 ± 52	153 ± 72	4.4 ± 0.2	5.7 ± 1.6	6.5 ± 1.5	4.8 ± 0.3
CGL9	-	-	-	-	-	-	-
U-87 MG	(4/4)	256 ± 27	241 ± 44	4.4 ± 0.7	5.9 ± 0.9	5.9 ± 1.2	11.7 ± 2.6

Tableau IV.3-2 : Données quantitatives histologiques: la densité des vaisseaux, le VSI_{histo} et la surface vasculaire sont présentés pour chaque modèle pour les ROIs controlatérales (n1 : nombre d'animaux) et tumorales (n2 : nombre d'animaux). On peut aussi noter que l'analyse quantitative n'a pas été réalisée sur tous les animaux imagés.

IV.3.1.2 Modèle 9L

Contrairement au modèle GV1A1, le modèle 9L est largement utilisé comme modèle expérimental de tumeur cérébrale chez le rat (Barth et al. 2009). La survie moyenne des rats 9L implantés est de $15,0 \pm 1,0$ jours. Les tumeurs avaient un volume tumoral de 75 mm^3 après 11 jours de croissance. Comme GV1A1, la tumeur 9L est très bien délimitée sur les images IRM et sur les colorations H&E, même si de nombreux foyers de cellules tumorales sont clairement visibles dans les tissus cérébraux contigus (observé sur les colorations H&E). Les tumeurs 9L apparaissent en hypersignal homogène sur les images T_{2w} et sur les cartes d'ADC (tumeur *versus* controlatéral: 1210 ± 10 *versus* $762 \pm 13 \text{ μm}^2.\text{s}^{-1}$). Ces tumeurs se caractérisent par la présence de deux types de cellules, qui diffèrent par l'arrangement et la forme des noyaux.

Certaines cellules à noyaux ronds sont organisées en grappes, alors que des cellules allongées aux noyaux ovales forment de longs faisceaux. Ces cellules s'apparentent à des cellules sarcomateuses. Ces cellules sont incorporées dans un stroma riche en collagène IV (comme en témoigne le niveau de bruit de fond élevé dans les coupes marquées au collagène IV). Toutes ces caractéristiques morphologiques se retrouvent dans la littérature (Schmidek et al. 1971, Wilkins et al. 1995, Zhang et al. 2007). Les valeurs d'ADC dans la tumeur 9L sont environ 1,4 fois plus élevées que dans le tissu controlatéral (Kim et al. 2008,

Zhang et al. 2007). Nos valeurs d'ADC sont similaires à celles rapportées par Hall et al. (Hall et al. 2004). Les deux paramètres, BVf et VSI sont plus élevés dans les tumeurs 9L ($4,0 \pm 0,3 \%$ et $8,6 \pm 1,3 \mu\text{m}$) que dans le tissu controlatéral ($2,7 \pm 0,2 \%$ et $5,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$). Cela est cohérent avec l'analyse qualitative des données immunohistochimiques. La densité de vaisseaux dans les tumeurs 9L est réduite par rapport au tissu controlatéral (mais pas autant que dans les tumeurs GV1A1) et les diamètres des vaisseaux dans les tumeurs sont nettement plus grands que dans le tissu controlatéral. La plupart des vaisseaux sont perfusés et la plupart des vaisseaux perfusés sont perméables. Dans la littérature, la gliosarcome 9L est décrit comme un modèle très vascularisé, sans aucun signe de nécrose ou d'ischémie (Provenzale et al. 2006, Sadeghi et al. 2008). En utilisant une approche histologique, Pathak et al. (Pathak et al. 2001) ont obtenu des valeurs de volume sanguin dans des tumeurs 9L et dans le tissu controlatéral ($5,29 \pm 1,67 \%$ et $1,89 \pm 0,39 \%$, respectivement). Ces valeurs sont du même ordre que nos mesures de BVf réalisées par IRM.

IV.3.1.3 Modèle C6

Le modèle C6 est aussi largement utilisé en neuro-oncologie expérimentale (Barth et al. 2009). Les tumeurs C6 ont progressé moins vite que les tumeurs GV1A1 et 9L et ont montré une plus grande variabilité dans la croissance tumorale. La survie moyenne des rats porteurs de tumeurs C6 est de $28,3 \pm 6,8$ jours. On obtient un volume de 75 mm^3 au bout de 17 jours de croissance. Comme les modèles GV1A1 et 9L, les tumeurs C6 sont relativement bien délimitées sur les images IRM ainsi que sur les colorations H&E, même si une invasion du tissu cérébral contigu semble évidente sur les colorations H&E. A ce stade de croissance, les tumeurs C6 sont relativement homogènes avec un hypersignal sur les images pondérées en T_2 et sur les cartes d'ADC. Les valeurs d'ADC mesurées pour les tumeurs C6 et le tissu controlatéral ($1151 \pm 80 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ vs $791 \pm 42 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) sont proches de celles du modèle 9L. Les tumeurs C6 sont caractérisées par la présence de quelques petits foyers nécrotiques, entourés par de petites cellules à noyau dense qui ont un aspect typique de cellules en pseudo-palissade d'un glioblastome multiforme. Toutes ces caractéristiques morphologiques sont en accord avec les nombreuses études décrivant le modèle de gliome C6 (Grobbs et al. 2002). Comparées aux modèles GV1A1 et 9L, les tumeurs C6 présentent une plus faible densité de vaisseaux ($32 \pm 13 \text{ mm}^{-2}$), des $\text{VSI}_{\text{histo}}$ et VSI plus élevés ($9,5 \pm 1,5$ et $18,2 \pm 1,7 \mu\text{m}$, respectivement). Dans le modèle C6, le BVf ($2,4 \pm 0,4\%$) a tendance à être plus faible que dans le tissu controlatéral ($2,7 \pm 0,2\%$) mais, contrairement à la surface vasculaire, cette

différence n'est pas significative. La plupart des vaisseaux dans la tumeur C6 sont perfusés et les plus gros sont très perméables. Les mesures de BVf, VSI et VSI_{histo} sont similaires à celles précédemment reportées par IRM dans la littérature (Tropres et al. 2004, Valable et al. 2008) et sont aussi en accord avec l'étude histologique de Farrell et al. (Farrell et al. 1991). Au stade de croissance des tumeurs de notre étude, les valeurs de BVf assez homogènes dans le tissu tumoral, contrairement à ce qui est observé à des stades plus tardifs, lorsque la périphérie tumorale apparaît hypervascularisée par rapport au cœur de la tumeur (Tropres et al. 2004, Valable et al. 2008).

IV.3.1.4 Modèle CGL3

Les tumeurs CGL3 ont une progression très lente par rapport à tous les autres types de tumeurs. La survie moyenne des rats porteurs de gliome CGL3 est de $66,3 \pm 5,0$ jours. On obtient un volume tumoral de 75 mm^3 après 49 jours de croissance. La périphérie tumorale du modèle CGL3 n'est pas aussi bien délimitée sur les colorations H&E que pour les autres types de tumeurs. Les tumeurs CGL3 sont homogènes avec un hypersignal sur les images pondérées en T_2 et sur les cartes d'ADC. Les valeurs d'ADC dans les tumeurs CGL3 ($959 \pm 80 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) sont significativement plus élevées que dans le tissu controlatéral ($707 \pm 65 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). La densité cellulaire est inférieure à celle observée dans les autres types de tumeurs et les noyaux cellulaires sont de forme irrégulière. La taille des vaisseaux des tumeurs CGL3 ($VSI_{\text{histo}} = 5,7 \pm 1,6 \mu\text{m}$ et $VSI = 8,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$) a tendance à être plus élevés que dans le tissu controlatéral ($VSI_{\text{histo}} = 4,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ et $VSI = 6,7 \pm 0,7 \mu\text{m}$) mais cette différence n'est pas significative. Le BVf des tumeurs CGL3 ($4,0 \pm 0,7 \%$) est légèrement, mais significativement plus élevé que dans le striatum controlatéral ($3,2 \pm 0,7 \%$), alors que la surface vasculaire estimée en histologie n'est pas significativement différente. Tous les vaisseaux tumoraux de ce modèle sont perfusés mais non perméables, similaires à un système vasculaire cérébral normal.

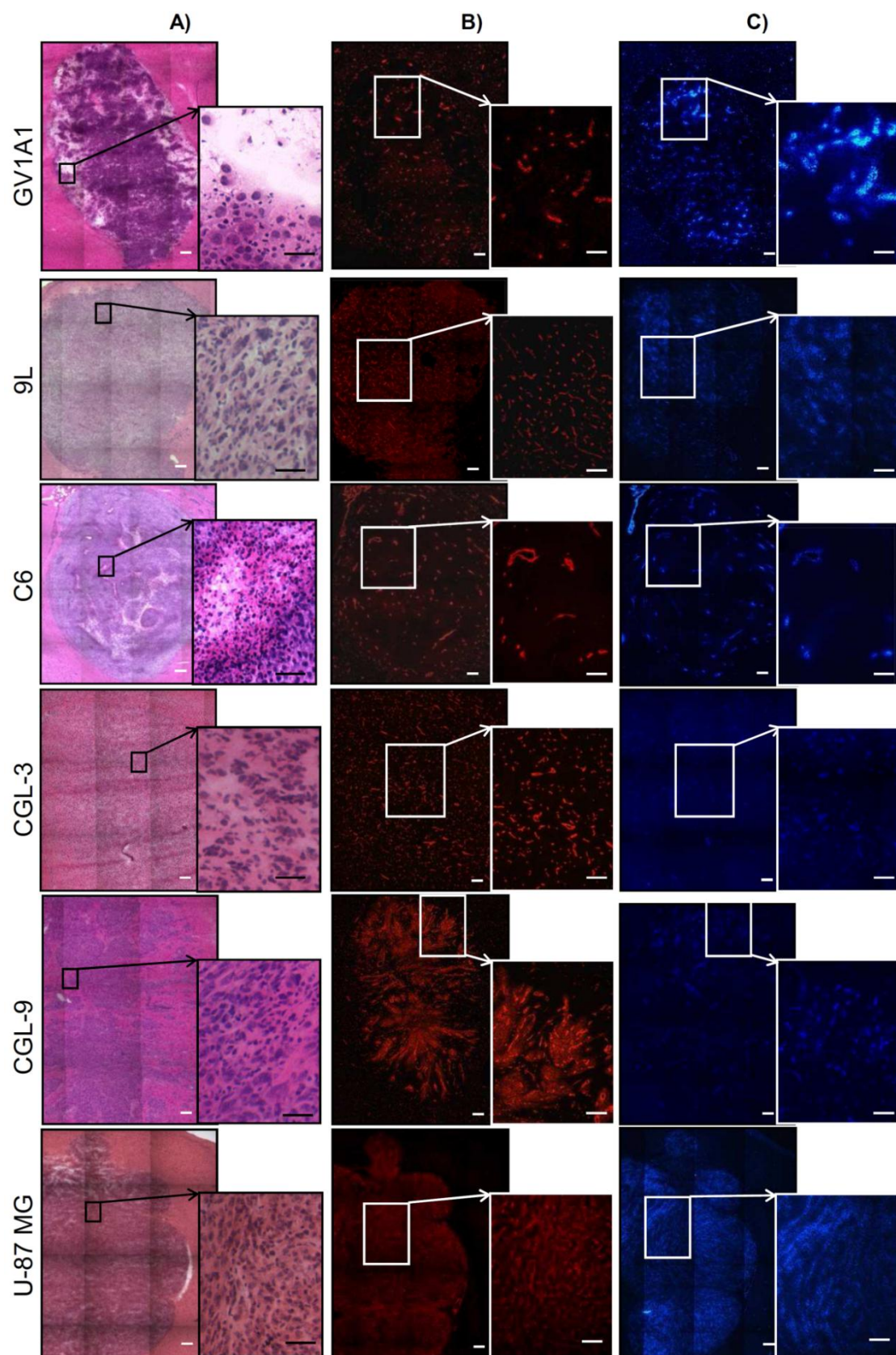


Figure IV.3-3 Photographies représentatives de tous les modèles de tumeur colorées en H&E (A), collagène IV (B) et Hoechst (C). Pour chaque coloration, un zoom des principales caractéristiques est présenté. Barre d'échelle noir = 50 µm, et barre d'échelle blanche = 200 µm

IV.3.1.5 Modèle CGL9

La survie moyenne des rats « *nude* » porteurs de tumeur CGL9 est de $33,4 \pm 1,9$ jours. Un volume de 75 mm^3 est obtenu 23 jours après l'implantation des cellules tumorales. L'aspect des tumeurs CGL9 sur les images IRM ainsi que sur les colorations H&E et le marquage du collagène IV est très différent des autres types de tumeurs. Sur les images T_{2w} et les cartes d'ADC, les tumeurs paraissent respectivement en hypersignal et en isosignal entouré par un anneau mince en hyposignal, entouré lui-même par un anneau mince en hypersignal. Sur les colorations H&E, les tumeurs CGL9 présentent un aspect unique par rapport aux autres types de tumeurs et sont très infiltrantes: le cœur de la tumeur contient des zones tumorales et du tissu normal. Des îlots de cellules tumorales, à noyau rond, de différentes tailles sont dispersés parmi les faisceaux de cellules tumorales à noyau allongé. Cette tumeur progresse dans un schéma radial avec des faisceaux parallèles de tissus normaux et tumoraux. Un premier anneau de tissu avec une densité cellulaire plus proche de celle du tissu normal et la présence de nombreux faisceaux de matière blanche caractérisent la périphérie tumorale. Ces caractéristiques correspondent aux hyposignaux observés autour du centre de la tumeur sur images pondérées en T_2 et sur les cartes d'ADC. Le second anneau de tissu très œdémateux entourant la périphérie tumorale corrèle avec l'anneau en hypersignal observé sur les images IRM. Une autre caractéristique des tumeurs CGL9 est l'expression élevée de collagène IV, qui a empêché l'analyse quantitative des vaisseaux sanguins, avec notre méthode. Contrairement aux modèles précédents, les valeurs d'ADC des tumeurs CGL9 ($809 \pm 30 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ne sont pas significativement différentes de celles des tissus controlatéraux ($738 \pm 56 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Les valeurs du BVf et du VSI sont plus élevées dans la tumeur ($4,4 \pm 0,3 \%$ et de $12,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$) que dans le tissu controlatéral ($2,8 \pm 0,4 \%$ et $5,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$). Malgré un bruit de fond élevé dû à la surexpression du collagène IV, la densité des vaisseaux apparaît légèrement diminuée par rapport au tissu controlatéral mais avec un diamètre plus grand. En outre, l'orientation des vaisseaux CGL9 n'est pas aléatoire comme dans les autres tumeurs: il existe une orientation préférentielle longitudinale du centre vers la périphérie de la tumeur, mimant une organisation en étoile. Les données histologiques du marquage au Hoechst suggèrent qu'une partie seulement des vaisseaux est perfusée et que la plupart d'entre eux sont perméables.

IV.3.1.6 Modèle U-87 MG

Le modèle de gliome de haut grade U-87 MG est largement utilisé comme modèle xénogreffé chez des souris « *nude* » mais dans une moindre mesure comme modèle xénogreffé sur des rats « *nude* ». La survie moyenne des rats porteurs de gliome U-87 MG est de $26,5 \pm 1,9$ jours. On obtient un volume de 75 mm^3 environ 17 jours après l'implantation des cellules tumorales. Les tumeurs U-87 MG sont bien délimitées sur les images pondérées en T_2 et sur les colorations H&E. Les tumeurs U-87 MG apparaissent homogènes en hypersignal sur les images pondérées en T_2 . Contrairement aux autres modèles de tumeurs, les tumeurs U-87 MG sont à peine détectables sur les cartes d'ADC et de manière cohérente, les valeurs d'ADC intra-tumoral ($734 \pm 44 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) ne sont pas significativement différentes de celles mesurées dans le tissu controlatéral ($706 \pm 43 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Une étude antérieure de Sun et al. a mesuré un ADC plus élevé dans des gliomes U-87 MG implantés dans le cerveau de souris « *nude* » ($1030 \pm 20 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) que dans le tissu controlatéral ($730 \pm 30 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) (Sun et al. 2004). Cette différence pourrait être due à des différences dans le lot de cellules utilisées, l'origine de l'animale hôte, ou le stade de développement de la tumeur lors de la mesure. Dans l'étude longitudinale (présentée au chapitre V page 99), nous avons observé que l'ADC des gliomes U-87 MG à un stade précoce de la croissance tumorale est légèrement plus élevé que dans le tissu controlatéral et, qu'au cours de la croissance tumorale, cette valeur avait tendance à diminuer jusqu'à des valeurs comparable à cette étude. Sur les colorations H&E, les tumeurs U-87 MG sont très homogènes avec une densité cellulaire élevée et avec certaines cellules tumorales alignées le long des vaisseaux, formant des faisceaux minces. Les tumeurs sont œdémateuses mais ne présentent pas de nécrose, ou de pseudo-kystes. La densité des vaisseaux des tumeurs U-87 MG ($241 \pm 44 \text{ mm}^2$) est semblable à celle du tissu controlatéral ($256 \pm 27 \text{ mm}^2$). La taille des vaisseaux est légèrement supérieure dans la tumeur que dans les tissus controlatéraux, cette différence est significative sur la quantification histologique du collagène IV mais pas en IRM ($p = 0,54$). Le BVf des tumeurs U-87 MG ($5,3 \pm 0,1 \%$) est significativement plus élevé que dans le tissu controlatéral ($2,3 \pm 0,2 \%$). Tous les vaisseaux sont perfusés et perméables. Dans la littérature, le modèle murin U-87 MG implanté en orthotopique est décrit comme une tumeur non nécrotique et très vascularisée (Candolfi et al. 2007), ce qui est cohérent avec les données obtenues dans notre étude.

IV.3.2 Activité anti-tumorale du BCNU

IV.3.2.1 Cytotoxicité *in vitro* du BCNU

Les IC₅₀ moyens calculés pour chaque lignée cellulaire sont indiqués dans le Tableau IV.3-3. *In vitro*, les lignées cellulaires montrent une sensibilité différente au BCNU (de la moins sensible au plus sensible: CGL9, U-87 MG, C6, CGL3 $\approx$ GV1A1 et 9L).

Lignée cellulaire	Origine des tumeurs	IC ₅₀ (μ M)
GV1A1	Rat	59.7 $\pm$ 14.2
9L	Rat	31.2 $\pm$ 18.4
C6	Rat	112.2 $\pm$ 72.7
CGL3	Human	60.5 $\pm$ 13.9
CGL9	Human	173.2 $\pm$ 65.5
U-87 MG	Human	138.5 $\pm$ 74.2

Tableau IV.3-3 : Cytotoxicité *in vitro* (déterminée à partir de 3 expériences indépendantes) d'un traitement de 96 h au BCNU mesurée par des tests MTT (moyenne $\pm$ écart-type).

IV.3.2.2 Activité anti-tumorale *in vivo* du BCNU

La moyenne et la médiane de survie du groupe contrôle et du groupe traité au BCNU ainsi que l'augmentation de la survie (ILS) des animaux sous traitement sont présentées dans le Tableau IV.4-1 pour chaque modèle. Les tumeurs U-87 MG et 9L ont la plus faible sensibilité au BCNU *in vivo* (aucune augmentation de la moyenne et de la médiane de survie). On observe environ 30% d'augmentation de l'ILS pour les modèles C6 et CGL3 et de 123% pour le modèle GV1A1. Le traitement au BCNU est le plus efficace sur les tumeurs CGL9 avec une augmentation de l'ILS supérieur à 230%.

IV.4 Discussion

Les objectifs de cette première étude étaient premièrement, de caractériser la microstructure et la microvascularisation de 6 modèles de gliomes. Deuxièmement évaluer si les paramètres IRM (reflétant l'état de la vascularisation tumorale) mesurés au même stade de développement tumoral pourraient décrire le phénotype et la microvascularisation de chacune des tumeurs. Et enfin de déterminer si ces paramètres IRM, mesurés avant traitement, pouvaient être un facteur prédictif de réponse à un agent chimiothérapeutique.

A cet effet, l'étude a été menée en utilisant 6 modèles de gliomes (3 humains et 3 murins) implantés en orthotopique dans le cerveau de rats. Les 3 modèles de rats, ainsi que le modèle U-87 MG de gliomes humains ont été choisis car ils ont été couramment utilisés en oncologie lors d'études précliniques (Barth et al. 2009). Nous avons également inclus deux modèles de gliomes humains qui ont été développés à Oncodesign en raison de leurs propriétés morphologiques atypiques mais aussi à cause de leur sensibilité au BCNU *in vitro*. Les animaux ont été traités par BCNU, agent chimiothérapeutique utilisé en routine clinique pour le traitement des gliomes.

Tumors	Treatment Groups	Number of rats	treatment days	Mean survival time (days)	Median survival Time (days)	ILS %
GV1A1	Control	3		13.3 ± 0.6	13	123%
	BCNU	4	D9, D23	29.2 ± 6.6	29	
9L	Control	5		15.0 ± 1.0	15	6%
	BCNU	5	D11	15.8 ± 0.5	16	
C6	Control	5		28.3 ± 6.8	26	31%
	BCNU	5	D17, D31	31.7 ± 5.9	34	
CGL3	Control	3		66.3 ± 5.0	67	
	BCNU	3	D49, D63	89.7 ± 1.1	89	33%
CGL9	Control	5		33.4 ± 1.9	34	
	BCNU	5	D23, D37	>113*	>113*	>230%
U-87 MG	Control	4		26.5 ± 1.9	26	
	BCNU	4	D17	26.0 ± 2.9	26	0%

Tableau IV.4-1 Tableau présentant le nombre de rats dans chaque groupe, le jours d'administration du BCNU (D0 est le jour d'injection des cellules tumorales), la moyenne ($\pm$ écart-type) et la médiane de survie (en jours) pour les groupes *control* et BCNU et augmentation de la survie des animaux (ILS).

* Les animaux porteurs de tumeurs CGL9 ont été sacrifiés à D113 (pas de développement de tumeurs observées à l'autopsie).

Seules quelques études dans la littérature ont comparé différents modèles de gliomes. Les similitudes et les différences génétiques entre les 4 lignées de gliome les plus utilisées de rat ou humaine ont été évaluées (Sibenaller et al. 2005). La vascularisation tumorale a également été caractérisée sur la plupart des modèles de tumeurs cérébrales en utilisant une technique d'immunohistologie quantitative (ENU, MSV, RG-2, S635cl15, et D-54MG (Schlageter et al. 1999) et C6 et RG2 (Seitz et al. 1988)). Plus récemment, les caractéristiques histopathologiques de 3 modèles de xénogreffes (GL26, C57BL/6 et CNS-1) et 1 modèle (U-87 MG) syngénique ont été comparées aux données de gliomes spontanés dans chez le chien (U251) (Candolfi et al. 2007). Récemment, une revue a été publiée

regroupant les caractéristiques des modèles syngéniques de gliomes les plus couramment utilisés chez le rat (Barth et al. 2009). L'originalité de notre étude, par rapport à la littérature, est d'avoir pu mettre en évidence les caractéristiques morphologiques et vasculaires de 6 modèles de gliomes à la fois par IRM et histologie.

IV.4.1 Hétérogénéité morphologique évaluée par histologie

Au même stade de développement (à savoir le volume moyen des tumeurs d'environ 75mm^3), chaque modèle de gliome présente des caractéristiques morphologiques typiques, ce qui permet de les identifier seulement en observant les colorations H&E. Les kystes nécrotiques et les pseudo-kystes sont caractéristiques des glioblastomes ; mais seulement un modèle de gliome, le C6, a montré certains foyers nécrotiques à ce stade de croissance, un phénomène qui se produit plus tard dans tous les autres modèles. Seul le modèle GV1A1 présente des pseudo-kystes à ce stade de croissance tumorale. Ces pseudo-kystes peuvent également être trouvés dans des gliomes de haut grade et pourraient être corrélés à l'inflammation. Des amas de cellules gliomateuses entre les faisceaux de cellules sarcomatoïdes sont caractéristiques du modèle 9L. Dans le modèle U-87 MG, certaines cellules tumorales sont alignées le long des vaisseaux. Les tumeurs CGL3 se caractérisent par une faible coloration H&E comparativement aux autres modèles, les noyaux cellulaires sont de formes irrégulières et la BHE semble intacte, ce qui est généralement observé dans les gliomes de bas grade. Contrairement aux autres modèles, le CGL9 est très infiltrant, à l'instar de la plupart des glioblastomes humains.

IV.4.2 L'hétérogénéité structurelle et microvasculaire évaluée par IRM

Alors qu'aucune différence significative des valeurs d'ADC, de BVf et de VSI n'est trouvée pour les tissus contralatéraux des divers modèles en dépit des souches différentes de rats (Wistar, Fischer et le rat « *nude* ») ces mêmes paramètres sont très variables d'une tumeur à l'autre.

Un seul des paramètres IRM mesurés ne permet pas de caractériser avec certitude le phénotype tumoral par rapport au tissu sain. En effet, il y a toujours un modèle de tumeur pour lequel les valeurs intratumorales des paramètres sont similaires à celles du côté controlatéral (BVf pour C6 et GV1A1 ; ADC pour CGL9 et U-87 MG ; VSI pour U-87 MG et CGL3). Cependant la Figure IV.4-1C-D montre que la combinaison de deux paramètres IRM (BVf et ADC ou VSI et BVf) peut être utilisée pour discriminer le tissu tumoral du tissu sain. À ce jour, la plupart des études cliniques évaluent le BVf ou l'ADC séparément pour le diagnostic. Mais différentes études ont montré de grandes zones de chevauchement entre les tissus normaux et tumoraux, entre les différents types de tumeurs et entre différents grades de tumeurs (Provenzale et al. 2006, Sadeghi et al. 2008). Cette étude montre l'intérêt d'utiliser

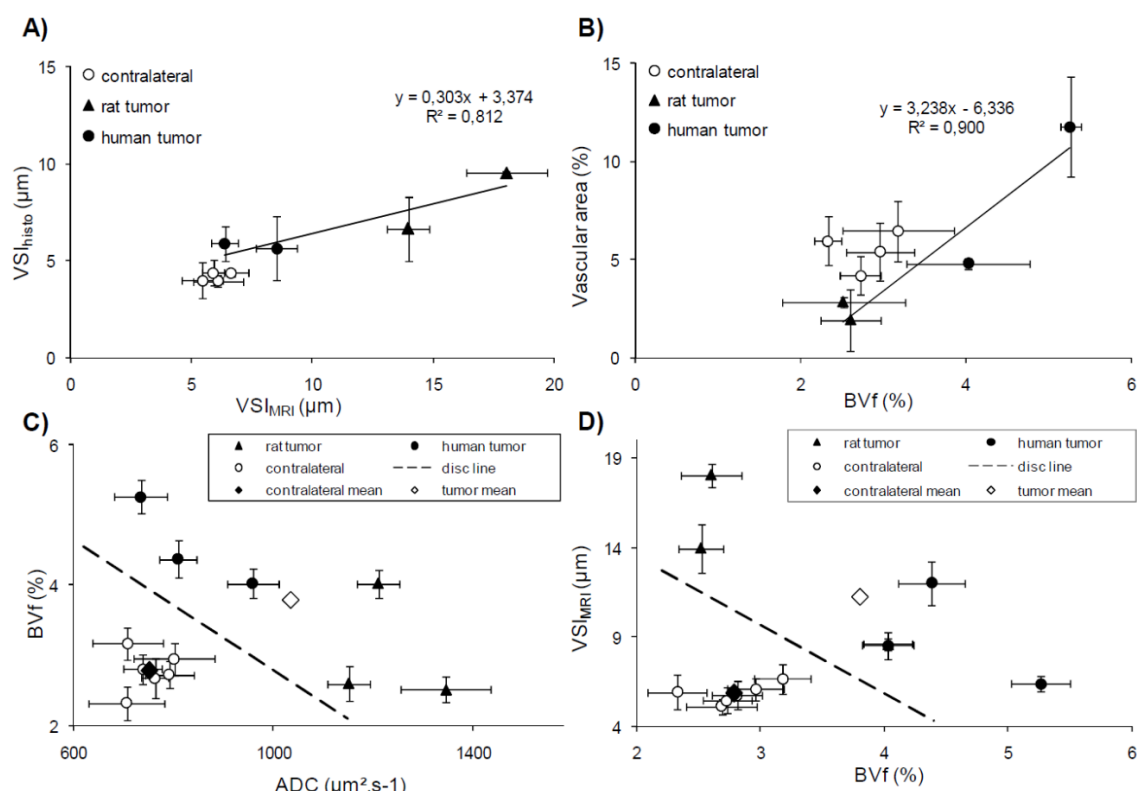


Figure IV.4-1 Corrélation entre les paramètres IRM et histologiques:

(A) VSI_{histo} versus VSI (IRM)

(B) Surface vasculaire versus BVf (IRM).

Chaque point représente soit un modèle de tumeur (symboles noirs) ou un tissu controlatéral (symboles blancs). Cette corrélation n'a été possible que pour 4 modèles de gliomes. La ligne noire montre le meilleur ajustement linéaire pour les mesures de tumeur seulement.

Corrélation entre les différents paramètres IRM:

(C) Diagramme de dispersion du BVf en fonction de l'ADC

(D) Diagramme de dispersion du VSI en fonction du BVf.

Les tumeurs d'origines humaines et murines sont identifiées (cercles noirs et des triangles noirs, respectivement). Les valeurs moyennes des ROIs tumeur et controlatérale sur tous les modèles sont présentées par des losanges blancs et noirs respectivement. Une ligne discriminante (pointillée) entre la tumeur et l'hémisphère sain (cercle blanc) est affichée. Elle a été calculée en utilisant une analyse discriminante linéaire.

une combinaison multivariée de paramètres IRM (BVf et ADC ou VSI) plutôt qu'un seul paramètre pour caractériser le phénotype tumoral.

IV.4.2.1 Caractéristiques structurelles

Un ADC faible dans une tumeur présentant une forte densité cellulaire est attribuée à une diffusion restreinte de l'eau en raison d'une diminution du volume extracellulaire. Une corrélation inverse entre ADC et densité cellulaire des tissus tumoraux a souvent été relevée dans la littérature (Hamstra et al. 2007). Dans plusieurs études cliniques et expérimentales (Colvin et al. 2008, Sadeghi et al. 2008, Valable et al. 2008), y compris dans la nôtre, cette corrélation n'a pas été observée. Cette corrélation inverse entre ADC et densité cellulaire est probablement correcte quand on étudie l'effet d'un traitement qui induit une diminution de la densité cellulaire et une augmentation de la nécrose mais ne s'applique pas quand on compare des tumeurs entre elles ou par rapport au tissu sain. Les valeurs d'ADC sont beaucoup plus élevées dans le modèle 9L que dans les tumeurs U-87 MG, bien que les densités cellulaires de ces deux modèles soient identiques. A l'inverse, les tumeurs CGL3 et U-87 MG ont des valeurs d'ADC similaires alors qu'elles ont une densité cellulaire très différente. Outre la densité de cellules, les valeurs d'ADC dans les modèles de gliomes pourraient dépendre d'autres facteurs comme l'œdème, la nécrose, l'échange d'eau entre les compartiments intra- et extra-cellulaires, ou encore de la composition de la matrice extracellulaire (Le Bihan et al. 2007).

IV.4.2.2 Caractéristiques microvasculaires

Toutes les tumeurs présentent des valeurs de BVf et de VSI similaires ou supérieures au tissu controlatéral. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Schlageter et al. obtenus sur 5 modèles différents de tumeurs cérébrales en utilisant l'histologie quantitative (ENU, MSV, RG-2, S635cl15, and D-54MG) (Schlageter et al. 1999). Pour 4 de nos modèles (GV1A1, C6, CGL3 et U-87 MG), il a été possible d'effectuer une analyse quantitative de la surface vasculaire et du VSI_{histo} sur les coupes de cerveau après marquages immunohistologiques de la lame basale des vaisseaux. Une bonne corrélation a été trouvée entre valeurs de VSI obtenues par IRM et l'histologie (Figure IV.4-1A) ainsi qu'entre le BVf et la surface vasculaire (Figure IV.4-1B). Cependant, les estimations du VSI sont supérieures d'un facteur 2 environ. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études (dont l'étude II de cette thèse présentée page 99), qui ont trouvé des valeurs de VSI plus grandes lorsqu'elles sont mesurées

par IRM que par l'histologie (Tropres et al. 2004, Valable et al. 2008). Cet écart peut être dû aussi bien à des biais induits dans les estimations par histologie que par IRM. Les estimations histologiques prennent en compte tous les vaisseaux alors que les mesures IRM reposent seulement sur les vaisseaux perfusés. La préparation des échantillons pour l'histologie pourrait induire la dilatation ou la compression des vaisseaux. Une coupe histologique de quelques micromètres d'épaisseur n'est pas une représentation exacte de l'hétérogénéité présente dans une tranche de 1 mm d'épaisseur (correspondant à l'épaisseur de nos coupes IRM). Les estimations du VSI par IRM peuvent être biaisées par une différence entre la configuration spatiale des vaisseaux réels (en particulier dans les tumeurs) et la configuration idéalisée (cylindres parfaits) utilisées par le modèle (Pathak et al. 2008), ou par des inhomogénéités de champ macroscopique. Il est difficile de conclure si les valeurs "exactes" des paramètres microvasculaires sont plus près des valeurs estimées par IRM ou par histologie (voir la 2^{ème} étude, chapitre V, page 99 pour une discussion plus détaillée). Toutefois, la bonne corrélation entre les paramètres déterminés par IRM et par histologie suggère qu'elles reflètent des caractéristiques microvasculaires similaires, montrant un bon potentiel de l'IRM pour évaluer ces caractéristiques de façon non invasive.

Des corrélations entre le BVf et la densité vasculaire ont déjà été mises en évidence dans des modèles de gliomes (Aronen et al. 1994, Cha et al. 2003, Sadeghi et al. 2008, Sugahara et al. 1998) suggérant que le BVf est un bon indicateur du degré de vascularisation d'une tumeur. La présente étude montre que le BVf seul ne peut pas être considéré comme un bon marqueur de l'état d'oxygénation de la tumeur. En effet les tumeurs C6 et GV1A1 ont un BVf égal au striatum controlatéral alors que la densité de vaisseaux (évaluée qualitativement ou quantitativement) est nettement plus faible que dans le tissu controlatéral. Ainsi, les cellules tumorales se retrouvent plus loin des vaisseaux sanguins, ce qui suggère que ces tumeurs ne sont probablement pas bien oxygénées. Dans ces tumeurs les valeurs de BVf sont « normales » car la faible densité de vaisseaux a été compensée par leur plus grande taille. Par ailleurs certaines tumeurs peuvent aussi avoir une mauvaise oxygénation en dépit de valeurs de BVf normales (et malgré une densité normale des vaisseaux) si le sang dans les vaisseaux est statique (pas ou peu de circulation sanguine) ou mal oxygéné. Notre étude montre que le degré de vascularisation et d'oxygénation d'une tumeur est mieux apprécié en combinant le VSI ou BVf. Il est probable que d'autres estimations accessibles par IRM tel que le flux sanguin, l'oxygénation du sang ou encore la perméabilité des vaisseaux seront nécessaires pour bien caractériser *in vivo* l'état vasculaire et l'oxygénation de la tumeur.

IV.4.3 Sensibilité au BCNU *in vitro* et *in vivo*

Plusieurs études cliniques ont mis en évidence une réponse différentielle à un traitement dans un même sous-groupe pathologique (Idbaih et al. 2007). L'étude présentée ici montre aussi une hétérogénéité dans les réponses au traitement BCNU entre les 6 modèles de gliomes, *in vitro* (dans la gamme 10 - 200 μM) et *in vivo*. En outre, les réponses au BCNU *in vitro* et *in vivo* ne sont pas corrélées entre elles (Tableau IV.3-3 et Tableau IV.4-1). Le modèle CGL9, qui est le moins sensible aux BCNU *in vitro* ($\text{IC}_{50} > 170 \mu\text{M}$) est le plus sensible *in vivo* ($\text{ILS} > 203 \%$) et inversement pour le modèle 9L ($\text{IC}_{50} \approx 31 \mu\text{M}$ et $\text{ILS} = 6 \%$). L'hétérogénéité de la réponse au traitement observée *in vitro* pourrait être liée à des caractéristiques génétiques différentes entre les 6 lignées tumorales utilisées (Leuraud et al. 2004, Sibenaller et al. 2005). Les différences observées *in vivo* peuvent être à la fois dues à des caractéristiques génétiques différentes entre les modèles mais aussi à des facteurs environnementaux qui limiteraient l'accès de la drogue à la tumeur (faible perfusion vasculaire et/ou faible perméabilité de la BHE). Les différences de sensibilité au BCNU observées, *in vitro* et *in vivo*, pour une même lignée cellulaire semblent être dues aux facteurs environnementaux.

Un second résultat apporté par notre étude est qu'aucune corrélation n'a été trouvée entre les ILS et les paramètres IRM, seuls ou en combinaison, mesurés avant traitement. Il en résulte que, dans notre étude, ces paramètres ne sont pas prédictifs de la réponse au traitement. Une analyse de corrélation canonique a été réalisée pour essayer de trouver la meilleure combinaison linéaire entre les 3 paramètres, VSI, ADC et BVf qui pourrait corrélérer avec l'ILS. Le plus haut coefficient de corrélation trouvé lors de cette analyse a été de $r^2 = 0,2$. Dans la littérature, un ADC peu élevé mesuré avant traitement s'est révélé prédictif de l'efficacité thérapeutique (chimiothérapie seule ou en combinaison avec la radiothérapie) dans un carcinome rectal chez l'homme (DeVries et al. 2003, Dzik-Jurasz et al. 2002) et expérimentalement dans des cancers du colon et mammaires (Lemaire et al. 1999, Roth et al. 2004). En ce qui concerne les tumeurs cérébrales, deux études (Babsky et al. 2006, Jäger et al. 2005) ont rapporté une valeur prédictive de l'ADC prétraitement. Mais ce qui est intéressant de constater c'est que la chimio-sensibilité a été associée à des valeurs faibles d'ADC dans le cas d'oligodendrogliomes chez l'homme (Jäger et al. 2005) et à des valeurs élevées d'ADC dans le cas de gliome 9L implanté en sous-cutané chez le rat (Babsky et al. 2006). Un index de perfusion, combinant les informations de surface de perméabilité et le volume/débit

sanguin, mesuré avant le début du traitement s'est avéré prédictif de la réponse thérapeutique (radiothérapie ou radio-chimiothérapie) chez les patients atteints d'un cancer du rectum et d'un carcinome du col de l'utérus (de Vries et al. 2000, Devries et al. 2001, DeVries et al. 2003, Kremser et al. 2007, Mayr et al. 1996). En revanche, aucun de ces paramètres mesurés avant le traitement en utilisant la technique de DCE (mesure dynamique de la perméabilité de la BHE) n'a permis de montrer de valeur prédictive pour les cancers de la tête et du cou (Hoskin et al. 1999). Pour les tumeurs cérébrales, une valeur faible mesurée avant traitement, d'un paramètre combinant à la fois le volume sanguin et le volume extracellulaire extravasculaire s'est montrée prédictive de la réponse à la radiothérapie chez des patients porteurs de gliome (Hawighorst et al. 1998) alors qu'un volume de sang élevé s'est révélé prédictif de chimiosensibilité dans un seul cas d'oligodendrogliome (Jäger et al. 2005).

La faible prédictivité de nos mesures IRM avant le début du traitement pourrait être due aux différences existant entre des tumeurs expérimentales et humaines (la plupart des études de la littérature ont été réalisées sur les tumeurs humaines), des points limites différents (l'ILS dans notre étude par rapport à la taille des tumeurs à différents temps après le début du traitement dans la plupart des études) ou encore le type de tumeur étudié (tumeur cérébrale versus d'autres types de tumeurs). Dans notre étude, les valeurs d'ADC, BVf et VSI mesurées avant le début du traitement ne semblent pas être des marqueurs prédictifs de la réponse à la chimiothérapie. En revanche, plusieurs études ont démontré que ces mêmes paramètres mesurés après le début du traitement se révèlent être des marqueurs précoces d'efficacité thérapeutique (Hamstra et al. 2007, O'Connor et al. 2008, Sorensen et al. 2009). Ces affirmations seront considérées dans les 2 dernières études de cette thèse (chapitre VI, page 119 et chapitre VII page 137).

IV.5 Conclusion

En conclusion, cette étude montre que les six modèles de gliomes étudiés présentent des caractéristiques différentes en termes de morphologie et de système vasculaire, ainsi que des réponses différentes au BCNU, malgré une taille tumorale similaire. Cette variabilité de modèle doit être prise en compte dans la conception d'études précliniques visant à tester l'efficacité de médicaments anticancéreux contre les modèles gliomes.

Mesurés avant le début du traitement, ni l'ADC, ni le BVf ni le VSI seuls ou en association sont prédictifs de la réponse *in vivo* de traitement au BCNU dans ces modèles de

gliomes. D'autres paramètres comme le flux sanguin, la perméabilité vasculaire, l'état d'hypoxie ou encore la pression interstitielle pourraient être pertinents dans la relation entre les effets de la drogue sur la vascularisation tumorale et son activité anti-tumorale.

Nos résultats indiquent aussi que le réseau vasculaire d'une tumeur ne peut être décrit par un seul paramètre tel que le BVf. La mesure du VSI peut aussi montrer un intérêt, car le BVf dépend à la fois de la densité et de la taille des vaisseaux. Dans l'étude présentée, le phénotype tumoral est mieux décrit en combinant deux paramètres IRM comme le BVf et le VSI ou encore le BVf avec le ADC, que par un seul de ces paramètres. Cette donnée souligne la nécessité d'une approche multiparamétrique comme l'IRM pour caractériser les tumeurs cérébrales.

Etude II : Suivi longitudinal de la
vascularisation de 2 modèles de
gliome : C6 et RG2

V.1 Objectifs de l'étude II

La réponse à un traitement peut varier selon les modèles animaux utilisés (Barth et al. 1998) (étude I présentée au §IV page 75). Dans l'étude I, nous avons pu caractériser différents paramètres cellulaires (ADC) et vasculaires (BVf et VSI) par IRM sur 6 modèles de gliomes. On a aussi montré dans cette étude que ces différents paramètres étaient corrélés avec des paramètres structuraux et vasculaires observés (et quantifiés) par histologie. À notre connaissance, aucune étude de suivi longitudinal *in vivo* de l'évolution de paramètres cellulaires (ADC) et vasculaires (BVf et VSI) n'a été réalisée sur des modèles de gliomes implantés en intracérébral chez le rat. Afin de tenir compte de l'hétérogénéité des gliomes humains et des limites connues de l'utilisation de modèles animaux (étude I présentée au chapitre IV page 75), deux modèles de gliomes ont été étudiés ici : C6 et RG2. Le modèle C6 est très utilisé pour étudier la caractérisation du remodelage vasculaire (Grobbs et al. 2002) mais il est connu pour être immunogène (Barth et al. 2009). Le modèle RG2, développé sur une autre souche de rat, est moins immunogène (Barth et al. 1998). Dans la conception de cette étude, nous avons plusieurs objectifs :

(i) Etudier la faisabilité d'une mesure répétée par IRM des paramètres BVf et de VSI sur le même animal en utilisant une technique dite « à l'équilibre », utilisant un agent de contraste (USPIO).

(ii) Comparer les mesures IRM, *in vivo*, du BVf et du VSI avec les mesures histologiques, *ex vivo*, correspondantes à savoir le BVf_{histo} et le VSI_{histo}.

(iii) Caractériser l'évolution des paramètres cellulaires (ADC) et vasculaires (BVf et VSI) durant la croissance des deux modèles de gliomes C6 et RG2. Les deux modèles présentant des degrés différents d'agressivité (données du laboratoire non publiées), nous nous attendons à ce qu'ils présentent des évolutions microvasculaires différentes.

(iv) Déterminer si ces différences – si elles existent – peuvent s'expliquer par l'expression du VEGF, de l'angiogénine-2 (Ang-2), et l'activité des métalloprotéinases (MMP) -2 et MMP-9.

Cette étude a été réalisée durant mon stage de Master II dans l'unité U594 (ancien nom de l'équipe 5 du GIN). Cette étude a été conçue et réalisée par Samuel Valable avec la participation de Régine Farion, Marine Beaumont et Emmanuel Barbier. Mon travail a principalement consisté à étudier le modèle C6 (hors acquisition IRM).

Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un article présenté en annexe.

