Développement d'interfaces micro/nano pour la capture d'espèces biologiques in vivo

Matthieu Dreyfus

▶ **To cite this version:**

Matthieu Dreyfus. Développement d'interfaces micro/nano pour la capture d'espèces biologiques in vivo. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAS022 . tel-01359196

HAL Id: tel-01359196

https://theses.hal.science/tel-01359196v1

Submitted on 2 Sep 2016

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologies, Instrumentation, Signal**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Matthieu DREYFUS

Thèse dirigée par **le Pr. François BERGER**

préparée au sein du **Laboratoire CLINATEC**
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Développement d'interfaces micro/nano pour la capture d'espèces biologiques *in vivo*

Thèse soutenue publiquement le **17 Décembre 2015**,
devant le jury composé de :

Monsieur Emmanuel GARCION
Docteur, Université d'Angers, Rapporteur
Monsieur Bertrand DEVAUX
Professeur, Université Paris Descartes, Rapporteur
Monsieur Emmanuel GAY
Professeur, Université Grenoble Alpes, Examinateur, Président du jury
Monsieur Laurent DURAFFOURG
Ingénieur-Chercheur, CEA Grenoble, Invité
Monsieur François BERGER
Professeur, Université Grenoble Alpes, Directeur de thèse

À Léo et Maël, mes deux plus belles expériences
À « grand-père »

Remerciements

Je remercie chaleureusement le Pr. François Berger pour m'avoir accueilli dans l'unité. François, c'est un véritable et IMMENSE merci que je vous adresse. Vous m'avez conseillé de partir en 2009 puis permis de revenir en 2011. Depuis je n'ai cessé d'apprendre, de découvrir et d'entreprendre avec votre soutien et la confiance sans faille que vous m'avez accordés. Merci de votre présence dans les épisodes plus durs et dans les beaux moments de vie. Ces presque cinq années de recherche sous votre direction auront été sans conteste ma plus belle expérience professionnelle, et c'est avec un farouche désir de poursuivre que je conclus ce travail de thèse. Pour tout cela, je vous serai éternellement reconnaissant.

Bien entendu, ce travail n'a pu être réalisé qu'avec l'aide d'un très grand nombre de personnes que je souhaite également remercier ici.

Ali, Adrien, Céline, Affif, merci à vous d'avoir fait de chaque journée de travail une aventure différente. Merci pour les rires aux éclats, pour la grande solidarité dans les instants de vie… Bien au delà du travail, c'est enrichies de très belles amitiés que ces « années thèse » prennent fin.

Vincent, merci pour « l'espace K » ! Le reste n'est que futilité …

Mylène, Diane, Rolande, Guillaume, Cyril, Clément, merci de votre soutien et de votre aide ô combien précieuse pour parvenir à mener à bien toutes les manipes au « R3 », vous êtes une équipe de choc, sans vous tout cela n'aurait pas été possible.

Je remercie tout spécialement Michèle pour toute l'aide que tu m'as apportée en biologie moléculaire ainsi que tous les membres de l'unité qui ont contribué aux réflexions, aux critiques, à la réalisation des manipes et à faire vivre ces travaux : Laurie, Didier, Hana, Arnaud, Marie, Lauriane, David, Julien, Graçiane, j'ai appris beaucoup grâce à vous, je vous remercie infiniment.

Un grand merci à Bénédicte Guehl et à Laetitia François, sans vous nous serions perdus !

Je souhaite remercier encore tout le personnel médical et hospitalier avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours de cette thèse.
Je remercie chaleureusement le Dr. Laurent Selek, un immense merci à toi pour ton aide, ta disponibilité, ta bonne humeur et ta redoutable efficacité.
Je remercie le Dr. Pierre Durand, « Pierrot », pour ton aide, ta présence et pour toutes les horreurs qu'on a pu dire.
Je remercie toute l'équipe du « Secteur Sujet Patient" de Clinatec: Nicolas Aubert, Lilia, Johan, Stéphane, Béatrice, Jean Claude, Manuela, Caroline et pardon à ceux que j'oublie.
Merci à tous les internes pour les fructueux échanges : Eric, Mikael, Cécile, Olivier, Lionel, Louis.

J'adresse également un grand merci à Stéphanie Guillermet et à Pascal Gayet, ainsi qu'à toute l'équipe de la société Fluoptics, nous avons construit de belles choses et je souhaite beaucoup de succès au projet GliomTracker.

Je tiens à remercier Hedi Gharbi et Candice Fauter pour la société MaunaKea Technologies. Vos conseils et votre disponibilité ont largement contribué à la construction de mon travail.

Je remercie tous les collaborateurs du Département Technologies Silicium et de Léti 3S : Fréderic Gaillard, Véra Aillelo, Christelle Yeromonahos, Vincent Jouceaume, Eric Rouchouze et Denis Renaud.

Je remercie également Nicolas Mollard qui nous a ouvert les portes de la plateforme de nano caractérisation.

Ce travail n'aurait naturellement pas pu être fait sans soutien financier, aussi je souhaite remercier le réseau des Instituts Carnot qui a soutenu avec force nos projets et financé les trois premières années de la thèse. Merci également à la fondation InnaBioSanté, à la Ligue contre le Cancer et au Cancéropôle de Lyon.

Si cette thèse a été l'occasion de très belles et nombreuses rencontres, je pense à mes racines, je pense au soutien de mes proches.

Je remercie mes parents, mes frères et ma sœur pour leur indéfectible soutien, leur amour, leurs encouragements. Ça n'a pas toujours été de tout repos et votre présence m'a permis de ne jamais oublier qu'on peut rire de tout, et continuer à avancer. Je vous aime.

Je remercie mes amis de toujours, mon Jeannot pour les longs débriefings qui font du bien mais qui finissent toujours trop tard dans la nuit…
Marine, Rémi, Véréna, Aymeric, je pense bien à vous au moment où j'écris ces mots.

Enfin, j'ai gardé précieusement ces mots pour mes deux garçons, Léo, Maël, et pour ma merveilleuse femme.

Mes fils, vous êtes la plus belle chose que j'ai pu entreprendre dans ma vie. Rien n'est et rien ne sera jamais plus comme avant. Je suis plus riche de vous. Je suis tellement fier de vous, je vous aime.

Mon amour, jamais je n'y serais arrivé sans toi. De Grenoble 2009 à Grenoble 2015, crochet par mille et une aventures. Tu m'as donné la force de faire, l'envie d'aller au bout, de ne rien lâcher. Je suis né une deuxième fois avec toi. Tu m'as donné les deux plus merveilleux des enfants. MERCI d'être là, MERCI d'être toi. Merci de m'avoir supporté tout au long de ce drôle de voyage et pour tout le support des dernières semaines. Promis, plus de thèse. Plus libre, inventons demain. Je t'aime plus que tout.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION ---------- **1**

I. Le système nerveux central. ---------- **2**

I.1 Généralités. ---------- 2

I.2 Un organe peu accessible. ---------- 4

II. Des pathologies mal comprises. ---------- **5**

II.1 Les glioblastomes. ---------- 6

II.1.1 La stratégie thérapeutique en échec. ---------- 6

II.1.2 Pourquoi cet échec ? ---------- 9

a. Leur hétérogénéité est grande. ---------- 9

b. Il n'y a presque pas de biomarqueurs (marqueurs biologiques). ---------- 10

c. Infiltration tumorale et récidive. ---------- 12

II.2 Neurogenèse, cellules souches et glioblastomes. ---------- 14

II.2.1 La zone sous-ventriculaire, territoire de neurogenèse. ---------- 14

II.2.2 Niches neurogéniques chez les grands mammifères. ---------- 15

II.2.3 Glioblastomes et zone sous ventriculaire. ---------- 17

II.2.4 Le modèle des neurosphères. ---------- 18

II.3 La maladie de Parkinson et la stimulation cérébrale profonde. ---------- 20

III. Explorer le tissu nerveux. ---------- **23**

III.1 L'apport des micro et nano technologies. ---------- 23

III.2 L'imagerie interventionnelle. ---------- 27

III.2.1 Les systèmes d'imagerie lourde. ---------- 27

III.2.2 Les systèmes d'imagerie dédiés à la détection de fluorescence. ---------- 28

III.2.3 Les fluorophores validés pour un usage clinique. ---------- 29

a. Le Gliolan®. ---------- 29

b. La fluorescéine. ---------- 31

c. Le vert d'indocyanine (ICG) et les traceurs proche infrarouge. ---------- 31

IV. Les objectifs du travail de thèse. ---------- **32**

IV.1 Nouvelle stratégie matériau. ---------- 32

IV.2 Améliorer la localisation des empreintes. ---------- 33

MATERIEL ET METHODES ---------- **35**

I. Cultures cellulaires. ---------- **36**

I.1 Entretien des lignées cellulaires. ---------- 36

a) Glioblastome murin F98 . ---------- 36

b) Glioblastome humain U87-MG. 36
I.2 Culture primaire de cellules souches neurales. 36
a) Etablissement de cultures primaires. 36
b) Mise en différenciation des Neurosphères. 37
I.3 Transduction lentivirale. 38

II. Techniques de microscopie. 38
II.1 Immunocytochimie de typage après différenciation des neurosphères. 38
II.2 Microscopie Electronique à balayage. 39

III. Modèles Animaux. 39
III.1 Implantation stéréotaxique de cellules tumorales chez le rat. 39
III.2 Xenogreffe ectopique de cellules tumorales chez la souris. 41
III.3 Chirurgie stéréotaxique chez le primate non humain. 42
a) Prélèvements de fluides biologiques avant et après chirurgie. 42
b) Analyse comportementale. 42
c) Procédure chirurgicale. 42
d) Recueil des empreintes tissulaires sur silicium. 43