V.2 Protocoles expérimentaux

V.2.1 Suivi longitudinal

Des rats mâles Wistar (n=27) et Fischer 344 (n=26) ont été implantés par des cellules tumorales C6 et RG2, respectivement (comme décrit au chapitre III.1.1.2 page 54). Pour chaque modèle, un groupe de 8 animaux, appelé sous groupe « longitudinal », a été soumis au protocole IRM à quatre reprises: 11, 15, 20, et 25 jours après l'implantation tumorale pour le modèle C6, et 6, 10, 14, et 18 jours pour le modèle RG2. Le dernier jour d'imagerie se situe environ 3 jours avant la moyenne de survie de chacun des modèles (données non publiées). Après la dernière mesure IRM, les animaux sont sacrifiés pour réaliser les expériences *ex vivo*. A chaque jour d'imagerie, et en plus des huit animaux déjà mentionnés, quatre animaux supplémentaires ont été imagés à l'IRM, puis sacrifiés pour des expériences *ex vivo*. Ces 16 animaux par modèle (4 animaux par jour d'imagerie) forment le sous groupe « ponctuel ». Ainsi, à chaque temps d'imagerie, 12 animaux ont été imagés (8 du sous groupe « longitudinal » et 4 du sous groupe « ponctuel ») et 4 ont été étudiés *ex vivo* (Figure V.2-1).

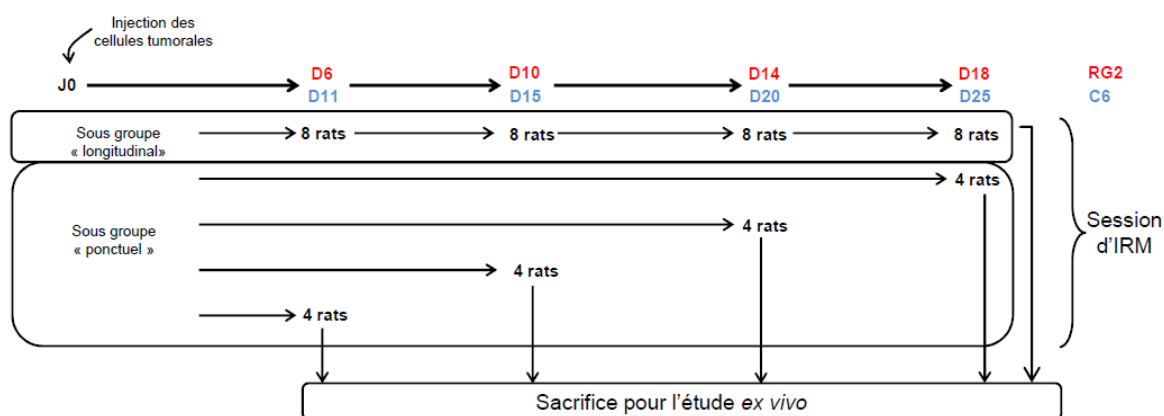


Figure V.2-1 Protocole expérimental du suivi longitudinal de deux modèles de gliome C6 et RG2, *in vivo* (IRM) et *ex vivo* (histologie et études protéiques)

V.2.1.1 Expérience IRM *in vivo*

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées sur une IRM 2,35T. Tous les rats

ont été imagés à l'aide d'une imagerie anatomique pondérée T₂ et des cartes d'ADC, BVf et VSI ont été réalisées. Pour plus de détails concernant la préparation des animaux, l'acquisition des séquences ou encore le traitement de données post-IRM veuillez vous référer au chapitre III : méthodologie à la page 51. Le temps d'acquisition par animal était de 1h et 20 minutes.

Avant et après chaque session d'IRM, 200 µl de plasma sont prélevés ; les échantillons ont été appelés « avant injection » et « après injection », respectivement.

V.2.1.2 Détermination de la concentration de fer dans le plasma

La méthode de calcul quantitative des paramètres BVf et VSI implique de connaître précisément la différence de susceptibilité magnétique entre le compartiment intra- et extra-vasculaire après injection de l'USPIO. Nous avons donc quantifié la quantité de fer dans le sang après l'injection de l'USPIO. Les échantillons de plasma « avant injection » et « après injection » ont été dilués 20 et 8 fois respectivement. Des mesures de T₂ ont été réalisées sur ces tubes et sur des tubes contenant des concentrations connues de Sinerem[®]. Pour cela, une fonction monoexponentielle a été ajustée aux données acquises à l'aide d'une séquence CPMG (400 échos ; TE=900 µs pour les plasmas « avant injection » et TE=8000 µs pour les plasmas « après injection ») (Meiboom et al. 1958). À partir des T₂ mesurés sur les échantillons contenant des concentrations connues de Sinerem[®], une courbe de calibration a été obtenue selon l'Équation 9.

$$[Fe] = 0,01056 \times \frac{1}{T_2} - 0,00024$$

Équation 9 : équation permettant de calculer la concentration en fer dans le plasma à partir des mesures de T₂. Elle a été obtenue à l'aide des mesures de T₂ sur la gamme étalon

V.2.1.3 Expériences *ex vivo*

Sur tous les animaux sacrifiés, le cerveau, la rate et le foie ont été prélevés puis congelés à -80°C. Les cerveaux, rates et foies ont été coupés au cryostat. Des échantillons protéiques ont été préparés seulement sur les cerveaux (pour plus de détails sur les techniques employées, veuillez vous reporter au chapitre III.2.1 page 67).

V.2.1.3.1 Histologie et immunohistologie

Sur les coupes de cerveaux, les structures vasculaires ont été mises en évidence par immunomarquage de la lame basale des vaisseaux à l'aide d'un anticorps anti-collagène IV

(détail de la technique au chapitre III.2.1.3.1 page 69). Après avoir pris 3 photos par régions d'intérêts (striatum et cortex controlatéraux, périphérie tumorale et centre de la tumeur) une analyse quantitative des vaisseaux a été réalisée en utilisant le protocole détaillé au chapitre III.2.1.3.2 page 70.

Les dépôts de fer ont été détectés à l'aide de la coloration de Perls sur des coupes de cerveau adjacentes au marquage vasculaire, ainsi que sur des coupes de foie et de rate (protocole détaillé au chapitre III.2.1.1 page 68).

V.2.1.3.2 Etudes protéiques

Les échantillons de tissus de l'hémisphère controlatéral et ipsilatéral à la tumeur ont été lysés et dosés (protocole détaillé au chapitre III.2.2 page 72). Des immunoblots pour les protéines VEGF et Ang-2 ainsi qu'un zymogramme des métalloprotéinases ont été effectués sur tous les échantillons (controlatéral et ipsilatéral à tous les temps et pour les 2 modèles). Tous les détails des techniques d'immunoblot et zymogramme utilisées sont présentés au §III.2.2.1 et III.2.2.2 pages 73 et 74, respectivement).

Les gels ont ensuite été numérisés et une analyse densitométrique de l'expression des facteurs angiogéniques a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ. Pour les immunoblots, l'expression des protéines a été normalisée à celle de la protéine β -actine et à l'expression de chaque protéine d'intérêt détectée dans la région controlatérale au premier jour d'étude (J11 pour C6 et J6 pour RG2).

V.2.2 Etude de l'extravasation du Sinerem®

La méthode de calcul quantitative des paramètres BVf et VSI utilisée au cours de cette étude, impose que l'USPIO reste dans le compartiment intra-vasculaire. Nous avons donc évalué, au cours d'une expérience séparée, sur 3 autres animaux porteurs de gliome C6 et 2 porteurs de gliome RG2, la quantité d'agent de contraste qui s'extravase lors de l'acquisition des données d'IRM.

Pour estimer la quantité d'agent de contraste qui s'extravase dans la tumeur pendant les mesures de BVf et de VSI, des acquisitions dynamiques de rehaussement de contraste (DCE) ont été effectuées sur la 2^{ème} série d'animaux, 14 et 18 jours après l'implantation de cellules RG2 et C6, respectivement. Une carte T_1 a été acquise grâce à une imagerie spirale d'inversion-récupération (TR/TE = 4400/1,6 ms, cinq entrelacements, et 11 inversions, taille

des voxels à l'acquisition = 468x468x2000 mm³). Ensuite une imagerie spirale pondérée T₁ a été répétée pendant 20 min (TR / TE = 600/1,6 ms, 16 entrelacements, taille des voxels à l'acquisition 234x234x2000 mm³, 20 sec par image). Après l'acquisition de cinq images de référence (correspondant à 1 min 40 sec après le début de l'imagerie), on a administré Sinerem[®] comme dans le chapitre III.1.3.3.3 page 62.

Une carte T₁₀ a été calculée à partir des données obtenues – avant injection d'agent de contraste – avec la séquence d'inversion récupération (après interpolation de Fourier pour compenser la différence de résolution spatiale). Puis, l'intensité du signal S, a été convertie voxel par voxel en valeur T₁ selon l'équation suivante:

$$T_1 = -\frac{TR}{\ln\left(1 - \frac{S}{S_0}\right)}$$

Équation 10 Equation permettant de convertir voxel par voxel le signal RMN en valeur de T₁.

où S₀ est le signal de l'aimantation complètement relaxée, obtenu à partir du signal moyen de la ligne de base (les cinq premières images acquises) et de la valeur T₁₀ (extraite de la carte T₁). Du fait du TE employé (1,6 ms), les variations de T₂* liées à la présence d'un agent de contraste ont été négligées. En faisant l'hypothèse que la réduction du T₁ du voxel est essentiellement due à l'extravasation de fer et que la contribution du signal intravasculaire est négligeable, la concentration en fer dans chaque voxel a été estimée en utilisant l'équation suivante:

$$[Fe] = \frac{1}{r_1} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_{10}} \right)$$

Équation 11 équation permettant de calculer la concentration en Fe à partir des données RMN.

Où r₁ représente la relaxivité du Sinerem[®]
r₁=8 mM⁻¹.s⁻¹ à 37°C et à 2,35 T

V.3 Résultats

V.3.1 Validation des mesures de BVf et VSI

La méthode de mesure quantitative des paramètres BVf et VSI utilisée au cours de cette étude, nécessite que l'agent de contraste injecté en i.v. (ici l'USPIO) reste intra-vasculaire. Les mesures de suivi de l'extravasation de l'USPIO (DCE) indiquent que la concentration en fer a légèrement augmenté avec le temps dans le tissu tumoral, alors que dans le tissu controlatéral, elle est restée inférieure au seuil de sensibilité de notre technique de mesure par DCE (< 1 μM). Seize minutes après l'injection de Sinerem[®], la concentration maximale en fer

extravasculaire estimé dans la tumeur est de 4 μM et 70 μM pour les modèles C6 et RG2, respectivement, soit au plus, 2% de la concentration plasmatique de fer ($3420 \pm 970 \mu\text{M}$, valeur moyenne, après injection, de tous les animaux et de tous les temps). Cette étude a porté sur les 16 premières minutes après l'injection du Sinerem[®], ce qui correspond à la fin de l'acquisition nécessaire aux calculs du BVf et du VSI (3 minutes d'attente après l'injection du Sinerem[®] plus les 13 min 40 sec de la séquence MGESE). Cette concentration plasmatique en fer correspond à une augmentation moyenne de la susceptibilité magnétique ($\Delta\chi$) du plasma de $5,6 \times 10^{-7}$ cgs.

V.3.2 Faisabilité d'un suivi longitudinal par IRM

Dans une étude longitudinale, les anesthésies et les injections répétées de produit de contraste effectuées sur le même animal peuvent affecter son état physiologique, la croissance tumorale ou encore la précision des mesures par IRM. Dans cette étude, aucune différence significative du poids des rats et de la croissance tumorale n'a été observée entre le groupe « longitudinal » et « ponctuel » que ce soit pour le modèle C6 ou RG2 (Figure V.3-1).

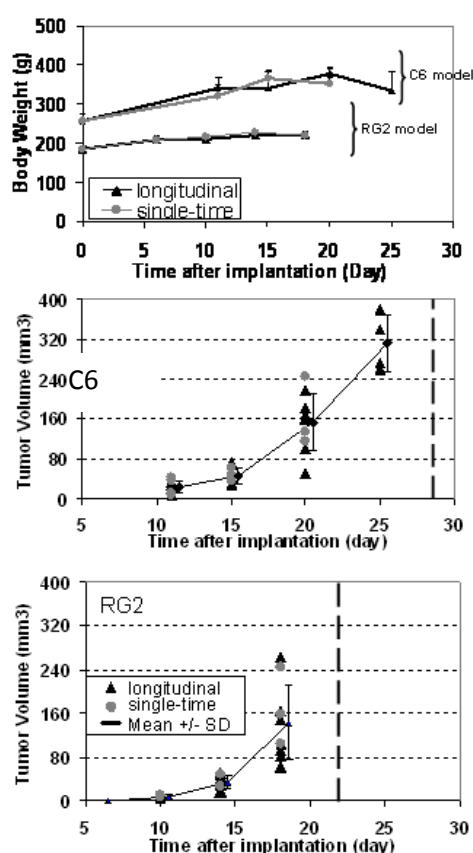


Figure V.3-1 La répétition des anesthésies et des injections d'agent de contraste n'affecte pas la prise de poids et la croissance tumorale. Les données des groupes «longitudinal» et « ponctuel » sont présentées séparément.

(A) Poids de l'animal mesuré à l'implantation tumorale (Day 0) et avant chaque session IRM; moyenne $\pm$ écart-type.

(B, C) Volume tumoral pour les modèles C6 et RG2. Chaque point représente un animal et les lignes représentent les valeurs moyennes $\pm$ écart-type. Pour chaque modèle, la médiane de survie est indiquée sous forme d'un trait pointillé vertical (données du laboratoire non publiées).

Dans le groupe « longitudinal » des deux modèles, la concentration de fer dans le plasma, des échantillons avant injection de Sinerem[®], a montré une légère augmentation

(+ 4,5±0,3 μM) entre la première et la deuxième session d'IRM (Figure V.3-2A). La concentration plasmatique en fer est restée stable au cours des séances suivantes (Figure V.3-2A). Dans le cerveau sain, les mesures de T_2^* avant injection Sinerem[®] sont restées stables entre les sessions d'IRM pour chaque ROI et chaque modèle (Figure V.3-2B). En ce qui concerne l'histologie, les colorations de Perls ne présentaient aucun dépôt de fer dans les deux hémisphères (sain ou tumoral), pour tous les temps et pour les deux modèles (Figure V.3-2Ca-c). En revanche, les coupes de rates ont montré d'importants dépôts de fer (Figure V.3-2Ce-f) par rapport aux rats témoins, qui n'ont pas été injectés avec du Sinerem[®] (Figure V.3-2C-D).

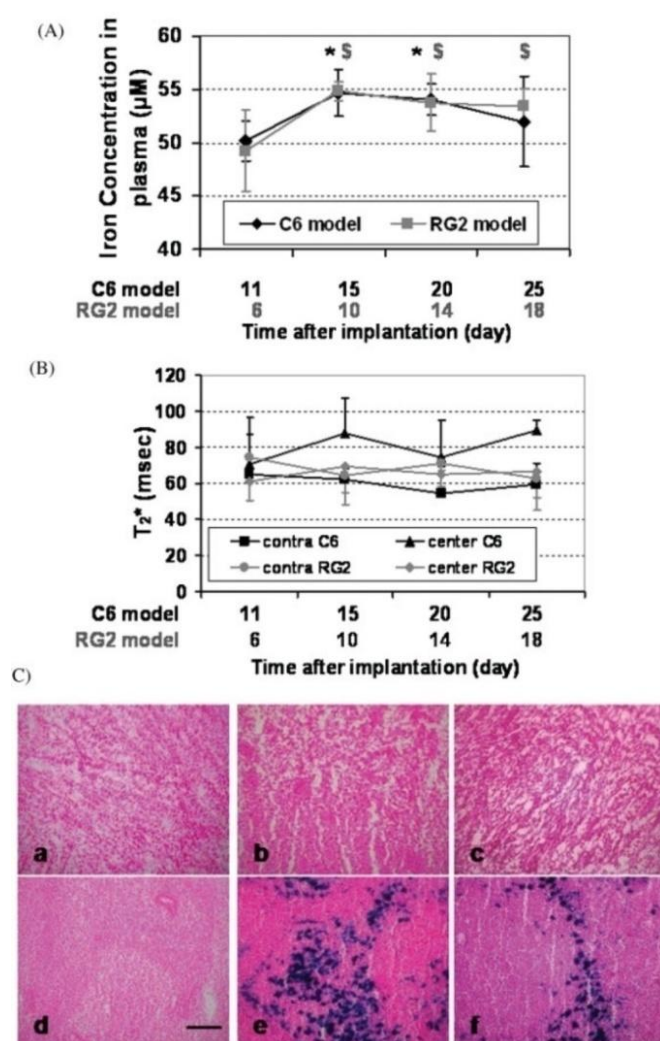


Figure V.3-2 Le Sinerem[®] ne s'accumule ni dans le plasma, ni dans le tissu cérébral sain, ni dans la tumeur.

(A) Concentration en Fe déterminée à chaque temps sur les échantillons de plasma prélevés avant injection de Sinerem[®]. *, \$ $p < 0.05$ par rapport au premier temps d'analyse pour le modèle C6 (*) et le modèle RG2 (\$) (moyenne $\pm$ écart-type).

(B) T_2^* mesuré dans le striatum controlatéral et dans le centre de la tumeur avant injection de Sinerem[®] (moyenne $\pm$ écart-type).

(C) Coloration de Perls pour détecter la présence de Fe dans le tissu tumoral (C6 : a, b; RG2 : c) et dans la rate (d-f). Rat Wistar porteur d'un gliome C6 mais n'ayant pas reçu d'injection de Sinerem[®] (a et d). Rat Wistar porteur d'un gliome C6 (b et e) et rat Fischer porteur d'un gliome RG2 (c et f) après la quatrième session d'IRM (groupe «longitudinal»). Les coupes ont été contre-colorées avec de l'érythrosine. Barre d'échelle = 100 μm .

V.3.3 Résultats du suivi IRM

Pour les deux modèles, les valeurs d'ADC, BVf, et VSI ne sont pas significativement différentes entre les groupes «longitudinal» et «ponctuel» quelque soit le jour d'observation.

Par conséquent, les valeurs des 2 groupes «longitudinal» et «ponctuel » sont rassemblées pour chacun des modèles à chaque temps.

V.3.3.1 Données controlatérales

Pour les deux modèles, aucune variation significative d'ADC, de BVf et de VSI n'est détectée dans le côté controlatéral (Figure V.3-3B, E et Figure V.3-4B, C, E, F). Les valeurs, moyennées à travers les différents temps, pour le cortex et le striatum controlatéraux sont résumées dans le Tableau V.3-1. Aucune différence n'est observée entre les valeurs d'ADC, de BVf et de VSI des deux souches de rats, quelque soit la ROI. Le BVf est plus élevé dans le cortex que dans le striatum pour les rats Wistar (Tableau V.3-1). Le VSI est significativement plus élevé dans le striatum que dans le cortex pour les deux souches de rats (Tableau V.3-1).

La variabilité globale (variabilités individuelle, temporelle et méthodologique cumulées) est d'environ 6% pour l'ADC, de 23% pour le BVf et de 20% pour le VSI.

	Modèle C6 (rats Wistar)		Modèle RG2 (rats Fischer)	
	<i>Cortex</i>	<i>Striatum</i>	<i>Cortex</i>	<i>Striatum</i>
ADC ($\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$)	724±56	742±69*	686±27	688±33
BVf (%)	3,1±0,7	2,8±0,7*	2,5±0,6	2,5±0,6
VSI (μm)	4,7±1,2	5,7±1,6*	3,7±0,7	4,4±0,9*

Tableau V.3-1 Valeurs d'ADC, de BVf et de VSI dans le cortex et dans le striatum des rats Wistar et Fischer. Moyenne ± écart-type sur les valeurs moyennées à travers les différents temps d'IRM pour les deux groupes (« longitudinal » et « ponctuel ». *p<0,05 entre le striatum et le cortex, test de Student apparié.

V.3.3.2 Données tumorales.

Sur les images pondérées T_2 et sur les cartes d'ADC correspondantes (Figure V.3-3A, D), on peut observer que les deux modèles de tumeur évoluent différemment. La tumeur C6 apparaît en hypersignal sur les images pondérées T_2 et sur les cartes d'ADC. Une augmentation significative des valeurs d'ADC est observée au centre de la tumeur dès D11 (C6, striatum controlatéral : $720 \pm 50 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, centre : $974 \pm 102 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$; Figure V.3-3B). Ensuite, l'ADC du centre tumoral est resté élevé jusqu'à la fin de l'expérience. Les valeurs d'ADC dans la périphérie de la tumeur C6 ne diffèrent pas des données controlatérales quelque soit le jour d'observation. À la différence du modèle C6, les valeurs d'ADC au centre du modèle RG2 sont restées stables dans le temps et ne sont pas différentes de leurs homologues controlatéraux (Figure V.3-3E). Dans la périphérie, le signal pondéré T_2 et les

valeurs d'ADC ont tous deux augmenté avec le temps (Figure V.3-3D, E).

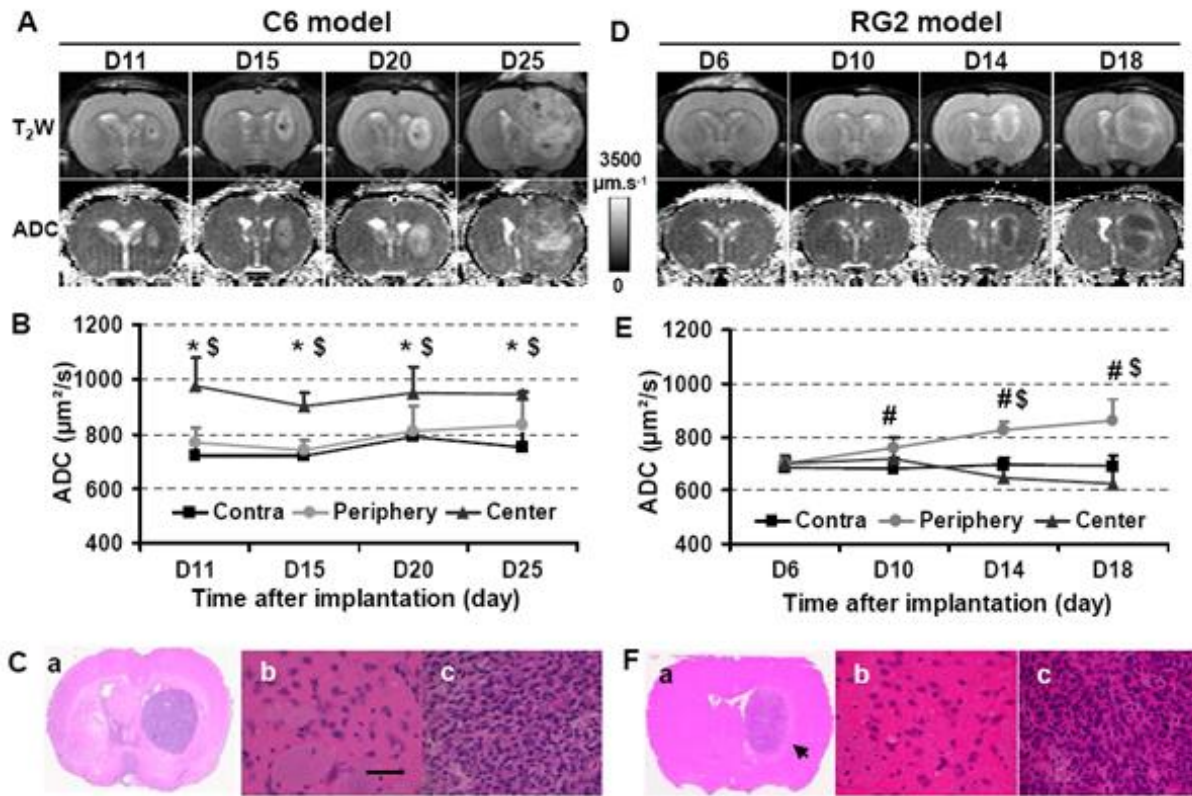


Figure V.3-3 Évolution de la morphologie des tumeurs et de l'ADC en fonction du temps pour les deux modèles.

(A, D) Images pondérées T₂ et cartes d'ADC correspondantes (échelle: 0 à 3500 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) provenant d'un animal représentatif du modèle C6 (A) et du modèle RG2 (D).

(B, E) Évolution des valeurs d'ADC en fonction du temps dans le striatum controlatéral (contra), la périphérie tumorale (« periphery ») et le centre tumoral (« center »). Moyenne $\pm$ écart-type. $p < 0,05$ * centre tumoral *versus* striatum controlatéral, # périphérie tumorale *versus* striatum controlatéral, \$ centre tumoral *versus* périphérie tumorale.

(C, F) Coloration H&E réalisées à J20 pour le modèle C6 (Ca) et à J14 pour le modèle RG2 (Fa). Zoom sur le striatum controlatéral (b) et sur le centre tumoral (c) du modèle C6 (C) et RG2 (F). Barre d'échelle = 100 μm .

Les BVf et VSI tumoraux des deux modèles évoluent différemment. Pour le modèle C6, les BVf du centre et de la périphérie tumorale restent semblables à celui du striatum controlatéral tout au long des mesures (Figure V.3-4A, B), sauf pour le dernier temps (D25) pour la ROI périphérie (C6, striatum controlatéral : $2,4 \pm 0,4\%$, périphérie : $4,0 \pm 1,4\%$). Pour le modèle RG2, une petite augmentation de BVf est observée dès D10 dans le centre et dans la périphérie de la tumeur (Figure V.3-4D, E). Dans la périphérie du RG2, le BVf continue d'augmenter à D14 jusqu'à atteindre des valeurs différentes des valeurs controlatérales (RG2, striatum controlatéral : $2,5 \pm 0,6\%$, périphérie : $3,4 \pm 0,6\%$) puis reste stable (Figure V.3-4E). Dans le centre de la tumeur, le BVf augmente continuellement au cours du temps (RG2, centre tumoral à D6 : $2,5 \pm 0,6\%$ et à D18 : $5,2 \pm 1,6\%$, Figure V.3-4D, E).

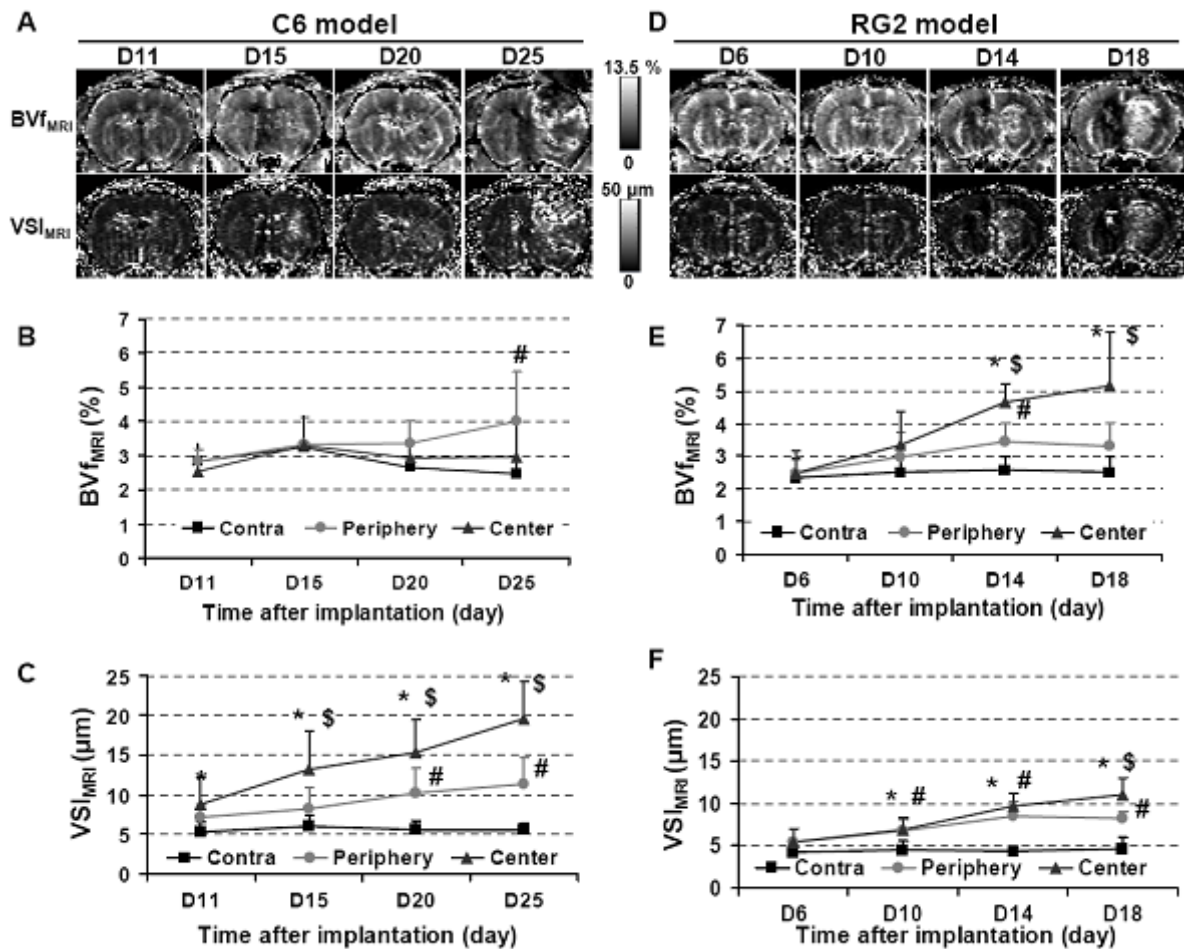


Figure V.3-4 Évolutions de BVf et de VSI estimés par IRM. (A, D) Cartes de BVf et de VSI provenant d'un animal représentatif de chaque modèle. (B, E) Évolution du BVf (C, F) Évolution du VSI_MRI dans le striatum controlatéral, la périphérie tumorale et le centre de la tumeur. Moyenne $\pm$ écart-type. $p < 0,05$: * Centre tumoral versus striatum controlatéral, # périphérie de la tumeur versus striatum controlatéral, \$ centre tumoral versus périphérie tumorale.

Dans le modèle C6, le VSI dans la tumeur est significativement différent de la valeur controlatérale dès J11 (C6, striatum controlatéral : $5,3 \pm 1,3 \mu\text{m}$, centre tumoral : $8,8 \pm 3,4 \mu\text{m}$) et continue d'augmenter jusqu'à D25 (C6, centre tumoral : $19,5 \pm 4,8 \mu\text{m}$, Figure V.3-4A, C). Dans la périphérie du C6, le VSI augmente de façon moins prononcée que dans le centre (C6, périphérie à D25 : $11,3 \pm 3,4 \mu\text{m}$; Figure V.3-4A, C). Dans le modèle RG2, le VSI dans le centre de la tumeur augmente plus doucement que dans le modèle C6 mais était significativement plus élevé que dans la région controlatérale (RG2, striatum controlatéral à D18 : $4,6 \pm 1,4 \mu\text{m}$; centre tumoral à D18 : $11,0 \pm 2,0 \mu\text{m}$). Dans la périphérie du RG2, le VSI augmente jusqu'à D14 et reste stable par la suite (Figure V.3-4D, F).

V.3.4 Résultats du suivi *ex vivo*

V.3.4.1 Histologie

Les coupes de cerveau colorées à l'H&E (Figure V.3-3C, E) montrent une augmentation de la densité cellulaire dans le centre des deux modèles de tumeurs par rapport à leurs homologues controlatéraux respectifs. (Figure V.3-3Cb-c et Figure V.3-3Fb-c, respectivement). Les modèles C6 et RG2 ne présentaient pas de régions de nécrose macroscopique, sauf pour le dernier temps du modèle C6 (données non illustrées). Le modèle RG2 est également caractérisé par une région de faible coloration en H&E (flèche sur Figure V.3-3Fa) qui correspondait à l'anneau d'hyperintensité observé sur les cartes d'ADC (Figure V.3-3D). Enfin, aucune hémorragie n'est détectée dans les tumeurs quels que soient le temps et le modèle.

V.3.4.2 Immunohistologie

Le modèle C6 est caractérisé par une faible densité de vaisseaux par rapport au tissu controlatéral (D11 : C6, centre tumoral : 99 ± 32 vaisseaux/mm² et C6, striatum controlatéral : 297 ± 38 vaisseaux/mm² ; à D25 : C6, centre tumoral : 70 ± 32 vaisseaux/mm² et C6, striatum controlatéral : 321 ± 15 vaisseaux/mm², Figure V.3-5B). Pour le modèle RG2, la réduction de densité des vaisseaux par rapport au striatum controlatéral est beaucoup moins prononcée que pour le modèle C6 (D6 : RG2, centre tumoral : 254 ± 38 vaisseaux/mm² et RG2, striatum controlatéral : 302 ± 15 vaisseaux/mm²; D18 : RG2, centre tumoral : 195 ± 6 vaisseaux/mm² et RG2, striatum controlatéral : 354 ± 40 vaisseaux/mm²; Figure V.3-5D).

Le $BV_{f_{histo}}$ dans le modèle C6 ne présente pas de différence significative entre le centre tumoral et le striatum controlatéral (Figure V.3-5B). Par contre, le modèle RG2 est caractérisé par une augmentation de $BV_{f_{histo}}$ avec le temps dans le centre de la tumeur (RG2, striatum controlatéral à D18 : $1,3 \pm 0,5$ % ; RG2, centre à D18 : $2,9 \pm 0,6$ %, Figure V.3-5D). Pour les deux modèles et pour les trois ROIs, $BV_{f_{histo}}$ et BV_f sont corrélés ($p < 0,005$; Figure V.3-6A).

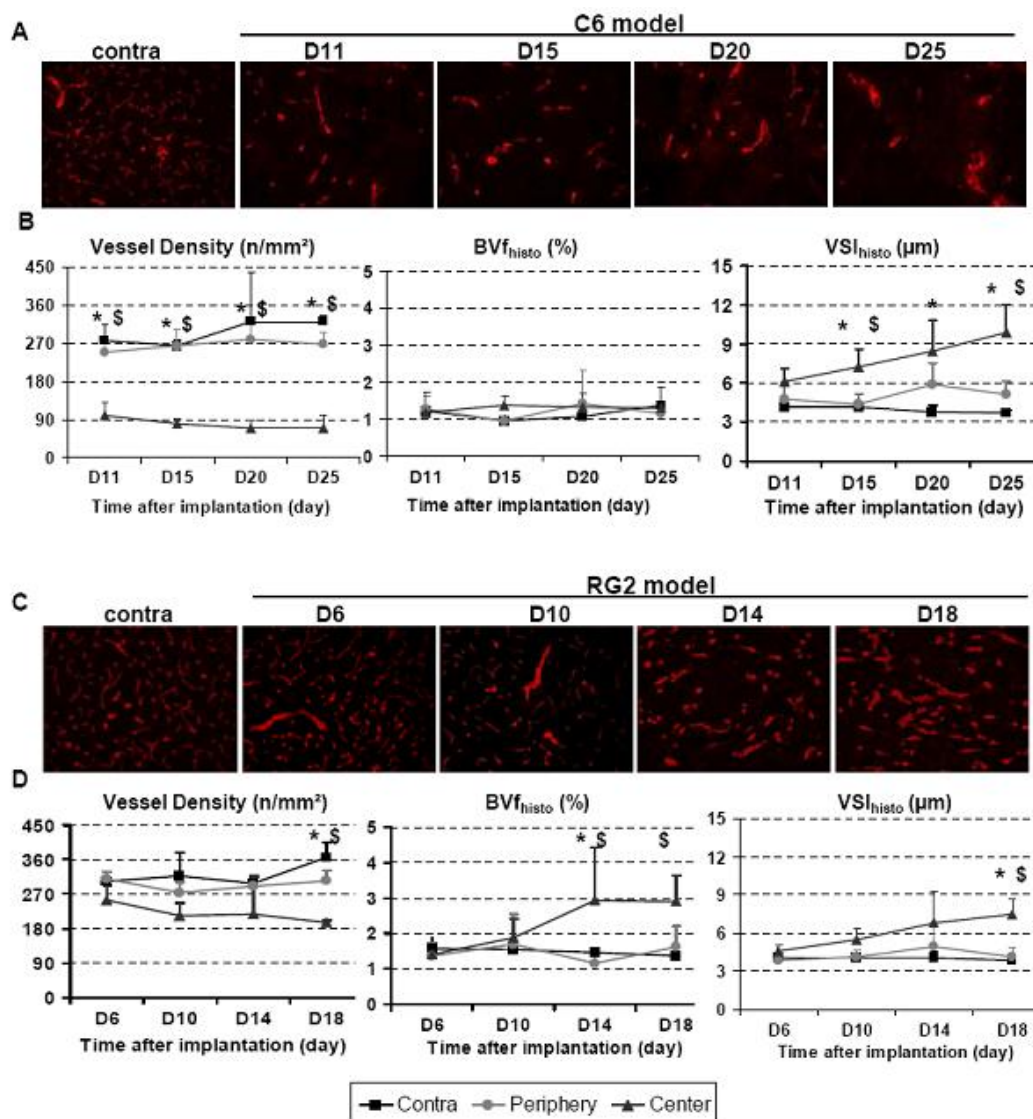


Figure V.3-5 Évolutions de la densité de vaisseaux, de BVf_{histo} et de VSI_{histo}.

(A, C) Marquage au Collagène IV pour les modèles C6 et RG2.

(B, D) Analyse quantitative de la densité de vaisseaux, de BVf_{histo} et de VSI_{histo} pour les modèles C6 et RG2 dans le striatum controlatéral, la périphérie tumorale et le centre de la tumeur.

Moyenne $\pm$ écart-type. $p < 0,05$: * Centre tumoral *versus* striatum controlatéral, # périphérie de la tumeur *versus* striatum controlatéral, \$ centre tumoral *versus* périphérie tumorale.

Dans le centre de la tumeur C6, le VSI_{histo} augmente continuellement avec le temps (C6, striatum controlatéral à D25 : $3,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$; centre : $9,9 \pm 2,1 \mu\text{m}$; Figure V.3-5B). Dans le modèle RG2, le VSI_{histo} dans le centre de la tumeur augmente de façon moins marquée que pour le modèle C6 (RG2, striatum controlatéral à D18 : $3,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$; centre : $7,4 \pm 1,3 \mu\text{m}$, Fig. 5.2.5D). Le VSI et le VSI_{histo} sont très bien corrélés (en groupant les deux modèles et les trois ROIs, on obtient $r^2 = 0,85$, Figure V.3-6B).

V.3.4.3 Expression des facteurs angiogéniques

Pour le modèle C6, le VEGF est exprimé dans l'hémisphère ipsilatéral (Figure V.3-7A) et cette expression est bien corrélée au volume tumoral (Figure V.3-7C, $r^2=0,84$). Pour le modèle RG2, l'expression du VEGF est détectable à D14 et D18 (Figure V.3-7D, F). Pour les deux modèles, une expression du VEGF dans l'hémisphère controlatéral ne devient significative qu'au dernier temps. On observe dès D11, une surexpression d'Ang-2 dans l'hémisphère ipsilatéral par rapport au controlatéral pour le modèle C6 (Figure V.3-7A, C) qui reste stable par la suite. Pour le modèle RG2, on observe à D18 une surexpression d'Ang-2 par rapport à son tissu controlatéral (Figure V.3-7D, F). Pour le modèle C6, l'activité de MMP-2 apparaît à D15 et reste stable par la suite (Figure V.3-7B) tandis que pour le modèle RG2, elle apparaît à D14 et augmente par la suite (Figure V.3-7E, F). Pour le modèle RG2, l'activité de MMP-2 est corrélée avec le volume tumoral ($r^2=0,84$). Enfin, l'activité de MMP-9 n'est pas détectable pour le modèle RG2 (Figure V.3-7F) quel que soit le volume tumoral tandis qu'elle est détectable après D20 pour le modèle C6 (Figure V.3-7B, C).

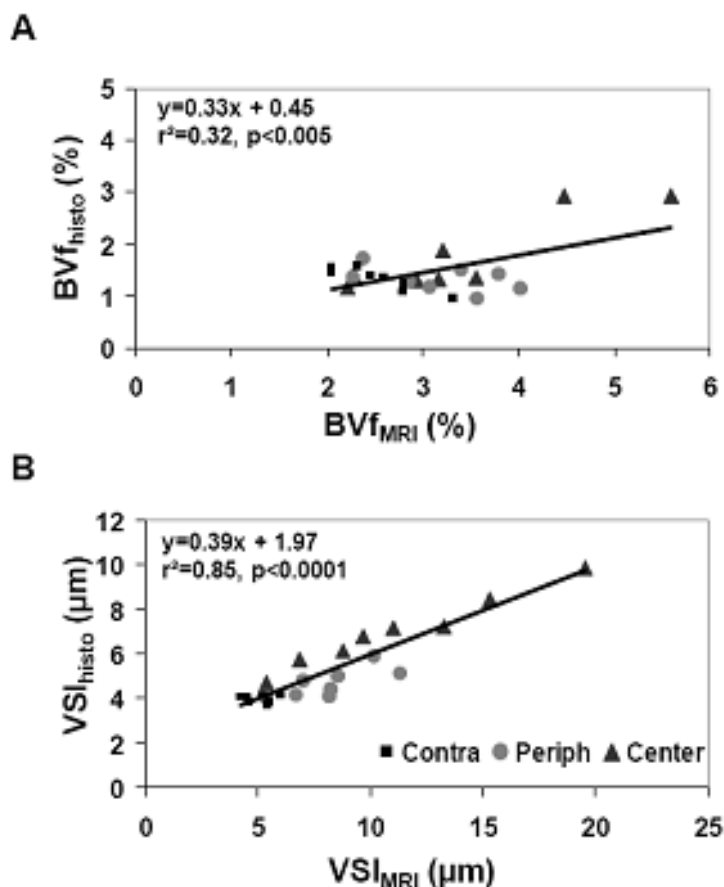


Figure V.3-6 Corrélations entre les données IRM et histologiques.

A) BVf_{histo} (histologie) en fonction de BVf (IRM) pour les différentes ROIs et pour les deux modèles.

(B) VSI (histologie) en fonction du VSI (IRM) pour les différentes ROIs et pour les deux modèles.

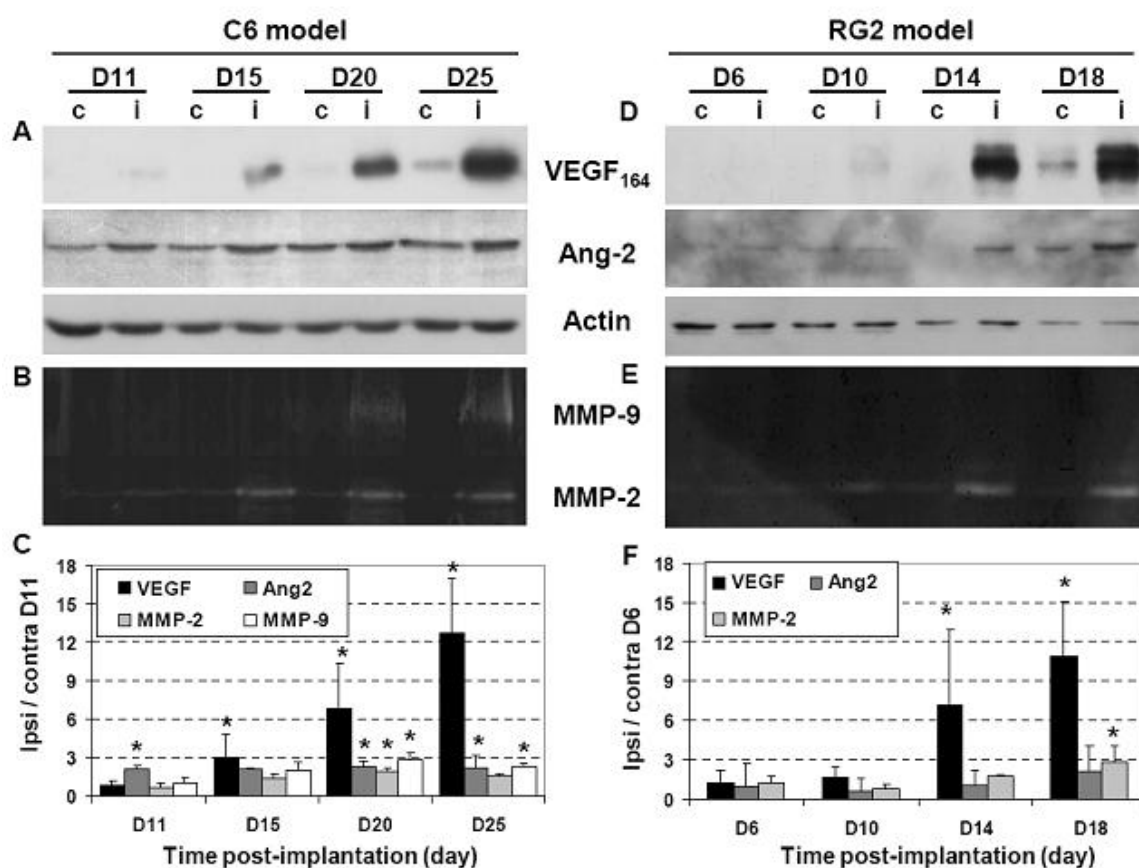


Figure V.3-7 Évolution de l'expression du VEGF₁₆₄ et d'Ang-2 et de l'activité des MMP-2 et MMP-9.