IV. Préparation des échantillons pour l'analyse transcriptomique. 43

RESULTATS 45

I. Capture tissulaire sur silicium poreux. 46
I.1 Publication en préparation: Mesoporous silica chips for safe deep brain proteomic investigation, a preclinical study. 46
I.2 Résultats complémentaires *in vitro* . 76
a) Etablissement de cultures primaires à partir d'empreintes sur silicium. 76
b) Evaluation du caractère multipotent en réponse au sérum de veau. 77
c) Analyse transcriptomique des cultures primaires issues d'empreintes sur silicium. 79
I.3 Conclusion sur les résultats de la partie I. 83

II. Un dispositif d'empreinte "optiquement guidé". 85
II.1 Publication 2: "Optimprint : a new optico-molecular device for brain tumor theranostic investigation." 85
II.2 Vers l'utilisation de nouveaux traceurs fluorescents. 108
II.3 Conclusion sur les résultats de la partie 2. 111

III. Les dispositifs d'empreinte « 3.0 » . 112
III.1 Brevet concernant un dispositif d'empreinte guidé par détection de fluorescence. 112

III.2 Brevet concernant un dispositif d'empreinte tissulaire sur silicium pour la chirurgie coelioscopique. ---------- 121

DISCUSSION ---------- 142

BIBLIOGRAPHIE ---------- 149

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Illustration de l'anatomie du SNC (D'après F.H. Netter, Human Anatomy) 2
Figure 2 : Représentation schématique des composants cellulaires du SNC 4
Figure 3 : Echec de l'Avastin® en essai clinique de phase III 8
Figure 4 : Complexité protéomique du plasma sanguin 11
Figure 5 : Illustration schématique des composants de la SVZ (D'après Alvarez-Buylla A., 2002 et Doetsch, F. 1997) 15
Figure 6: Principe schématique du Neurosphere Assay 19
Figure 7: Illustration de la collecte de micro fragments tissulaires au cours d'une intervention de DBS 21
Figure 8: Description de l'outil d'empreinte 22
Figure 9: Diversité architecturale des silicium poreux, caractérisation en MEB 26
Figure 10: Principe d'utilisation du Gliolan 30
Figure 11: Illustration de la croissance tumorale suivie en IRM dans un modèle de glioblastome orthotopique syngénique chez le rat. 41
Figure 12: Neurosphere assay à 4 ou 7 jours de culture (DIV) 77
Figure 13 (P.90): Différenciation des cellules souches issues des primo cultures en réponse au serum de veau foetal. 77
Figure 14: Liste des fonctions cellulaires différemment régulées. 80
Figure 15: Gènes régulés identifiés dans la voie de signalisation "Cyclins and cell cycle regulation". 81
Figure 16: Gènes régulés identifiés dans la voie de signalisation "Stem Cell Pluripotency" 82
Figure 17: Imagerie de fluorescence des gliomes par un traceur proche infrarouge, AngioStamp™ 109
Figure 18: Utilisation de l'AngioStamp™ et de la fluoresceine sodique pour l'imagerie de fluorescence des tumeurs cérébrales. 110

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-ALA : acide 5-aminolévulinique (principe actif du Gliolan®)

ADN : acide désoxyribonucléique

ANSM : agence nationale de sécurité du médicament (anciennement AFSSAPS)

ARN : acide ribonucléique

bFGF : basic fibroblast growth factor

CE-RTV : contrast-enhanced residual tumor volume

Da : Dalton, unité de poids moléculaire (1Da= masse d'un atome d'hydrogène soit 1g.mol^{-1})

EGF : epidermal growth factor

EOR : extent of resection

FPS : free progression survival

FUI : fonds unique interministériel

GFAP : glial fibrillary acidic protein

GTR : gross total resection

Gy : Gray, unité du système international pour la dose absorbée lors d'une irradiation par des rayonnements ionnisants

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisiation,

MALDI-TOF : MALDI Time of Flight

PCR : polymerase chain reaction

IRM : imagerie par résonnance magnétique

GBM : glioblastome (grade IV de la classification OMS)

MEB : microscopie électronique à balayage

NPV : negative predictive value

PpIX : protoporphyrine IX (produit métabolique du 5-ALA)

PET : positron emission tomography

SPECT : single photon emission computed tomography

ICG : indocyanin green

PPV : positive predictive value

Si : Silicium

SiPo : Silicium poreux

IHC : immunohistochimie

SNC : système nerveux Central

LCR : liquide céphalo-rachidien

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SVZ : subventricular zone

TDM / CT : tomodensitométrie ou scanner (Computed Tomography)

INTRODUCTION

I. Le système nerveux central.

I.1 Généralités.

En 1906, Santiago Ramon y Cajal et Camillo Golgi reçoivent le Prix Nobel de Physiologie et Médecine pour leurs travaux sur la structure du système nerveux. Quelques années plus tard, en 1932, Scherrington et Adrian reçoivent la même distinction pour la description de la synapse et du fonctionnement des neurones. Le XXème siècle verra par la suite l'avènement des "Neurosciences", discipline nouvelle au carrefour de la biologie, de la biochimie, de la physiologie, de la médecine, et aujourd'hui, de la biophysique, des mathématiques et de la bio-informatique. De grands progrès méthodologiques, techniques et technologiques vont permettre d'aborder l'étude du cerveau et de son fonctionnement. Plus largement, on parle de système nerveux central (SNC) qui comprend les deux hémisphères cérébraux, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière.
À ces structures s'ajoute le système ventriculaire (les 2 ventricules latéraux connectés au 3ème ventricule par les trous de Monroe et l'aqueduc de Sylvius faisant jonction entre les 3ème et 4ème ventricules) dans lequel circule le liquide céphalo rachidien (LCR).

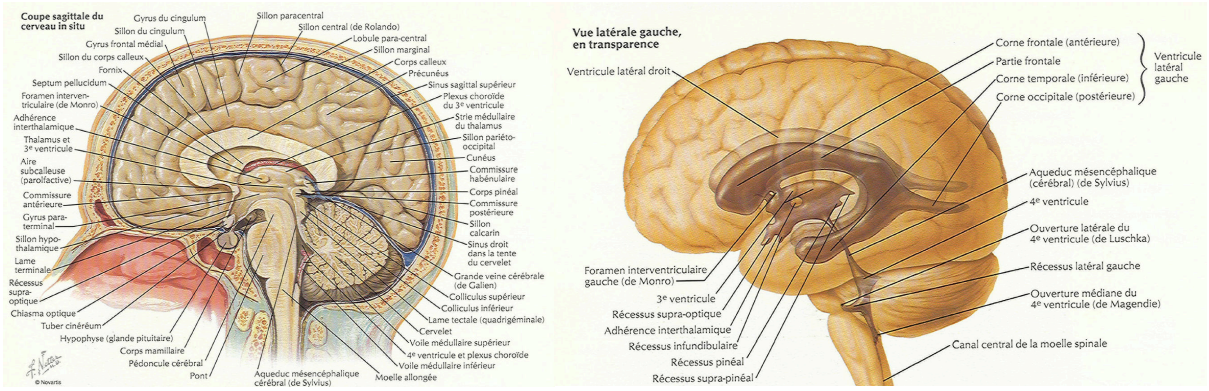


Figure 1 : Illustration de l'anatomie du SNC (D'après F.H. Netter, Human Anatomy)

Le SNC est composé de différentes entités cellulaires qui en assurent le fonctionnement.

- Neurones: unité fonctionnelle de base du tissu nerveux, ces cellules sont spécialisées dans la réception, l'intégration et la transmission de l'information électrique sous forme de potentiels d'action.

- Cellules gliales:

- *astrocytes*: ils ont longtemps été considérés comme des cellules de soutien sans fonction

particulière. On sait aujourd'hui que les astrocytes participent effectivement au soutien métabolique des neurones mais qu'ils assurent également de très nombreuses autres fonctions de régulation et de communication qui influencent la propagation du signal. Ils occupent notamment un rôle central dans les phénomènes de plasticité cérébrale et de mémorisation.

- *oligodendrocytes:* ces cellules interviennent dans la formation de la gaine de myéline qui entoure les axones des neurones de la substance blanche. La structure discontinue de la gaine de myéline (et des noeuds de Ranvier) permet une conduction saltatoire du potentiel d'action, augmentant considérablement la vitesse de conduction.

- Ependymocytes: le long du système ventriculaire, ces cellules forment une paroi à l'interface entre le LCR et le tissu nerveux. Elles permettent, grâce à des cils vibratiles la circulation du LCR, assurent des fonctions de transport métabolique et pourraient être à la base du processus de neurogenèse sous ventriculaire (voir paragraphe II.2.1).

- Endothélium vasculaire: "organe dans l'organe", le réseau vasculaire arbore une structure spécifique dans le système nerveux central. L'endothélium est constitué de cellules qui forment des jonctions serrées assurant une fonction de barrière sélective, la barrière hémato encéphalique (BHE).

- Cellules microgliales: "macrophages du cerveau", ces cellules, d'origine hématopoïétique, participent à la surveillance immunitaire et occupent un rôle central dans les phénomènes inflammatoires et de réparation.