(A-D) Analyses par immunoblot de l'expression du VEGF₁₆₄ et d'Ang-2.

(B-E) Zymogrammes de l'activité de MMP-2 et MMP-9.

(C-F) Analyse densitométrique de l'expression/activité de VEGF₁₆₄, Ang-2, MMP-2 et MMP-9 de tous les rats à chaque temps. Les lettres c et i indiquent l'origine des échantillons : controlatérales et ipsilatérales, respectivement. Moyenne $\pm$ écart-type. * $p < 0,05$ versus valeurs controlatérales à D11 pour le modèle C6 et D6 pour le modèle RG2 respectivement.

V.4 Discussion

Dans cette étude, nous avons réalisé un suivi longitudinal de deux modèles de gliome. Des données, obtenues *in vivo* et *ex vivo*, indiquent que ces deux modèles, qui conduisent à une mort rapide de l'animal, présentent des évolutions microvasculaires différentes.

Le premier objectif de cette étude est de déterminer si les imageries du BVf et du VSI pouvaient être répétées lors d'un suivi longitudinal. En comparant les sous groupes «longitudinal» et «ponctuel», cette étude a démontré que les anesthésies et les injections de produit de contraste répétées n'altèrent ni le poids des animaux, ni le volume des tumeurs, ni

les paramètres IRM mesurés. D'un point de vue méthodologique, l'accumulation de fer soit dans le sang soit dans le tissu pourrait altérer les mesures RMN (réduction du T_1 ou du T_2 du voxel, perturbation de la différence de susceptibilité entre intra et extravasculaire). Notre étude complémentaire de quantification de l'extravasation du Sinerem[®] par DCE, réalisée sur les deux modèles, indique que la concentration en Sinerem[®] extravasée représente au maximum 2% de la concentration intra-vasculaire en Sinerem[®] après injection. Ceci confirme que le Sinerem[®] peut être considéré comme un agent de contraste intra-vasculaire pendant les 16 min après son injection, même pour les vaisseaux des tumeurs C6 et RG2. Ce résultat est en accord avec ceux précédemment publiés (Dennie et al. 1998) qui suggèrent que, même en présence d'une tumeur cérébrale, des particules de type Sinerem[®] restent intra-vasculaires pendant au moins 90 min. Dans le plasma, une faible augmentation de la concentration en fer (environ 4,5 μM) est observée entre les deux premières sessions d'IRM. Cette augmentation est négligeable devant la concentration plasmatique en fer post injection (environ 3420 μM). L'étude histologique nous montre une accumulation massive de fer dans le foie et la rate des animaux. Ceci est en accord avec les observations de prises de Sinerem[®] par les cellules de Kupffer (Dennie et al. 1998). Dans les limites de la sensibilité des mesures de T_2^* (20 % de variabilité dans nos conditions expérimentales) et de celles de la coloration de Perls, aucune accumulation de fer n'est observée dans le parenchyme cérébral ou dans les gliomes (Figure V.3-2B, C) 4 jours après injection de Sinerem[®]. Dans la littérature (Moore et al. 2000), une accumulation de fer a été observée 24 h après administration intraveineuse de particules semblables au Sinerem[®] dans des gliosarcomes 9L. Nos observations, réalisées de façon précoce (20 min) et tardive (4 jours) après injection de Sinerem[®], sont complémentaires à celles déjà publiées. Prises ensemble, ces observations suggèrent que les imageries du BVf et du VSI, répétées tous les 4 jours et pendant 14 jours, sont faisables sans conséquence physiologique pour l'animal, la croissance tumorale et sans effet sur la précision des mesures RMN.

Le 2^{ème} objectif de cette étude est de comparer les estimations de BVf et VSI obtenues par IRM aux données obtenues en immunohistologie quantitative. Si les corrélations entre les mesures IRM et histologiques de BVf ($p < 0,005$) et de VSI ($p < 0,0001$) sont tout à fait significatives, les valeurs absolues obtenues par les deux méthodes diffèrent. La mesure IRM du VSI conduit à des valeurs plus élevées que l'approche histologique, comme précédemment observé (Tropres et al. 2004). De même, le volume sanguin mesuré par IRM est plus grand

que celui obtenu histologiquement. De nombreux facteurs peuvent biaiser les mesures de chaque méthode :

- Les mesures histologiques sont réalisées à partir de tous les vaisseaux visibles tandis que la mesure IRM ne s'appuie que sur les vaisseaux fonctionnels, c'est-à-dire perfusés par l'agent de contraste.
- La cryocoupe peut induire une compression du tissu, ce qui conduirait à une sous-estimation de certains diamètres ou de certaines longueurs de vaisseaux.
- Le diamètre des vaisseaux obtenu par marquage au collagène IV, structure extérieure aux vaisseaux, pourrait conduire à une surestimation des diamètres de vaisseaux
- L'extrapolation stéréologique de paramètres en volume à partir d'estimations surfaciques ne serait pleinement valable que si les vaisseaux étaient des cylindres parfaits, ce n'est pas le cas dans les tumeurs.
- Une coupe de quelques μm d'épaisseur, observée au microscope, ne peut pas représenter de façon robuste une coupe IRM de 1 mm d'épaisseur surtout dans des tumeurs hétérogènes.
- La précision de l'estimation IRM est également biaisée par le fait que les vaisseaux ne soient pas de parfaits cylindres (Pathak et al. 2008) et par les effets des inhomogénéités macroscopiques de champ magnétique (shim) sur les mesures de $\Delta R2^*$.

Il est difficile de conclure à partir de nos résultats si les «vraies» valeurs des paramètres microvasculaires sont plus près de l'une ou de l'autre des approches expérimentales. L'excellente corrélation entre les paramètres déterminés par IRM et par histologie indique que ces paramètres reflètent des caractéristiques microvasculaires similaires. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux évaluer la justesse et la précision des mesures de BVf et de VSI.

Le 3^{ème} objectif est de caractériser l'évolution des paramètres cellulaire (ADC) et vasculaire (BVf et VSI) dans les deux modèles de gliome. Les valeurs d'ADC, de BVf et de VSI obtenues dans le striatum controlatéral ne varient pas avec le temps (Tableau V.3-1). Les valeurs controlatérales des deux souches de rats sont similaires. Les valeurs d'ADC sont en accord avec la littérature (Barbier et al. 2005, Hoehn-Berlage et al. 1995). Les valeurs controlatérales de BVf et de VSI concordent avec celles obtenues avec la même méthode chez

des rats sains (Broux et al. 2002, Tropres et al. 2004) ainsi que le cortex ou le striatum controlatéral de rats porteurs d'un gliome C6 (Julien et al. 2004, Tropres et al. 2004).

Les valeurs d'ADC et leurs évolutions sont très différentes entre les deux modèles de gliomes. Pour le modèle C6, l'ADC dans le centre de la tumeur est plus élevé que dans le striatum controlatéral quelque soit le jour d'observation, tandis que pour le modèle RG2, l'ADC intra-tumoral est comparable aux valeurs du tissu controlatéral. Plusieurs facteurs sont connus pour avoir un effet sur la valeur d'ADC, comme la densité cellulaire (ou cellularité) (Fan et al. 2005, Hayashida et al. 2006) ou l'œdème vasogénique (Kimura et al. 2005). Les colorations H&E montrent que la densité cellulaire est plus importante dans le centre de la tumeur des deux modèles que dans le tissu sain. Dans l'étude présentée, une différence de perméabilité de BHE (Uehara et al. 1997) et donc potentiellement une différence dans le développement d'un œdème vasogénique, pourrait aussi expliquer cette différence de valeurs d'ADC entre les deux modèles de gliomes.

Concernant la microvascularisation, les mesures de BVf par IRM et par histologie présentent des évolutions comparables. Le BVf augmente avec le temps dans le modèle RG2, comme cela a été précédemment observé en histologie (Inamura et al. 1994, Schlageter et al. 1999, Seitz et al. 1988), alors qu'il reste stable dans le modèle C6, comme précédemment observé par IRM (Julien et al. 2004, Tropres et al. 2004). Cette valeur moyenne de BVf ne doit pas masquer une distribution hétérogène de BVf dans la tumeur, notamment pour le modèle C6. Nous aborderons cette notion d'hétérogénéité au sein des ROI dans l'étude 4 (chapitre VII page 137). À D25, le BVf augmente dans la périphérie de la tumeur C6 alors qu'il reste stable au centre de la tumeur. Les évolutions de VSI mesurées par IRM et par histologie sont également comparables. Les deux modèles de gliomes sont caractérisés par une augmentation de VSI au centre de la tumeur, et, dans une moindre mesure, dans sa périphérie. Des études histologiques (Schlageter et al. 1999, Seitz et al. 1988) montrent une évolution similaire de diamètre moyen de vaisseaux pour le modèle RG2. Les valeurs de VSI terminales dans le centre du modèle C6 sont 1,5 à 2 fois plus grandes que celles du centre du modèle RG2. Les valeurs de VSI déterminées par IRM pour le modèle C6 à D25 sont en accord avec les valeurs de la littérature (Tropres et al. 2004). La différence de VSI_{histo} entre les tissus sains et tumoraux, du modèle C6 à D25 (respectivement, $3,7 \pm 0,3$ vs $9,9 \pm 2,1$ μm , respectivement) est en accord avec l'augmentation du diamètre des vaisseaux mesurée dans des sphéroïdes C6 montrée par Farrell et al. (respectivement, $3,84 \pm 0,14$ versus $7,79 \pm 0,51$ μm) (Farrell et al. 1991). Malgré la stabilité du BVf, l'augmentation du VSI observée sur le

modèle C6 pourrait être expliquée par la réduction de la densité de vaisseaux, visible en immunohistologie (Figure V.3-5A). Le modèle RG2, quand à lui, caractérisé par une augmentation du BVf, une augmentation plus faible que le VSI et une légère réduction de densité de vaisseaux (Figure V.3-5D).

La dernière question de cette étude est de déterminer s'il existe une relation entre les caractéristiques microvasculaires des deux modèles de gliomes et l'expression des principaux facteurs angiogéniques. Bien que l'expression du VEGF semble corrélée au volume tumoral, les principales différences entre les deux modèles concernent Ang-2 et MMP-9. Ang-2 est connue pour son effet déstabilisant sur la microvascularisation (Maisonpierre et al. 1997), l'expression différentielle de cette protéine pourrait donc être à l'origine des différences de VSI observées entre les deux modèles. Pour le modèle C6, Ang-2 et MMP-2 sont surexprimées dès D11, ce qui pourrait être à l'origine de l'augmentation importante du VSI observée entre D11 et D15 (Hu et al. 2003). De plus, la MMP-9 est détectée dans l'hémisphère ipsilatéral seulement dans le modèle C6. Les expressions précoces et concomitantes d'Ang-2 et des MMP-2 et -9 pourraient déstabiliser les parois des vaisseaux (Galis et al. 2002) et expliquer ainsi la réduction massive de densité de vaisseaux observée pour ce modèle.

V.5 Conclusion

En conclusion, les imageries du BVf et du VSI peuvent être répétées dans le cadre d'un suivi longitudinal de croissance tumorale. Les données IRM et histologiques sont très bien corrélées pour les deux modèles et quel que soit leur stade de développement. Les évolutions de BVf et de VSI sont en accord avec l'évolution des différents facteurs angiogéniques caractérisés dans cette étude. Nos résultats soulignent l'importance d'étudier plusieurs paramètres caractéristiques de la microvascularisation par exemple le volume sanguin n'est pas un bon indicateur de la densité vasculaire car le BVf dépend à la fois de la densité des vaisseaux mais aussi de leurs diamètres. La mesure de l'index de taille des vaisseaux prend donc ici toute son importance. En effet bien que deux tissus peuvent avoir le même BVf ils peuvent avoir une densité de vaisseaux différente si leurs vaisseaux sont de taille différente. Les paramètres BVf et VSI apparaissent ici comme des indicateurs potentiels de réponse des gliomes à des traitements anti-vasculaires ou anti-angiogéniques, aux niveaux précliniques ou

cliniques. L'ajout de mesures de débit sanguin et de perméabilité de BHE (qualitative ou quantitative) ou d'oxygénation sanguine pourraient idéalement compléter cette approche. Les modèles de gliomes C6 et RG2 présentent des différences majeures en termes de caractéristiques microvasculaires. Ces deux modèles pourraient donc répondre de façon différente aux traitements anti-tumoraux, notamment à ceux dirigés contre la microvascularisation. Les conclusions de cette étude, quant à l'hétérogénéité des modèles entre eux, vont dans le même sens que celles de l'étude I réalisée sur 6 modèles de gliomes. L'ensemble de ces données souligne l'importance d'étudier plusieurs modèles tumoraux lors d'études thérapeutiques précliniques.

Etude III : Impact d'une
chimiothérapie et d'un anti-
angiogénique sur un gliome : U-87 MG

VI.1 Objectifs de l'étude III

Dans l'étude I, nous avons montré l'apport des paramètres ADC, BVf et VSI pour la caractérisation de différents modèles de gliomes au même stade de croissance tumorale. Ces paramètres sont très variables d'un gliome à l'autre et ils permettent de différencier les tissus tumoraux des tissus sains mais ne sont pas prédictifs de la réponse à un traitement au BCNU.

L'étude II a montré qu'il était techniquement possible de réaliser un suivi longitudinal de ces paramètres lors du développement de 2 glioblastomes. Au cours de ce suivi longitudinal, on a aussi pu observer que ces paramètres évoluent différemment au cours du développement de 2 modèles de tumeurs. Enfin, les études I & II ont permis de démontrer que les paramètres vasculaires estimés par IRM (BVf et VSI) étaient corrélés avec les mêmes paramètres estimés par une technique d'histologie quantitative du réseau vasculaire (BVf_{hiso} et VSI_{histo}).

Dans cette 3^{ème} étude, nous avons voulu évaluer si les paramètres estimés par IRM ((le volume tumoral, l'ADC, le BVf, le VSI, et l'intégrité de la paroi des vaisseaux (par une technique d'IRM de rehaussement de contraste ; CE)) peuvent être modifiés par des thérapies anti-tumorales. Le but étant de déterminer si un ou plusieurs de ces paramètres IRM sont sensibles à un traitement donné.

Pour répondre à cette problématique, nous avons mis en place un protocole combinant des mesures IRM et des analyses histologiques dans le but de suivre l'effet d'une thérapie cytotoxique (Carmustine/BCNU; agent alkylant de l'ADN) et d'une thérapie anti-angiogénique (Sorafenib; Nexavar[®], inhibiteur multikinase) sur un modèle de glioblastome humain (U-87 MG) implanté chez le rat « *nude* ». Le modèle U-87 MG a été choisi pour cette étude car les résultats de l'étude 1 ont montré qu'il n'était pas sensible au BCNU. Il était prévu initialement de compléter cette étude par une seconde, identique à celle là, en utilisant le modèle CGL9 qui est très chimiosensible au BCNU (résultat de l'étude 1). En effet, il nous paraissait intéressant de comparer deux modèles qui présentaient des sensibilités opposées à une même drogue. Pour des raisons techniques, notamment dues à des problèmes de reproductibilité du modèle CGL9, cette 2^{nde} étude n'a pas pu se réaliser.

Les animaux, traités ou non, ont été imagés 1 jour avant et 1, 4 et 14 jours après le début des traitements. Différents paramètres IRM ont été estimés: le volume des tumeurs, l'ADC, le BVf, le VSI et l'intégrité de la paroi des vaisseaux (par une technique d'IRM de prise de

contraste ; CE). L'effet des traitements sur chacun de ces paramètres IRM a été évalué et comparé aux caractéristiques cellulaires et vasculaires décrits par histochimie et immunohistologie.

Cette étude a été conçue et réalisée grâce à la collaboration entre Oncodesign et l'équipe 5 du GIN. L'implantation de tous les animaux a été réalisée à Oncodesign, avec la participation d'Olivier Duchamp, Xavier Tizon, Peggy Provent et des techniciens de l'entreprise. L'imagerie et l'étude immunohistologique ont été réalisées dans les locaux de l'équipe 5 du GIN avec la participation de Thomas Christen, Régine Farion, Nadège Fondraz et Emmanuel Barbier

Ces travaux ont donné lieu à la soumission d'un article présenté en annexe.

VI.2 Protocole expérimental

Des rats « *nude* » (RH-*rnu/rnu*; n = 60) ont reçu une injection de cellules de glioblastome humain U-87 MG. Les animaux ont été implantés à Oncodesign puis, 5 jours après implantation, les animaux ont été transférés à Grenoble. Onze jours après l'implantation tumorale (D11), des images anatomiques (pondérées T₂) ont été effectuées pour évaluer le volume de chaque tumeur. Les rats ont ensuite été randomisés et stratifiés en 3 groupes (n = 20 par groupe) avec un volume tumoral moyen homogène par groupe (volume tumoral moyen pour l'ensemble des rats à D11 : $3,8 \pm 2,2 \text{ mm}^3$). Les traitements ont commencé 14 jours après l'implantation des cellules tumorales (D14_(T0)).

- Les animaux du **groupe BCNU** ont reçu deux injections intraveineuses de BCNU le premier et le 13^{ème} jour après le début du traitement (D14_(T0) et D27_(T13)). Le BCNU a été injecté à 10 mg.kg^{-1} .
- Les animaux du **groupe SORA** ont reçu une administration orale quotidienne de Sorafenib entre le 1^{er} et le 14^{ème} après le début du traitement (D14_(T0) à D28_(T14)). Le Sorafenib a été administré à 100 mg.kg^{-1} .
- Les animaux du **groupe non traité** (untreated) n'ont reçu aucun traitement.

Pour plus d'informations sur la lignée tumorale utilisée (§III.1.1.1.2 page 54), l'implantation des animaux (§III.1.1.2 page 54), les médicaments utilisés ou encore le protocole de traitement (§III.1.2 page 56), veuillez vous référer au chapitre méthodologie correspondant.

Pour chaque groupe, 4 rats, appelés sous-groupe «*longitudinal*» ont été imagés à

chaque temps (D13_(T-1), D15_(T1), D18_(T4) et D28_(T14)). Après la dernière mesure IRM, les animaux ont été euthanasiés pour réaliser des expériences *ex vivo*. Pour chaque groupe, les seize rats restants ont été imagés une fois et euthanasiés à la fin de la séance d'imagerie pour permettre des études *ex-vivo* (4 animaux / temps). Ils forment le sous-groupe «*single-time*». Avec ce protocole, on obtient des données IRM de 8 animaux par temps et par groupe et des données histologiques pour seulement 4 de ces animaux par temps et par groupe. Un schéma représentatif du protocole expérimental est présenté à la Figure VI.2-1.

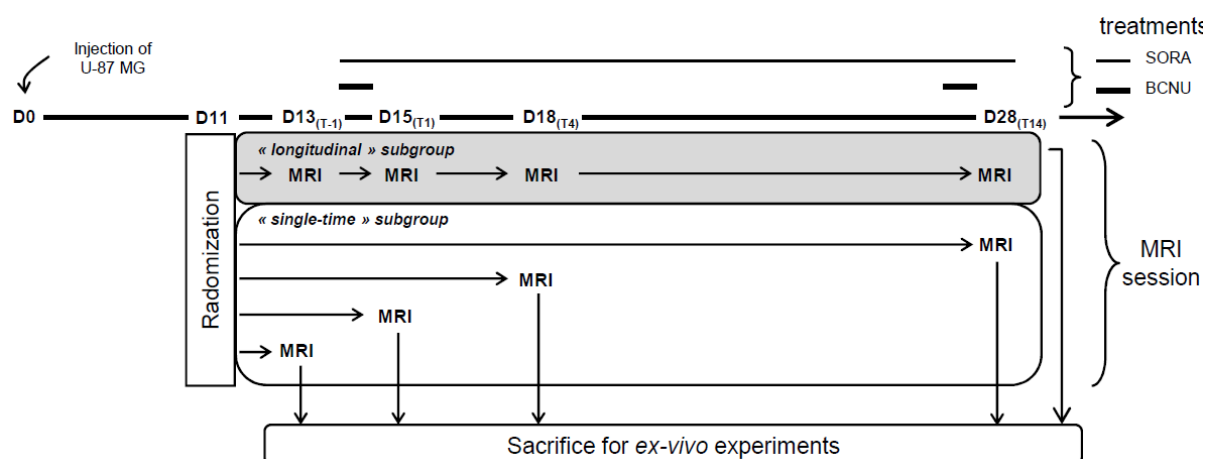


Figure VI.2-1 Protocole expérimental du suivi de l'efficacité de deux traitements (BCNU et Sorafenib) sur des tumeurs U-87 MG implantées en orthotopique dans le cerveau de rats « *nude* ».

VI.2.1 Expériences IRM *in vivo*

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées sur une IRM 2,35 T. Tous les animaux ont été imagés avec le protocole suivant :

- Imagerie anatomique T_{2w} (§III.1.3.3.1 page 61).
- Cartes d'ADC (§III.1.3.3.2 page 61).
- Carte de BVf / VSI (§III.1.3.3.3 page 62).
- Etude qualitative de la perméabilité des vaisseaux (par rehaussement de contraste ; CE). (§III.1.3.3.5 pages 62).

Le déroulement du protocole IRM est présenté à la Figure VI.2-2 . Pour plus de détails concernant la préparation des animaux, l'acquisition des séquences ou encore le traitement de données post-IRM, veuillez vous référer au chapitre III : méthodologie à la page 51.



Groupes	Sous-groupes	D13 _(T-1)	D15 _(T1)	D18 _(T4)	D28 _(T14)
non traité	‘Longitudinal’	4	4	4	3
	‘Single-time’	3	3	3	1
	Total	7	7	7	4
BCNU	‘Longitudinal’	4	4	3	2
	‘Single-time’	3	3	4	2
	Total	7	7	7	4
SORA	‘Longitudinal’	4	4	3	2
	‘Single-time’	3	3	4	2
	Total	7	7	7	4

Tableau VI.2-1 Données exploitables pour chacun des groupes (non traité, BCNU and SORA), chacun des sous-groupes (« longitudinal » and « single-time ») et pour tous les jours d'observations (D13_(T-1), D15_(T1), D18_(T4) and D28_(T14)).

Après avoir prélevé et congelé les cerveaux à -80°C, on a réalisé des coupes au cryostat. Pour chacun des rats, une 1^{ère} lame a été colorée en H&E et un immunomarquage du réseau vasculaire a été réalisé sur une 2^{ème} lame, adjacente à la 1^{ère}. Pour cela, un double marquage de la lame basale des vaisseaux et des cellules endothéliales a été réalisé. Pour plus de détails concernant les sacrifices des animaux, les prélèvements des cerveaux et la

réalisation des coupes au cryostat (§III.2.1 page 67) ou encore les colorations H&E (§III.2.1.2 page 69) et les immunomarquages du réseau vasculaire (§III.2.1.3.1 page 69), veuillez vous reporter au chapitre méthodologique correspondant.

VI.2.3 Extravasation du Sinerem®

La méthode IRM utilisée pour estimer le BVf et le VSI exige que l'agent de contraste utilisé (Sinerem®) reste intravasculaire durant le temps d'acquisition. Cette caractéristique a déjà été démontré dans le cadre du suivi longitudinal de modèles de gliome murin (C6 et RG2) de l'étude II présentée au §V page 99. Ce paramètre doit être à nouveau vérifié dans cette étude car d'une part le modèle utilisé n'est pas le même (U-87 MG), d'autre part certains animaux ont été traités avec des agents anti-tumoraux, ce qui peut affecter la perméabilité des vaisseaux au Sinerem®.

Pour estimer la quantité de Sinerem® qui s'extravase pendant les mesures de BVf et de VSI, de l'imagerie dynamique (DCE) a été réalisé sur des rats « *nude* » porteurs de tumeurs U-87 MG (n = 12, en plus des rats déjà mentionnés). À chaque jour d'observations (D13_(T-1), D15_(T1), D18_(T4) et D28_(T14)), 4 animaux par groupe (non traité, BCNU et SORA) ont été imagés à l'aide d'une séquence spin écho pondérée en T₁ (TR / TE = 600/17ms, la taille du voxel à l'acquisition = 234x234x1000 µm³, 1 min 17 secs / image, 17 répétitions). Après la 1^{ère} acquisition, le Sinerem® a été administré et les acquisitions poursuivies comme décrit dans le §III.1.3.2.1 page 59.

A partir de ces acquisitions, les concentrations plasmatiques et extravasculaires de Sinerem® ont été calculées comme décrit dans l'étude II présentée au §V.2.2 page 103.

VI.3 Résultats

VI.3.1 Validité des mesures de BVf et VSI

En utilisant notre modèle de calcul, la validité des mesures de BVf et de VSI nécessite que l'agent de contraste utilisé (Sinerem®) reste dans le compartiment intravasculaire. Nos résultats montrent que, quel que soit le jour d'observation, l'extravasation de l'agent de contraste n'est pas différente entre les 3 groupes (les données ont ainsi été moyennées). Dans le tissu controlatéral, la concentration en fer est restée inférieure à la sensibilité de détection

de notre technique de détection de DCE ($\leq 1 \mu\text{M}$). Dix-neuf minutes après l'injection du Sinerem[®] (correspondant au temps d'acquisition des données IRM permettant de mesurer le BVf et le VSI), la concentration de fer intra-tumorale est de $2,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (moyenne pour tous les temps et tous les groupes) soit 0,3% de la concentration plasmatique de fer après l'injection ($3420 \pm 970 \mu\text{M}$, valeur mesurée dans l'étude II présentée au §V.3.1 page 104 et dans l'article en annexe « Valable et al 2008 »).

VI.3.2 Faisabilité d'un suivi longitudinal par IRM

Dans une étude longitudinale, l'anesthésie et les injections répétées de produit de contraste peuvent affecter l'état physiologique de l'animal, le taux de croissance tumorale et la précision des mesures par IRM. Afin de vérifier cela nous avons comparé, à tous les temps et pour chacun des 3 groupes, les données des sous-groupes « *single-time* » et « *longitudinal* ». Nous n'avons observé aucune différence dans les mesures de poids, de taille de tumeur, d'ADC, BVf, VSI et CE entre les sous-groupes. Le protocole expérimental de suivi longitudinal réalisé au cours de cette étude (avec répétition du protocole IRM) n'a pas d'impact sur les paramètres estimés. Par conséquent, pour les 3 groupes et pour chaque temps, les valeurs des sous-groupes « *longitudinal observation* » et « *single-time observation* » ont été regroupées.

VI.3.3 Activité anti-tumorale *in vivo* des traitements

VI.3.3.1 Données IRM dans le striatum controlatéral

Aucune différence significative des mesures d'ADC, BVf et VSI n'est détectée dans le tissu controlatéral, quelque soit le jour d'observation ou le groupe (ADC : $720 \pm 85 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, BVf : $3,3 \pm 0,5 \%$ et VSI : $5,6 \pm 1,1 \mu\text{m}$; moyenne de tous les temps et de tous les groupes). Par conséquent, par souci de clarté, la valeur moyenne de l'ensemble des groupes du tissu controlatéral, est représentée en ligne pointillée sur tous les graphiques de cette étude (Figure VI.3-3). Toutefois, les comparaisons statistiques entre tumeurs et tissus controlatéraux sont effectuées en utilisant seulement les valeurs controlatérales appariées de chaque groupe à chaque temps.

VI.3.3.2 Evolution du gliome U-87 MG

La médiane de survie des rats « nude » porteurs d'un glioblastome U-87 MG non traité est de 31 jours (Figure VI.3-1). Le volume tumoral des animaux du groupe non traité augmente de façon exponentielle entre D13 et D28 ($4,5 \pm 1,4$ à $117,1 \pm 22,9$ mm³, respectivement; Figure VI.3-2). Dans les tumeurs U-87 MG, l'ADC, le BVf et le VSI sont significativement plus élevés que dans le striatum controlatéral et sont restés stables dans le temps (tumeur: 851 ± 43 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, $4,4 \pm 0,3$ % et $7,9 \pm 1,2$ μm ; striatum controlatéral: 720 ± 85 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, $3,3 \pm 0,5\%$ et $5,5 \pm 0,3$ μm , respectivement pour les valeurs moyennes de tous les temps pour l'ADC, le BVf et le VSI; $p < 0,001$; Figure VI.3-3A-C). Dans le groupe non traité, les vaisseaux tumoraux sont perméables au P846 tout au long du suivi (rehaussement du contraste (CE): 190 ± 47 %, correspondant à la moyenne des quatre temps; Figure VI.3-3D).

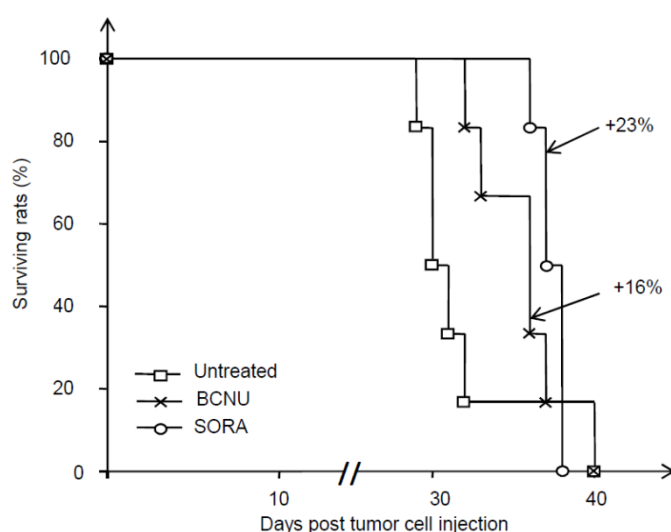


Figure VI.3-1 Survie des animaux en fonction du temps. Les flèches indiquent le pourcentage d'augmentation de la médiane de survie des animaux des groupes traités par rapport au groupe contrôle non traité (untreated).

VI.3.3.3 Effet du BCNU sur le gliome U-87 MG

Le traitement au BCNU induit une légère augmentation de la médiane de survie des rats porteurs de gliome U-87 MG (+16 %; Figure VI.3-1). Le BCNU inhibe fortement la croissance tumorale par rapport au groupe non traité ($5,7 \pm 4,9$ vs $117,1 \pm 22,9$ mm³; respectivement pour les groupes BCNU et non traité à D28_(T14), $p < 0,001$; Figure VI.3-2). Les ADC intra-tumoraux sont comparables entre les groupes BCNU et non traité à tous les temps sauf à D28_(T14) où l'ADC dans le groupe BCNU est devenu plus important que dans le groupe

non traité (respectivement, 1048 ± 10 vs $794 \pm 49 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, $p < 0,001$; Figure VI.3-3A). Les mesures de VSI, BVf et CE dans le groupe BCNU ne diffèrent pas de celles mesurées dans le groupe non traité (Figure VI.3-3B-D).

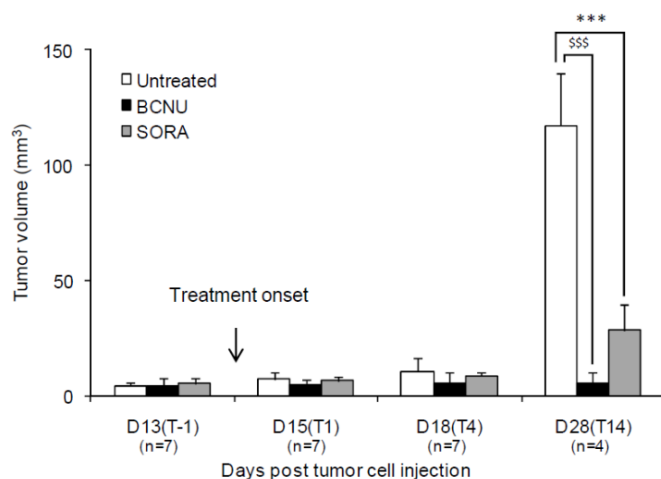


Figure VI.3-2 Evolution des volumes tumoraux pour les groupes SORA, BCNU et non traité (« untreated ») évalués par IRM. Moyenne $\pm$ écart-type.
P < 0,001: *, groupe non traité (« untreated ») versus SORA**
p < 0,001: \$\$\$, groupe non traité (« untreated ») versus BCNU

VI.3.3.4 Effet du Sorafenib sur le gliome U-87 MG

Le traitement au Sorafenib induit une augmentation de la médiane de survie des rats portant de gliomes U-87 MG, par rapport au groupe non traité (+23 %; Figure VI.3-1). Le Sorafenib inhibe aussi de façon significative la croissance tumorale ($28,7 \pm 11,1$ vs $117,1 \pm 22,9 \text{ mm}^3$ pour les groupes SORA et non traité, respectivement, à D28(T14), $p < 0,001$; Figure VI.3-2). À D28(T14), l'ADC intra-tumoral dans le groupe SORA est plus important que dans le groupe non traité (976 ± 37 et $794 \pm 49 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, respectivement, $p < 0,001$; Figure VI.3-3A).

Tous les paramètres vasculaires évalués dans cette étude (BVf, VSI et CE-IRM) sont modifiés par le traitement au Sorafenib. Alors que le VSI tumoral dans les groupes SORA et non traité sont similaires avant traitement (D13(T-1)), le VSI devient statistiquement plus grand dans le groupe SORA par rapport au groupe non traité dès D18(T4) et jusqu'à D28(T14) (D18(T4): $7,2 \pm 1,8$ vs $5,8 \pm 1,8 \mu\text{m}$, $p < 0,001$ et D28(T14): $12,4 \pm 1,7$ vs $8,7 \pm 1,7 \mu\text{m}$, $p < 0,01$, respectivement; Figure VI.3-3B). Dans le groupe SORA, le BVf tumoral diminue au cours du traitement (D15(T1): $5,0 \pm 0,8$ et D28(T14): $2,6 \pm 1\%$; Figure VI.3-3C), tandis qu'il reste stable dans le groupe non traité (D15(T1): $5,2 \pm 0,9$ et D28(T14): $5,5 \pm 0,8\%$; Figure VI.3-3C). Contrairement à ce qui s'est produit pour les groupes non traité et BCNU, dans le groupe SORA, l'extravasation du P846 est significativement réduite dès le 1^{er} jour de traitement au Sorafenib (CE: $116 \pm 65\%$ versus $184 \pm 42\%$ pour les groupes SORA et non traité,

respectivement, à D15(T1)) et n'est pas plus détectable à D28(T14) (Figure VI.3-3D).

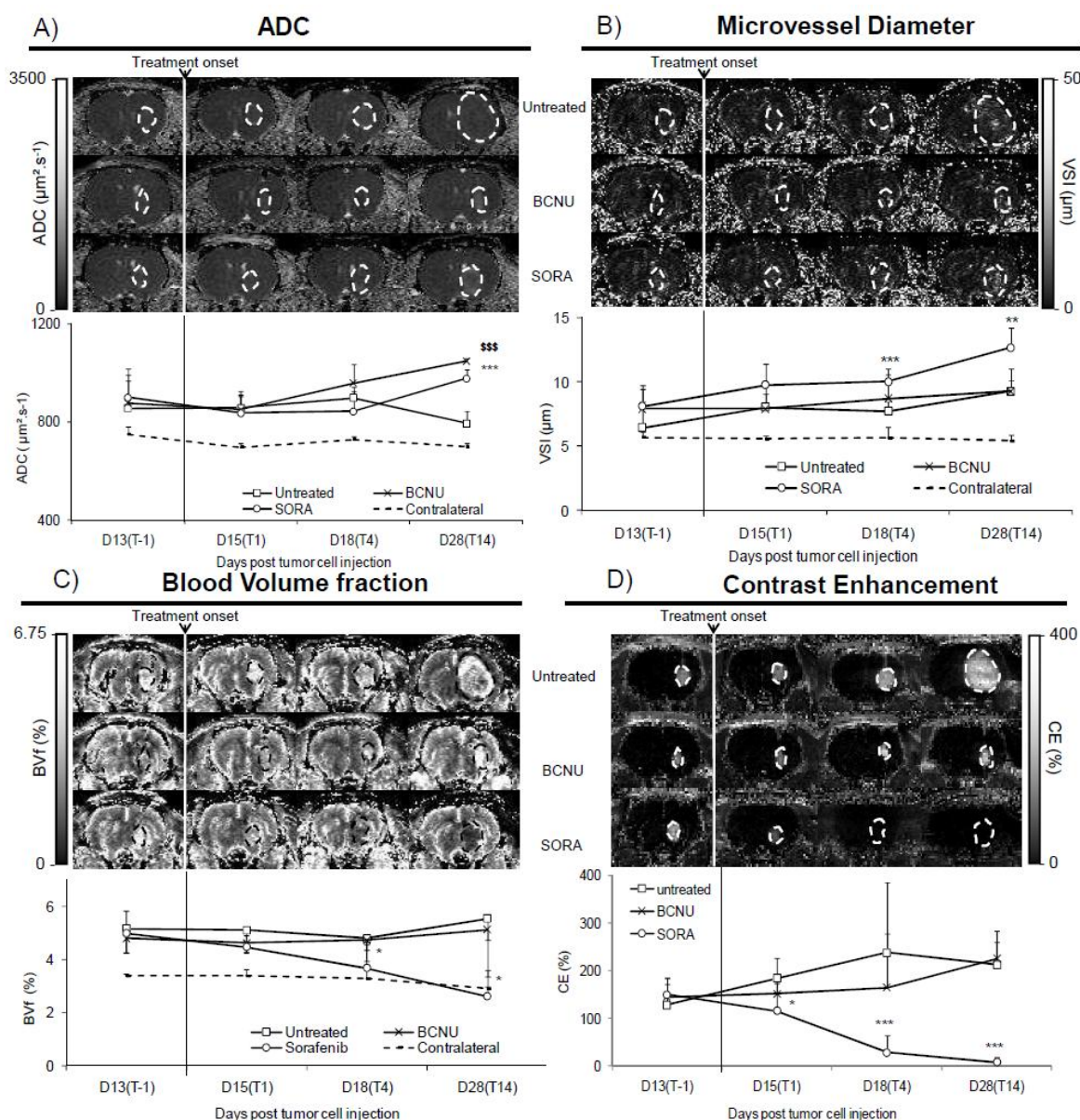


Figure VI.3-3 Paramètres IRM estimés *in vivo*. (A) Evolution de l'ADC, (B) du diamètre des vaisseaux (VSI), (C) du volume sanguin (BVf) et (D) la perméabilité des vaisseaux (CE) en fonction du temps pour chaque groupe. Une carte représentative ainsi que la valeur moyenne pour chaque paramètre étudié, pour chaque groupe et chaque temps sont représentées. Les lignes en pointillées sur les cartes IRM représentent la ROI tumeur déterminée sur les images anatomiques. Les lignes en pointillées sur les graphiques représentent la valeur de moyenne de la ROI contralatérale de tous les groupes.

Moyenne $\pm$ écart type de valeur.

P < 0,05: *, p < 0,01: ** p < 0,001: ***, groupe non traité (« *untreated* ») versus groupe SORA, p < 0,001: \$\$\$, groupe non traité (« *untreated* ») versus groupe BCNU.

La Figure VI.3-4 montre qu'il n'existe pas de corrélations entre les paramètres IRM estimés dans cette étude (volume tumoral, ADC, BVf, VSI et CE), ce qui suggère que ces paramètres peuvent être utilisés de manière indépendante pour caractériser l'évolution d'une tumeur.

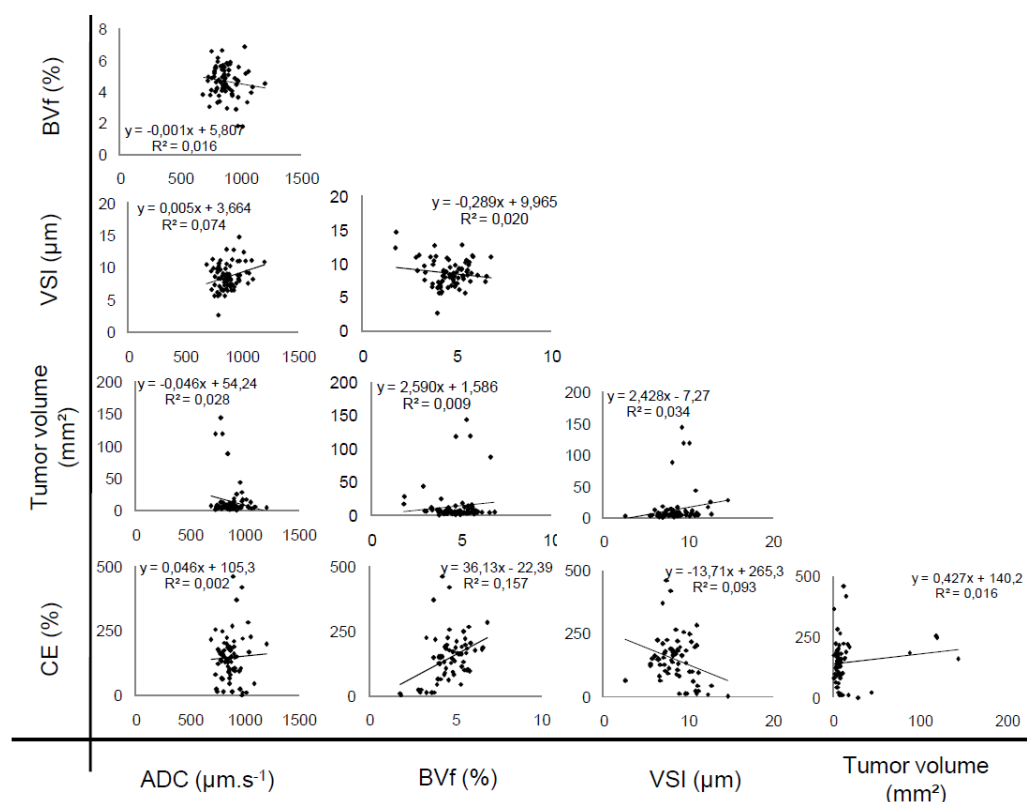


Figure VI.3-4 L'analyse de la corrélation entre chaque paramètre IRM estimé dans la ROI tumorale: ADC, BVf, VSI, le volume tumoral et le CE-IRM. Pour tous les graphiques, chaque point correspondant à aux données pour un rat. Les ROIs tumeurs pour tous les groupes et pour tous les jours d'observation sont regroupées. La valeur R^2 représente le coefficient de corrélation de Pearson.

VI.3.3.5 Coloration H&E

Entre D13_(T-1) à D18_(T4), les tumeurs U-87 MG traitées ou non présentent des structures anatomiques histologiques très similaires sur les colorations H&E. La densité cellulaire est plus élevée dans le centre de la tumeur avec certaines cellules tumorales alignées le long des vaisseaux, formant ainsi des faisceaux minces. Les tumeurs sont entourées par un anneau de tissu très œdémateux. Ni nécrose, ni pseudo-kyste ne sont observés (Figure VI.3-5). À D28_(T14), les densités cellulaires des tumeurs des groupes SORA et BCNU sont réduites par rapport aux temps précédents et on a également observé des zones œdémateuses au sein des tumeurs (Figure VI.3-5).

VI.3.3.6 Marquages vasculaires

Pour évaluer les modifications du système vasculaire des immunomarquages du collagène IV (lame basale) et du RecA-1 (cellules endothéliales) sont réalisés (Figure VI.3-5). Les vaisseaux localisés dans le striatum controlatéral de tous les groupes et de tous les jours

d'observations, possèdent des diamètres, une densité et une surface vasculaire similaires ($4,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$, 337 ± 37 vaisseaux par mm^2 et $3,76 \pm 0,34$ % de surface vasculaire; moyenne de tous les groupes et de tous les temps). Tous les vaisseaux sont également marqués par le collagène IV et RecA (Figure VI.3-5). Avant traitements, dans tous les groupes, le diamètre des vaisseaux tumoraux est plus élevé que dans le striatum controlatéral ($5,2 \pm 0,6$; $5,4 \pm 0,6$ et $6,0 \mu\text{m} \pm 0,3$ *versus* $4,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ respectivement pour les groupes non traité, BCNU et SORA *versus* la moyenne calculée dans le striatum controlatéral de l'ensemble des groupes, $p < 0,05$; Tableau VI.3-1) et la surface vasculaire est plus élevée que dans le striatum controlatéral ($9,1 \pm 1,4$; $6,2 \pm 1,3$ et $7,7 \pm 0,3$ % *versus* $3,7 \pm 0,5$ % respectivement pour les groupes non traité, BCNU et SORA *versus* la moyenne calculée dans le striatum controlatéral de l'ensemble des groupes, $p < 0,05$; Tableau VI.3-1).