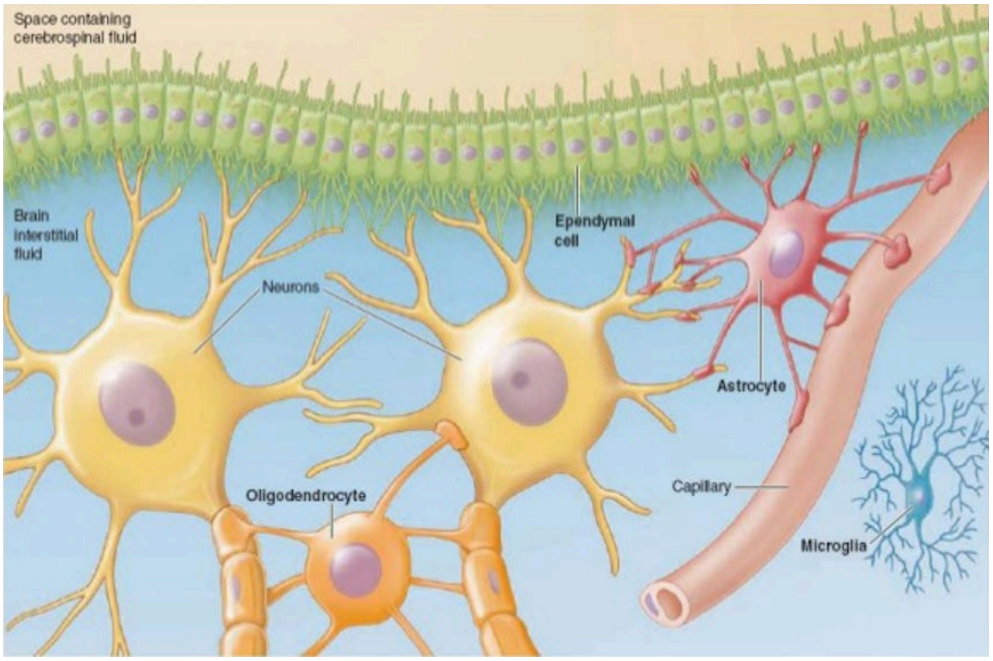


Figure 2 : Représentation schématique des composants cellulaires du SNC

I.2 Un organe peu accessible.

Le SNC est un organe très peu accessible à l'exploration fonctionnelle. Son anatomie complexe et la distribution des fonctions cérébrales en territoires multiples en font l'organe le plus difficile à explorer sur les plans cellulaire, moléculaire et fonctionnel. Ceci explique un retard considérable dans le traitement des pathologies cérébrales comparativement aux autres organes du corps humain. Même si les connaissances sur le fonctionnement du SNC n'ont cessé de croître dans le dernier siècle, il reste encore beaucoup à explorer, preuve en est le programme Européen *Human Brain Project* financé à hauteur d'1,2 milliards d'euros et lancé en Octobre 2013. Ce projet fédératif de recherche sur le fonctionnement du cerveau humain regroupe 112 instituts, 24 pays et 12 thématiques de recherche en neurosciences. Parmi les objectifs visés se trouvent la modélisation complexe du cerveau par un supercalculateur, la cartographie détaillée des pathologies cérébrales, le développement d'une théorie multi échelle du cerveau et le transfert de ces savoirs vers l'industrie. [1]

Longtemps, ce sont les lésions du tissu nerveux qui ont permis de comprendre les relations entre structure et fonction, faisant de certains malades des exemples célèbres, Phineas Gage et le lobe frontal [2] ou Henry Molaison et les structures du système limbique [3], toujours étudiés aujourd'hui. Le raffinement des méthodes, et plus particulièrement depuis une dizaine d'années, le développement des techniques d'analyse à grande échelle et à haut

débit ont permis la construction ou la consolidation de nombreuses librairies biologiques, autorisant des décryptages moléculaires à tous les niveaux : génomique, épigénétique, transcriptomique et protéomique [4,5]. Cependant, parmi les obstacles persistants qui se dressent dans la compréhension des phénomènes pathologiques, se trouve le fait que les tissus cérébraux humains ne sont souvent accessibles que *post mortem*, à des stades donc très tardifs/terminaux de maladies. D'un point de vue éthique et pratique, leur recueil est un processus complexe qui s'associe avec la souffrance des familles. De plus, de nombreuses publications ont rapporté l'impact du délai post mortem sur la qualité des échantillons, soulevant la problématique d'une dégradation pouvant être importante avec les délais de préparation qui s'allongent, source potentielle de biais expérimentaux [6–10].
Dans les phases symptomatiques précoces, l'accès au tissu nerveux pathologique est limité aux indications de stéréobiopsies ou aux pièces d'exérèse chirurgicale. D'une part, l'essentiel de ces prélèvements reste destiné à l'analyse anatomopathologique à visée diagnostique, et d'autre part, même si le chirurgien dispose aujourd'hui d'outils de localisation d'une précision remarquable (neuronavigation, bras robotisés etc...), la biopsie conventionnelle par section des tissus demeure un acte qui peut générer des complications [11–13] et qui ne peut être entrepris dans les territoires péri-tumoraux ou les noyaux profonds dans les maladies neurodégénératives.
Ensemble, ces éléments font émerger dans la pratique clinique un besoin crucial d'accès au tissu nerveux dans le contexte chirurgical et de dispositifs médicaux capables de prélever de l'information biologique (cellules, fluides, macromolécules et métabolites) de manière peu lésionnelle. Lever ce verrou technologique ouvre la voie à une compréhension accrue des mécanismes moléculaires qui sont au cœur de la pathologie.

II. Des pathologies mal comprises.

Les pathologies du SNC sont classiquement subdivisées en plusieurs grandes familles: les pathologies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer, de Parkinson etc.), les pathologies tumorales (gliomes, méningiomes etc.), les pathologies psychiatriques (schizophrénie, troubles obsessionnels compulsifs etc…) … Deux de ces ensembles nous intéressent ici plus particulièrement, les tumeurs et les maladies neurodégénératives.
Améliorer la prise en charge et la connaissance des pathologies cérébrales passe inévitablement par le recensement du besoin biomédical. Comprendre ce besoin au contact du

clinicien permet d'élaborer des prototypes (ou des protocoles de recherche) qui y répondent. La stratégie du laboratoire repose sur l'élaboration rapide de prototypes, ou de démonstrateurs dont le développement est assuré, dès le départ et dans toutes les phases amont, en étroite collaboration avec l'utilisateur final. La multidisciplinarité et l'unité de lieu permettent d'aller rapidement dans les étapes de validation préclinique, d'analyse de biocompatibilité et de portage règlementaire. Le transfert clinique de stratégies très innovantes dans le contexte du glioblastome prend tout son sens lorsque, d'un point de vue strictement éthique, l'on mesure la balance bénéfice / risque pour le patient. Cette approche permet de valider rapidement, dans un environnement hautement sécurisé pour le patient, la fonctionnalité et l'opérabilité clinique de nouvelles modalités diagnostiques ou pronostiques. Ces preuves de concept peuvent alors servir de base pour la dissémination à d'autres centres, et la déclinaison pour d'autres pathologies non tumorales, typiquement, le cerveau neurodégénératif.

II.1 Les glioblastomes.

II.1.1 La stratégie thérapeutique en échec.

Les tumeurs primitives du système nerveux central représentent 3 à 5% des cancers en France, soit 10 à 15 cas pour 100 000 habitants. De très nombreuses données sur les glioblastomes sont disponibles, notamment au travers des travaux de l'Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française (ANOCEF) qui tient la base de données française des tumeurs cérébrales, et du *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS). Une des problématiques dans l'enregistrement des données épidémiologiques réside dans la difficulté à classifier ces tumeurs. Plusieurs types de classification coexistent. Le standard international repose sur la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans sa quatrième Edition de 2007 [14]. Cette classification proposée initialement en 1979 [15] a connu de nombreuses révisions pour intégrer des données relatives à l'origine cellulaire des tumeurs, à leur localisation puis plus tard, aux premières données moléculaires associées. En marge de la classification OMS, il existe également une classification française proposée par l'hôpital Sainte-Anne [16,17] qui apporte des critères cliniques de classification comme la prise de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Parmi l'ensemble des tumeurs cérébrales, le glioblastome multiforme (GBM), grade IV de la classification OMS, demeure la tumeur de plus sombre pronostic. La survie médiane des

patients au diagnostic est de 15 mois. Les traitements actuels consistent, lorsque c'est possible, en une exérèse chirurgicale suivie de radio/chimiothérapie. Il faut ici souligner les extraordinaires progrès qui ont révolutionné l'instrumentation et les techniques chirurgicales. En imagerie, les rayons X en chaîne radiographique puis la tomodensitométrie (TDM ou scanner) vont conduire au développement de la ventriculographie, de l'angioscanner… L'IRM viendra compléter les bilans pré-opératoires. La mise au point et le perfectionnement des cadres de stéréotaxie (de Talayrach, de Leksell) viennent augmenter considérablement la précision du geste et la localisation des instruments dans le référentiel 3D. Aujourd'hui, les blocs sont équipés de microscopes (Pentero® de Zeiss, Surgiscope® d'ISIS) qui sont interfacés avec des systèmes de neuronavigation qui donnent à tout instant la position exacte de l'instrument dans le référentiel d'imagerie pré-opératoire. La neuroendoscopie a conduit à de nouveaux abords moins invasifs, comme la chirurgie trans-sphénoïdale pour les adénomes hypophysaires par exemple. La neurochirurgie fonctionnelle autorise des interventions au cours desquelles on réveille le patient afin de faire une cartographie des aires fonctionnelles, voire des enregistrements électrophysiologiques, préservant les fonctions cognitives des patients. La tendance actuelle, enfin, est à la chirurgie stéréotaxique sans cadre (*frameless*) qui repose sur des systèmes de type chirurgie robotisée, comme le bras ROSA® de la société Medtech qui assure la fusion des images pré-opératoires et rend possible la planification et la réalisation de trajectoires avec une précision submillimétrique. Les abords frameless s'étendent et seront probablement élargis à l'avenir grâce à l'arrivée des systèmes d'IRM intra-opératoires et de TDM per-opératoires dont les coûts sont en train de diminuer. Ces grandes avancées ont indéniablement augmenté la précision et l'efficacité du geste chirurgical, même si de nombreux obstacles persistent dans le traitement des GBM.