Groupe	Paramètre vasculaire	D13 _(T-1)	D15 _(T1)	D18 _(T4)	D28 _(T14)
non traité	Nombre d'animaux	3	3	3	4
	Densité (vaisseaux par mm^2)	328 ± 31	281 ± 46	245 ± 19	303 ± 60
	Surface vasculaire (%)	9.1 ± 1.4	6.4 ± 0.8	6.4 ± 1.4	9.1 ± 2.4
	Diamètre moyen (μm)	5.2 ± 0.6	5.5 ± 0.4	5.4 ± 0.4	5.7 ± 0.9
BCNU	Nombre d'animaux	3	3	4	2
	Densité (vaisseaux par mm^2)	292 ± 17	242 ± 15	319 ± 21	281 ± 24
	Surface vasculaire (%)	6.2 ± 1.3	6.3 ± 1.6	6.3 ± 0.8	6.5 ± 0.3
	Diamètre moyen (μm)	5.4 ± 0.6	5.5 ± 0.5	5.2 ± 0.6	4.9 ± 0.3
SORA	Nombre d'animaux	3	3	4	2
	Densité (vaisseaux par mm^2)	238 ± 32	358 ± 35	214 ± 65	142 ± 21
	Surface vasculaire (%)	7.7 ± 0.3	7.2 ± 2.8	3.9 ± 0.6	3.7 ± 1.4
	Diamètre moyen (μm)	6.0 ± 0.3	4.8 ± 0.5	5.1 ± 1.0	5.8 ± 0.7
Striatum controlatéral	Nombre d'animaux	9	9	11	8
	Densité (vaisseaux par mm^2)	344 ± 38	322 ± 41	353 ± 18	329 ± 57
	Surface vasculaire (%)	3.7 ± 0.5	3.7 ± 0.3	4.0 ± 0.3	3.7 ± 0.3
	Diamètre moyen (μm)	4.2 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.1	4.3 ± 0.1

Tableau VI.3-1 Données de l'immunohistologie quantitative du marquage collagène IV pour chaque groupe (non traité, BCNU and SORA) et pour chaque jour d'observation (D13_(T-1), D15_(T1), D18_(T4) et D28_(T14)). Les données pour le striatum controlatéral proviennent de la moyenne de tous les groupes.

À D28_(T14), dans le groupe SORA, la densité des vaisseaux tumoraux diminue par rapport au groupe non traité (141 ± 21 *versus* 301 ± 60 vaisseaux par mm^2 , respectivement, $p < 0,01$; Tableau VI.3-1) et la surface vasculaire est similaire au striatum controlatéral ($3,7 \pm 1,4$ *versus* $3,7 \pm 0,3$ %, respectivement, $p = 0,45$; Tableau VI.3-1), en revanche le diamètre des vaisseaux est plus grand que dans le striatum controlatéral ($5,8 \pm 0,7$ *versus* $4,2 \pm 0,1$ vaisseaux par mm^2 , respectivement $p < 0,05$; Tableau VI.3-1). Pour finir on observe

que seulement une partie des vaisseaux tumoraux marqués par l'anticorps anti-collagène IV est également marquée par l'anticorps anti-RecA-1 (Figure VI.3-5).

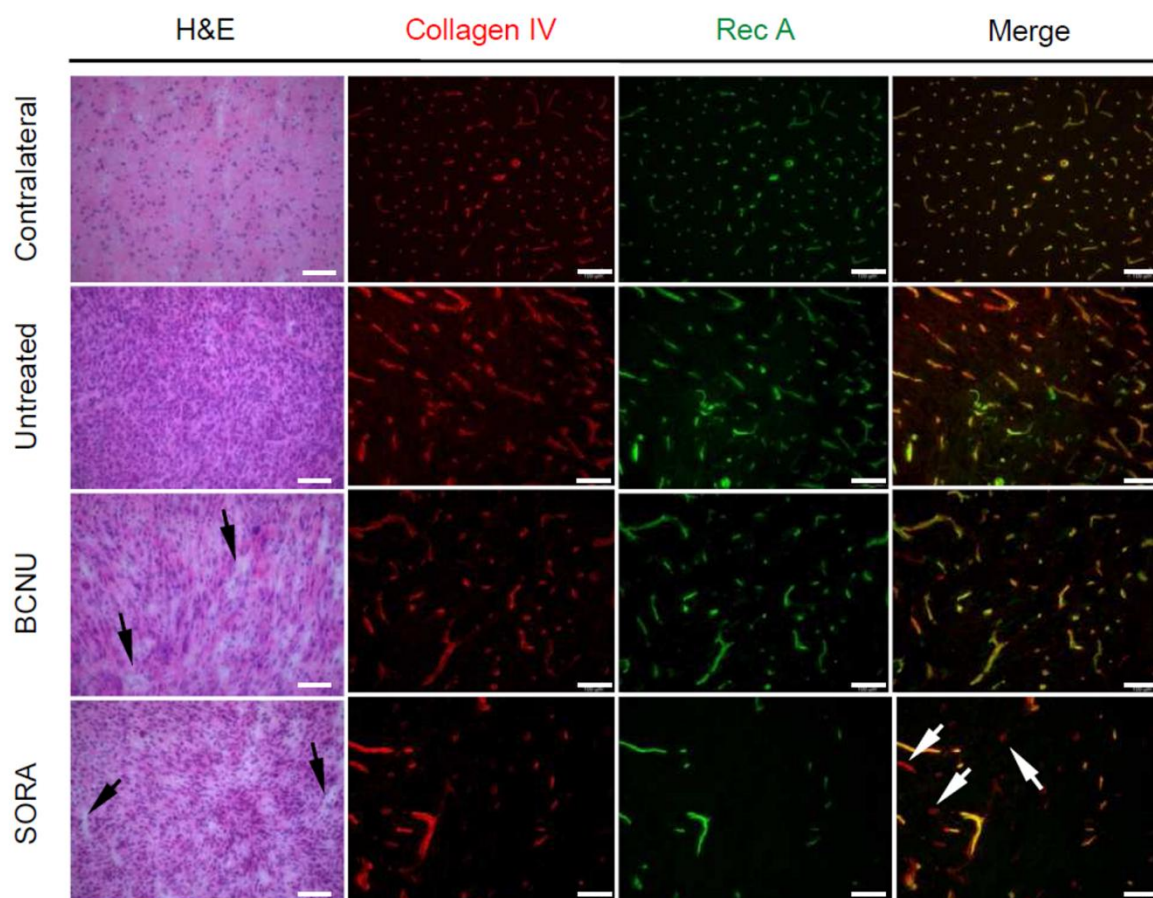


Figure VI.3-5 Images histologiques et immunohistologiques à D28_(T14). Exemple de coloration (H&E) du tissu controlatéral et intra-tumoral des 3 groupes étudiés. Les flèches noires pointent vers des zones en hypodensité correspondant à des œdèmes intra-tumoraux. Images représentatives des immunomarquages du collagène IV et du RecA dans le striatum controlatéral et dans une tumeur représentative de chacun des groupes. Les flèches blanches pointent des vaisseaux intra-tumoraux seulement marqués au collagène IV dans le groupe SORA. Barre d'échelle = 100 μ m.

VI.4 Discussion

L'effet de deux traitements différents (BCNU, un agent alkylant de l'ADN et le Sorafenib, un inhibiteur multikinases) sur un modèle orthotopique de glioblastome humain (U-87 MG) implanté sur des rats « *nude* » a été étudié par IRM et par immunohistologie. L'IRM anatomique a mis en évidence une inhibition importante de la croissance des tumeurs induite par les deux traitements (Sorafenib et BCNU). Cette étude montre que les valeurs des paramètres ADC, BVf et VSI avant traitement sont plus élevées dans les tissus tumoraux que dans le striatum controlatéral. Le traitement Sorafenib induit d'importantes modifications tout

d'abord sur la prise de contraste de la tumeur ($D13_{(T-1)}$), puis, sur les paramètres BVf et VSI ($D18_{(T4)}$) et enfin, sur l'ADC et la taille de la tumeur ($D28_{(T14)}$) par rapport aux animaux témoins. Dans le groupe BCNU, seule la taille de la tumeur et l'ADC sont modifiés 14 jours après le début du traitement.

La 1^{ère} condition permettant de valider cette étude était de déterminer si le protocole IRM, mis en œuvre ici pouvait être répété dans le but de suivre la réponse thérapeutique des tumeurs cérébrales. Cette condition a été vérifiée dans l'étude II lors d'un suivi de croissance tumorale (C6 et RG2) mais devait être aussi vérifié dans ce modèle de gliome (U-87 MG) et aussi lorsqu'un traitement est administré aux animaux. Pour vérifier cela, nous avons comparé au sein de chaque groupe, les sous-groupes "*single-time*" et "*longitudinal*" à chaque temps. Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux sous groupes. En effet, ni les anesthésies et les injections répétées de produit de contraste, ni les traitements (BCNU ou sorafenib) n'ont d'effets détectables sur le poids des rats (données non présentées), le volume de tumoral et les paramètres IRM. La 2^{ème} condition était d'évaluer si l'USPIO utilisé pour estimer les paramètres BVf et VSI s'extravase dans ce modèle de tumeur pendant le temps de la mesure. Pour répondre à cette question, une expérience séparée, sur 4 animaux par groupe suivis à chaque temps ($D13_{(T-1)}$, $D15_{(T1)}$, ($D18_{(T4)}$ et $D28_{(T14)}$) montre que la concentration d'USPIO extravasculaire présent dans la tumeur était environ égale à 0,3% de la concentration plasmatique 20 min après son injection. Ce résultat confirme l'hypothèse principale sur laquelle repose l'imagerie du BVf et du VSI : l'USPIO doit rester intra-vasculaire pendant la mesure. Pour finir, cette étude montre que le protocole d'imagerie complet peut être réalisé en 90 minutes environ, ce qui a permis de réaliser un suivi longitudinal avec un nombre suffisant d'animaux par groupe. Tous ces résultats indiquent que notre protocole expérimental est approprié pour réaliser un suivi longitudinal de l'effet de thérapies anticancéreuses sur le modèle de glioblastome U-87 MG.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité de l'IRM multiparamétrique pour suivre l'activité anti-tumorale du BCNU et du Sorafenib.

Les deux traitements induisent une augmentation de l'ADC intra-tumoral par rapport au groupe non traité 14 jours après le début des traitements. Cette augmentation est cohérente avec l'effet cytotoxique du BCNU car on sait que l'ADC reflète les variations de densité cellulaire (ou cellularité) (Koh et al. 2007) et la survenue d'un œdème vasogénique. Les colorations H&E montrent que la densité cellulaire est plus faible dans les tumeurs des deux

groupes traités que dans le groupe non traité, 14 jours après le début des traitements. Les colorations H&E montrent également la présence d'un œdème intra-tumoral dans les deux groupes traités. Même si les mécanismes impliqués dans les changements d'ADC sont complexes, ces résultats histologiques peuvent expliquer l'augmentation l'ADC des tumeurs dans les groupes BCNU et SORA observée 14 jours après le début des traitements.

Les propriétés de la microvascularisation tumorale évaluées par IRM et l'histologie ne sont pas modifiées par le traitement au BCNU. En revanche, le Sorafenib induit des modifications importantes des paramètres microvasculaires dans la tumeur. Quatre et 14 jours après le début du traitement anti-angiogénique, la valeur moyenne du BVf intra-tumoral est significativement réduite par rapport à celle du groupe non traité et est proche d'une valeur normale. Ce résultat suggère que la vascularisation tumorale a tendance à se normaliser sous traitement anti-angiogénique. Toutefois, au même jour d'observation (D18_(T4) D28_(T14)), le VSI intra-tumoral est toujours nettement supérieur aux VSI mesurés dans les tissus controlatéraux. Comme le BVf dépend à la fois de la densité des vaisseaux et de leur diamètres, ces données suggèrent une diminution de la densité des vaisseaux sous traitement anti-angiogénique. L'immunohistologique quantitative nous indique que la densité de vaisseaux tumoraux sous Sorafenib est considérablement réduite par rapport aux valeurs mesurées dans les tumeurs non traitées et confirme donc l'hypothèse déduite des paramètres IRM : BVf et VSI. En plus de ces changements morphologiques, 1 jour après le début du traitement au Sorafenib (D15_(T1)), les marquages immunohistochimiques montrent que certains vaisseaux tumoraux sont marqués par le collagène IV sans être marqués par le RecA-1. Ces observations indiquent que certains vaisseaux tumoraux sont formés uniquement de lame basale. Cette différence entre les deux marquages est encore plus prononcée après 4 et 14 jours de traitement. Ces observations ont déjà été rapportées dans plusieurs études (Inai et al. 2004, Mancuso et al. 2006). Inai et al. ont observé des vaisseaux marqués seulement au collagène IV (absence de cellules endothéliales) dans des tumeurs pancréatiques spontanées des îlots de Langerhans traitées par un inhibiteur des récepteurs au VEGF.

Nous avons observé une diminution de la prise de contraste des tumeurs 1 jour après le début du traitement anti-angiogénique. Cette réduction est plus prononcée 4 jours après le début du traitement et pour finir, aucune extravasation de l'agent de contraste P846 n'est détectable 14 jours après le début du traitement. Les estimations du BVf et VSI réalisées au cours de cette étude, nécessitant l'utilisation d'un agent de contraste (USPIO) indiquent qu'au moins une partie des vaisseaux tumoraux sous traitement anti-angiogénique est perfusée.

L'absence de prise de contraste des tumeurs après 14 jours de traitement au Sorafenib est donc due à des modifications de la perméabilité des vaisseaux et non à un défaut de perfusion des vaisseaux tumoraux. Les modifications de prise de contraste observées dans notre étude sont cohérentes avec les résultats de Flaherty et al. qui ont observé par IRM, une diminution de la perméabilité/perfusion des vaisseaux (K_{trans}) après 3 à 12 semaines chez de patients porteur d'un carcinome à cellules rénales traités au Sorafenib (Flaherty et al. 2008).

Dans notre étude, les paramètres BVf et CE semblent indiquer une normalisation des vaisseaux tumoraux sous traitement anti-angiogénique, phénomène qui a déjà été décrit dans plusieurs études concernant les tumeurs cérébrales et un autre antiangiogénique que le Sorafenib (Batchelor et al. 2007, Jain et al. 2007). Outre ces deux paramètres IRM, les mesures du VSI montrent que les vaisseaux tumoraux présentaient des tailles anormalement grandes par rapport à des vaisseaux présents dans des tissus sains. La normalisation du BVf traduit plus, dans notre étude, une altération de la vascularisation qu'une normalisation. Cette altération était attendue dans le cas d'un traitement anti-angiogénique. Une normalisation de la perméabilité/perfusion vasculaire (mesuré par IRM (DCE)) associée à une augmentation du diamètre des vaisseaux (estimé par immunohistologie) d'un modèle de carcinome épidermoïde sous traitement anti-angiogénique a déjà été décrite (Nakamura et al. 2006). Ces résultats mettent en évidence la nécessité de mesurer ensemble les paramètres BVf, VSI et CE afin de vérifier les différents aspects de la microvascularisation tumorale sous traitement anti-angiogénique.

L'absence de corrélation entre les différents paramètres IRM estimés dans cette étude (volume tumoral, ADC, BVf, VSI et CE) suggèrent qu'ils sont indépendants les uns des autres. D'autres études seraient nécessaires pour venir conforter ces résultats préliminaires. Montrer l'indépendance des différents paramètres estimés par IRM est capital dans l'objectif de raccourcir au maximum le temps d'acquisition par animal. En effet, si 2 paramètres étaient redondants il serait alors inutile de les mesurer tous les deux. Pour aller plus loin dans le traitement de données on pourrait essayer de corréler, en utilisant des méthodes d'analyses statistiques multivariées, les différents paramètres IRM avec la survie des animaux ou la progression tumorale. Des corrélations de ce genre ont déjà été utilisées avec succès dans d'autres études comme celle de Sorensen et al. (Sorensen et al. 2009).

Les glioblastomes sont des tumeurs très résistantes à de nombreux types de traitement. Dans notre étude les traitements au BCNU et au Sorafenib, montrent une efficacité modérée de l'augmentation de la médiane de survie des animaux porteurs de glioblastome. Le

protocole d'IRM multiparamétrique mis en place dans cette étude permet de montrer que les médicaments ont atteint leur cible en induisant des changements morphologiques et/ou physiologiques au sein de tumeurs. Ces résultats montrent que l'IRM multiparamétrique pourrait être utile dans l'optimisation et/ou la combinaison des traitements pharmacologiques.

L'approche multiparamétrique IRM décrite dans cette étude a permis de mesurer diverses caractéristiques du remodelage cellulaire et vasculaire qui se produit sous traitement. Afin de compléter cette caractérisation, d'autres développements IRM pourraient être évalués pour raffiner cette analyse. Dans notre étude, nous utilisons une technique de CE évaluant l'intégrité de la paroi vasculaire, mais ce paramètre dépend du débit sanguin, de la perméabilité des vaisseaux et de la diffusion de l'agent de contraste dans le compartiment extravasculaire. Une technique de CE dynamique (DCE) traitée avec un modèle mathématique (Nakamura et al. 2006, Tofts et al. 1995) pourrait être utilisée afin de quantifier et éventuellement de différencier le changement de perméabilité vasculaire et le débit sanguin. Pour appliquer cette telle approche quantitative, nous avons besoin au préalable d'optimiser notre protocole afin d'obtenir à la fois des mesures de VSI, BVf (en utilisant des USPIO) et de perméabilité / perfusion (à l'aide d'un agent de contraste à base de gadolinium) dans une même session d'IRM (Beaumont et al. 2009). Des mesures de débit sanguin peuvent également être obtenues par IRM en utilisant une méthode de contraste de susceptibilité magnétique ou de marquage de spins artériels (Barbier et al. 2001). En utilisant une analyse quantitative de décroissance T_2^* (He et al. 2007), on pourrait aussi estimer la fraction d'extraction d'oxygène dans la tumeur, un marqueur possible de l'hypoxie tumorale.

VI.5 Conclusion

En conclusion, cette étude indique que de nombreux changements microvasculaires et cellulaires se produisent au sein de la tumeur après thérapie anti-angiogénique ou cytotoxiques. Les paramètres IRM étudiés ici sont sensibles aux traitements appliqués et que ces modifications sont dépendantes du traitement appliqué et ces modifications ne se produisent pas en même temps. Dans le cadre du traitement au Sorafenib, les paramètres vasculaires (BVf, VSI et CE) sont modifiés plus précocement que l'ADC. En outre, notre étude montre que ces changements apparaissent complexes et ne peuvent pas se résumer à une mesure physiologique unique telle que le BVf. L'IRM multiparamétrique, constitue donc une modalité d'imagerie à un fort potentiel pour l'évaluation de nouveaux médicaments sur les

tumeurs cérébrales. En outre, cette méthodologie permet de mieux décrire et comprendre les mécanismes d'actions de thérapies anti-angiogéniques ou anti-vasculaires. Ainsi la conception rationnelle de combinaisons optimisées avec des chimiothérapies et/ou radiothérapies peut être envisagée.

Etude IV : Impact d'une
radiothérapie synchrotron et/ou
d'un anti-angiogénique sur un
gliome 9L

VII.1 Objectifs de l'étude IV

Dans l'étude III, nous avons mis en évidence que différents paramètres estimés par IRM tels que le l'ADC, le BVf, le VSI et des mesures qualitatives de perméabilité de la BHE pouvaient se révéler sensibles à une chimiothérapie (ADC) et à un traitement anti-angiogénique (BVf, VSI et perméabilité). Dans cette nouvelle étude, nous voulions évaluer la sensibilité de ces paramètres dans le cadre de suivis d'une radiothérapie synchrotron (MRT) et d'un agent anti-angiogénique appliqués seuls ou en combinaison sur un modèle de gliosarcome (9L). Le modèle de tumeur 9L a été choisi car plusieurs études ont montré qu'il était sensible à la MRT (Dilmanian et al. 2002, Serduc et al. 2008). De plus, des études préliminaires ont montré que la microvascularisation tumorale de ce modèle était modifiée sous l'effet du Sorafenib. Enfin les gliosarcomes 9L sont des modèles syngéniques de rat, ce qui implique que lors de cette étude la réponse immunitaire, des animaux sous traitements, ne sera pas entravée (à l'inverse des études sur des animaux « *nude* »). Historiquement le laboratoire avait déjà travaillé et publié, en collaboration avec l'ESRF (*European Synchrotron Radiation Facility*), sur cette modalité de radiothérapie. Il avait été montré que la MRT unidirectionnelle n'avait pas d'effet sur la vascularisation saine (Serduc et al. 2006). Par contre il était suspecté, mais pas démontré, que les effets sur la tumeur étaient dus à des effets sur la vascularisation tumorale du fait de son caractère anormal.

Au cours de cette étude, le protocole d'imagerie a été complété et amélioré par rapport à l'étude précédente pour une meilleure caractérisation de la vascularisation et perfusion tumorale. En effet, en plus des paramètres estimés au cours de l'étude III, nous avons ajouté la mesure de la saturation locale en oxygène dans le sang (ISO₂) ainsi que des mesures dynamiques quantitatives de prise de contraste réalisées en utilisant deux agents de contraste de taille différente.

La quantité de données générées par cette étude nous a conduits à fractionner nos résultats en 4 parties distinctes répondant à des problématiques indépendantes :

- **Problématique 1 :** Caractériser l'impact, sur la vascularisation, des différents traitements sur le modèle 9L à l'aide de IRM multiparamétrique.
- **Problématique 2 :** Quel est l'impact d'une MRT par microfaisceaux croisés sur la microvascularisation des tissus cérébraux sains et tumoraux ?
- **Problématique 3 :** Y-a-t-il un intérêt à utiliser une injection séquentielle de deux

agents de contraste de taille différente (P846 *versus* Gd-DOTA) pour évaluer l'impact de traitements anti-tumoraux (MRT et/ou anti-angiogénique) sur l'état de la BHE des tissus cérébraux sains et tumoraux ?

- **Problématique 4 :** Evaluation d'un nouveau paramètre IRM développé au laboratoire : la ISO_2 . Est-ce que la ISO_2 estimé par IRM est un paramètre indépendant des autres paramètres de la microvascularisation estimés par IRM notamment le BVf ? Est-ce que la ISO_2 est représentative d'un phénomène biologique tel que l'hypoxie tissulaire ? En enfin, quel est l'impact d'un agent anti-angiogénique sur la ISO_2 ?

Ce travail a été conçu et réalisé grâce à la collaboration entre l'ESRF et l'équipe 5 du GIN. En effet, les animaux ont été implantés et irradiés à l'ESRF avec notamment la participation de Raphaël Serduc, Audrey Bouchet et Géraldine Le Duc. L'imagerie ainsi que les études ex-vivo ont été réalisées au sein de l'équipe 5 du GIN avec la participation de Régine Farion, Thomas Christen, Nicolas Pannetier, Cécile Maisin, Pierre Dillenseger, Ariana Sherdil et Emmanuel Barbier.

VII.2 Protocole expérimental

L'implantation stéréotaxique des cellules tumorales (9L) a été réalisée sur 164 rats Fisher. Sept jours après l'implantation des tumeurs (D7), des images anatomiques (pondérées T_2) ont été effectuées pour évaluer le volume de chaque tumeur. Les rats ont ensuite été randomisés et stratifiés en 4 groupes ($n = 41$ par groupe) avec un volume tumoral moyen homogène par groupe (volume tumoral moyen pour l'ensemble des rats à D7 : $4,6 \pm 2,5 \text{ mm}^3$). Les traitements ont commencé 10 jours après l'implantation des cellules tumorales ($D10_{(T0)}$).

- Les animaux du groupe MRT ont été traités par radiothérapie croisée de type microfaisceaux à $D10_{(T0)}$.
- Les animaux du groupe SORA devaient recevoir une administration orale quotidienne de Sorafenib (100 mg.kg^{-1}) entre le 1^{er} et le 14^{ème} jour après le début du traitement ($D10_{(T0)}$ à $D24_{(T14)}$).
- Les animaux du groupe MRT+SORA ont été traités par MRT à $D10_{(T0)}$. Ces animaux devaient aussi recevoir une administration orale quotidienne de Sorafenib (100 mg.kg^{-1}) entre $D11_{(T1)}$ et $D24_{(T14)}$. Les animaux de ce groupe n'ont pas été traités

au Sorafenib à D10_(T0), comme les animaux du groupe SORA à cause temps nécessaire à l'irradiation de tous les animaux et du transfert d'animaux entre le synchrotron et l'institut des neurosciences.

- Les animaux du groupe non traité (*untreated*) n'ont reçu aucun traitement.

Pour plus d'informations sur la lignée tumorale utilisée (§III.1.1.1.1 page 53), l'implantation des animaux (§III.1.1.2 page 54), les traitements effectués (§III.1.2 page 56), veuillez vous référer au chapitre méthodologique correspondant.

Chaque groupe a été divisé en 3 sous groupes. Neuf animaux par groupe ont permis de réaliser une étude de survie (sous groupe « survie »). Ces animaux n'ont pas subi d'autres IRM que l'IRM anatomique. Les rats du sous-groupe «longitudinal» ont été imagés à chaque temps (D9_(T-1), D11_(T1), D13_(T3), D15_(T5), D18_(T8), D25_(T15) et D55_(T45)). Après la dernière mesure IRM, les animaux ont été euthanasiés pour réaliser des expériences *ex vivo* (n = 4 par groupe). Les rats du sous-groupe « ponctuel » ont été imagés une seule fois et euthanasiés à la fin de la séance d'imagerie pour permettre des études *ex-vivo* (n = 28 par groupe ; 4 animaux / temps).

Un schéma représentatif du protocole expérimental est présenté à la Figure VII.2-1.

VII.2.1 Expériences IRM *in vivo*

Toutes les expériences de cette étude ont été réalisées sur une IRM 4,7T. Tous les animaux ont été imagés avec le protocole suivant :

- Imagerie anatomique T_{2w} (§III.1.3.3.1 page 61).
- Carte d'ADC (§III.1.3.3.2 page 61).
- Carte de la ISO₂ (§III.1.3.3.4 page 62).
- Carte de BVf / VSI (§III.1.3.3.3 page 62).
- Etude de la perméabilité des vaisseaux durant l'injection de deux agents de contraste de tailles différents (§III.1.3.3.5 page 62).

Le déroulement du protocole IRM est présenté sur la Figure VII.2-2. Avant et après chaque session IRM, une prise de sang (environ 100 µl) est réalisée pour chaque animal. Une étude des gaz du sang nous permet d'obtenir le pourcentage d'hématocrite dans le sang, rat par rat. La moyenne du pourcentage d'hématocrite (avant/après IRM) est utilisé dans les calculs des cartes de ISO₂. Pour plus de détails concernant la préparation des animaux, l'acquisition des séquences ou encore le traitement de données post-IRM, veuillez vous

référer au chapitre III : méthodologie à la page 51.

Du fait du grand nombre d'animaux à imager par temps ($n = 32$), nous avons été obligé de fractionner le protocole général (Figure VII.2-2) en deux sessions :

- Une 1^{ère} session a été réalisée avec les animaux du groupe SORA et la moitié des animaux du groupe non traité. La moitié de ces animaux a été implantée à un jour J et l'autre moitié à J+2. Ce protocole a permis d'imager 6 animaux par jour : 2 du groupe non traité (1 du sous-groupe « longitudinal » et 1 du sous-groupe « ponctuel ») et 4 du groupe SORA (2 du sous-groupe « longitudinal » et 2 du sous-groupe « ponctuel »).
- Une 2^{ème} session a été réalisée avec les animaux des groupes MRT, MRT+SORA et la moitié du groupe non traité. Comme pour la 1^{ère} session, la moitié de ces animaux a été implantée à un jour J et l'autre moitié à J+2. Ce qui nous a permis d'imager 10 animaux par jour : 2 du groupe non traité (1 du sous-groupe « longitudinal » et 1 du sous-groupe « ponctuel »), 4 du groupe MRT (2 du sous-groupe « longitudinal » et 2 du sous-groupe « ponctuel ») et 4 du groupe MRT+SORA (2 du sous-groupe « longitudinal » et 2 du sous-groupe « ponctuel »).

VII.2.2 Expériences *ex vivo*

Après sacrifice, le cerveau de tous les animaux a été prélevé puis congelé à -80°C . Les cerveaux ont été coupés au cryotome et des échantillons protéiques ont été préparés. Seuls les animaux des groupes SORA et non traité ont reçu une injection de pimonidazole 1 h avant le sacrifice des animaux. Pour plus de détails sur les techniques employées veuillez vous reporter au chapitre III.2.1 page 67.

VII.2.2.1 Histologie et immunohistologie

Sur les coupes de cerveaux, les structures vasculaires ont été mises en évidence par immunomarquage de la lame basale des vaisseaux à l'aide d'un anticorps anti-collagène IV et par immunomarquage des cellules endothéliales à l'aide du marquage de l'antigène RECA-1 (*Rat Endothelial Cell Antigen*) (détail de la technique au §III.2.1.3.1 page 69).

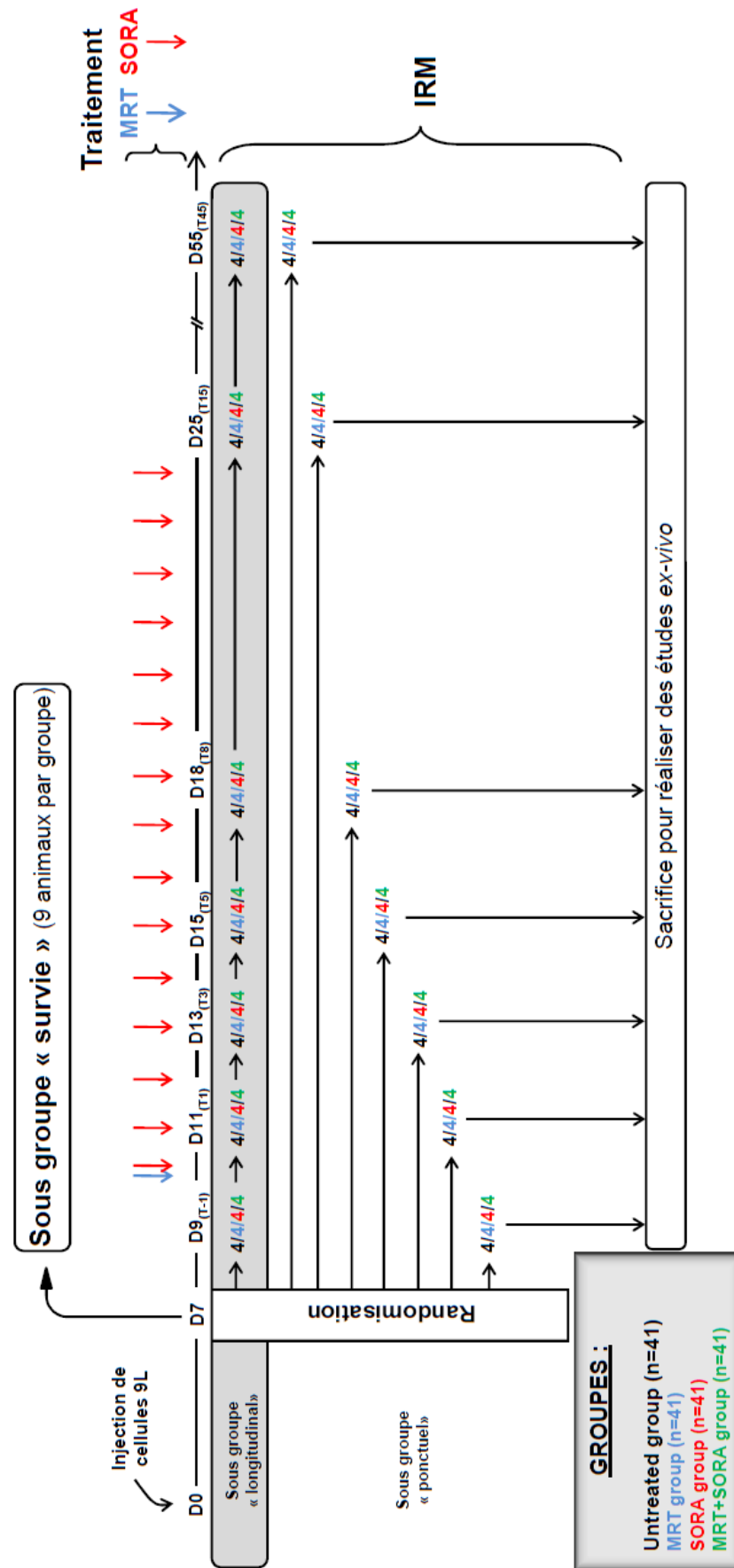
La prolifération cellulaire a aussi été étudiée pour les animaux des groupes non traité et MRT à l'aide de l'immunomarquage du Ki67 (marqueur des cellules en division) (détails de

la technique au §III.2.1.1 page 72).

On a réalisé un immunomarquage du pimonidazole pour détecter les zones hypoxiques sur les coupes des animaux des groupes non traité et SORA (détail de la technique au §III.2.1.4 page 71).

Enfin, une coloration des structures anatomiques a été réalisée à l'aide de la coloration H&E (détails de la technique au §III.2.1.2 page 69).

Figure VII.2-1 Protocole expérimental du suivi de l'efficacité de deux traitements Sorafenib et MRT (seul ou combiné) sur des tumeurs 9L implantées en orthotopique dans le cerveau de rats Fisher 344.



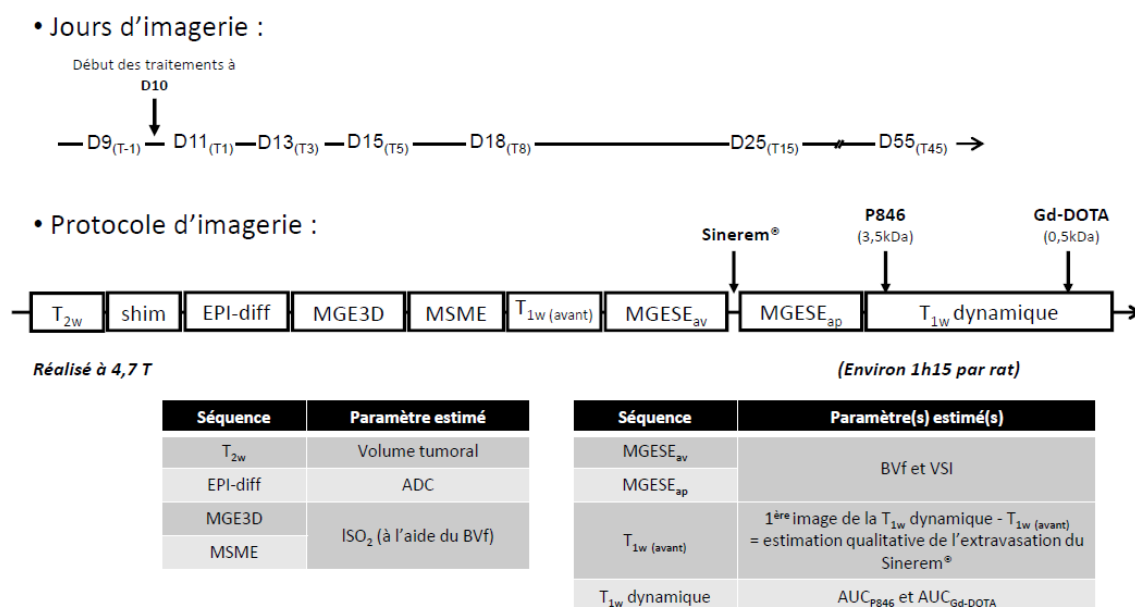


Figure VII.2-2 Protocole d'imagerie réalisé lors de cette étude. En haut de la figure, on a matérialisé les 7 jours d'imagerie et en bas sont représentées les différentes acquisitions réalisées pour chacun des rats.

VII.2.2.2 Etudes protéiques

Pour tous les temps de l'étude, on a réalisé une analyse protéique pour 2 animaux du groupe non traité et 3 du groupe MRT. Des échantillons du striatum controlatéral, du tissu ipsilatéral à la tumeur (en excluant la tumeur) et de tumeur ont été lysés et dosés (protocole détaillé au chapitre III.2.2 page 72). Des immunoblots du VEGF ont été effectués sur tous les échantillons. Après déhybridation, les membranes ont été hybridées de nouveaux afin de marquer une protéine de contrôle : la glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Milliat et al. 2006). Tous les détails de la technique d'immunoblot mise en œuvre sont présentés au §III.2.2.1 page 73.

Les membranes ont ensuite été numérisées afin de réaliser une analyse densitométrique de l'expression du VEGF à l'aide du logiciel ImageJ. L'expression du VEGF est normalisée à celle de la GAPDH.

VII.3 Résultats

Nous n'avons observé aucune différence en termes de croissance tumorale et de mesures des paramètres IRM entre les animaux du groupe non traité de la 1^{ère} session et de la 2^{ème} session. Au cours de cette étude (comme dans les études précédentes), nous n'avons pas

observé de différences dans les estimations dans aucun des paramètres estimés entre les sous groupes «ponctuel» et «longitudinal», pour chacun des groupes et chaque jours d'observations. Par conséquent, pour chacun des 4 groupes, les valeurs des sous-groupes «ponctuel» et «longitudinal» ont été regroupées et des comparaisons entre chacun des groupes ont pu être réalisées.

De plus, les observations, rat par rat, des images T_{1w} obtenues avant l'injection de Sinerem[®] soustraites aux images obtenues après l'acquisition de la séquence MGESEap indiquent qu'il n'y a pas eu d'extravasation de l'agent de contraste pendant cette période. En effet, un rehaussement (non observé dans notre étude) de signal T_{1w} après l'injection de Sinerem[®] aurait indiqué un phénomène d'extravasation. Ces résultats indiquent que notre protocole expérimental permet de réaliser un suivi longitudinal des mesures de BVf et VSI dans le cadre du protocole de traitement des tumeurs 9L mis en place dans de cette étude.

Aux différents temps du suivi, 8 animaux par groupe sont imagés (4 du sous-groupe longitudinal et 4 du sous-groupe pontuel). Du fait de différents problèmes (mortalité d'animaux, problème d'acquisition ou de traitement de données) le nombre de données IRM exploitables a été plus faible pour certain temps (Tableau VII.3-1).

Jour d'imagerie	D9 _(T-1)	D11 _(T+1)	D13 _(T+3)	D15 _(T+5)	D18 _(T+8)	D25 _(T15)	D55 _(T45)
Groupe non traité	6	8	4	8	5	/	/
Groupe MRT	4	7	/	8	8	8	5
Groupe SORA	8	8	8	8	7	/	/
Groupe MRT+SORA	4	8	/	7	8	6	/

Tableau VII.3-1 Données IRM exploitables aux différents temps pour les différents groupes.

VII.3.1 Impact des différents traitements sur la survie et croissance tumorale

VII.3.1.1 Impact des traitements sur la survie des animaux

La Figure VII.3-1 représente la courbe de survie des animaux de tous les groupes selon la représentation de Kaplan-Meier. La MRT augmente de façon significative la médiane de survie des animaux porteurs de gliosarcome 9L par rapport au groupe non traité (respectivement, D65 *versus* D20 ; $p = 0,003$; Figure VII.3-1). Le dernier rat du groupe non traité est mort à D26 alors qu'à ce même jour 90 % des animaux du groupe MRT étaient en vie, le dernier rat du groupe MRT est mort à D182. La médiane de survie des groupes

MRT+SORA est significativement augmentée par rapport au groupe non traité (D25 versus D20 ; $p = 0,01$; Figure VII.3-1). En revanche la médiane de survie des animaux du groupe SORA n'était pas différente de celle du groupe non traité (D20; Figure VII.3-1).

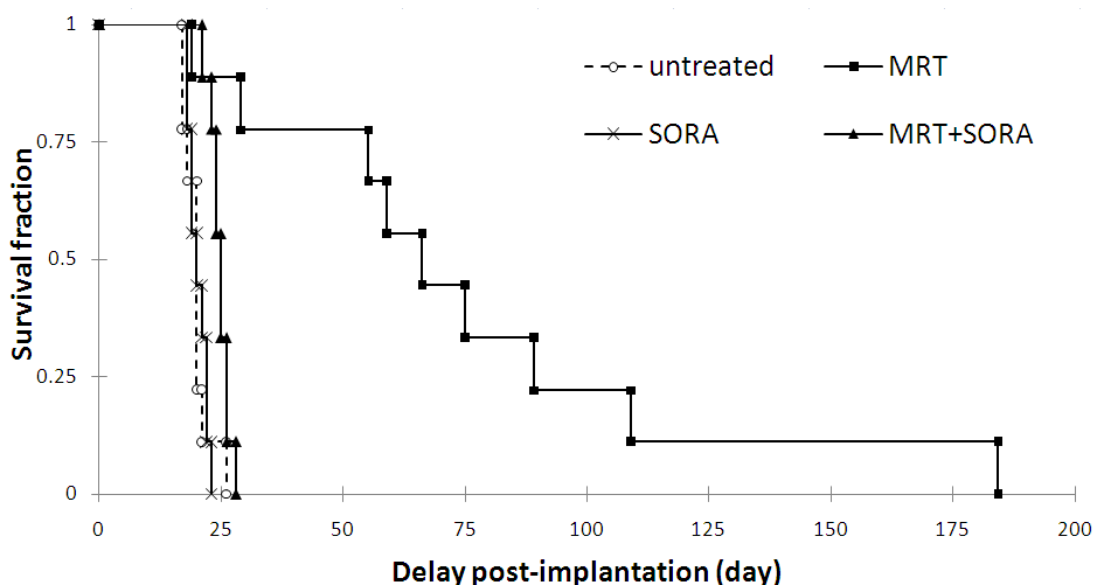


Figure VII.3-1 Représentation des courbes de survie (en jour), selon la représentation de Kaplan Meier. Le traitement MRT a induit une augmentation significative du temps de survie médian des animaux (D65 versus D20, test log-rank $p = 0,0003$).

VII.3.1.2 Impact des traitements sur la croissance tumorale

La taille des tumeurs 9L du groupe non traité augmente de façon exponentielle entre le 9^{ème} et le 18^{ème} jour après l'implantation des cellules tumorales (de $4 \pm 3 \text{ mm}^3$ à D9_(T-1) à $183 \pm 98 \text{ mm}^3$ à D18_(T8); Figure VII.3-2). La croissance tumorale dans le groupe SORA est significativement plus faible que la croissance des tumeurs du groupe non traité (respectivement, 43 ± 23 vs $183 \pm 98 \text{ mm}^3$ à D18_(T8), $p < 0,01$; Figure VII.3-2). La MRT seule ou combinée au sorafenib inhibe significativement la croissance tumorale par rapport au groupe non traité (respectivement, 2 ± 2 et 7 ± 3 vs $183 \pm 98 \text{ mm}^3$ à D18_(T8), $p < 0,01$; Figure VII.3-2). Les traitements MRT et MRT+SORA ont un impact plus important sur la croissance tumorale que le traitement au Sorafenib seul (respectivement, 2 ± 2 et 7 ± 3 vs $43 \pm 23 \text{ mm}^3$ à D18_(T8) ; Figure VII.3-2). A D25_(T15), le volume moyen des tumeurs des groupes MRT+SORA et MRT sont respectivement de 2 ± 0.6 et $2 \pm 2 \text{ mm}^3$. A ce temps là, il n'y a plus d'animaux des groupes non traité et SORA. Au dernier jour d'imagerie, à D55_(T45), le volume tumoral des animaux du groupe MRT (seuls animaux à être encore en vie) est de $55 \pm 91 \text{ mm}^3$ (1 tumeur ayant un volume de 218 mm^3 versus $14 \pm 4 \text{ mm}^3$ pour la moyenne des 4 autres animaux).