En parallèle des progrès des techniques chirurgicales, des efforts considérables ont été menés dans la prise en charge thérapeutique des GBM ces dernières années, notamment autour du développement de drogues dirigées contre la néoangiogenèse (fabrication de nouveaux vaisseaux) tumorale. Depuis la découverte des facteurs pro angiogéniques par le Pr. J. Folkman dans les années 70 [18,19], de très nombreuses stratégies ont été développées avec l'espoir que ces drogues offriraient une solution thérapeutique efficace. Toutefois, plusieurs dizaines d'années plus tard, force est de constater que la stratégie thérapeutique est en échec. Un des exemples les plus retentissants est l'échec du bevacizumab (Avastin®) en essai clinique de phase III relayé par une publication dans le *New England Journal of Medicine* en

2014 [20]. La figure ci-dessous, extraite de l'article, illustre l'absence d'effet de l'Avastin sur la survie et les conclusions de l'étude déclarent « First-line use of bevacizumab did not improve overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma. Progression-free survival was prolonged but did not reach the prespecified improvement target ». Littéralement, « l'utilisation en première intention du bevacizumab n'a pas augmenté la survie globale des patients avec un GBM nouvellement diagnostiqué. La durée de progression sans récidive a été prolongée mais n'a pas atteint le seuil significatif escompté ». La plupart des thérapies ciblées testées à ce jour ont connu le même échec.

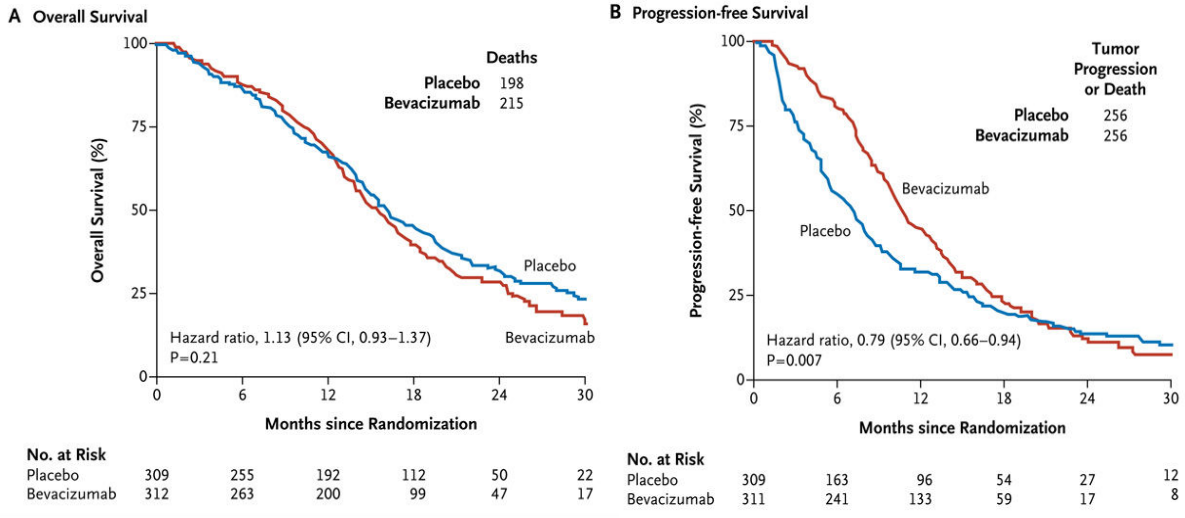


Figure 3 : Echec de l'Avastin® en essai clinique de phase III

Enfin, quelques approches en rupture se développent depuis quelques années, ce sont souvent des modalités thérapeutiques basées sur des principes physiques. On peut citer par exemple la mise au point du Gamma Knife et les progrès de la radiochirurgie (rayons gamma ou rayons X) [21]. De très nombreux travaux utilisent également les faisceaux ultrasonores, soit pour des approches de thermo ablation soit pour des perméabilisations transitoires de la barrière hémato-encéphalique, qui autoriseraient une délivrance accrue de drogues dans les territoires ciblés [22–24]. On voit également émerger des approches de microcurie thérapie pour les gliomes qui reposent sur l'utilisation et la délivrance localisée de micro/nano particules radioactives (rhenium, holmium …) [25,26] qui augmentent considérablement la dose déposée localement (jusqu'à 1800Gy et plus) comparativement aux 60Gy en 30 fractions qui constituent le standard. Ces développements font partie des stratégies prometteuses pour la thérapie des glioblastomes.