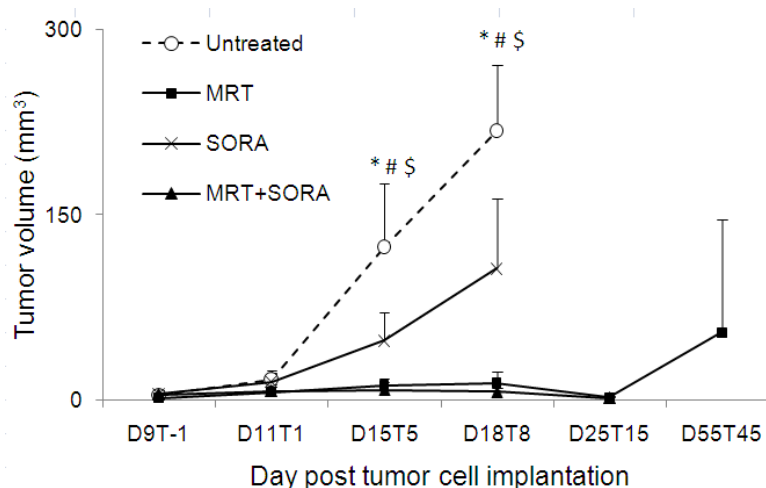


Figure VII.3-2 Courbe de croissance des tumeurs 9L des groupes non traité (« *untreated* »), SORA, MRT et MRT+SORA évaluée par IRM en fonction du temps. Moyenne $\pm$ écart-type. $P < 0,01$:

* groupe MRT versus non traité;

groupe SORA versus non traité ;

\$ groupe MRT+SORA versus non traité.

VII.3.2 Résultat 1: Caractériser l'impact des différents traitements sur le modèle 9L à l'aide de l'IRM multiparamétrique

La Figure VII.3-3, présente des images représentatives de tous les paramètres IRM estimés au cours de cette étude (ADC, VSI, BVf, ISO₂, AUC_{P846} et AUC_{Gd-DOTA}). On peut voir dans cette figure l'évolution de chacun de ces paramètres au cours du développement d'une tumeur 9L appartenant au groupe non traité (D9, D11, D13, D15, D18).

Tout d'abord, il est important de noter que la croissance du modèle 9L induit une importante hétérogénéité au sein des valeurs de tous les paramètres IRM estimés surtout aux temps D15 et D18 (Figure VII.3-3). Cette hétérogénéité est aussi présente dans certaines tumeurs des autres groupes (données non présentées). Cette grande hétérogénéité implique une augmentation du pourcentage de pixels exclus (selon les critères présentés au §III.1.3.4.7 page 66). Le pourcentage de pixels exclus pour chaque groupe, chaque ROI et chaque jour d'observation est présenté dans le Tableau VII.3-2. Tous ces pixels sont exclus des calculs des moyennes présentés à la Figure VII.3-4, mais aussi dans tous les résultats présentés dans ce chapitre.

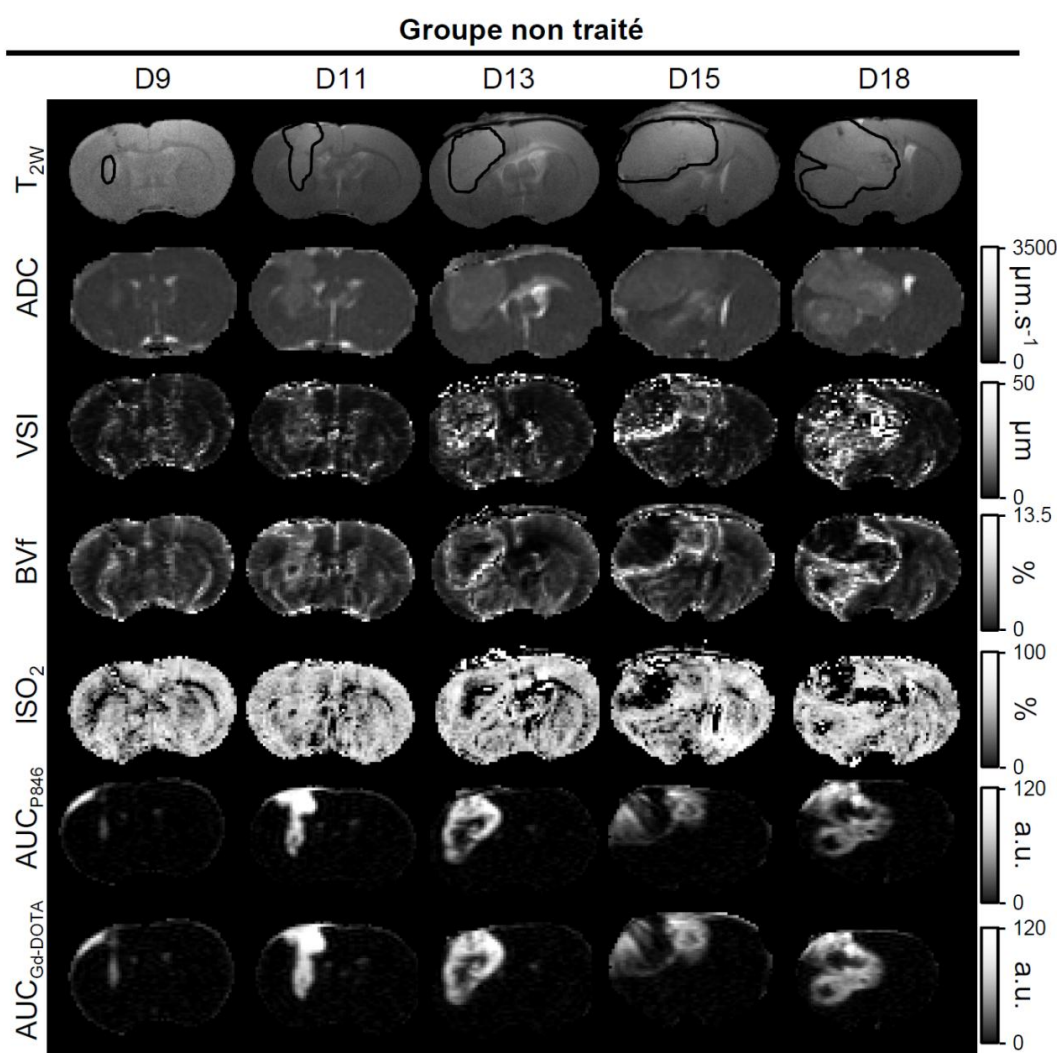


Figure VII.3-3 De haut en bas sont représentées les cartes de tous les paramètres IRM estimés issues d'animaux représentatifs porteur d'un gliosarcome 9L non traité. De gauche à droite, on peut voir l'évolution de chacun des paramètres au cours du développement de la tumeur. Les tracés en noir sur les images T_{2w} (anatomiques) représentent le contour des tumeurs. Les images proviennent d'animaux du sous-groupe ponctuel.

ROI	groupe	D9 _(T-1)	D11 _(T+1)	D13 _(T+3)	D15 _(T+5)	D18 _(T+8)	D25 _(T15)	D55 _(T45)
Tumeur	Non traité	1,9	3,2	11,6	23,9	36,2	/	/
	MRT	0,0	3,7	/	5,5	12,5	49,1	65,6
	SORA	2,0	5,3	22,5	26,9	37,1	/	/
	MRT+SORA	1,4	10,9	/	40,3	34,5	48,4	/
Ipsilatéral	Non traité	1,3	5,0	4,8	15,0	18,1	/	/
	MRT	0,6	7,9	/	9,8	9,8	3,7	32,6
	SORA	3,9	4,6	11,9	6,3	18,4	/	/
	MRT+SORA	1,5	7,1	/	20,5	4,4	14,8	/
Controlatéral	Non traité	2,0	2,3	6,5	13,6	14	/	/
	MRT	3,2	2,9	/	9,1	12,7	5,2	17
	SORA	1,3	3,2	15,0	7,5	15	/	/
	MRT+SORA	3,3	10,2	/	25,1	4,4	13,5	/

Tableau VII.3-2 tableau présentant le pourcentage de pixels exclus en fonction du groupe, de la ROI et du jour d'observation. Tout pixel exclu par les critères d'un des paramètres IRM et exclu de tous les autres paramètres. Tout pixel négatif ou avec une valeur d'ADC $> 3500 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ou de VSI $> 50 \mu\text{m}$ ou de BVf $> 13,5 \%$ ou de ISO₂ $> 100 \%$ est rejeté.

VII.3.2.1 Caractérisation du tissu controlatéral du groupe non traité

Dans le tissu controlatéral des animaux non traités l'ADC, BVf, VSI et ISO₂ ne varient pas au cours du temps ni dans le groupe non traité et ni dans le groupe SORA (ADC : $738 \pm 15 \mu\text{m.s}^{-1}$, BVf : $2,9 \pm 0,2 \%$, VSI : $5,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ et ISO₂ : $68 \pm 2 \%$; moyennes des deux groupes à tous les temps ; Figure VII.3-4). On n'observe aucune prise de contraste dans le striatum controlatéral des animaux non traités, quel que soit l'agent de contraste utilisé (Figure VII.3-3).

VII.3.2.2 Caractérisation de la croissance 9L

Au 9^{ème} jour de croissance, les gliosarcomes 9L présentent des valeurs d'ADC, BVf VSI plus élevés que dans le striatum controlatéral des animaux non traités (ADC : 978 ± 106 vs 758 ± 30 , BVf : $6,0 \pm 0,9$ vs $3,0 \pm 0,5$ et VSI : $11,0 \pm 1,1$ vs $5,2 \pm 1,0$; Figure VII.3-4a-c-d). Les valeurs de BVf et d'ADC des tumeurs non traitées ne varient pas dans le temps alors le VSI augmente (de $11,0 \pm 1,1$ à $18,5 \pm 4,0 \mu\text{m}$; Figure VII.3-4a). La ISO₂ ne varie pas dans le temps, de plus il n'y a pas de différence entre les mesures réalisées dans le striatum controlatéral et les tumeurs non traitées (respectivement, 68 ± 2 vs $71 \pm 2 \%$; moyenne de tous les temps). A tous les stades de croissance du modèle 9L on observe des valeurs élevées de prise de contraste, quelque soit l'agent de contraste utilisé (P846 ou Gd-DOTA) (Figure VII.3-4e-f).

VII.3.2.3 Effet de la MRT sur les paramètres IRM

Entre D9_(T-1) et D18_(T8), on n'observe pas de différence significative pour chacun des paramètres estimés par IRM entre les groupes MRT et non traité. Au dernier jour d'observation (D55_(T45)) on observe une diminution des valeurs moyennes d'ADC, ISO₂, BVf, AUC_{P846} et AUC_{Gd-DOTA} par rapport aux valeurs du même groupe à D18_(T8) (respectivement, ADC : 888 ± 140 versus $1058 \pm 47 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, ISO₂ : 34 ± 11 versus $61 \pm 6 \%$, BVf : $3,8 \pm 1,0$ versus $5,3 \pm 0,7$, AUC_{P846} : $0,5 \pm 0,3$ versus $2,9 \pm 1,4$ a.u. et AUC_{Gd-DOTA} : $1,8 \pm 0,7$ versus $5,0 \pm 1,4$ a.u ; Figure VII.3-4).

VII.3.2.4 Effet du Sorafenib sur les paramètres IRM

Le traitement des tumeurs 9L par le sorafenib n'induit aucune modification des

paramètres ADC et VSI par rapport aux tumeurs non traitées (Figure VII.3-4ad). En revanche on observe une diminution de la ISO_2 , du BVf ainsi que de l' AUC_{P846} entre $D9_{(T-1)}$ et $D15_{(T5)}$ par rapport aux tumeurs non traitées (à $D15_{(T5)}$, ISO_2 : 54 ± 5 vs 68 ± 4 % ; BVf : $3,4 \pm 0,7$ vs $5,1 \pm 0,5$ % et AUC_{P846} : $12,1 \pm 0,5$ vs $43,3 \pm 0,2$ u.a., respectivement pour les tumeurs des groupes SORA et non traité; Figure VII.3-4b-c-e). Les valeurs du BVf et de l' AUC_{P846} des tumeurs du groupe SORA tendent vers des valeurs proches du striatum controlatéral (à $D15_{(T5)}$, BVf : $3,4 \pm 0,7$ vs $2,8 \pm 0,4$ % et AUC_{P846} : $12,1 \pm 0,5$ vs proche de zéro (vaisseaux non perméables) ; respectivement pour les tumeurs traitées et le tissu controlatéral; Figure VII.3-4c-e). En revanche, durant tout le suivi on n'observe pas de différence significative entre les valeurs d' $AUC_{Gd-DOTA}$ mesurée dans les tumeurs traitées au Sorafenib et les tumeurs non-traitées (Figure VII.3-4f). Cette différence de prise rehaussement de contraste entre les deux agents de contraste sera détaillée dans les résultats 2 de cette étude à la page 164.

La ISO_2 qui était identique à celle du tissu controlatéral avant traitement au Sorafenib diminuent jusqu'à atteindre des valeurs non-physiologiques (à $D15_{(T5)}$, ISO_2 : 54 ± 5 vs 68 ± 5 % ; respectivement pour les tumeurs traités et le tissu controlatéral; Figure VII.3-4b).

VII.3.2.5 Effet du double traitement sur les paramètres IRM

Entre $D9_{(T-1)}$ et $D15_{(T5)}$, on n'observe pas de différence significative entre les valeurs des paramètres estimés par IRM entre les groupes SORA et MRT+SORA, excepté pour les valeurs de ISO_2 (Figure VII.3-4). En effet, entre $D9_{(T-1)}$ et $D15_{(T5)}$ la diminution des valeurs de ISO_2 observée dans le groupe MRT+SORA est plus importante que la diminution déjà observée dans le groupe SORA (passant respectivement de, 67 ± 10 à 41 ± 7 % versus 72 ± 5 à 54 ± 5 % ; Figure VII.3-4b)

A $D25_{(T15)}$, les valeurs d'ADC, VSI et d' $AUC_{Gd-DOTA}$ mesurées dans les tumeurs doublement traitées diminuent par rapport aux valeurs de ce même groupe à $D15_{(T5)}$ (ADC : 1088 ± 55 à 823 ± 121 $\mu m^2.s^{-1}$, VSI : $15,4 \pm 2,7$ à $10,7 \pm 1,5$ μm et $AUC_{Gd-DOTA}$: $3,6 \pm 1,6$ à $1,3 \pm 1,0$ a.u. ; Figure VII.3-4a-d-f). Les valeurs de ISO_2 et d' AUC_{P846} restent stables. En ce qui concerne le BVf, on observe une augmentation de ce paramètre $D25_{(T15)}$, dans les animaux doublement traités par rapport au animaux du même groupe à $D15_{(T5)}$ (passant respectivement de $3,4 \pm 0,3$ à $4,7 \pm 0,8$ %; Figure VII.3-4c).

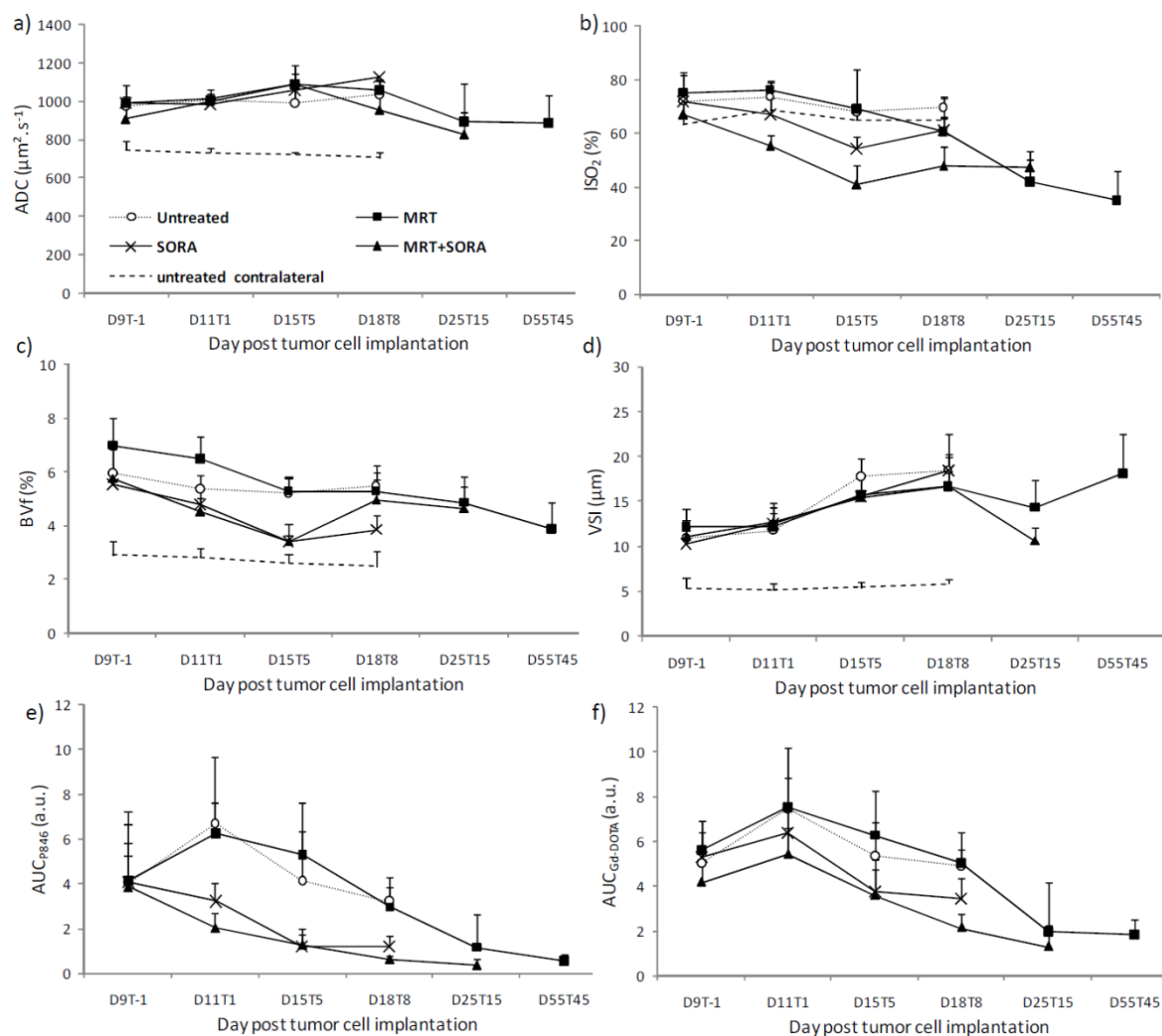


Figure VII.3-4 Evolution des différents paramètres estimés par IRM au cours du temps dans les tumeurs pour chacun des groupes. Les valeurs des paramètres ADC (a), ISO_2 (b), BVf (c), VSI (d), AUC_{p846} (e) et $\text{AUC}_{\text{Ga-DOTA}}$ (f) présentées sont les moyennes $\pm$ écart-type des tumeurs des groupes non traité (cercle blanc), MRT (carré noir), SORA (croix noire), MRT+SORA (triangle noir). Les lignes en pointillés représentent les moyennes $\pm$ écart-type des valeurs du striatum controlatéral du groupe non traité.

VII.3.2.6 Discussion / conclusion

Un des objectifs de l'étude était d'évaluer la sensibilité des différents paramètres IRM vis-à-vis de différents traitements seuls ou combinés sur les tumeurs 9L. Nos résultats montrent que tous les paramètres sont sensibles aux différents traitements. La cinétique de ces modifications au sein des tumeurs est dépendante du traitement appliqué.

Le traitement au Sorafenib induit sur les tumeurs syngéniques 9L des effets semblables (ralentissement de la croissance tumorale, diminution du BVf et de la perméabilité des vaisseaux) à ceux observés sur le modèle de tumeur d'origine humaine (U-87 MG) présentés dans l'étude III. La diminution du BVf, et l'augmentation constante du VSI durant

ce suivi indique une diminution de la densité vasculaire au sein des tumeurs traitées au Sorafenib. La diminution de la ISO_2 constatée dans ces mêmes tumeurs peut être une conséquence de ces altérations de la vascularisation.

Aucun des paramètres IRM n'est modifié dans la 1^{ère} semaine après traitement par MRT croisée et ce malgré un arrêt de la croissance tumorale. A plus long terme après radiothérapie, nous montrons une diminution dans les tumeurs de tous les paramètres IRM excepté le VSI qui ne change pas. Les animaux du groupe MRT meurent alors qu'ils ne présentent que des tumeurs de petites tailles. Des hypothèses concernant ce phénomène sont présentées au §VII.3.3.2.1 page154.

L'évolution des paramètres IRM estimés pour les tumeurs doublement traitées est comparable à l'évolution de tous les paramètres du groupe SORA durant la 1^{ère} semaine après le début des traitements (diminution du BVf, AUC_{P846} et ISO_2). Durant la 2^{ème} semaine, toutes les valeurs des paramètres IRM mesurées dans les tumeurs doublement traitées sont identiques aux paramètres estimés dans le groupe MRT. Il est paradoxal de constater, que les animaux de ce groupe meurent alors qu'ils présentent des tumeurs de petites tailles. A l'heure actuelle nous n'avons pas d'explications claires pour expliquer ce phénomène. Il serait intéressant d'étudier plus en détails les données de ce groupe afin de déterminer les causes exactes de la mort de ces animaux (*in vivo* : les paramètres IRM de toutes les ROIs et *ex vivo* en réalisant des analyses protéiques et histologiques).

L'analyse de ces données a soulevé deux questions méthodologiques qui nous conduisent à être prudents sur les interprétations de certains temps. En effet, on a constaté que les tumeurs 9L traitées ou non étaient très hétérogènes. Une analyse basée sur la moyenne $\pm$ écart-type sur des ROIs risque donc de nous faire perdre des informations utiles. On reviendra sur ce problème d'hétérogénéité dans un prochain chapitre (§VII.3.6 page 174). Cette hétérogénéité joue sûrement un rôle dans le nombre de pixels exclus au cours de cette étude (valeurs des paramètres non physiologiques ou hors des modèles mathématiques utilisés). En effet, on observe que le nombre de ces pixels augmente avec la taille des tumeurs non traitées et avec le temps pour les tumeurs traitées (Tableau VII.3-2 à la page 148). Il serait intéressant d'étudier plus en détails les données pour déterminer quel paramètre est le plus restrictif (parmi les quatre qui interviennent dans les critères d'exclusion) afin d'en identifier les causes et éventuellement pouvoir réduire le nombre de pixels exclus.

VII.3.3 Résultat 2 : Impact de la MRT sur la vascularisation saine et tumorale

VII.3.3.1 Effets de la MRT sur la prolifération cellulaire

Les immunomarquages du Ki67 et les colorations H&E révèlent que la MRT induit des dommages tissulaires à partir de D15_(T5) par rapport au groupe non traité. En effet, dans les tumeurs des animaux irradiés, on observe une diminution de la densité cellulaire (sur les colorations H&E ; Figure VII.3-5b-e) et de la prolifération cellulaire (proportion des cellules tumorales positives au marquage Ki67 ; Figure VII.3-5j-m). Des cellules tumorales géantes sont aussi observées (Figure VII.3-5e-f). A D25_(T15), le tissu tumoral irradié est fortement désorganisé, présentant un polymorphisme cellulaire et des régions nécrotiques au cœur des tumeurs (Figure VII.3-5g). Seules quelques cellules en division sont trouvées à la périphérie des tumeurs (Figure VII.3-5o). Sur 2 des 3 animaux observés par immunohistologie à D55_(T45), il n'est pas possible de délimiter une tumeur. Inversement, le 3^{ème} rat présente une tumeur, avec de nombreuses cellules positives pour le marqueur Ki67, envahissant l'ensemble de l'hémisphère ipsilatéral (Figure VII.3-5p).

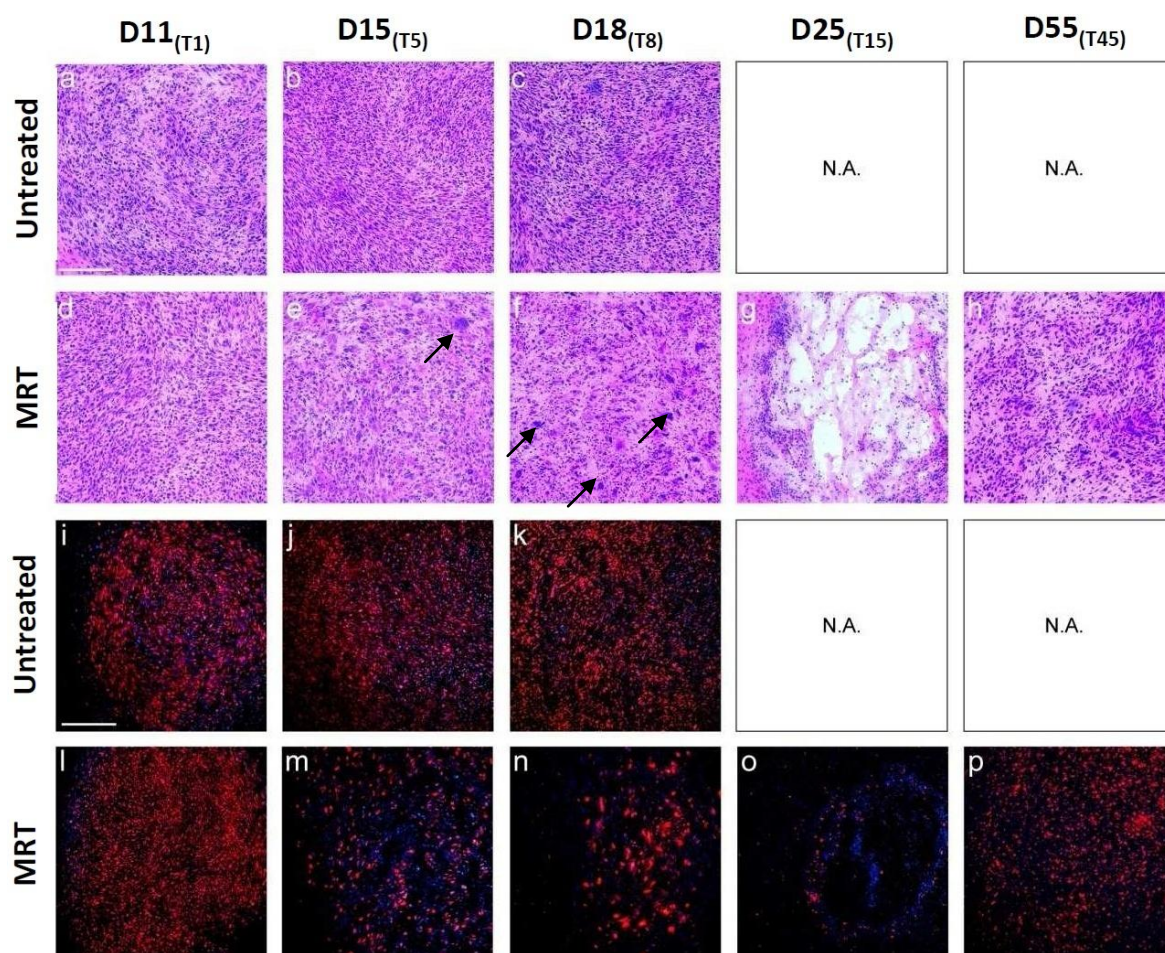


Figure VII.3-5 Photos de colorations H&E (a-h) et d'immunomarquage du Ki67 (i-p) représentatives d'animaux des groupes non traité (« *untreated* ») et MRT en fonction du temps. Les flèches noires pointent des cellules tumorales géantes. La fluorescence rouge représente le marquage Ki67 et bleue la contre-coloration des noyaux au DAPI. Barre d'échelle = 200 µm.

VII.3.3.2 Effets de la MRT sur les vaisseaux sains et tumoraux

VII.3.3.2.1 Effets de la MRT sur les paramètres IRM

VII.3.3.2.1.1 Effets de la MRT sur le BVf

Avant traitement, les BVf intra-tumoraux des deux groupes (non traité $6,0 \pm 0,8$ % et MRT $7,0 \pm 1,0$ %) sont significativement plus grands que dans les tissus ipsilatéraux et controlatéraux (respectivement $3,0 \pm 0,5$ et $2,8 \pm 0,4$ % ; moyenne des deux groupes à D9_(T-1) ; Figure VII.3-6a). Pendant tout le suivi des animaux du groupe non traité, le BVf intra-tumoral n'a pas évolué, et est resté significativement supérieur au BVf des tissus controlatéraux et ipsilatéraux (Figure VII.3-6a). Entre D11_(T1) et D55_(T45), on observe une diminution significative du BVf intra-tumoral dans le groupe MRT (passant respectivement de $7,0 \pm 1,0$ à

$3,9 \pm 1,0 \%$; $p < 0,001$; Figure VII.3-6a). A D55(T45) dans le groupe MRT, il n'y a plus de différences entre les mesures de BVf des 3 ROIs d'intérêts (controlatéral : $3,4 \pm 0,8 \%$, ipsilatéral : $4,1 \pm 0,4 \%$ et tumeur $3,9 \pm 1,0 \%$; Figure VII.3-6a).

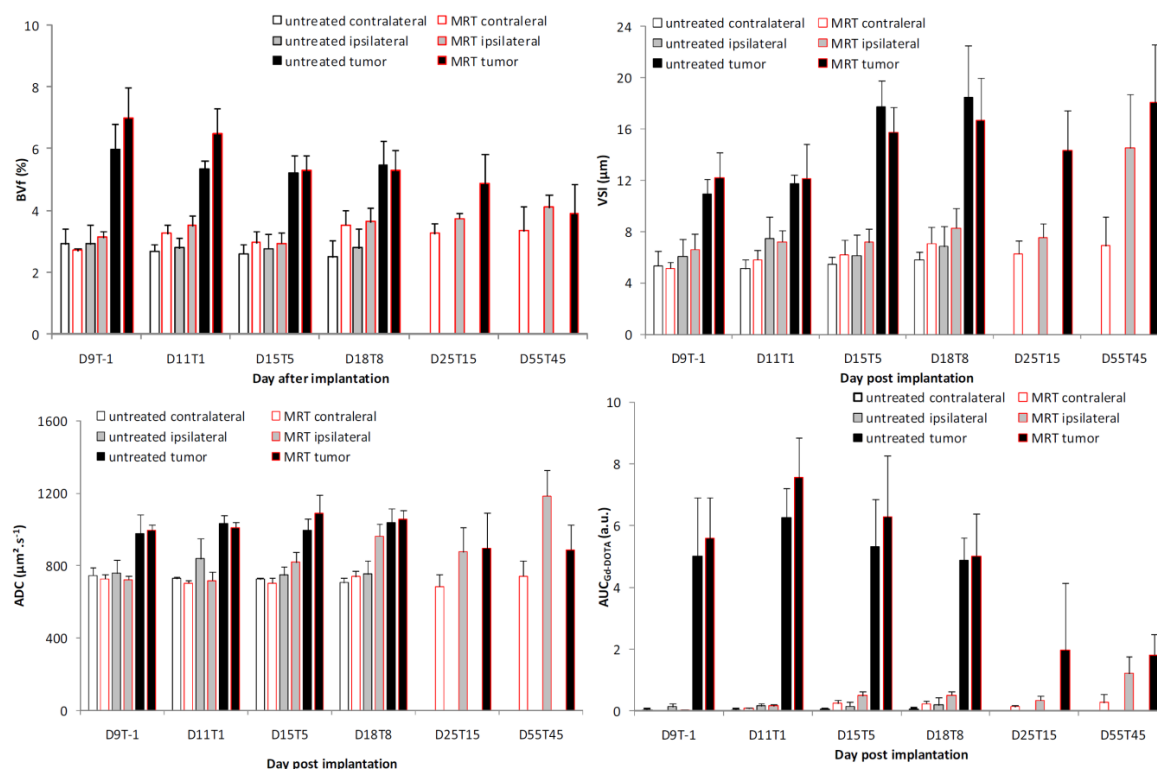


Figure VII.3-6 Mesures des paramètres cellulaires (ADC) et vasculaires (BVf, VSI et AUC_{Gd-DOTA}) par IRM. Les valeurs moyennes du BVf (a), VSI (b), ADC (c) et d'AUC_{Gd-DOTA} (d) sont présentées par : ROI controlatérale (barres blanches), ipsilatérale (barres grises) et tumorale (barres noires) et par groupe : non traité (« untreated » ; encadrement noir) et MRT (encadrement rouge). Moyenne $\pm$ écart-type.

VII.3.3.2.1.2 Effets de la MRT sur le VSI

Avant traitement, les VSI intra-tumoraux des deux groupes (non traité $11,0 \pm 1,1 \mu\text{m}$ et MRT $12,2 \pm 2,0 \mu\text{m}$) sont significativement plus grands que les valeurs de VSI dans les tissus ipsilatéraux et controlatéraux (respectivement $6,3 \pm 1,3$ et $5,3 \pm 0,9 \mu\text{m}$; moyenne des deux groupes à D9(T-1) ; Figure VII.3-6b). Entre D9(T-1) et D18(T8), on observe une augmentation des VSI intra-tumoraux similaire dans les deux groupes (passant pour les groupes non traité et MRT, respectivement de $12,2 \pm 2,0$ à $16,6 \pm 3,4 \mu\text{m}$ et de $11,0 \pm 1,1$ à $18,5 \pm 4,0 \mu\text{m}$; Figure VII.3-6b). Entre D18(T8) et D55(T45) dans le groupe MRT, aucune modification du VSI intra-tumoral n'est observée (D18(T8) : $16,6 \pm 3,4 \mu\text{m}$ et D55(T45) : $18,0 \pm 4,5 \mu\text{m}$; Figure VII.3-6b). Toujours dans le groupe MRT, entre D25(T8) et D55(T45), on observe une augmentation du VSI dans le tissu ipsilatéral, atteignant une valeur proche du VSI tumoral (à D55(T45), MRT ipsilatéral : $14,5 \pm 4,2 \mu\text{m}$ et MRT tumeur : $18,0 \pm 4,5 \mu\text{m}$; Figure VII.3-6b).

VII.3.3.2.1.3 Effet de la MRT sur l'ADC

Avant traitement, les ADC intra-tumoraux des deux groupes non traité et MRT (respectivement, 978 ± 106 et $994 \pm 34 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) sont significativement plus grands que l'ADC dans les tissus ipsilatéraux et controlatéraux (respectivement 744 ± 60 et $739 \pm 37 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$; moyenne des deux groupes à $D9_{(T-1)}$; Figure VII.3-6c). Entre $D9_{(T-1)}$ et $D18_{(T8)}$, l'ADC intra-tumoral des deux groupes reste stable. L'ADC ipsilatéral mesuré dans le groupe MRT reste stable jusqu'à $D15_{(T5)}$ puis augmente significativement par rapport à l'ADC ipsilatéral du groupe non traité. A $D18_{(T8)}$, la mesure de l'ADC ipsilatéral du groupe MRT est similaire aux valeurs relevées dans les tumeurs des deux groupes au même temps (MRT ipsilatéral : $964 \pm 67 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ versus tumeurs non traitées : $1039 \pm 78 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et MRT tumeur : $1058 \pm 47 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$; Figure VII.3-6c). Entre $D18_{(T8)}$ et $D55_{(T45)}$, l'ADC ipsilatéral du groupe MRT augmente encore, jusqu'à atteindre une valeur significativement plus grande que celles mesurées dans les tissus controlatéral et tumoral ($D55_{(T45)}$) : MRT ipsilatéral $1186 \pm 47 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ versus MRT controlatéral : $741 \pm 88 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ et MRT tumeur : $888 \pm 140 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$; Figure VII.3-6c).

VII.3.3.2.1.4 Effets de la MRT sur la perméabilité vasculaire

Avant traitement, les $\text{AUC}_{\text{Gd-DOTA}}$ intra-tumoraux des deux groupes non traité et MRT (respectivement, $5,0 \pm 1,9$ et $5,6 \pm 1,3 \text{ a.u.}$) ne sont pas différents entre eux et sont significativement plus grands que les $\text{AUC}_{\text{Gd-DOTA}}$ des tissus ipsilatéraux et controlatéraux (valeurs proches de 0; Figure VII.3-6d). Au temps $D11_{(T1)}$ et $D15_{(T5)}$, les $\text{AUC}_{\text{Gd-DOTA}}$ intra-tumoraux du groupe MRT ont tendance à être supérieurs aux $\text{AUC}_{\text{Gd-DOTA}}$ intra-tumoraux du groupe non traité, sans pour autant être significatifs (Figure VII.3-6d). Entre $D18_{(T8)}$ et $D55_{(T45)}$, dans le groupe MRT, on observe une diminution significative de l' $\text{AUC}_{\text{Gd-DOTA}}$ intra-tumoral (passant respectivement de $5,0 \pm 1,4$ à $1,8 \pm 0,6 \text{ a.u.}$; $p < 0,01$; Figure VII.3-6d). Dans le même temps on observe une augmentation significative de l' $\text{AUC}_{\text{Gd-DOTA}}$ mesuré dans le tissu ipsilatéral (passant respectivement de $0,05 \pm 0,01$ à $1,2 \pm 0,6 \text{ a.u.}$ entre $D18_{(T8)}$ et $D55_{(T45)}$; $p < 0,01$; Figure VII.3-6d).

VII.3.3.2.2 Effets de la MRT sur les paramètres histologiques et protéiques

VII.3.3.2.2.1 Effet de la MRT sur le réseau vasculaire

L'immunomarquage du collagène IV et de RecA-1 permet de mettre en évidence le réseau vasculaire sain et tumoral. L'analyse des coupes immunohistologiques montre une distribution homogène des capillaires de petits diamètres dans le tissu sain (Figure VII.3-7a-c) alors que les tumeurs non traitées présentent un réseau vasculaire chaotique, non homogène (distance inter-vaisseaux variable) formé de gros vaisseaux épars (Figure VII.3-7n-p). Aucune différence de morphologie des vaisseaux n'a pu être mise en évidence au niveau des tissus controlatéraux du groupe MRT (irradiés unidirectionnellement) jusqu'à 55 jours post-implantation par rapport aux tissus controlatéraux du groupe non traité (Figure VII.3-7d-h). Tous ces vaisseaux présentent la double coloration collagène IV – RecA-1 et leur densité ne semble pas être modifiée par la MRT. En revanche, la morphologie des vaisseaux sanguins situés dans le tissu sain ipsilatéral du groupe MRT (doublement irradié) change progressivement au cours du temps. A D55_(T45), ce réseau vasculaire présente une importante désorganisation avec une tortuosité vasculaire accrue (Figure VII.3-7m). Le marquage du collagène IV permet d'observer la présence d'entités beaucoup plus étroites que les vaisseaux observés dans le tissu controlatéral du groupe non traité (Figure VII.3-7m *versus* Figure VII.3-7a-c). Ces entités sont caractérisées par une absence du marquage des cellules endothéliales au RecA-1 (Figure VII.3-7m). On observe aussi la présence de vaisseaux de taille normale marqués au collagène IV mais avec un faible marquage au RecA-1.

A D11_(T1), les vaisseaux observés au niveau des tumeurs des groupes non traités et MRT sont moins nombreux, de taille plus importante et de répartition moins régulière que les vaisseaux du tissu controlatéral du groupe non traité au même jour d'observation (Figure VII.3-7n-u *versus* Figure VII.3-7a). Entre D11_(T1) et D18_(T8), la densité vasculaire semble diminuer quel que soit le groupe (Figure VII.3-7n-s). Cependant, à partir du 5^{ème} jour post irradiation, l'intensité du marquage RecA-1 dans les tumeurs devient de plus en plus faible, par rapport au marquage collagène IV. A partir de D18_(T8), la majorité des vaisseaux tumoraux irradiés ne présente plus de marquage RecA-1 (Figure VII.3-7s-u et Figure VII.3-8).

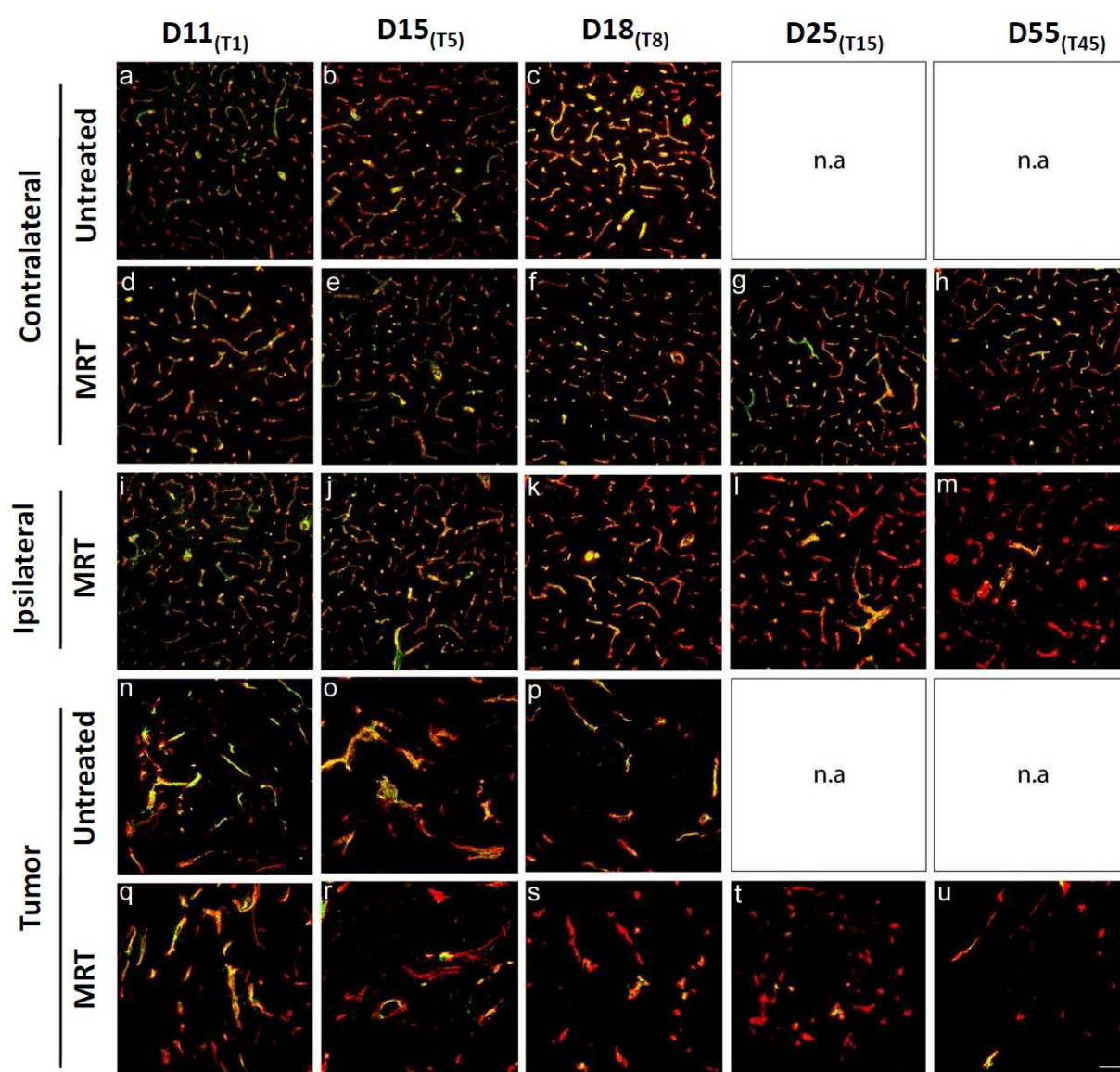


Figure VII.3-7 Immunomarquage des cellules endothéliales (RecA-1 ; en vert) et de la lame basale des vaisseaux (collagène IV ; en rouge), à différents temps post implantation d'un gliosacrome 9L traité par MRT ou non traité (« *untreated* »). Barre d'échelle : 200 μ m.

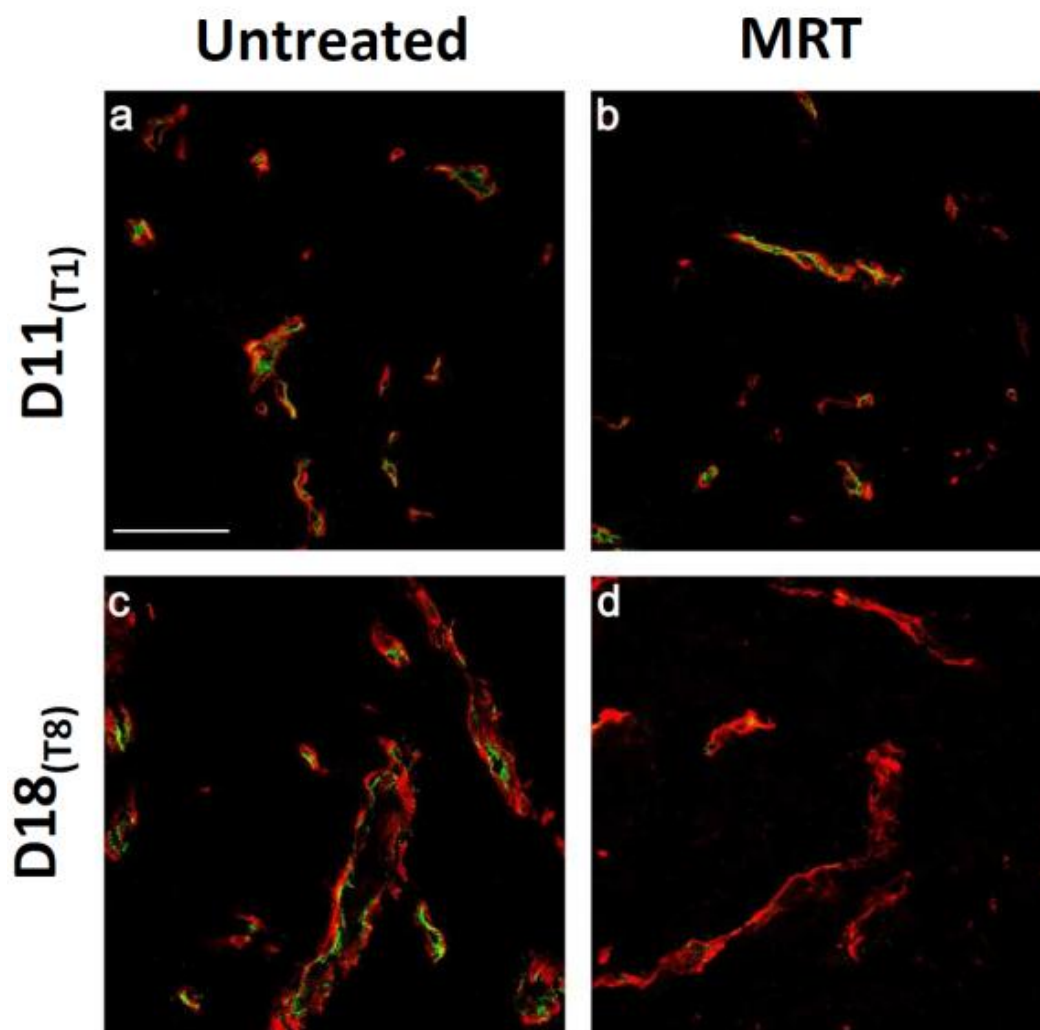


Figure VII.3-8 Images confocales représentatives de l'immunomarquage des cellules endothéliales (RecA-1 ; en vert) et de la lame basale des vaisseaux (collagène IV ; en rouge) des tumeurs des groupes non traité (« untreated ») et MRT à D11_(T1) et D18_(T8). Barre d'échelle : 70 μ m.

VII.3.3.2.2 Effets de la MRT sur l'expression du VEGF

L'expression de la protéine VEGF a été analysée par immunoblot dans les 3 régions d'intérêts : striatum controlatéral, hémisphère ipsilatéral à la tumeur (en excluant la tumeur) la tumeur. Aucune expression de VEGF n'est détectée dans les tissus controlatéraux des rats non traités (Figure VII.3-9a-b). Dans le tissu controlatéral des animaux du groupe MRT (tissus qui sont irradiés unidirectionnellement), l'expression de VEGF est faiblement détectée à partir de D15_(T5) et augmente progressivement jusqu'au dernier jour de l'étude (D55_(T45)) (Figure VII.3-9a-b). Pour les tissus ipsilatéraux du groupe MRT (tissus doublement irradiés), le VEGF est présent plus précocement et est détectable dès D11_(T1) (Figure VII.3-9a-b). Dans le groupe MRT à D55_(T45), l'expression de VEGF dans le tissu ipsilatéral est 2,5 fois supérieure à celle du tissu controlatéral (Figure VII.3-9b).

Au cours de la croissance tumorale, l'expression de la protéine VEGF n'est que très peu modifiée (petite augmentation à D18_(T8)) dans les animaux du groupe non traité. En revanche, entre D11_(T1) et D18_(T8), on observe une augmentation significative de l'expression de VEGF au cours du temps dans le groupe MRT par rapport au groupe non traité (MRT tumeur : passant de $0,5 \pm 0,2$ à $1,2 \pm 0,2$ *versus* tumeur non traitée : $0,5 \pm 0,2$ à $0,8 \pm 0,2$; Figure VII.3-9b). Au temps D25_(T15) et D55_(T45) dans les tumeurs du groupe MRT, l'expression relative de VEGF augmente significativement par rapport au temps D18_(T8), (l'expression est respectivement 1,35 et 1,8 fois plus important à D25_(T15) et D55_(T45) par rapport à D18_(T8); Figure VII.3-9b).

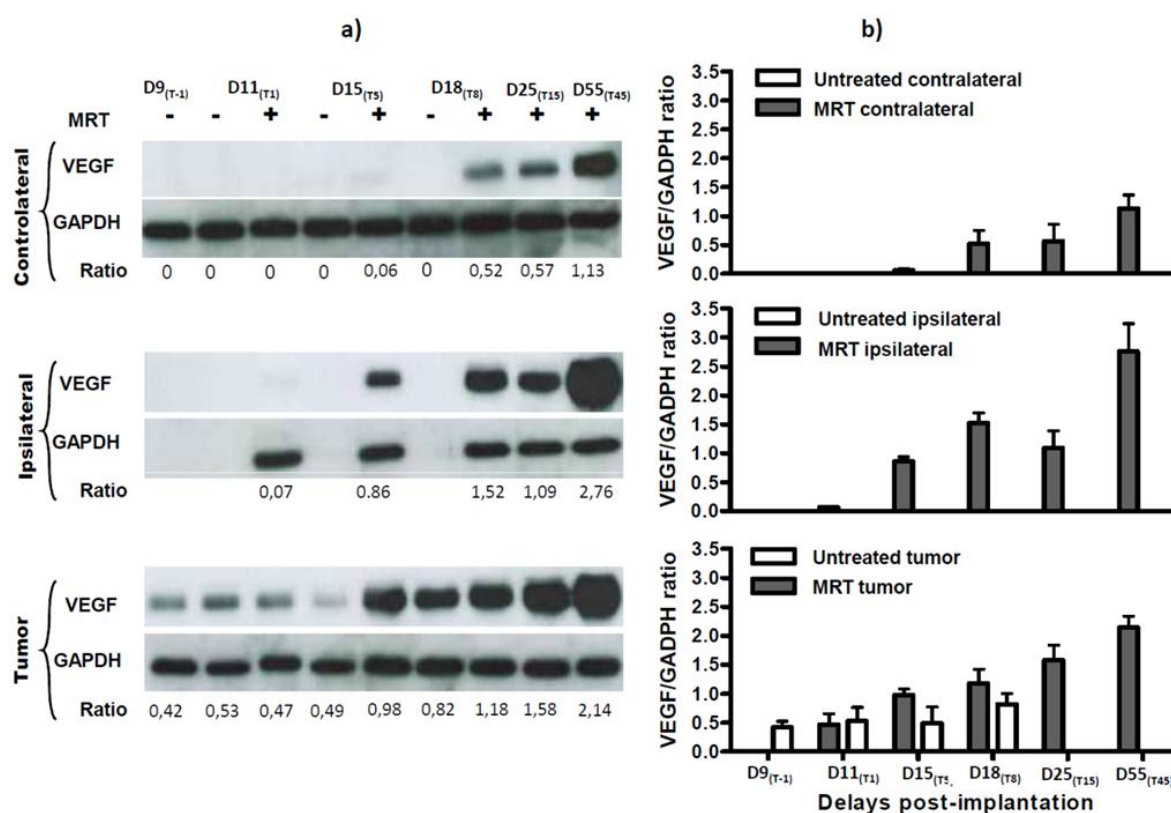


Figure VII.3-9 Suivi de l'expression des protéines VEGF par immunoblot dans les tissus controlatéraux, ipsilatéraux et tumoraux en fonction du temps et du groupe. a) Membrane représentative (des 3 échantillons par temps, ROI et groupe) de l'expression de VEGF dans les tissus controlatéraux, ipsilatéraux et tumoraux en fonction du temps et du groupe. Les ratios d'expression représentent la moyenne d'expression obtenue par rapport à l'expression de la protéine contrôle (GADPH). b) histogramme représentant le taux d'expression de VEGF réalisé à partir des immunoblots de 3 échantillons par temps, par ROI et par groupe. Moyenne $\pm$ ET.

VII.3.3.3 Discussion

Les réponses cellulaires et vasculaires de la radiothérapie synchrotron (MRT) sur le modèle de gliosarcome 9L implanté en orthotopique ont été étudiées par IRM et par biologie (histologie et immunoblot). Le protocole d'irradiation croisée utilisé dans cette étude augmente de manière significative la médiane de survie des rats irradiés (65 jours) comparativement aux animaux témoins non irradiés (20 jours, $p = 0,0003$) (résultats présentés au §VII.3.1.1 page 145). L'IRM anatomique montre aussi une inhibition de la croissance des tumeurs des animaux irradiés (résultats présentés au §VII.3.1.2 page 146). Les observations histopathologiques montrent que la MRT induit une diminution de la densité cellulaire et de la prolifération des cellules tumorales ainsi qu'une perte des cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux à partir du 5^{ème} jour après MRT par rapport aux tumeurs non traitées. Entre le 8^{ème} et le 45^{ème} jour après MRT, l'IRM montre une petite diminution du BVf intra-tumoral dans le groupe MRT, alors que la microvascularisation (marquage des cellules endothéliales et mesure de BVf) du tissu controlatéral n'est pas affectée. En revanche, dans les tissus ipsilatéraux, l'analyse des paramètres IRM (BVf, VSI, ADC et AUC_{Gd-DOTA}), des immunomarquages et des immunoblots du VEGF révèlent que la MRT endommage la vascularisation du tissu cérébral doublement irradié.

Dans l'étude présentée, la croissance tumorale est inhibée pendant plusieurs semaines après MRT, comme le montrent les mesures des volumes tumoraux à partir des images IRM anatomiques (résultats présentés au §VII.3.1.2 page 146). Le ralentissement de la croissance tumorale est associé à une réduction significative de la proportion de cellules tumorales en prolifération. En effet, la fraction de cellules Ki67 positives dans la tumeur diminue progressivement dès le 5^{ème} jour après MRT. Deux semaines après la MRT, de grandes régions nécrotiques sont observées dans le cœur des tumeurs.

Notre étude montre que plusieurs rats porteurs de gliosarcome 9L survivent pendant une très longue période après la MRT. Ces résultats sont en accord avec la littérature (Dilmanian et al. 2002). Dans cette étude, il est suggéré que l'effet majeur de la MRT sur la tumeur serait un effet préférentiel de la MRT unidirectionnelle sur les vaisseaux sanguins tumoraux. Leur destruction conduirait alors à une nécrose de cellules tumorales. Dans les résultats de notre étude, on n'observe aucun effet de la MRT sur les paramètres BVf et VSI du réseau vasculaire tumoral à court terme après traitement D11_(T1) et D18_(T8) entre les tumeurs irradiées et non irradiées. De plus, au cours de cette période dans les tumeurs irradiées, le

marquage RecA-1 des cellules endothéliales, n'est pas détecté dans toutes les structures vasculaires marquées par le collagène IV de la lame basale dans le groupe MRT, alors que les vaisseaux tumoraux du groupe non traité sont doublement marqués. Cette diminution de densité du marquage RecA-1 indique probablement une perte de cellules endothéliales dans les tumeurs irradiées. Folberg et al. ont décrit que des entités pseudo-vasculaires composées de protéines matricielles (collagène IV et VI, laminine, protéoglycannes de type héparane sulfate...) semblent capables d'irriguer temporairement les tumeurs (mimétisme vasculaires) (Folberg et al. 2004). Pendant la 2^{ème} semaine après la MRT, la nécrose tumorale observée en histologie est corrélée avec la diminution du BVf et de l'AUC_{Gd-DOTA} qui fait suite à la perte de marquage des cellules endothéliales.

L'utilisation de microfaisceaux de 50 µm de largeur a considérablement amélioré les résultats thérapeutiques de la MRT (Serduc et al. 2009, Serduc et al. 2009) et la médiane de survie obtenue dans cette étude est l'une des meilleures obtenues pour le modèle de gliosarcome 9L. Ce modèle particulièrement radio-résistant nécessite un dépôt de dose très élevé (400 Gy dans notre étude) pour obtenir un impact significatif sur les tumeurs. Une dose de 40 Gy ne contrôle que 50 % des tumeurs 9L (Kim et al. 1999). Dans notre étude, les animaux du groupe MRT meurent avec des petites tumeurs (à l'exception d'un rat). Les causes sous-jacentes à ce phénomène ne sont pas encore très claires. Cependant, on observe une augmentation significative d'ADC, VSI, BVf et de l'AUC_{Gd-DOTA} dans les tissus ipsilatéraux aux tumeurs (tissus doublement irradiés) des rats du groupe MRT à des temps tardifs après irradiation (D25_(T15) et D55_(T45)). L'étude histologique montre aussi une forte désorganisation du réseau vasculaire dans cette région non tumorale. En effet, les vaisseaux observés apparaissent tortueux et plus grands que les vaisseaux présents dans le striatum controlatéral. Des entités pseudo-vasculaires, sont fréquemment observées avec un marquage RecA-1 diffus. Ces observations sont en accord avec l'augmentation importante du VSI à D55_(T45). Ces résultats tendent à montrer que la MRT peut remodeler les vaisseaux sanguins du cerveau sain exposés à une double irradiation. Les résultats de notre étude sont cohérents avec les observations de Laissue et al. qui ont montré des dommages cérébraux, vasculaires et anatomiques, limités aux régions doublement irradiées, alors que seulement des dégâts mineurs sont produits dans des zones du cerveaux simplement irradiées (Laissue et al. 1998). Nous pouvons donc supposer que les effets néfastes de la radiothérapie croisée sur les tissus non tumoraux peuvent induire la mort des animaux du groupe MRT.

La surexpression de la protéine VEGF dans les différentes régions d'intérêts est

cohérente avec le remodelage vasculaire observé en IRM et en histologie. En effet, le VEGF joue un rôle clé dans l'angiogenèse (Jain et al. 2007) et est produit dans de nombreuses pathologies des tumeurs cérébrales, mais aussi après une exposition à un rayonnement (Jiang et al. 2004, Kim et al. 2004). Dans notre étude, une augmentation progressive de l'expression du VEGF est détectée dans le tissu tumoral, ainsi que dans les tissus non tumoraux. Toutefois, la cinétique et la quantité de protéine produite semblent dépendre de la dose d'irradiation (exposition à l'irradiation uni- ou bidirectionnelle) et l'état du tissu (normal ou tumoral). Dans l'hémisphère ipsilatéral, le VEGF, est détectable dès le 2^{ème} jour, après la MRT et atteint, le 5^{ème} jour post MRT, une expression comparable à celle mesurée dans les tumeurs non irradiées. Le VEGF semble donc impliqué dans la phase précoce de la réponse cérébrale à la MRT. La surexpression du VEGF dans l'hémisphère ipsilatéral après MRT peut être corrélée à l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins ($AUC_{Gd-DOTA}$) et l'augmentation de l'ADC conduisant à la présence d'un important œdème cérébral.

VII.3.3.4 Conclusion

Nous avons analysé ici les effets de la MRT sur un modèle de gliosarcome 9L implanté dans le cerveau de rat. La configuration de l'irradiation utilisée (2 tirs croisés avec une dose d'entrée de 400 Gy, des microfaisceaux de 50 μ m de largeurs et espacés de 200 μ m) s'est avérée particulièrement efficace et a réduit significativement la croissance tumorale au cours des 7 semaines qui ont suivi le traitement. Les premiers effets de la MRT sont cytotoxiques avec une diminution significative de la densité des cellules endothéliales et du nombre de cellules en mitose dans les tumeurs. Au cours de la 2^{ème} semaine après traitement, une composante vasculaire a contribué à la régression tumorale, avec une diminution significative du BVf et de la perméabilité des vaisseaux tumoraux entre D18_(T8) et D55_(T45). A des délais plus longs (à partir de la 2^{ème} semaine après MRT), les analyses IRM révèlent une augmentation du BVf, VSI, $AUC_{Gd-DOTA}$ et ADC des tissus cérébraux doublement irradiés induisant un œdème cérébral sévère. Tous ces résultats sont corrélés aux études histologiques, immunohistotogiques et protéiques. Malgré ces effets néfastes, notre protocole d'irradiation a augmenté la médiane de survie des rats porteurs de gliosarcome 9L par un facteur de 3,25 par rapport aux animaux non-traités.

VII.3.4 Résultat 3 : Apport de la caractérisation de la perméabilité avec 2 agents de contraste

VII.3.4.1 Au niveau des tumeurs

Avant traitement ($D9_{(T-1)}$), les vaisseaux tumoraux de tous les groupes sont autant perméables au P846 (Figure VII.3-10) et ont la même AUC moyenne (Figure VII.3-11a). Quel que soit le temps après le début des traitements ($D11_{(T1)}$, $D15_{(T5)}$ et $D18_{(T8)}$), l'AUC_{P846} moyenne intra-tumorale du groupe MRT est comparable à celle mesurée dans le groupe non traité (Figure VII.3-10a-b et Figure VII.3-11a). A *contrario*, les AUC_{P846} estimées dans les tumeurs des groupes SORA et MRT+SORA sont significativement plus faibles que celles du groupe non traité dès un jour après le début des traitements et restent stables à $D15_{(T5)}$, $D18_{(T8)}$ (Figure VII.3-10a-c-d et Figure VII.3-11a, $p < 0,01$).

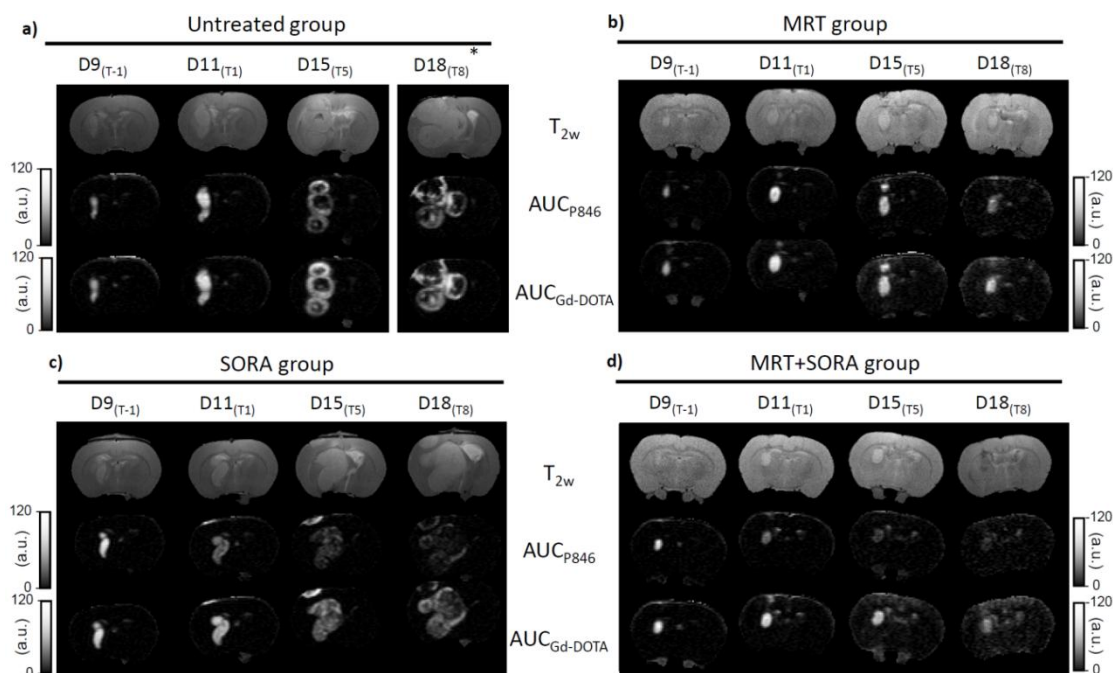


Figure VII.3-10 Images anatomiques (T_{2w}) et cartes des paramètres AUC_{P846} et $AUC_{Gd-DOTA}$ représentatives d'un animal suivi du groupe (a) non traité (« untreated »), (b) MRT, (c) SORA et (d) MRT+SORA en fonction du temps.

* les images présentées pour le groupe non traité (« untreated ») à $D18_{(T8)}$ proviennent d'un animal différent des images présentées pour les 3 temps précédents.

À tous les temps, les $AUC_{Gd-DOTA}$ mesurées dans les tumeurs des groupes traités sont du même ordre que celles mesurées dans le groupe non traité, excepté à $D18_{(T8)}$. En effet, à ce temps, une baisse significative de l'AUC_{Gd-DOTA} est mesurée dans la ROI tumeur des groupes

MRT+SORA par rapport aux données du groupe non traité (Figure VII.3-10 et Figure VII.3-11b, $p < 0,01$).

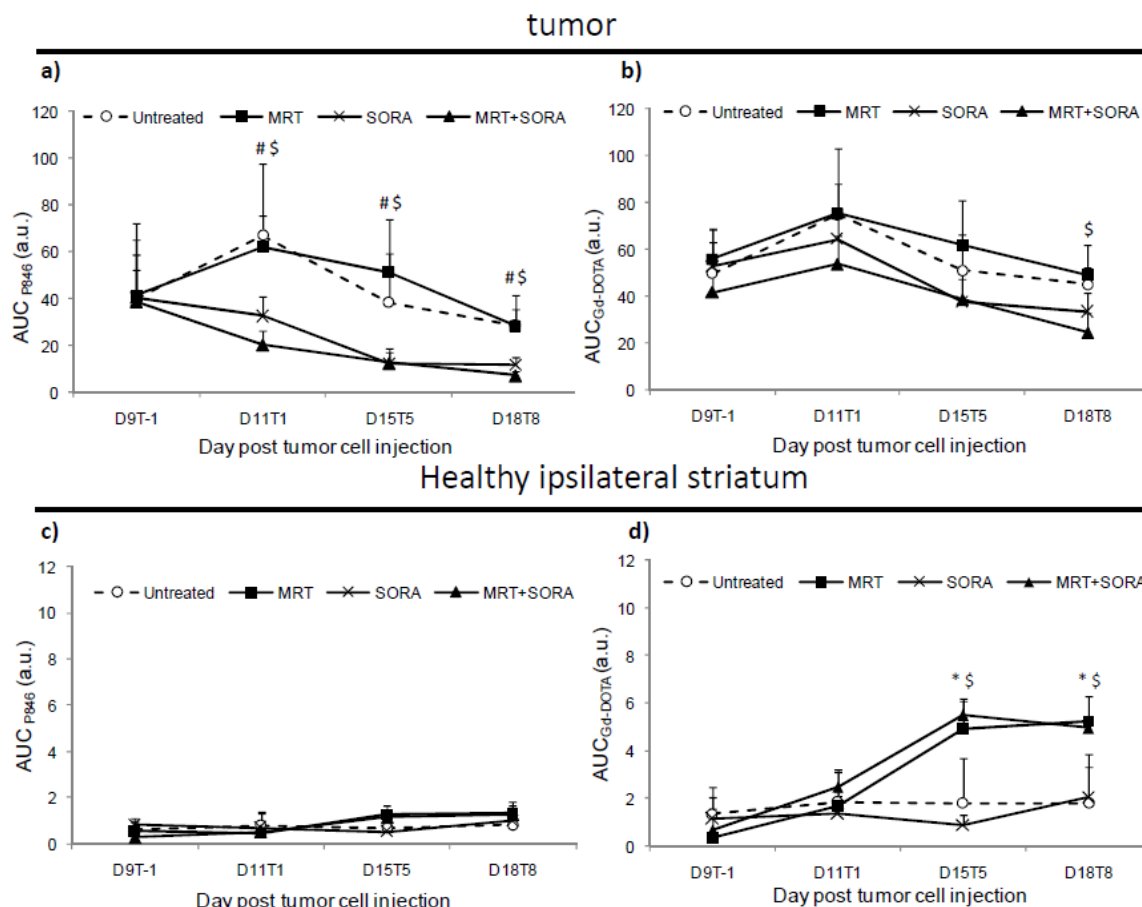


Figure VII.3-11 Quantification du rehaussement du signal RMN induit par l'injection de 2 agents de contraste différents (P846 et Gd-DOTA) dans 2 ROIs différentes (tumeur et hémisphère ipsilatéral « sain ») en fonction des jours d'observation et des 4 groupes. Les valeurs moyennes de l'AUC_{P846} (a-c) et AUC_{Gd-DOTA} (b-d) des ROIs tumeur (a-b) et de l'hémisphère ipsilatéral (c-d) sont présentées. Moyenne ± écart-type. $P < 0.01$:

* groupe MRT versus non traité (« untreated »); #, groupe SORA versus non traité et \$, groupe MRT+SORA versus non traité.

La Figure VII.3-12a-d montre les profils d'intensité du signal RMN mesuré sans une tumeur de chaque groupe à D15(T5). Après l'injection du 1^{er} agent de contraste (P846), l'intensité du signal dans les tumeurs augmente rapidement jusqu'à atteindre un plateau environ 3 min après l'injection (correspondant à la 15^{ème} image sur les graphiques de la Figure VII.3-12a-d). Ce plateau diminue très légèrement dans les groupes non traité et MRT (Figure VII.3-12a-b) et inversement, il augmente lentement pour les groupes SORA et MRT+SORA (Figure VII.3-12c-d). Toujours dans la ROI tumeur à D15(T5), l'augmentation du signal induit par l'injection du P846 est moins importante dans les groupes traités par l'anti-angiogénique (SORA et MRT+SORA; Figure VII.3-12c-d) que dans les groupes non traité et MRT (Figure VII.3-12a-b). Pour chacun des groupes, on observe distinctement le rehaussement de signal

induit par l'injection du Gd-DOTA et cette augmentation semble plus lente dans les groupes SORA et MRT+SORA par rapport aux groupes non traité et MRT (Figure VII.3-12a-d).

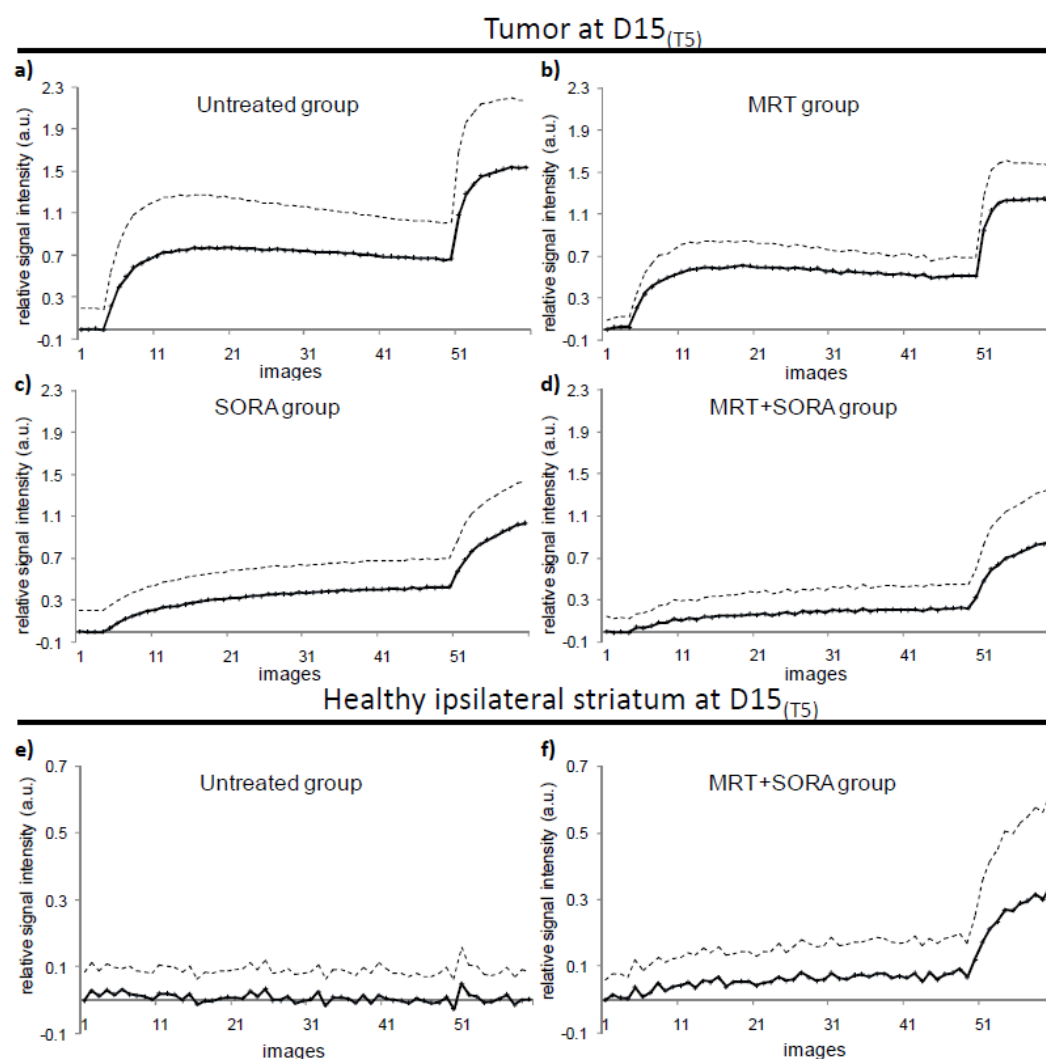


Figure VII.3-12 Courbes représentatives de l'évolution de l'intensité du signal au temps D15_(T5) au sein d'une ROI tumeur de chacun des groupes (a-d) et d'une ROI de l'hémisphère ipsilatéral des groupes non traité (« *untreated* ») et MRT+SORA (e-f). Pour plus de clarté, chaque courbe a été normalisée par l'intensité de la première image. Les images 4 et 51 correspondent à l'injection de P846 et Gd-DOTA, respectivement. Pour chacun des graphiques, la courbe noire représente la moyenne de l'AUC de la ROI et en pointillés son écart type.

VII.3.4.1 Au niveau de l'hémisphère ipsilatéral

Pour chaque groupe et quel que soit le jour d'observation, les vaisseaux présents dans l'hémisphère ipsilatéral ne sont pas perméables au P846 (Figure VII.3-10 et Figure VII.3-11c).

Avant traitement (D9_(T-1)), les vaisseaux de l'hémisphère ipsilatéral de tous les groupes

ne sont pas perméables au Gd-DOTA (Figure VII.3-10 et Figure VII.3-11d). En l'absence de traitement ou sous sorafenib seul, les vaisseaux de l'hémisphère ipsilatéral restent imperméables au Gd-DOTA quel que soit le jour d'observation (Figure VII.3-10a et Figure VII.3-11d). A *contrario*, aux temps D15_(T5) et D18_(T8), l'AUC_{Gd-DOTA} dans l'hémisphère ipsilatéral augmente significativement dans les groupes MRT et MRT+SORA par rapport au groupe non traité (Figure VII.3-10a-b-d et Figure VII.3-11d, $p < 0,01$).

Aucune modification de l'intensité du signal n'a été observée dans l'hémisphère ipsilatéral à D15_(T5) par le groupe non traité (et SORA ; données non présentées) en dépit de l'injection des deux agents de contraste (Figure VII.3-12e). Au même jour d'observation, dans le groupe MRT+SORA (et MRT ; données non présentées), l'intensité du signal dans l'hémisphère ipsilatéral est très légèrement rehaussée par l'injection du P846 et l'injection de Gd-DOTA augmente très nettement l'intensité du signal RMN (Figure VII.3-12e).

VII.3.4.2 Discussion

Cette étude montre que l'injection de deux agents de contraste de taille différente, dans un même protocole IRM, permet de révéler des effets biologiques différents sur l'intégrité de la paroi vasculaire induits suite à deux traitements (anti-angiogénique et MRT). En effet, un agent de contraste de faible poids moléculaire (Gd-DOTA ; 0,5 kDa) met en évidence des lésions de la BHE des vaisseaux de l'hémisphère ipsilatéral doublement irradiés. Alors que l'agent de contraste de gros poids moléculaire (P846 ; 3,5kDa) met en évidence l'effet d'un traitement anti-angiogénique sur un modèle de gliosarcome (9L).

Dans cette étude, deux points méthodologiques méritent d'être discutés. Premièrement, nous avons réalisé deux injections d'agents de contraste sur un même animal au cours d'une même acquisition de type DCE. Il est donc important d'étudier l'impact du premier agent de contraste injecté sur les mesures quantitatives du second. Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que le premier agent de contraste n'a que très peu d'impact sur les mesures du second. En effet, l'intensité du signal varie très lentement à partir de la 3^{ème} minute après injection du P846 (correspondant à la 15^{ème} image sur les graphiques de la Figure VII.3-12). Les variations de signal induites par l'injection du 2nd agent de contraste (le Gd-DOTA) sont beaucoup plus importantes par rapport à cette faible variation. Ceci suggère que le délai entre les deux injections (environ 11 min) est suffisant pour distinguer l'effet de chaque injection. La deuxième question à discuter est la méthodologie de la quantification des données DCE réalisées au cours de cette étude. Nous avons choisi une

analyse assez simple (calcul de l'aire sous la courbe de l'intensité du signal), facilement applicable dans un environnement clinique. En utilisant les données d'une carte T_1 acquises en début d'expérience (rat par rat), on aurait pu en déduire la concentration de chacun des agents de contraste extravasés. En utilisant une fonction d'entrée artérielle, on aurait même pu quantifier des constantes de transfert pour chacun des agents de contraste. Toutefois, l'influence du 1^{er} agent de contraste au cours de la 2^{ème} mesure (apparemment faible dans cette étude) soulève également la question des effets T_2 et des effets possibles de susceptibilité magnétique (effets T_2^*). Une quantification précise de la concentration des agents de contraste aurait donc été extrêmement difficile à obtenir et n'est pas nécessaire pour cette étude (chaque rat est son propre contrôle pour un même agent de contraste). Pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à ce changement d'extravasation entre les 2 agents de contraste il faudrait quantifier les différents paramètres qui influent sur la vitesse d'extravasation de l'agent de contraste :

- le débit sanguin, qui régule l'arrivée de l'agent de contraste dans les vaisseaux,
- la perméabilité de la BHE, qui régule le transfert de l'agent de contraste entre les compartiments intra- et extra-vasculaires
- la diffusion dans l'espace extra-cellulaire et extra-vasculaire qui limite également la quantité d'agent de contraste qui s'extravase au cours d'une étude de type DCE.

Bien qu'estimant de manière imparfaite la perméabilité des vaisseaux, l'AUC a été capable de décrire dans cette étude le changement induit par un anti-angiogénique et une radiothérapie synchrotron.

Dans tous les groupes avant traitement, il n'y a pas de différence significative entre l'AUC_{P846} et l'AUC_{Gd-DOTA} mesurées dans les tumeurs, bien que la dose de P846 administrée soit 8 fois moins importante que la dose de Gd-DOTA (AUC_{P846} : $4,0 \pm 2,0$ a.u. *versus* l'AUC_{Gd-DOTA} : $5,0 \pm 1,4$ a.u.; correspondant à la moyenne de tous les groupes à D9_(T-1); Figure VII.3-11a-b). Ce résultat indique qu'en injectant le P846 à 1/8^{ème} de la dose de Gd-DOTA, il est aussi efficace pour mettre en évidence la présence de tumeurs cérébrales. Avant traitement, les tumeurs de tous les groupes sont perméables au P846 alors que l'hémisphère ipsilatéral ne prend pas le contraste. Un jour après la thérapie anti-angiogénique seule ou combinée à la MRT, l'AUC_{P846} intra-tumorale est considérablement réduite et reste inférieure à celle des deux groupes n'ayant pas reçu la drogue anti-angiogénique. Nos résultats sont cohérents avec la diminution de la perméabilité observée pour d'autres types de tumeurs sous

traitements anti-angiogéniques (Batchelor et al. 2007, Fortin et al. 2005, Zwick et al. 2009). On peut aussi noter que la réduction de l' AUC_{P846} des tumeurs traitées au Sorafenib se produit en parallèle d'un ralentissement du développement tumoral (par rapport aux tumeurs non traitées). Le P846 ne s'extravase jamais dans l'hémisphère ipsilatéral quel que soit le traitement appliqué. Le P846 n'est pas en mesure de mettre en évidence les dommages radio-induits de la BHE révélés par le Gd-DOTA. En effet, 5 jours après radiothérapie, l' $AUC_{Gd-DOTA}$ augmente dans les deux groupes soumis à la radiothérapie. Ces dommages radio-induits sont décrits dans différentes études (Diserbo et al. 2002, Nakata et al. 1995, Serduc et al. 2006). On peut aussi noter que le traitement anti-angiogénique ne modifie pas l'extravasation du Gd-DOTA, induite par la MRT, dans l'hémisphère ipsilatéral (l' $AUC_{Gd-DOTA}$ dans les groupes MRT et MRT+SORA sont similaires).

VII.3.4.3 Conclusion

La thérapie anti-angiogénique et la radiothérapie ont des effets différents sur l'extravasation d'agents de contraste dans les tissus tumoraux et sains, suggérant des modifications de la perméabilité des vaisseaux. Cette étude suggère que le choix de l'agent de contraste utilisé pour réaliser une imagerie DCE dépend de la question physiologique posée. Un agent de contraste de haut poids moléculaire (le P846) permet de détecter une diminution de la perméabilité des vaisseaux induite par un traitement anti-angiogénique, alors qu'un agent de contraste de plus petite taille (le Gd-DOTA) permet de détecter une augmentation de la perméabilité des vaisseaux induite par une radiothérapie. Cette étude indique aussi que l'utilisation de deux agents de contraste au cours d'une même session IRM est réalisable.

VII.3.5 Résultat 4 : Evaluation du paramètre ISO_2

A chaque temps d'imagerie, 4 animaux de chaque groupe ont été sacrifiés. Pour chaque rat, le marquage du pimonidazole a été effectué sur 4 coupes (§III.2.1.4 page 71). Mais la correspondance histologie / IRM n'a été réalisée que sur les coupes qui correspondaient le mieux aux coupes IRM. A la date de rédaction de cette thèse, l'analyse d'images n'est pas terminée. Le nombre d'images analysées n'est donc pas identique à tous les temps (Tableau VII.3-3). Le reste des images sera analysé par la suite.

Jour de sacrifice	D9 _(T-1)	D11 _(T+1)	D13 _(T+3)	D15 _(T+5)	D18 _(T+8)
Groupe non traité	2(2/4)	1(1/4)	5(2/4)	0(0/4)	6(2/4)
Groupe SORA	4(3/4)	2(2/4)	3(3/4)	6(3/4)	7(3/4)

Tableau VII.3-3 Nombre d'images du marquage du pimonidazole analysées aux différents temps de sacrifices, dans les groupes non traité et SORA. Entre parenthèses est indiqué le nombre de rats analysés sur le nombre de rats ayant reçu le pimonidazole.

VII.3.5.1 Corrélation entre ISO₂ vs BVf et ISO₂ vs hypoxie

L'ajout d'un nouveau paramètre pour caractériser la microvascularisation tumorale n'est utile que si le paramètre ajouté apporte une information supplémentaire par rapport aux paramètres existants. C'est pourquoi on a souhaité caractériser la dépendance du paramètre ISO₂ par rapport au paramètre BVf en particulier car ce paramètre rentre dans le calcul des cartes de ISO₂. On peut voir, sur les cartes paramétriques des paramètres ISO₂ et BVf, qu'il n'y a pas de corrélation parfaite entre ces paramètres, surtout dans les tumeurs du groupe SORA (Figure VII.3-13a et Figure VII.3-14a). En zoomant, on voit distinctement qu'il existe des pixels possédant des valeurs faibles de BVf alors que ces mêmes pixels ont une ISO₂ élevée (Figure VII.3-13b flèches rouges). Quantitativement, on observe qu'il n'existe pas de corrélation simple, pixel à pixel, entre mesures de BVf et de ISO₂, ni dans le striatum controlatéral ni dans la tumeur quel que soit le groupe (Figure VII.3-13c et Figure VII.3-14b). Les graphiques de corrélation (BVf/ISO₂) entre les tumeurs des deux groupes sont très différents : la corrélation, pixel à pixel, des tumeurs traitées au Sorafenib est plus aléatoire que celle des tumeurs non-traitées (Figure VII.3-13c et Figure VII.3-14b).

Dans un deuxième temps, on s'est intéressé à caractériser la ISO₂ d'un point de vue biologique en corrélant ce paramètre avec un marquage immunohistologique de l'hypoxie. En effet, d'après la littérature, en dessous d'une saturation sanguine en oxygène d'environ 40 %, l'apport en oxygène n'est plus suffisant pour les cellules et peut induire une hypoxie tissulaire (Kurth et al. 2002, Merritt et al. 2003). On a donc estimé d'une part le pourcentage de surface marquée par le pimonidazole (+ la surface nécrosée) dans les tumeurs et d'autre part, on a quantifié le pourcentage de la surface tumorale dont la ISO₂ est inférieure à 40 %. Visuellement, il semble y avoir une bonne corrélation entre les zones de faible ISO₂ et les zones marquées par le pimonidazole, surtout dans le groupe non traité (Figure VII.3-13 flèches bleues). Les données quantitatives entre les pourcentages de surface de ISO₂ < 40 % et de surface nécrotico-hypoxique montrent une bonne corrélation dans les tumeurs du groupe

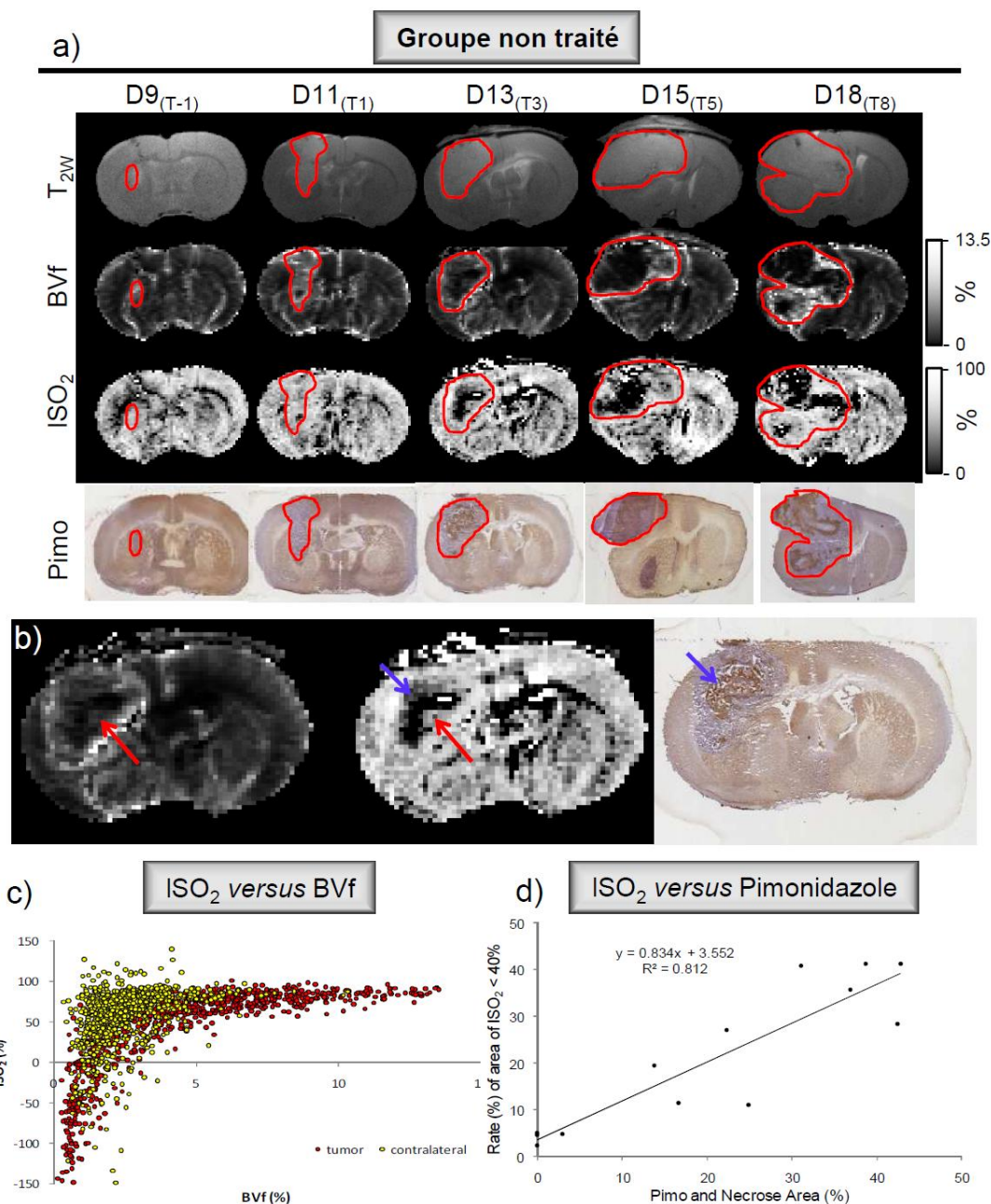


Figure VII.3-13 Corrélation qualitative et quantitative entre ISO₂, BVf et marquage du pimonidazole des animaux non traités.

a) Images anatomiques, cartes paramétriques (BVf et ISO₂) et marquage au pimonidazole représentatifs d'animaux du groupe non traité à tous les temps. En rouge est entourée la tumeur.

b) Agrandissement des cartes de BVf, ISO₂ et du marquage pimonidazole à D13_(T3). Les flèches rouges représentent une zone avec un faible BVf et une forte ISO₂. Les flèches bleues représentent une zone avec une ISO₂ faible et un marquage positif au pimonidazole.

c) Graphique représentatif de la corrélation entre les paramètres IRM, ISO₂ et BVf, dans 2 ROIs tumeur et controlatérale au temps D18_(T8) du groupe non traité. Chaque point représente la corrélation BVf/ISO₂ d'un pixel. Pour chaque ROI, 1000 pixels tirés au hasard sont représentés.

d) Graphique de corrélation entre le paramètre ISO₂ (IRM) et le marquage du pimonidazole (histologique) du groupe non traité. La corrélation du pourcentage de surface de la tumeur dont la ISO₂ est inférieure à 40% avec le pourcentage de surface nécrotico-hypoxique est présentée pour le groupe non traité. Chaque point correspond à une corrélation IRM / histologie. Les données de tous les jours d'observations sont présentées.

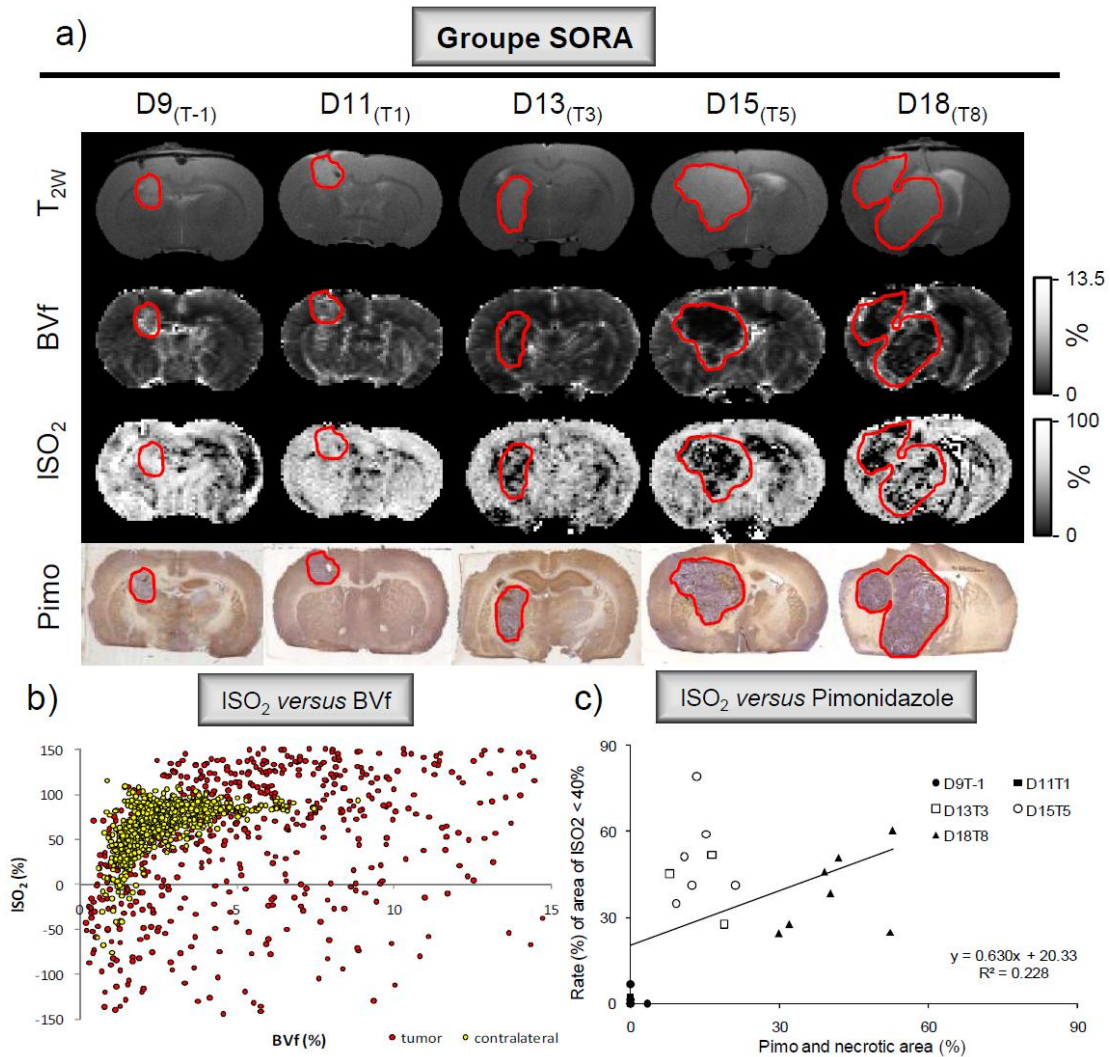


Figure VII.3-14 Corrélation qualitative et quantitative entre la ISO₂, le BVf et le marquage du pimonidazole pour le groupe traité au Sorafenib.

a) Images anatomiques, cartes paramétriques (BVf et ISO₂) et marquage au pimonidazole représentatifs d'animaux du groupe SORA à tous les temps. En rouge est entourée la tumeur.

b) Graphique représentatif de la corrélation entre les paramètres IRM, ISO₂ et BVf, dans 2 ROIs tumeur et controlatérale au temps D18_(T8) du groupe SORA. Chaque point représente la corrélation BVf/ISO₂ d'un pixel. Pour chaque ROI, 1000 pixels tirés au hasard sont représentés.

c) Graphique de corrélation entre le paramètre ISO₂ (IRM) et le marquage du pimonidazole (histologique) du groupe SORA. La corrélation du pourcentage de surface de la tumeur dont la ISO₂ est inférieure à 40% avec le pourcentage de surface nécrotico-hypoxique est présentée pour le groupe SORA. Chaque point correspond à une corrélation IRM / histologie. Les données de chaque jour d'observation sont identifiées par un symbole différent.

non traité ($r^2 = 0,81$; Figure VII.3-13c). Dans le groupe traité au Sorafenib, les données corrélaient moins bien ($r^2 = 0.23$; Figure VII.3-14c). Si on prend en compte uniquement les données obtenues aux temps D9_(T-1), D11_(T1) et D18_(T8), on obtient une bonne corrélation ($r^2 = 0,90$; donnée non présentée). Au temps D13_(T3) et D15_(T5), la surface de la tumeur dont la ISO₂ est inférieure à 40 % est 3 à 4 fois plus élevée que la surface nécrotico-hypoxique

(respectivement 50,9 et 13,8 % ; moyenne des 2 temps).

VII.3.5.2 Discussion

Le paramètre IRM ISO_2 correspond à la mesure du taux d'hémoglobine saturée en oxygène dans le sang. La première motivation de cette étude était de déterminer si ce nouveau paramètre, la ISO_2 , pouvait apporter des informations complémentaires du BVf. En effet, puisque la formule permettant de calculer le paramètre ISO_2 intègre la donnée BVf (formule de la ISO_2 présentée au §I.5.5 page 45), il est important de déterminer si les informations apportées par la ISO_2 ne sont pas redondantes avec les mesures de BVf. Les résultats présentés au cours de cette étude démontrent que la ISO_2 , bien que pondérée par le BVf, est bien un paramètre différent de la mesure de BVf. On obtient par exemple, pour une même valeur de BVf différentes valeurs de ISO_2 .

Dans un 2^{ème} temps, on a essayé de définir la relation qu'il pouvait y avoir entre notre technique de mesure par IRM de la ISO_2 et l'hypoxie tissulaire estimée par immunohistologie. En effet, il est connu que lorsque la SO_2 sanguine est inférieure à 40% environ, les cellules sont mal approvisionnées en oxygène et se retrouvent en situation hypoxique (Kurth et al. 2002, Merritt et al. 2003). La pression partielle en oxygène (pO_2) est un paramètre qui correspond à la quantité d'oxygène présent dans les tissus. La relation entre la SO_2 et la pO_2 est très mal connue dans la littérature. Nous avons essayé de corrélérer les mesures de SO_2 sanguine mesurées par IRM avec des mesures d'immunohistologie quantitative de l'hypoxie tissulaire à l'aide du marquage au pimonidazole. Les surfaces de tumeurs dont la SO_2 est inférieure à 40% ont donc été corrélées avec les surfaces marquées au pimonidazole (en incluant les zones nécrotiques). Dans le groupe non traité, il existe une très bonne corrélation entre la SO_2 inférieure à 40% et la surface nécrotico-hypoxique (Figure VII.3-13). Ces résultats indiquent que des mesures par IRM de SO_2 faible semblent refléter une hypoxie tissulaire. Dans le groupe traité au Sorafenib, la surface de la tumeur dont la SO_2 est inférieure à 40% corréle bien avec la surface nécrotico-hypoxique à $D9_{(T-1)}$, $D11_{(T1)}$ et $D18_{(T8)}$. Par contre, la surface de tumeur dont la SO_2 est inférieure à 40% a des valeurs 2 à 3 fois plus élevées que la surface nécrotico-hypoxique à $D13_{(T3)}$ et $D15_{(T5)}$ (Figure VII.3-14). Les fortes modifications de la microvascularisation tumorale sous Sorafenib, (diminution du BVf et de l' AUC_{P846}) peuvent impacter les mesures IRM de la SO_2 mais aussi perturber la circulation et la distribution du pimonidazole avant sacrifice de l'animal.

VII.3.5.3 Conclusion

Cette étude présente une première approche pour la caractérisation de la ISO₂ par IRM. Une bonne corrélation entre les mesures IRM de ISO₂ et les mesures de l'hypoxie tissulaire (immunomarquage du pimonidazole) dans les tumeurs du groupe non traité a été montrée. Ces premiers résultats démontrent qu'il existe un lien étroit entre des valeurs faibles de ISO₂ mesurées par IRM et l'hypoxie tissulaire. De plus, nous avons montré que les informations apportées par les mesures de ISO₂ sont indépendantes de celles apportées par les mesures de BVf. Enfin, nous avons pu démontrer que la ISO₂ était sensible à l'effet d'un traitement anti-angiogénique sur un gliosarcome 9L.

VII.3.6 Réflexion sur le traitement de données

Au cours des 4 études de cette thèse, nous avons analysé nos différents paramètres IRM par une technique très classique qui consiste à calculer des valeurs moyennes sur des ROIs. Cette méthode est détaillée dans le chapitre (III.1.3.4.7 page 66). Cette méthode convient quand les valeurs au sein de chaque ROI sont assez homogènes comme c'est le cas dans les études I, II (sauf pour le modèle C6 au temps tardif) et III. Cependant, lorsqu'on a analysé et interprété les données de cette dernière étude, on s'est aperçu que cette méthode, bien que très simple à mettre en œuvre, pouvait masquer l'hétérogénéité au sein de chacune des ROIs. C'est pourquoi, lors de l'analyse de l'étude 4, nous avons commencé à réfléchir sur la façon dont on pourrait appréhender cette hétérogénéité avec des paramètres quantitatifs. En effet, deux ROIs peuvent avoir la même valeur moyenne (exemple un BVf de 3 %), mais avoir des profils de distribution des valeurs des voxels très différents (valeur homogène autour des 3% ou au contraire très large allant de 1 à 5 %). Une étude préliminaire nous a permis de déterminer que la coupe centrale de la tumeur (surface où la tumeur est la plus large) était représentative du paramètre IRM étudié. C'est pourquoi, pour réduire les données, nous avons analysé l'hétérogénéité d'une seule coupe IRM par rat. On a appliqué les mêmes critères d'exclusion des pixels que dans la méthode de calcul des moyennes pour chacun des paramètres (Tableau III.1-3 page 67).

Pour traiter les données de l'étude 4, nous avons réalisé un utilitaire Matlab qui a permis de recueillir automatiquement la valeur de chacun des pixels pour chaque paramètre, ROI par ROI. Un autre développement Matlab a permis de générer automatiquement des histogrammes de distribution pour chacune des ROIs. A partir de ces histogrammes, plusieurs

paramètres statistiques ont été automatiquement calculés toujours à l'aide de Matlab. Comme le montre la Figure VII.3-15, nous avons testé trois paramètres permettant d'analyser la distribution d'histogrammes.

Le premier est le coefficient d'asymétrie de Pearson (ou skewness) qui permet de définir l'asymétrie de la distribution de l'histogramme (Gujarati et al. 1995). Si ce coefficient est nul, la distribution est symétrique (loi normale). Un coefficient positif indique une distribution étalée vers la gauche, et donc une queue de distribution étalée vers la droite, inversement si le coefficient est négatif. Cet indicateur trouve son principal intérêt dans le cadre de comparaisons de distribution (Figure VII.3-15A).

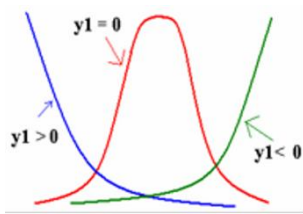
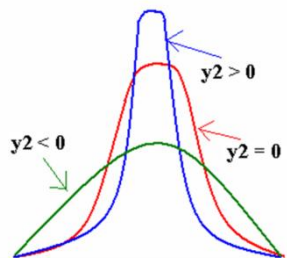
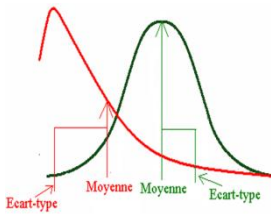
a) coefficient d'asymétrie	b) coefficient d'aplatissement	c) coefficient de variation
$y1 = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum_i \left(\frac{x_i - m}{\sigma} \right)^3$ 	$y2 = \left\{ \frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)} \sum_i \left(\frac{x_i - m}{\sigma} \right)^4 \right\} - \frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)}$ 	$c_v = \frac{\sigma}{m}$ 
y1 = coefficient d'asymétrie n = nombre de pixels de l'image σ = écart type m = moyenne des pixels x_i = valeur des pixels	y2 = coefficient d'aplatissement n = nombre de pixels de l'image σ = écart type m = moyenne des pixels x_i = valeur des pixels	Cv = coefficient de variation σ = écart type m = moyenne des pixels

Figure VII.3-15 Paramètres utilisés lors de l'analyse de la distribution des histogrammes.

a) Coefficient d'asymétrie. y1>0 : courbe étalée à droite ; y1<0 : courbe étalée à gauche ; y1=0 : courbe symétrique

b) Coefficient d'aplatissement. y2>0 : distribution leptokurtique ; y2<0 distribution platykurtique ; y2=0 : distribution mésodermique.

c) Coefficient de variation. Plus l'écart type est différent de la moyenne, plus le coefficient de variation est élevé.

Le second paramètre est le coefficient d'aplatissement (ou kurtosis ou encore coefficient B_2 de Pearson) qui permet de mesurer l'aplatissement de l'histogramme (Gujarati et al. 1995). Pour une distribution de probabilités suivant la loi normale centrée réduite, ce coefficient d'aplatissement vaut 0. On nomme cette distribution « mésodermique ». Un coefficient d'aplatissement positif indique que la distribution est plutôt pointue en sa moyenne, et les queues de distribution sont plutôt épaisses («fat tails») ; on parle de distribution leptokurtique. À l'opposé, un coefficient d'aplatissement négatif indique une distribution relativement aplatie, on parle alors de distribution platikurtique (Figure

VII.3-15B).

Le dernier paramètre statistique étudié est le coefficient de variation (Hubler et al. 1996). C'est un paramètre statistique utile pour comparer la dispersion de variables qui ont des écarts-types et des moyennes différentes. Plus ce coefficient augmente, plus l'histogramme est hétérogène (Figure VII.3-15C).

VII.3.6.1 Résultats

Seuls les temps D9_(T-1) et D18_(T8) des groupes non traité et SORA seront présentés dans les résultats suivants.

VII.3.6.1.1 Le coefficient de diffusion apparent (ADC)

La moyenne de l'ADC des tumeurs des groupes non traité et SORA augmente de la même façon entre D9_(T-1) et D18_(T8) (passant d'environ 1000 à 1150 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) et reste stable en controlatéral (750 $\mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) (Figure VII.3-16a). On pourrait conclure, d'après ces résultats que le traitement n'a pas d'influence sur ce paramètre dans la tumeur.

En analysant les cartes paramétriques IRM de l'ADC, on remarque que l'hétérogénéité augmente dans la tumeur entre D9_(T-1) et D18_(T8) pour les groupes non traité et SORA (Figure VII.3-16b). Cette hétérogénéité évolue de la même façon dans les 2 groupes car il n'y a pas de différence significative du coefficient de variation à D18_(T8) ($0,18 \pm 0,02$ et $0,12 \pm 0,03$; respectivement pour les animaux du groupe non traité et SORA ; $p=0,064$; (Figure VII.3-16a).

En revanche, le coefficient d'asymétrie met en évidence une différence significative au niveau de la tumeur entre les groupes non traité et SORA à D18_(T8) ($0,99 \pm 0,16$ et $-0,32 \pm 0,63$; $p<0,05$; (Figure VII.3-16a). Cette différence entre les coefficients d'asymétrie des 2 groupes est clairement visible sur les histogrammes représentatifs d'une ROI de tumeur présentée à la (Figure VII.3-16c). Le coefficient d'asymétrie des côtés controlatéraux est stable ($\sim 0,05$). Le coefficient d'aplatissement ne montre aucune modification entre les deux groupes étudiés (données non montrées). Cela montre que le Sorafenib a un impact sur l'ADC tumoral uniquement et que cet effet n'a pas été mis en évidence avec des mesures « classiques » de moyennes de pixels.

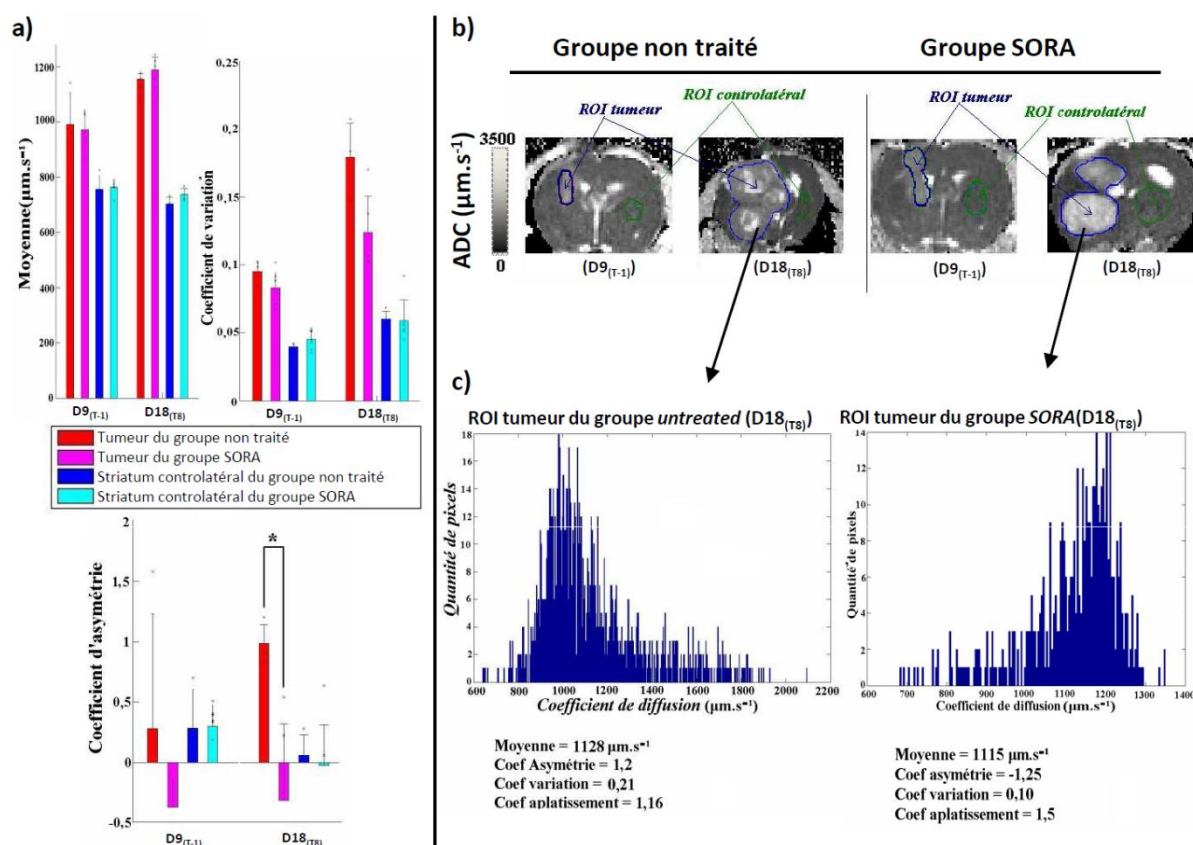


Figure VII.3-16 Analyse des histogrammes de distribution des pixels du paramètre ADC.

a) Evolution de la moyenne, du coefficient de variation et du coefficient d'asymétrie de l'ADC.

b) Cartes paramétriques de l'ADC, représentatives d'un animal du groupe non traité (« *untreated* ») et SORA au temps D9_(T-1) et D18_(T8).

c) L'histogramme des ROIs tumeurs à D18_(T8), représentatif des rats du groupe non traité (« *untreated* ») a une distribution plus étalée à droite et présente donc un coefficient d'asymétrie positif ($\gamma_1 > 0$). Alors que l'histogramme de la ROI tumeur à D18_(T8) représentatif des rats du groupe SORA a une distribution plus étalée à gauche et présente donc un coefficient d'asymétrie négatif ($\gamma_1 < 0$).

Attention, les échelles sur les histogrammes ne sont pas identiques (*: $p < 0,05$).

VII.3.6.1.2 Le volume sanguin (BVf)

Le BVf tumoral du groupe SORA diminue significativement ($p < 0,001$) entre D9_(T-1) et D18_(T8) (passant de $5,32 \pm 0,38 \%$ à $3,11 \pm 0,59 \%$) pour atteindre une valeur proche du volume sanguin du striatum controlatéral (environ 3 %) (Figure VII.3-17a). Dans le même temps, le BVf tumoral du groupe non traité ne varie que très peu (passant de $5,48 \pm 0,27 \%$ à $4,6 \pm 0,18 \%$). D'après ces résultats, on pourrait donc conclure que le BVf intratumoral se « normalise » (c.à.d BVf tumoral = BVf striatum controlatéral).

Cependant, les cartes paramétriques IRM du BVf montrent une hétérogénéité plus marquée à D18_(T8) dans les tumeurs que dans le tissu controlatéral des animaux traités au Sorafenib (Figure VII.3-17b). Les histogrammes représentatifs des 2 ROIs ainsi que leur

coefficient de variation sont présentés à la Figure VII.3-17b. La moyenne des coefficients de variation pour les ROIs tumeurs et striatum controlatéral (respectivement $0,85 \pm 0,1$ et $0,33 \pm 0,04$; Figure VII.3-17a) souligne cette hétérogénéité qui permet ainsi de montrer une différence significative entre la tumeur et le striatum controlatéral des animaux du groupe SORA ($p < 0,001$). Cette différence n'était pas observable en n'étudiant que la valeur moyenne de chacune des ROIs. Pour ce paramètre (BVf), les coefficients d'aplatissement et d'asymétrie n'ont pas montré de différences significatives entre les ROIs tumeurs et controlatérales.

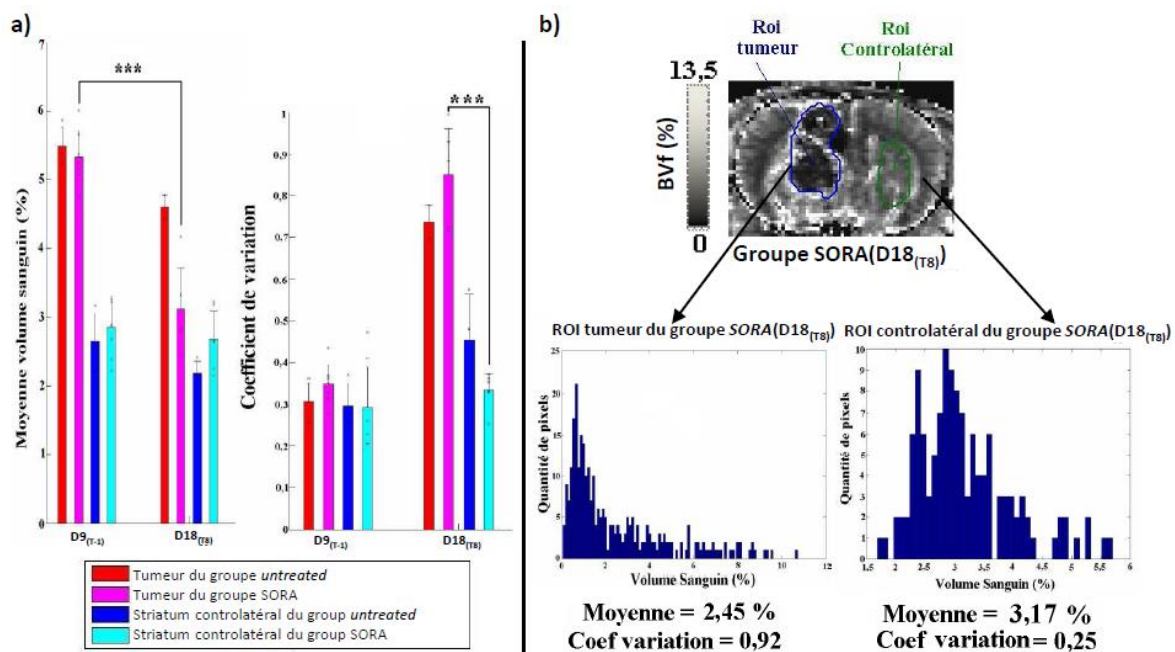


Figure VII.3-17 Analyse des histogrammes de distribution des pixels du paramètre BVf

a) Evolution de la moyenne et du coefficient de variation du BVf

b) Carte paramétrique du BVf à D18_(T8) d'un rat représentatif du groupe SORA avec les histogrammes correspondant aux ROIs dessinées sur la coupe. L'histogramme de la ROI tumeur a une distribution plus hétérogène que l'histogramme de la ROI controlatérale d'où un coefficient de variation plus élevé.

Attention, les échelles sur l'histogramme ne sont pas identiques (: $p < 0,01$).**

VII.3.6.2 Discussion

Les paramètres statistiques mesurant l'hétérogénéité de l'image ont mis en évidence des différences entre les groupes non traité et SORA, et entre le striatum controlatéral et la tumeur de certains paramètres IRM (ADC, BVf) qui n'étaient pas visibles en n'étudiant que la moyenne arithmétique de ces paramètres.

L'analyse de l'hétérogénéité des valeurs d'ADC montre une disparité au niveau des

tumeurs entre les deux groupes (non traité et SORA) qu'on ne distinguait pas en ne s'intéressant qu'à la moyenne. Dans la tumeur du groupe non traité à D18_(T8), il y a un étalement de l'histogramme de distribution des pixels vers la droite qui pourrait traduire des zones de nécrose caractérisées par un ADC élevé (Ross et al. 2003). Par contre, l'histogramme de distribution des valeurs des pixels d'ADC au même temps pour les tumeurs du groupe SORA s'étale vers la gauche, ce qui pourrait caractériser la présence d'œdème (Ross et al. 2003). En ce qui concerne le Volume Sanguin (BVf), l'étude de la méthode de la moyenne arithmétique permet d'affirmer que le traitement agit sur le BVf tumoral qui atteint des valeurs identiques au côté controlatéral. Cela pourrait signifier qu'il y a une « normalisation » du BVf de la tumeur traitée. Or, le coefficient de variation indique une hétérogénéité beaucoup plus importante dans la tumeur par rapport au côté controlatéral à D18_(T8). Nous avons déjà vu que d'après les valeurs du VSI (résultats présentés au §VII.3.2.4 page 149), il ne s'agissait pas d'une vraie normalisation des vaisseaux mais cet effet pourrait être encore plus important. En effet, on vient de voir qu'il existe des zones au sein des tumeurs qui possèdent un BVf supérieur aux valeurs du tissu sain, et inversement.

Plusieurs équipes commencent à s'intéresser à l'analyse de l'hétérogénéité des tumeurs en étudiant d'autres paramètres que la moyenne. Des études récentes ont montré qu'il était possible de prédire précocement la réponse d'un traitement anti-tumoral grâce à l'analyse des histogrammes au sein des tumeurs des valeurs d'ADC (Galbán et al. 2009, Tozer et al. 2007) et de perméabilité (Tofts et al. 2007). A ce jour, peu de publications existent sur ce sujet.

VII.3.6.3 Conclusion

L'analyse quantitative de l'hétérogénéité des valeurs des pixels constituant les ROIs tumeurs, introduites dans cette étude indique qu'il est nécessaire d'être prudent sans les interprétations effectuées sur des ROIs. En effet, on peut maintenant émettre l'hypothèse que le traitement au Sorafenib induit d'importantes modifications au cœur de la tumeur avec une diminution du BVf bien en dessous de la valeur normale. En revanche, au bord de la tumeur, les vaisseaux sanguins sont en forte prolifération, ce qui correspond à une augmentation du BVf.

Les résultats de cette étude démontrent que l'analyse de l'hétérogénéité des valeurs des pixels contenus dans une ROI, apporte des informations supplémentaires à une simple analyse de moyenne allant jusqu'à revisiter l'interprétation de certains résultats.

VII.4 Conclusions

A ma connaissance, il n'existe pas d'autres études précliniques publiées montrant l'évolution d'autant de paramètres IRM dans le cadre d'un suivi de l'impact d'un traitement anti-angiogénique et d'une radiothérapie seuls ou combinés sur un modèle de gliosarcome 9L. Une seule étude clinique publiée par Batchelor et al. a suivi autant de paramètres pour suivre l'effet d'une thérapie anti-angiogénique sur des patients porteurs de glioblastome (Batchelor et al. 2007). Cette étude a généré un très grand nombre de données qui n'ont pas encore été toutes exploitées comme, par exemple, une partie des échantillons biologiques n'a pas encore été analysée pour l'expression du VEGF pour les groupes SORA et MRT+SORA.

Cependant, nous avons pu faire ressortir un certain nombre d'informations en rapport à des problématiques précises. La première partie de cette étude consistait à étudier la sensibilité des différents paramètres IRM vis-à-vis de différents traitements sur les tumeurs 9L. Nos résultats montrent que tous les paramètres sont sensibles aux différents traitements. La cinétique de ces modifications au sein des tumeurs est dépendante du traitement appliqué. Ainsi, les paramètres BVf, AUC et ISO₂ sont sensibles au traitement anti-angiogénique très précocement alors qu'aucun paramètre n'est pas (ou très peu), affecté par la MRT pendant la 1^{ère} semaine après le début du traitement.

Nos résultats de la 2^{ème} partie de cette étude montrent que la MRT bidirectionnelle augmente de façon très importante la médiane de survie des animaux porteurs de tumeur 9L. Bien que l'effet bénéfique sur la survie des animaux soit important, nous avons aussi montré par IRM, histologie et étude protéique que la MRT croisée induit des dommages importants sur la vascularisation des tissus non tumoraux. Ces dégâts pourraient expliquer le fait que la majorité des animaux du groupe MRT sont morts alors qu'ils possédaient des tumeurs de petite taille.

La 3^{ème} partie de cette étude a montré l'utilité d'utiliser 2 agents de contraste de taille différents pour caractériser l'état de la BHE lors de traitements anti-tumoraux. Cette nouvelle approche apporte de nouvelles informations sur l'état de la BHE tout en conservant le même temps d'acquisition IRM. Le développement de nouveaux agents de contraste de plus grosse taille ayant l'autorisation de mise sur le marché permettrait à terme un transfert clinique de ce type de protocole de double injection.

La 4^{ème} partie des résultats de cette étude a permis de caractériser et de valider un

nouveau paramètre IRM, développé dans le laboratoire : la mesure de l'oxygénation sanguine (ISO₂). Notre étude a montré la robustesse et la reproductibilité des mesures de ISO₂ sur 132 animaux (dont certains suivis à plusieurs temps), en ce qui concerne le striatum controlatéral, pour lequel les valeurs obtenues sont conformes avec celles de la littérature. Nous avons montré à l'aide d'une analyse de données pixel à pixel, que ce nouveau paramètre, bien que dépendant mathématiquement du BVf, n'était pas redondant avec les données de BVf. La ISO₂ apporte donc une information supplémentaire. Il existe un lien entre la ISO₂ estimée par IRM et l'hypoxie tissulaire mesurée par histologie. Cette relation semble claire dans le tissu tumoral non traité mais plus complexe dans des tumeurs sous anti-angiogénique. Ces premiers résultats doivent donc être confirmés par d'autres approches de mesure de l'hypoxie (par exemple *ex vivo* par un marquage de la protéine HIF ou encore *in vivo* par des mesures spectroscopiques dans le proche infrarouge NIRS). Ce paramètre ISO₂ estimé par IRM est sensible à l'action d'un anti-angiogénique utilisé seul ou en combinaison avec une MRT bidirectionnelle.

Pour finir, cette étude a montré l'importance de la méthode utilisée lors de l'analyse de données des paramètres IRM. En effet, la très grande hétérogénéité constatée lors du suivi des tumeurs 9L, surtout au temps tardif, a souligné un problème d'ordre méthodologique au niveau de l'analyse des données. Cette hétérogénéité était très peu marquée au cours des 3 premières études. Nous avons montré sur l'exemple de 2 paramètres et sur 2 des 4 groupes étudiés qu'une analyse de l'hétérogénéité des valeurs des pixels au sein d'une ROI permettait de mettre en évidence des informations qui se trouvaient masquées dans le traitement de données classiques (moyenne $\pm$ écart-type). Ces résultats, bien que préliminaires, montrent l'importance dans le futur de mettre en place des méthodologies permettant d'exploiter les informations contenues dans l'hétérogénéité à l'intérieur d'une même région d'intérêt.

CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES

Conclusions

L'objectif principal de ce travail était d'étudier l'intérêt de l'IRM multiparamétrique dans l'évaluation de nouvelles drogues anti-angiogéniques. Différents paramètres IRM ont été évalués et confrontés à des données biologiques. Le point de départ du travail reposait sur la mesure par IRM de l'index de taille des vaisseaux (VSI) qui, à ce moment là constituait une nouvelle technique développée en partie dans notre laboratoire. Deux études antérieures avaient montré qu'il était possible de mesurer le VSI sur des cerveaux d'animaux sains (Tropres et al. 2001) et porteurs d'un gliome C6 (Tropres et al. 2004). L'étude du modèle C6 a montré que les mesures de VSI réalisées, à un temps donné de la croissance des tumeurs C6, étaient corrélées aux mesures de VSI réalisées sur des coupes histologiques.

Au cours de cette thèse nous avons montré que l'IRM multiparamétrique (BVf et VSI) permet une meilleure description de la microvascularisation cérébrale que la mesure seule du BVf. Nos résultats indiquent aussi que ces deux mesures peuvent être répétées sur le même animal au cours d'un suivi longitudinal. Grâce à ces techniques, nous avons pu caractériser la microvascularisation de 6 modèles de gliomes au même stade de développement ainsi que 2 modèles à différents stades de croissance. Tous les résultats obtenus *in vivo*, par IRM, ont été corrélés aux données immunohistochimiques quantitatives du réseau vasculaire obtenues *ex vivo*. Ces premiers résultats soulignent l'hétérogénéité de la microvascularisation entre les différents modèles de gliomes utilisés. Nos travaux montrent l'importance d'étudier plusieurs modèles tumoraux lors d'études de nouvelles thérapies précliniques.

Dans un 2^{ème} temps, nous avons évalué l'IRM multiparamétrique comme indicateur d'effets de thérapie anti-angiogénique couplée ou non à d'autres thérapies (chimio ou radiothérapie). L'originalité de nos travaux, par rapport à la littérature, est d'avoir utilisé l'IRM avec autant de paramètres (jusqu'à 6 : ADC, BVf, VSI, AUC_{P846}, AUC_{GD-DOTA} et ISO₂) ce qui a permis de réaliser des suivis longitudinaux d'effets de traitements anti-tumoraux. Nos résultats montrent que ces techniques (temps d'acquisition, injection répétée d'agent de contraste, traitement de données) sont faisables et que le suivi de plusieurs paramètres permet d'évaluer l'impact de traitements sur la microvascularisation tumorale. En effet, l'action d'une drogue anti-angiogénique *in vivo* est un phénomène très complexe qui peut induire beaucoup de modifications au sein du réseau vasculaire. Le fait de pouvoir suivre, *in vivo*, des paramètres structurels (BVf, VSI) et fonctionnels (AUC_{P846}, AUC_{GD-DOTA} et ISO₂) de la microvascularisation cérébrale et tumorale a permis d'évaluer plus précisément l'effet, ou

non, d'un traitement. Nos résultats indiquent aussi que tous les paramètres IRM de la microvascularisation étudiés (BVf, VSI et perméabilité des vaisseaux) apparaissent être des indicateurs plus précoces de l'effet d'un traitement anti-angiogénique (le Sorafenib) sur différents modèles de gliomes (U-87 MG et 9L) que le critère classiquement utilisé, la croissance tumorale (RECIST).

Il apparaît évident que, dans un avenir proche, l'imagerie médicale prendra de plus en plus d'importance, en préclinique, dans l'évaluation de nouvelles drogues, mais aussi en clinique dans le suivi thérapeutique des patients. Dans ce contexte-là, les développements méthodologiques et les résultats de nos travaux mettent en avant la puissance de l'IRM multiparamétrique comme indicateur, non invasif, des effets bénéfiques ou néfastes de nouveaux traitements.

Perspectives

Dans la continuité des travaux de cette thèse, il serait intéressant de poursuivre différentes études méthodologiques, précliniques ou cliniques.

- **Méthodologies :**

- Approfondir la validation et la compréhension du paramètre ISO_2 , en confrontant des mesures de ISO_2 aux mesures de saturation sanguine en oxygène réalisées avec d'autres techniques de mesure. Par exemple, la technique de *Near InfraRed Spectroscopy* (NIRS) ou des mesures d'hypoxie tissulaire en utilisant des rapporteurs endogènes comme l'*Hypoxia Induce Factor* (HIF-1).
- Valider la faisabilité de la mesure de la perméabilité des vaisseaux à deux agents de contraste de taille différente. Dans ce but, il serait nécessaire d'évaluer l'impact de la présence du 1^{er} agent de contraste sur les mesures du 2^{ème}. En ce sens, des mesures quantitatives de la perméabilité des vaisseaux aux deux agents de contraste en utilisant un modèle mathématique (comme le modèle de Tofts étendu) serait nécessaire.
- Les travaux présentés ici ont soulevé la difficulté d'extraire des informations pertinentes à partir d'un grand nombre de données. Il apparaît évident que l'avenir de l'imagerie médicale réside dans le développement

d'outils permettant d'analyser d'importantes quantités d'informations. Ces outils devront aussi être capables de prendre en compte l'hétérogénéité des données afin de faire sortir toutes les informations. Dotés de ces outils nous réaliserons aussi des analyses par combinaisons de paramètres, afin d'extraire le maximum d'informations des données d'acquisitions.

- Enfin, en permettant des acquisitions rapides, nous pourrions mesurer les mêmes paramètres IRM tout en augmentant les résolutions spatiale et temporelle.
- **Préclinique** : L'IRM multiparamétrique (ADC, BVf, VSI, ISO₂ et perméabilité des vaisseaux à 2 agents de contraste de tailles différentes) telle que présentée dans les différentes études, pourrait être utilisée pour :
 - Evaluer de nouveaux médicaments anti-angiogéniques sur les tumeurs cérébrales.
 - Mieux décrire et comprendre les mécanismes d'actions de thérapies anti-angiogéniques ou anti-vasculaires.
 - Etudier les effets secondaires et la toxicité induits par certains traitements (comme nous l'avons décrit avec la MRT).
 - Optimiser la conception rationnelle de combinaison de traitement entre un agent anti-angiogénique et une chimiothérapie et / ou une radiothérapie.
 - Mieux comprendre le phénomène d'échappement des tumeurs aux traitements quel qu'en soit le type (anti-angiogénique, chimio-radiothérapie).
- **Clinique** : Le transfert clinique de toutes ces techniques IRM est aussi envisagé.
 - L'ADC commence à être utilisé en routine clinique avec de très bons résultats dans le suivi de thérapies cytotoxiques.
 - En ce qui concerne les mesures de BVf et de VSI, les agents de contraste utilisés tels que le Sinerem[®] ne peuvent être utilisés en clinique. Une technique utilisant un agent de contraste autorisé, comme le Gd-DOTA, est en cours de mise en place dans l'unité IRM de Grenoble. Cette technique de mesure dynamique a déjà été utilisée dans des centres avancés pour mesurer le BVf mais encore très peu pour cartographier le VSI.

- Une fois la technique de mesure du BVf en place chez l'homme, on peut penser que le transfert de la méthode de mesure de la ISO_2 ne devrait pas poser de problème méthodologique majeur (puisque l'on utilise la cartographie du BVf dans la mesure de ISO_2).
- En ce qui concerne l'évaluation de la perméabilité à 2 agents de contraste de tailles différentes, il n'existe pas de contrainte technique à son transfert en clinique. Cependant, à ce jour, il n'existe pas encore de molécule de haut poids moléculaire autorisée chez l'homme. Lorsque de telles molécules (comme le P846), auront obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM), le transfert clinique de cette nouvelle méthode sera envisageable rapidement.

BIBLIOGRAPHIE

Aronen HJ, Gazit IE, Louis DN, Buchbinder BR, Pardo FS, Weisskoff RM, Harsh GR, Cosgrove GR, Halpern EF, Hochberg FH.

Cerebral blood volume maps of gliomas: comparison with tumor grade and histologic findings.

Radiology. 1994 Apr;191(1):41-51.

Aznar AO, Vidal FJR.

[Central nervous system tumours in childhood: their clinical pathological aspects].

Rev Neurol. 2004;38(6):554-64.

Babsky AM, Hekmatyar SK, Zhang H, Solomon JL, Bansal N.

Predicting and monitoring response to chemotherapy by 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea in subcutaneously implanted 9L glioma using the apparent diffusion coefficient of water and ²³Na MRI.

J Magn Reson Imaging. 2006;24(1):132-9.

Barbier EL, Lamalle L, Décorps M.

Methodology of brain perfusion imaging.

J Magn Reson Imaging. 2001 Apr;13(4):496-520.

Barbier EL, Liu L, Grillon E, Payen J-F, Lebas J-F, Segebarth C, Rémy C.

Focal brain ischemia in rat: acute changes in brain tissue T1 reflect acute increase in brain tissue water content.

NMR Biomed. 2005 Dec;18(8):499-506.

Barrett T, Brechbiel M, Bernardo M, Choyke PL.

MRI of tumor angiogenesis.

J Magn Reson Imaging. 2007 Aug;26(2):235-49.

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(1):91-102.

Barth RF, Kaur B.

Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas.

J Neurooncol. 2009 Sep;94(3):299-312.

Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang W-T, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen P-J, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK.

AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients.

Cancer Cell. 2007;11(1):83-95.

Beaumont M, Lemasson B, Farion R, Segebarth C, Remy C, Barbier EL.

Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using iron-based vessel size index MRI in combination with gadolinium-based dynamic contrast-enhanced MRI.

J Cereb Blood Flow Metab. 2009 Oct;29(10):1714-26.

Black PM.

Brain tumors. Part 1.

N Engl J Med. 1991 May;324(21):1471-6.

Bonnotte B, Larmonier N, Favre N, Fromentin A, Moutet M, Martin M, Gurbuxani S, Solary E, Chauffert B, Martin F.

Identification of tumor-infiltrating macrophages as the killers of tumor cells after immunization in a rat model system.

J Immunol. 2001 Nov;167(9):5077-83.

Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouysségur J.

Hypoxia and cancer.

J Mol Med. 2007 Dec;85(12):1301-7.

Bräuer-Krisch E, Requardt H, Brochard T, Berruyer G, Renier M, Laissue JA, Bravin A.

New technology enables high precision multislit collimators for microbeam radiation therapy.

Rev Sci Instrum. 2009 Jul;80(7):074301.

Bredel M.

Anticancer drug resistance in primary human brain tumors.

Brain Res Brain Res Rev. 2001 Apr;35(2):161-204.

Broux C, Tropres I, Montigon O, Julien C, Decorps M, Payen J-F.

The effects of sustained hyperventilation on regional cerebral blood volume in thiopental-anesthetized rats.

Anesth Analg. 2002 Dec;95(6):1746-51.

Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF, Lerner J, Lowenstein PR, Castro MG.

Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression.

J Neurooncol. 2007 Nov;85(2):133-48.

Carmeliet P.

Angiogenesis in life, disease and medicine.

Nature. 2005 Dec;438(7070):932-6.

Cha S, Johnson G, Wadghiri YZ, Jin O, Babb J, Zagzag D, Turnbull DH.

Dynamic, contrast-enhanced perfusion MRI in mouse gliomas: correlation with histopathology.

Magn Reson Med. 2003 May;49(5):848-55.

Chauveinc L, Flam T, Solignac S, Rosenwald JC, Thiounn N, Firmin F, Cosset JM.

[Indications for curietherapy of the prostate using permanent implants].

Cancer Radiother. 2002 May;6(3):154-8.

Chenevert TL, McKeever PE, Ross BD.

Monitoring early response of experimental brain tumors to therapy using diffusion magnetic resonance imaging.

Clin Cancer Res. 1997 Sep;3(9):1457-66.

Cheng HL.

Improved correlation to quantitative DCE-MRI pharmacokinetic parameters using a modified initial area under the uptake curve (mIAUC) approach.

J Magn Reson Imaging. 2009 Oct;30(4):864-72.

Claes A, Wesseling P, Jeuken J, Maass C, Heerschap A, Leenders WPJ.

Antiangiogenic compounds interfere with chemotherapy of brain tumors due to vessel normalization.

Mol Cancer Ther. 2008;7(1):71-8.

Colvin DC, Yankeelov TE, Does MD, Yue Z, Quarles C, Gore JC.

New insights into tumor microstructure using temporal diffusion spectroscopy.

Cancer Res. 2008 Jul;68(14):5941-7.

Cornain S, Carnaud C, Silverman D, Klein E, Rajewsky MF.

Spleen-cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specificity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes.

Int J Cancer. 1975 Aug;16(2):301-11.

Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C.

[Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications].

Ann Pathol. 2000 Oct;20(5):413-28.

de Groot JF, Gilbert MR.

New molecular targets in malignant gliomas.

Curr Opin Neurol. 2007 Dec;20(6):712-8.

de Vries A, Griebel J, Kremser C, Judmaier W, Gneiting T, Debbage P, Kremser T, Pfeiffer KP, Buchberger W, Lukas P.

Monitoring of tumor microcirculation during fractionated radiation therapy in patients with rectal carcinoma: preliminary results and implications for therapy.
Radiology. 2000 Nov;217(2):385-91.

Dennie J, Mandeville JB, Boxerman JL, Packard SD, Rosen BR, Weisskoff RM.

NMR imaging of changes in vascular morphology due to tumor angiogenesis.
Magn Reson Med. 1998 Dec;40(6):793-9.

Devaux BC, O'Fallon JR, Kelly PJ.

Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. A retrospective study of clinical parameters, therapy, and outcome.
J Neurosurg. 1993 May;78(5):767-75.

Devries AF, Griebel J, Kremser C, Judmaier W, Gneiting T, Kreczy A, Ofner D, Pfeiffer KP, Brix G, Lukas P.

Tumor microcirculation evaluated by dynamic magnetic resonance imaging predicts therapy outcome for primary rectal carcinoma.
Cancer Res. 2001 Mar;61(6):2513-6.

DeVries AF, Kremser C, Hein PA, Griebel J, Kreczy A, Ofner D, Pfeiffer KP, Lukas P, Judmaier W.

Tumor microcirculation and diffusion predict therapy outcome for primary rectal carcinoma.
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003 Jul;56(4):958-65.

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, Rosen EM.

Response of rat intracranial 9L gliosarcoma to microbeam radiation therapy.
Neuro Oncol. 2002 Jan;4(1):26-38.

DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG.

The price of innovation: new estimates of drug development costs.
J Health Econ. 2003 Mar;22(2):151-85.

Diserbo M, Agin A, Lamproglou I, Mauris J, Staali F, Multon E, Amourette C.

Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study.
Can J Physiol Pharmacol. 2002 Jul;80(7):670-8.

Djonov V, Baum O, Burri PH.

Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis.
Cell Tissue Res. 2003 Oct;314(1):107-17.

Dunn IF, Black PM.

The neurosurgeon as local oncologist: cellular and molecular neurosurgery in malignant glioma therapy.

Neurosurgery. 2003 Jun;52(6):1411-22; discussion 22-4.

Dzik-Jurasz A, Domenig C, George M, Wolber J, Padhani A, Brown G, Doran S.

Diffusion MRI for prediction of response of rectal cancer to chemoradiation.

Lancet. 2002 Jul;360(9329):307-8.

Enchev YP, Popov RV, Romansky KV, Marinov MB, Bussarsky VA.

Cranial neuronavigation--a step forward or a step aside in modern neurosurgery.

Folia Med (Plovdiv). 2008;50(2):5-10.

Fan G, Zang P, Jing F, Wu Z, Guo Q.

Usefulness of diffusion/perfusion-weighted MRI in rat gliomas: correlation with histopathology.

Acad Radiol. 2005 May;12(5):640-51.

Farrell CL, Farrell CR, Stewart PA, Maestro RFD, Ellis CG.

The functional microcirculation in a glioma model.

Int J Radiat Biol. 1991;60(1-2):131-7.

Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Paula AMD, Fernandez C, Bouvier C.

[Histological and molecular classification of gliomas].

Rev Neurol (Paris). 2008;164(6-7):505-15.

Flaherty KT, Rosen MA, Heitjan DF, Gallagher ML, Schwartz B, Schnall MD, O'Dwyer PJ.

Pilot study of DCE-MRI to predict progression-free survival with sorafenib therapy in renal cell carcinoma.

Cancer Biol Ther. 2008 Apr;7(4):496-501.

Fogh J, Fogh JM, Orfeo T.

One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice.

J Natl Cancer Inst. 1977 Jul;59(1):221-6.

Folberg R, Maniotis AJ.

Vasculogenic mimicry.

APMIS. 2004 Jul-Aug;112(7-8):508-25.

Folkman J.

Tumor angiogenesis: therapeutic implications.

N Engl J Med. 1971 Nov;285(21):1182-6.

Folkman J, Beckner K.

Angiogenesis imaging.

Acad Radiol. 2000;7(10):783-5.

Fortin D, Desjardins A, Benko A, Niyonsega T, Boudrias M.

Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: the Sherbrooke experience.

Cancer. 2005 Jun 15;103(12):2606-15.

Gagner J-P, Law M, Fischer I, Newcomb EW, Zagzag D.

Angiogenesis in gliomas: imaging and experimental therapeutics.

Brain Pathol. 2005;15(4):342-63.

Galbán CJ, Chenevert TL, Meyer CR, Tsien C, Lawrence TS, Hamstra DA, Junck L, Sundgren PC, Johnson TD, Ross DJ, Rehemtulla A, Ross BD.

The parametric response map is an imaging biomarker for early cancer treatment outcome.

Nat Med. 2009 May;15(5):572-6.

Galis ZS, Khatri JJ.

Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.

Circ Res. 2002 Feb;90(3):251-62.

Gerard JP, Romestaing P, Chapet O.

Radiotherapy alone in the curative treatment of rectal carcinoma.

Lancet Oncol. 2003 Mar;4(3):158-66.

Gossmann A, Helbich TH, Kuriyama N, Ostrowitzki S, Roberts TPL, Shames DM, van Bruggen N, Wendland MF, Israel MA, Brasch RC.

Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a surrogate marker of tumor response to anti-angiogenic therapy in a xenograft model of glioblastoma multiforme.

J Magn Reson Imaging. 2002;15(3):233-40.

Grobbs B, De Deyn PP, Slegers H.

Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion.

Cell Tissue Res. 2002;310(3):257-70.

Gujarati D, N.

Basic Econometrics

3rd ed: MacGraw Hill; 1995.

Haie-Meder C, Breton C, de Crevoisier R, Gerbaulet A.

[Curietherapy in uterine cervix cancers: what therapeutic trends?].

Cancer Radiother. 2000;4(2):133-9.

Hall DE, Moffat BA, Stojanovska J, Johnson TD, Li Z, Hamstra DA, Rehemtulla A, Chenevert TL, Carter J, Pietronigro D, Ross BD.

Therapeutic efficacy of DTI-015 using diffusion magnetic resonance imaging as an early surrogate marker.

Clin Cancer Res. 2004 Dec;10(23):7852-9.

Hamstra DA, Rehemtulla A, Ross BD.

Diffusion magnetic resonance imaging: a biomarker for treatment response in oncology.

J Clin Oncol. 2007 Sep;25(26):4104-9.

Hawighorst H, Knopp MV, Debus J, Hoffmann U, Grandy M, Griebel J, Zuna I, Essig M, Schoenberg SO, DeVries A, Brix G, van Kaick G.

Pharmacokinetic MRI for assessment of malignant glioma response to stereotactic radiotherapy: initial results.

J Magn Reson Imaging. 1998;8(4):783-8.

Hayashida Y, Hirai T, Morishita S, Kitajima M, Murakami R, Korogi Y, Makino K, Nakamura H, Ikushima I, Yamura M, Kochi M, i Kuratsu J, Yamashita Y.

Diffusion-weighted imaging of metastatic brain tumors: comparison with histologic type and tumor cellularity.

AJNR Am J Neuroradiol. 2006 Aug;27(7):1419-25.

He X, Yablonskiy DA.

Quantitative BOLD: mapping of human cerebral deoxygenated blood volume and oxygen extraction fraction: default state.

Magn Reson Med. 2007 Jan;57(1):115-26.

He X, Zhu M, Yablonskiy DA.

Validation of oxygen extraction fraction measurement by qBOLD technique.

Magn Reson Med. 2008 Oct;60(4):882-8.

Hoehn-Berlage M, Eis M, Back T, Kohno K, Yamashita K.

Changes of relaxation times (T1, T2) and apparent diffusion coefficient after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat: temporal evolution, regional extent, and comparison with histology.

Magn Reson Med. 1995 Dec;34(6):824-34.

Hoskin PJ, Saunders MI, Goodchild K, Powell ME, Taylor NJ, Baddeley H.

Dynamic contrast enhanced magnetic resonance scanning as a predictor of response to accelerated radiotherapy for advanced head and neck cancer.

Br J Radiol. 1999 Nov;72(863):1093-8.

Hu B, Guo P, Fang Q, Tao H-Q, Wang D, Nagane M, Huang H-JS, Gunji Y, Nishikawa R, Alitalo K, Cavenee WK, Cheng S-Y.

Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul;100(15):8904-9.

Hubler J.

Statistique descriptive appliquée à la gestion et à l'économie

2nd ed. Bréal E, editor1996.

Idbaih A, Omuro A, Ducray F, Hoang-Xuan K.

Molecular genetic markers as predictors of response to chemotherapy in gliomas.

Curr Opin Oncol. 2007 Nov;19(6):606-11.

Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, Hu-Lowe DD, Shalinsky DR, Thurston G, Yancopoulos GD, McDonald DM.

Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts.

Am J Pathol. 2004 Jul;165(1):35-52.

Inamura T, Black KL.

Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors.

J Cereb Blood Flow Metab. 1994 Sep;14(5):862-70.

Jäger HR, Waldman AD, Benton C, Fox N, Rees J.

Differential chemosensitivity of tumor components in a malignant oligodendroglioma: assessment with diffusion-weighted, perfusion-weighted, and serial volumetric MR imaging.

AJNR Am J Neuroradiol. 2005 Feb;26(2):274-8.

Jain RK.

Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy.

Science. 2005 Jan;307(5706):58-62.

Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT.

Angiogenesis in brain tumours.

Nat Rev Neurosci. 2007;8(8):610-22.

Jain RK, Duda DG, Willett CG, Sahani DV, Zhu AX, Loeffler JS, Batchelor TT, Sorensen AG.

Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy.

Nat Rev Clin Oncol. 2009 Jun;6(6):327-38.

Jansen M, de Witt Hamer PC, Witmer AN, Troost D, van Noorden CJF.

Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas.
Brain Res Brain Res Rev. 2004 Jul;45(3):143-63.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ.

Cancer statistics, 2008.
CA Cancer J Clin. 2008;58(2):71-96.

Jiang F, Zhang ZG, Katakowski M, Robin AM, Faber M, Zhang F, Chopp M.

Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains.
Photochem Photobiol. 2004 Jun;79(6):494-8.

Julien C, Payen J-F, Tropres I, Farion R, Grillon E, Montigon O, Remy C.

Assessment of vascular reactivity in rat brain glioma by measuring regional blood volume during graded hypoxic hypoxia.
Br J Cancer. 2004;91(2):374-80.

Key G, Becker MH, Baron B, Duchrow M, Schluter C, Flad HD, Gerdes J.

New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope.
Lab Invest. 1993 Jun;68(6):629-36.

Kim B, Chenevert TL, Ross BD.

Growth kinetics and treatment response of the intracerebral rat 9L brain tumor model: a quantitative in vivo study using magnetic resonance imaging.
Clin Cancer Res. 1995 Jun;1(6):643-50.

Kim JH, Chung YG, Kim CY, Kim HK, Lee HK.

Upregulation of VEGF and FGF2 in normal rat brain after experimental intraoperative radiation therapy.
J Korean Med Sci. 2004 Dec;19(6):879-86.

Kim JH, Khil MS, Kolozsvary A, Gutierrez JA, Brown SL.

Fractionated radiosurgery for 9L gliosarcoma in the rat brain.
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999 Nov 1;45(4):1035-40.

Kim S, Pickup S, Hsu O, Poptani H.

Diffusion tensor MRI in rat models of invasive and well-demarcated brain tumors.
NMR Biomed. 2008 Mar;21(3):208-16.

Kimura R, Nakase H, Tamaki R, Sakaki T.

Vascular endothelial growth factor antagonist reduces brain edema formation and venous

infarction.

Stroke. 2005 Jun;36(6):1259-63.

Kiselev VG, Strecker R, Ziyeh S, Speck O, Hennig J.

Vessel size imaging in humans.

Magn Reson Med. 2005;53(3):553-63.

Kleihues P, Burger P, Collins V, Newcomb EW.

Glioblastoma. In Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. Kleihues p CWK, editor: FIARC Press, Lyon. 23-39; 2000.

Koh D-M, Collins DJ.

Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology.

AJR Am J Roentgenol. 2007 Jun;188(6):1622-35.

Kremser C, Trieb T, Rudisch A, Judmaier W, de Vries A.

Dynamic T(1) mapping predicts outcome of chemoradiation therapy in primary rectal carcinoma: sequence implementation and data analysis.

J Magn Reson Imaging. 2007 Sep;26(3):662-71.

Kurth CD, Levy WJ, McCann J.

Near-infrared spectroscopy cerebral oxygen saturation thresholds for hypoxia-ischemia in piglets.

J Cereb Blood Flow Metab. 2002 Mar;22(3):335-41.

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, Sawaya R.

A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival.

J Neurosurg. 2001 Aug;95(2):190-8.

Laissue JA, Geiser G, Spanne PO, Dilmanian FA, Gebbers JO, Geiser M, Wu XY, Makar MS, Micca PL, Nawrocky MM, Joel DD, 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 Nov 23;78(5):654-60.

Laperriere N, Zuraw L, Cairncross G, Group CCOPGIN-ODS.

Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review.

Radiother Oncol. 2002 Sep;64(3):259-73.

Le Bihan DL.

The 'wet mind': water and functional neuroimaging.

Phys Med Biol. 2007 Apr;52(7):R57-R90.

Leach MO, Brindle KM, Evelhoch JL, Griffiths JR, Horsman MR, Jackson A, Jayson GC, Judson IR, Knopp MV, Maxwell RJ, McIntyre D, Padhani AR, Price P, Rathbone R, Rustin GJ, Tofts PS, Tozer GM, Vennart W, Waterton JC, Williams SR, Workman P, Pharmacodynamic/Pharmacokinetic Technologies Advisory Committee DDORUK.

The assessment of antiangiogenic and antivasular therapies in early-stage clinical trials using magnetic resonance imaging: issues and recommendations.

Br J Cancer. 2005 May;92(9):1599-610.

Lee SJ, Kim JH, Kim YM, Lee GK, Lee EJ, Park IS, Jung JM, Kang KH, Shin T.

Perfusion MR imaging in gliomas: comparison with histologic tumor grade.

Korean J Radiol. 2001 Jan-Mar;2(1):1-7.

Lefranc F, Brotchi J, Kiss R.

Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis.

J Clin Oncol. 2005 Apr 1;23(10):2411-22.

Lemaire L, Howe FA, Rodrigues LM, Griffiths JR.

Assessment of induced rat mammary tumour response to chemotherapy using the apparent diffusion coefficient of tissue water as determined by diffusion-weighted 1H-NMR spectroscopy in vivo.

MAGMA. 1999 Mar;8(1):20-6.

Leuraud P, Taillandier L, Medioni J, Aguirre-Cruz L, Crinière E, Marie Y, Kujas M, Golmard J-L, Duprez A, Delattre J-Y, Sanson M, Poupon M-F.

Distinct responses of xenografted gliomas to different alkylating agents are related to histology and genetic alterations.

Cancer Res. 2004 Jul;64(13):4648-53.

Liu G, Rugo HS, Wilding G, McShane TM, Evelhoch JL, Ng C, Jackson E, Kelcz F, Yeh BM, Lee FT, Jr., Charnsangavej C, Park JW, Ashton EA, Steinfeldt HM, Pithavala YK, Reich SD, Herbst RS.

Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a pharmacodynamic measure of response after acute dosing of AG-013736, an oral angiogenesis inhibitor, in patients with advanced solid tumors: results from a phase I study.

J Clin Oncol. 2005 Aug 20;23(24):5464-73.

Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, Wilhelm S, Lynch M, Carter C.

Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5.

Cancer Res. 2006 Dec 15;66(24):11851-8.

Machein MR, Renninger S, de Lima-Hahn E, Plate KH.

Minor contribution of bone marrow-derived endothelial progenitors to the vascularization of

murine gliomas.

Brain Pathol. 2003 Oct;13(4):582-97.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD.

Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.

Science. 1997;277(5322):55-60.

Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freemark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM.

Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition.

J Clin Invest. 2006;116(10):2610-21.

Matz PG, Cobbs C, Berger MS.

Intraoperative cortical mapping as a guide to the surgical resection of gliomas.

J Neurooncol. 1999 May;42(3):233-45.

Mayr NA, Yuh WT, Magnotta VA, Ehrhardt JC, Wheeler JA, Sorosky JI, Davis CS, Wen BC, Martin DD, Pelsang RE, Buller RE, Oberley LW, Mellenberg DE, Hussey DH.

Tumor perfusion studies using fast magnetic resonance imaging technique in advanced cervical cancer: a new noninvasive predictive assay.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1996 Oct;36(3):623-33.

McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM, of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics SS.

REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK).

Nat Clin Pract Oncol. 2005 Aug;2(8):416-22.

Meiboom S, Gill D.

Modifed Spin Echo method of measuring nuclear relaxation times.

Rev Sci Instrum. 1958;29(8):688-91.

Meier P, Zierler KL.

On the theory of the indicator-dilution method for measurement of blood flow and volume.

J Appl Physiol. 1954 Jun;6(12):731-44.

Merritt S, Bevilacqua F, Durkin AJ, Cuccia DJ, Lanning R, Tromberg BJ, Gulsen G, Yu H, Wang J, Nalcioğlu O.

Coregistration of diffuse optical spectroscopy and magnetic resonance imaging in a rat tumor model.

Appl Opt. 2003 Jun 1;42(16):2951-9.

Milliat F, Francois A, Isoir M, Deutsch E, Tamarat R, Tarlet G, Atfi A, Validire P,

Bourhis J, Sabourin JC, Benderitter M.

Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages.

Am J Pathol. 2006 Oct;169(4):1484-95.

Moore A, Marecos E, Bogdanov AJ, Weissleder R.

Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model.

Radiology. 2000;214(2):568-74.

Mosmann T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.

J Immunol Methods. 1983 Dec;65(1-2):55-63.

Nakamura K, Taguchi E, Miura T, Yamamoto A, Takahashi K, Bichat F, Guilbaud N, Hasegawa K, Kubo K, Fujiwara Y, Suzuki R, Shibuya M, Isae T.

KRN951, a highly potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, has antitumor activities and affects functional vascular properties.

Cancer Res. 2006 Sep 15;66(18):9134-42.

Nakata H, Yoshimine T, Murasawa A, Kumura E, Harada K, Ushio Y, Hayakawa T.

Early blood-brain barrier disruption after high-dose single-fraction irradiation in rats.

Acta Neurochir (Wien). 1995;136(1-2):82-6; discussion 6-7.

Newton HB.

Primary brain tumors: review of etiology, diagnosis and treatment.

Am Fam Physician. 1994 Mar;49(4):787-97.

Nimsky C, Ganslandt O, Kober H, Buchfelder M, Fahlbusch R.

Intraoperative magnetic resonance imaging combined with neuronavigation: a new concept.

Neurosurgery. 2001 May;48(5):1082-9; discussion 9-91.

Norden AD, Drappatz J, Wen PY.

Advances in meningioma therapy.

Curr Neurol Neurosci Rep. 2009 May;9(3):231-40.

O'Connor JPB, Jackson A, Asselin M-C, Buckley DL, Parker GJM, Jayson GC.

Quantitative imaging biomarkers in the clinical development of targeted therapeutics: current and future perspectives.

Lancet Oncol. 2008 Aug;9(8):766-76.

Oldenhuis CNAM, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EGE.

Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology.
Eur J Cancer. 2008 May;44(7):946-53.

Padhani AR, Liu G, Koh DM, Chenevert TL, Thoeny HC, Takahara T, Dzik-Jurasz A, Ross BD, Van Cauteren M, Collins D, Hammoud DA, Rustin GJ, Taouli B, Choyke PL.
Diffusion-weighted magnetic resonance imaging as a cancer biomarker: consensus and recommendations.
Neoplasia. 2009 Feb;11(2):102-25.

Pathak AP, Schmainda KM, Ward BD, Linderman JR, Rebro KJ, Greene AS.
MR-derived cerebral blood volume maps: issues regarding histological validation and assessment of tumor angiogenesis.
Magn Reson Med. 2001;46(4):735-47.

Pathak AP, Ward BD, Schmainda KM.
A novel technique for modeling susceptibility-based contrast mechanisms for arbitrary microvascular geometries: the finite perturber method.
Neuroimage. 2008 Apr;40(3):1130-43.

Paulson ES, Schmainda KM.
Comparison of dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced MR methods: recommendations for measuring relative cerebral blood volume in brain tumors.
Radiology. 2008 Nov;249(2):601-13.

Peles E, Lidar Z, Simon AJ, Grossman R, Nass D, Ram Z.
Angiogenic factors in the cerebrospinal fluid of patients with astrocytic brain tumors.
Neurosurgery. 2004 Sep;55(3):562-7; discussion 7-8.

Pisansky TM.
External beam radiotherapy as curative treatment of prostate cancer.
Mayo Clin Proc. 2005 Jul;80(7):883-98.

Provenzale JM, Mukundan S, Barboriak DP.
Diffusion-weighted and perfusion MR imaging for brain tumor characterization and assessment of treatment response.
Radiology. 2006 Jun;239(3):632-49.

Rakusan K.
Coronary angiogenesis. From morphometry to molecular biology and back.
Ann N Y Acad Sci. 1995 Mar;752:257-66.

Ricci PE.
Imaging of adult brain tumors.

Neuroimaging Clin N Am. 1999 Nov;9(4):651-69.

Rijken PF, Bernsen HJ, van der Kogel AJ.

Application of an image analysis system to the quantitation of tumor perfusion and vascularity in human glioma xenografts.

Microvasc Res. 1995;50(2):141-53.

Robinson SP, Howe FA, Griffiths JR, Ryan AJ, Waterton JC.

Susceptibility contrast magnetic resonance imaging determination of fractional tumor blood volume: a noninvasive imaging biomarker of response to the vascular disrupting agent ZD6126.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2007 Nov;69(3):872-9.

Robinson SP, McIntyre DJO, Checkley D, Tessier JJ, Howe FA, Griffiths JR, Ashton SE, Ryan AJ, Blakey DC, Waterton JC.

Tumour dose response to the antivascular agent ZD6126 assessed by magnetic resonance imaging.

Br J Cancer. 2003;88(10):1592-7.

Robinson SP, Rijken PFJW, Howe FA, McSheehy PMJ, van der Sanden BPJ, Heerschap A, Stubbs M, van der Kogel AJ, Griffiths JR.

Tumor vascular architecture and function evaluated by non-invasive susceptibility MRI methods and immunohistochemistry.

J Magn Reson Imaging. 2003;17(4):445-54.

Ross BD, Moffat BA, Lawrence TS, Mukherji SK, Gebarski SS, Quint DJ, Johnson TD, Junck L, Robertson PL, Muraszko KM, Dong Q, Meyer CR, Bland PH, McConville P, Geng H, Rehemtulla A, Chenevert TL.

Evaluation of cancer therapy using diffusion magnetic resonance imaging.

Mol Cancer Ther. 2003;2(6):581-7.

Roth Y, Tichler T, Kostenich G, Ruiz-Cabello J, Maier SE, Cohen JS, Orenstein A, Mardor Y.

High-b-value diffusion-weighted MR imaging for pretreatment prediction and early monitoring of tumor response to therapy in mice.

Radiology. 2004 Sep;232(3):685-92.

Sadeghi N, D'Haene N, Decaestecker C, Levivier M, Metens T, Maris C, Wikler D, Baleriaux D, Salmon I, Goldman S.

Apparent diffusion coefficient and cerebral blood volume in brain gliomas: relation to tumor cell density and tumor microvessel density based on stereotactic biopsies.

AJNR Am J Neuroradiol. 2008 Mar;29(3):476-82.

Salcman M.

Malignant glioma management.

Neurosurg Clin N Am. 1990 Jan;1(1):49-63.

Sampath P, Weaver CE, Sungarian A, Cortez S, Alderson L, Stopa EG.

Cerebrospinal fluid (vascular endothelial growth factor) and serologic (recoverin) tumor markers for malignant glioma.

Cancer Control. 2004;11(3):174-80.

Sathornsumetee S, Rich JN.

Designer therapies for glioblastoma multiforme.

Ann N Y Acad Sci. 2008 Oct;1142:108-32.

Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD, Groothuis DR.

Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties.

Microvasc Res. 1999;58(3):312-28.

Schmainda KM, Rand SD, Joseph AM, Lund R, Ward BD, Pathak AP, Ulmer JL, Badruddoja MA, Krouwer HGJ.

Characterization of a first-pass gradient-echo spin-echo method to predict brain tumor grade and angiogenesis.

AJNR Am J Neuroradiol. 2004;25(9):1524-32.

Schmidek HH, Nielsen SL, Schiller AL, Messer J.

Morphological studies of rat brain tumors induced by N-nitrosomethylurea.

J Neurosurg. 1971 Mar;34(3):335-40.

Seitz RJ, Deckert M, Wechsler W.

Vascularization of syngenic intracerebral RG2 and F98 rat transplantation tumors. A histochemical and morphometric study by use of ricinus communis agglutinin I.

Acta Neuropathol. 1988;76(6):599-605.

Selker RG, Shapiro WR, Burger P, Blackwood MS, Arena VC, Gilder JC, Malkin MG, Mealey JJ, Neal JH, Olson J, Robertson JT, Barnett GH, Bloomfield S, Albright R, Hochberg FH, Hiesiger E, Green S, Group BTC.

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 Aug;51(2):343-55; discussion 55-7.

Serduc R, Bouchet A, Bräuer-Krisch E, Le Duc G.

Microbeam radiation therapy parameters optimization for rat brain tumors palliation. Influence of the microbeam width at constant valley dose.

Phys Med Biol. 2009;Accepted

Serduc R, Bräuer-Krisch E, Bouchet A, Renaud L, Brochard T, Bravin A, Laissue JA, Duc GL.

First trial of spatial and temporal fractionations of the delivered dose using synchrotron microbeam radiation therapy.

J Synchrotron Radiat. 2009 Jul;16(Pt 4):587-90.

Serduc R, Christen T, Laissue J, Farion R, Bouchet A, van der Sanden B, Segebarth C, Bräuer-Krisch E, Duc GL, Bravin A, Rémy C, Barbier EL.

Brain tumor vessel response to synchrotron microbeam radiation therapy: a short-term in vivo study.

Phys Med Biol. 2008 Jul;53(13):3609-22.

Serduc R, Vérant P, Vial J-C, Farion R, Rocas L, Rémy C, Fadlallah T, Brauer E, Bravin A, Laissue J, Blattmann H, 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. 2006 Apr;64(5):1519-27.

Seshadri M, Ciesielski MJ.

MRI-based characterization of vascular disruption by 5,6-dimethylxanthenone-acetic acid in gliomas.

J Cereb Blood Flow Metab. 2009 May.

Sibenaller ZA, Etame AB, Ali MM, Barua M, Braun TA, Casavant TL, Ryken TC.

Genetic characterization of commonly used glioma cell lines in the rat animal model system.

Neurosurg Focus. 2005;19(4):E1-.

Soffietti R.

Chemotherapy of anaplastic oligodendroglial tumours.

Expert Opin Pharmacother. 2004 Feb;5(2):295-306.

Sorensen AG, Batchelor TT, Zhang W-T, Chen P-J, Yeo P, Wang M, Jennings D, Wen PY, Lahdenranta J, Ancukiewicz M, di Tomaso E, Duda DG, Jain RK.

A "vascular normalization index" as potential mechanistic biomarker to predict survival after a single dose of cediranib in recurrent glioblastoma patients.

Cancer Res. 2009 Jul;69(13):5296-300.

Sugahara T, Korogi Y, Kochi M, Ikushima I, Hirai T, Okuda T, Shigematsu Y, Liang L, Ge Y, Ushio Y, Takahashi M.

Correlation of MR imaging-determined cerebral blood volume maps with histologic and angiographic determination of vascularity of gliomas.

AJR Am J Roentgenol. 1998 Dec;171(6):1479-86.

Sun Y, Mulkern RV, Schmidt K, Doshi S, Albert MS, Schmidt NO, Ziu M, Black P,

Carrol R, Kieran MW.

Quantification of water diffusion and relaxation times of human U87 tumors in a mouse model.

NMR Biomed. 2004 Oct;17(6):399-404.

Swenberg JA, Koestner A, Wechsler W, Denlinger RH.

Quantitative aspects of transplacental tumor induction with ethylnitrosourea in rats.

Cancer Res. 1972 Dec;32(12):2656-60.

Tate MC, Aghi MK.

Biology of angiogenesis and invasion in glioma.

Neurotherapeutics. 2009 Jul;6(3):447-57.

Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KSC, Chapman JD, Eckelman WC, Fyles AW, Giaccia AJ, Hill RP, Koch CJ, Krishna MC, Krohn KA, Lewis JS, Mason RP, Melillo G, Padhani AR, Powis G, Rajendran JG, Reba R, Robinson SP, Semenza GL, Swartz HM, Vaupel P, Yang D, Croft B, Hoffman J, Liu G, Stone H, Sullivan D.

Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy.

Int J Radiat Biol. 2006 Oct;82(10):699-757.

Tofts PS, Benton CE, Weil RS, Tozer DJ, Altmann DR, Jager HR, Waldman AD, Rees JH.

Quantitative analysis of whole-tumor Gd enhancement histograms predicts malignant transformation in low-grade gliomas.

J Magn Reson Imaging. 2007 Jan;25(1):208-14.

Tofts PS, Berkowitz B, Schnall MD.

Quantitative analysis of dynamic Gd-DTPA enhancement in breast tumors using a permeability model.

Magn Reson Med. 1995 Apr;33(4):564-8.

Tofts PS, Kermode AG.

Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts.

Magn Reson Med. 1991 Feb;17(2):357-67.

Tozer DJ, Jager HR, Danchaivijitr N, Benton CE, Tofts PS, Rees JH, Waldman AD.

Apparent diffusion coefficient histograms may predict low-grade glioma subtype.

NMR Biomed. 2007 Feb;20(1):49-57.

Tropres I, Grimault S, Vaeth A, Grillon E, Julien C, Payen JF, Lamalle L, Decorps M.

Vessel size imaging.

Magn Reson Med. 2001;45(3):397-408.

Tropres I, Lamalle L, Farion R, Segebarth C, Remy C.

Vessel size imaging using low intravascular contrast agent concentrations.

MAGMA. 2004;17(3-6):313-6.

Tropres I, Lamalle L, Peoc'h M, Farion R, Usson Y, Decorps M, Remy C.

In vivo assessment of tumoral angiogenesis.

Magn Reson Med. 2004;51(3):533-41.

Turetschek K, Preda A, Novikov V, Brasch RC, Weinmann HJ, Wunderbaldinger P, Roberts TPL.

Tumor microvascular changes in antiangiogenic treatment: assessment by magnetic resonance contrast media of different molecular weights.

J Magn Reson Imaging. 2004 Jul;20(1):138-44.

Uehara H, Miyagawa T, Tjuvajev J, Joshi R, Beattie B, Oku T, Finn R, Blasberg R.

Imaging experimental brain tumors with 1-aminocyclopentane carboxylic acid and alpha-aminoisobutyric acid: comparison to fluorodeoxyglucose and diethylenetriaminepentaacetic acid in morphologically defined tumor regions.

J Cereb Blood Flow Metab. 1997 Nov;17(11):1239-53.

Valable S, Lemasson B, Farion R, Beaumont M, Segebarth C, Remy C, Barbier EL.

Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal in vivo and ex vivo study.

NMR Biomed. 2008 Nov;21(10):1043-56.

van Osch MJ, Vonken EJ, Bakker CJ, Viergever MA.

Correcting partial volume artifacts of the arterial input function in quantitative cerebral perfusion MRI.

Magn Reson Med. 2001 Mar;45(3):477-85.

Varallyay CG, Muldoon LL, Gahramanov S, Wu YJ, Goodman JA, Li X, Pike MM, Neuwelt EA.

Dynamic MRI using iron oxide nanoparticles to assess early vascular effects of antiangiogenic versus corticosteroid treatment in a glioma model.

J Cereb Blood Flow Metab. 2009 Apr;29(4):853-60.

Vaupel P, Thews O, Hoeckel M.

Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia.

Med Oncol. 2001;18(4):243-59.

Vautier J, Heilmann M, Dimicoli JL, Volk A. Characterization of an experimental setup to study in vitro permeability properties of macromolecular contrast agents by DCE-MRI.

Proceedings of the fifteenth International Society for Magnetic Resonance in Medicine. Berlin, Germany 2007. p. 969.

Wade TP, Kozlowski P.

Longitudinal studies of angiogenesis in hormone-dependent Shionogi tumors. Neoplasia. 2007 Jul;9(7):563-8.

Walker-Samuel S, Leach MO, Collins DJ.

Evaluation of response to treatment using DCE-MRI: the relationship between initial area under the gadolinium curve (IAUGC) and quantitative pharmacokinetic analysis. Phys Med Biol. 2006 Jul 21;51(14):3593-602.

Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Mealey J, Owens G, Ransohoff J, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR, Wilson CB, Strike TA.

Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. N Engl J Med. 1980 Dec;303(23):1323-9.

Wen PY, Kesari S.

Malignant gliomas in adults. N Engl J Med. 2008 Jul;359(5):492-507.

Wilkins DE, Raaphorst GP, Saunders JK, Sutherland GR, Smith IC.

Correlation between Gd-enhanced MR imaging and histopathology in treated and untreated 9L rat brain tumors. Magn Reson Imaging. 1995;13(1):89-96.

Zhang J, van Zijl PCM, Laterra J, Salhotra A, Lal B, Mori S, Zhou J.

Unique patterns of diffusion directionality in rat brain tumors revealed by high-resolution diffusion tensor MRI. Magn Reson Med. 2007 Sep;58(3):454-62.

Zwick S, Strecker R, Kiselev V, Gall P, Huppert J, Palmowski M, Lederle W, Woenne EC, Hengerer A, Taupitz M, Semmler W, Kiessling F.

Assessment of vascular remodeling under antiangiogenic therapy using DCE-MRI and vessel size imaging. J Magn Reson Imaging. 2009 May;29(5):1125-33.

PUBLICATIONS

Liste des publications

2009

M. Beaumont, B. Lemasson, R. Farion, C. Segebarth, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Characterization of tumor angiogenesis in rat brain using Iron-based Vessel Size Index MRI in combination with Gadolinium-based Dynamic Contrast Enhanced MRI.

J Cereb Blood Flow Metab 2009 jul; 29(10):1714-26

B. Lemasson, O. Duchamp, E. L. Barbier, P. Provent, X. Tizon, M. Coquand-Gandit, C. Segebarth, B. Van der Sanden, P. Genne and C. Rémy.

Multiparametric MRI Characterization of Six Glioma Models - Link to Carmustine Treatment Outcome.

Neuro-Oncology en révision.

B. Lemasson*, R. Serduc, C. Maisin, A. Bouchet, N. Coquery, P. Robert, C. Segebarth, G. Le Duc, I. Tropès, C. Rémy and E.L. Barbier.

Dual-injection of a low and a macro-molecular weight contrast media to monitor the blood-brain barrier status in a glioma model under therapy

Radiology en révision.

B. Lemasson, T. Christen, X. Tizon, R. Farion, N. Fondraz, P. Provent, C. Segebarth, and E. L. Barbier, P. Genne, O. Duchamp and C. Rémy.

Evaluation of five MRI biomarkers in a human glioma model under cytotoxic and antiangiogenic therapies.

NMR in Biomed en soumission.

T. Christen, B. Lemasson, N. Pannetier, R. Farion, C. Segebarth, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Evaluation of a quantitative bold approach to map local blood oxygen saturation.

J Cereb Blood Flow Metab en soumission.

T. Mannic, A. Sidibé, C. Le Henaff, S. Bouillot, B. Lemasson, J-O. Contreres, C. Rémy, E. Barbier, G. Tobelem, P. Huber, E. Dupuy and I. Vilgrain.

Evidence for in vivo VE-cadherin phosphorylation at site Y658 in tumoral angiogenesis: implication of Syk pathway.

Circulation research en soumission.

B. Lemasson*, A. Bouchet*, G. Le DUC, C. Maisin, E. Bräuer-Krisch, E. A. Siegbahn, L. Renaud, C. Rémy, E. L. Barbier, A. Bravin, J. A. Laissue and R. Serduc.

First evidences for a preferential effect of synchrotron microbeam radiation therapy on tumor vascular network

Int J Radiat Biol en soumission.

B. Lemasson, T. Christen, R. Serduc, C. Maisin, A. Bouchet, C. Segebarth, G. Le Duc,

C. Rémy and E.L. Barbier.

Evaluation of the relationship between ^{15}O MR measurement and hypoxia: impact of an antiangiogenic treatment on a gliosarcoma model.

NMR in biomed. en cours de rédaction.

2008

S. Valable, B. Lemasson, R. Farion, C. Segebarth, C. Remy, and E. L. Barbier.

Assessment of blood volume, vessel size, and the expression of angiogenic factors in two rat glioma models: a longitudinal in vivo and ex vivo study.

NMR Biomed. 2008 Nov; 21(10):1043-56.

Communications orales

2010

B. Lemasson, R. Serduc, A. Bouchet, N. Coquery, P. Robert, G. Le Duc, I. Tropres, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Characterization of vessel permeability using a low- and a macro-molecular-weight-contrast media in a glioma model after antiangiogenic therapy and radiotherapy

ORAL, CLARA 2010

B. Lemasson, T. Christen, R. Serduc, C. Maisin, A. Bouchet, C. Segebarth, G. Le Duc, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Evaluation of the relationship between ISO₂ MR measurement and hypoxia: impact of an antiangiogenic treatment on a gliosarcoma model.

ORAL-Tumor Therapy Response session, ISMRM-ESMRMB 2010

2009

T. Christen, B. Lemasson, N. Pannetier, R. Farion, C. Segebarth, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Evaluation of a New Quantitative BOLD Approach to Map Local Blood Oxygen Saturation

ORAL-fMRI Calibration session, ISMRM 2009.

N. Pannetier, B. Lemasson, T. Christen, R. Farion, C. Segebarth, C. Remy, and E. L. Barbier.

Vessel Size Imaging with Iron Oxide and with Gadolinium: A Comparative Study in Rodent

ORAL-Perfusion & Diffusion: Animal Models, ISMRM 2009

2008

B. Lemasson, T. Christen, X. Tizon, R. Farion, E. Barbier, C. Segebarth, P. Genne, O. Duchamp et C. Remy,

Evaluation par imagerie par résonance magnétique de l'efficacité de deux traitements anti-tumoraux sur un modèle de glioblastome humain.

Oral GRAMM 2008

Communications sous forme de poster

2010

B. Lemasson, R. Serduc, C. Maisin, A. Bouchet, N. Coquery, P. Robert, G. Le Duc, I. Tropres, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Dual-injection of a low- and a macro-molecular-weight-contrast media to monitor the blood-brain barrier status in a glioma model under therapy

Poster 4467, ISMRM 2010

B. Lemasson, T. Christen, R. Serduc, C. Maisin, A. Bouchet, C. Segebarth, G. Le Duc, C. Rémy, and E. L. Barbier.

ISO₂ measured by MRI in tumor: a reporter of hypoxia ?

Poster, CLARA 2010

2009

B. Lemasson, N. Pannetier¹, T. Christen, J. Warnking, A. Krainik, R. Farion, C. Segebarth, O. Duchamp, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Assessment of Vascular Reactivity in Two Rat Brain Gliomas (C6 and RG2) by Blood Volume Fraction MRI During CO₂ Challenge and Correlation to Mature Vessels.

Poster 1012, ISMRM 2009

B. Lemasson, T. Christen, N. Pannetier, R. Farion, C. Segebarth, X. Tizon, P. Provent, P. Genne, E. L. Barbier, O. Duchamp, and C. Rémy

Avastin alone or combined to Campto® reduces local Blood Oxygen Saturation in an orthotopic human glioblastoma model (U87-MG) in nude rats

Poster 1013, ISMRM 2009

T. Christen, B. Lemasson, N. Pannetier, O. Detante, R. Farion, E. Grillon, C. Segebarth, C. Rémy, and E. L. Barbier

Application of a modified quantitative BOLD approach to monitor local Blood Oxygen Saturation in two glioma models and a stroke model in rat

Poster 1053, ISMRM 2009

2008

B. Lemasson, T. Christen, R. Farion, E. L. Barbier, X. Tizon, C. Segebarth, P. Genne, O. Duchamp, and C. Rémy.

Evaluation of Tumor Response to Carmustine and Sorafenib with MRI in an Orthotopic Human Glioblastoma Model Xenografted in Nude Rats.

ISMRM 2008 (poster 2200) and AACR 2008

M. Beaumont, B. Lemasson, R. Farion, C. Segebarth, C. Rémy, and E. L. Barbier.

Vascular Permeability to Gd-DOTA and USPIO in C6 and RG2 Rat Glioma Models
Poster 1887, ISMRM 2008

2007

S. Valable, B. Lemasson, R. Farion, C. Segebarth, C. Remy, and E. L. Barbier.

Relation between changes in microvasculature detected by MRI and evolutions of the expression of the main angiogenic factors on two different rat brain tumors.

ISMRM/ESMRMB 2007.

2006

S. Valable, B. Lemasson, R. Farion, C. Segebarth, C. Remy, and E. L. Barbier

In vivo longitudinal assessment of the changes in microvasculature of brain tumours in rats.

ISMRM 2006

ANNEXES