II.1.2 Pourquoi cet échec ?

Les GBM sont des tumeurs extrêmement complexes pour lesquelles la prise en charge se heurte à plusieurs difficultés majeures.

a. Leur hétérogénéité est grande.

De nombreuses publications scientifiques se sont intéressées à l'architecture cellulaire et moléculaire de ces tumeurs. Il en ressort une segmentation en territoires tissulaires présentant des profils très variés [27]. On trouve classiquement au centre de la tumeur une zone nécrotique et, en périphérie, des zones de prolifération et d'infiltration qui posent également la question du rôle du micro-environnement dans la progression tumorale. Cela pose un problème considérable car chaque tumeur est donc une somme de micro-régions à profils variables. Il est donc très difficile, voire vain, de vouloir établir un profil moyen. Cela se traduit en pratique clinique par des difficultés importantes dans l'interprétation des données, y compris dans l'identification sur la base des biopsies stéréotaxiques ou des pièces anatomiques chirurgicales. Par exemple, la reproductibilité du diagnostic anatomo-pathologique est de l'ordre de 40 à 60% (variabilité intra et inter-opérateurs) [28–31]. Cette complexité tissulaire n'est aujourd'hui pas suffisamment prise en compte dans l'exploitation des données pourtant immenses (les « Big Data ») que les technologies rendent accessibles. Elle cache nécessairement une logique fonctionnelle de l'objet d'étude. C'est en décryptant le rôle de cette hétérogénéité que l'on améliorera la compréhension des processus pathologiques, notamment ceux de l'infiltration du parenchyme et de l'échappement thérapeutique. Cela sous-entend qu'il existe un grand besoin de mettre au point des stratégies de classification robustes, multi-paramétriques et multimodales permettant d'augmenter la reproductibilité du diagnostic. Mieux encore, ces méthodes de classification devraient tenir dans un format temporel qui soit compatible avec un résultat extemporané chirurgical, d'autant plus que les schémas thérapeutiques en sont dépendants. Quelques très belles démonstrations de ce type d'approche ont récemment été rapportées, on citera la caractérisation per opératoire des adénomes hypophysaires par imagerie MALDI (voir description), ou le génotypage par PCR dans le temps opératoire [32,33]. Ces outils innovants ouvrent la voie à un paradigme nouveau qui est celui d'intégrer la complexité du tissu pour élaborer une véritable stratégie de médecine personnalisée.

b. *Il n'y a presque pas de biomarqueurs (marqueurs biologiques).*

Le *National Institutes for Health (NIH)* américain définit les biomarqueurs comme « caractéristique objectivement mesurable et évaluée comme indicateur d'un processus biologique normal ou pathologique, ou comme réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique » [34]. En routine, les biomarqueurs peuvent être de différentes natures : biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou de réponse au traitement. Ils peuvent également être subdivisés en biomarqueurs tissulaires ou périphériques. Ces dernières années, une attention toute particulière a été portée sur les marqueurs circulants, et de nombreux articles ont identifié la présence d'éléments circulants reflétant les pathologies tissulaires. On retrouve dans la littérature un très grand nombre de publications qui ont décrit la présence de cellules, d'ARN (non codants, micro ARN …) et d'ADN circulants proposés comme biomarqueurs dans les cancers du sein, du tractus digestif, du poumon …
Dans le contexte des glioblastomes, les biomarqueurs tissulaires sont maintenant validés et reconnus. C'est le cas notamment des mutations IDH1/2, EGFR, de la méthylation du promoteur MGMT, des délétions 1p/19q … [35]. D'autres biomarqueurs circulants candidats sont de plus en plus mis en évidence [36–38] mais la démonstration de valeur pronostique ou diagnostique reste problématique.

La recherche et l'identification de biomarqueurs d'un état pathologique est un processus long et difficile dans la mesure où cela nécessite d'avoir accès à un très grand nombre d'échantillons pour atteindre une puissance statistique élevée. S'ajoute à cela la difficile standardisation du recueil et de la préparation de l'échantillon dans des protocoles multicentriques. D'autre part, pour les biomarqueurs protéiques périphériques (du sang, du LCR etc…), il intervient une difficulté supplémentaire sachant que la gamme dynamique de concentrations des protéines circulantes s'étale sur plusieurs ordres de grandeur logarithmiques (Figure 4A). Dans le plasma sanguin, quelques protéines hyper majoritaires et constitutives occupent 99% de la masse protéique totale du plasma [39]. Dans le LCR, 80% des protéines sont d'origine vasculaire et 20% seulement d'origine cérébrale [40]. Il y a donc un besoin de stratégies pour décomplexifier les échantillons et ouvrir un accès aux entités

moléculaires minoritaires, en protéomique couramment appelées *Deep Proteome*.

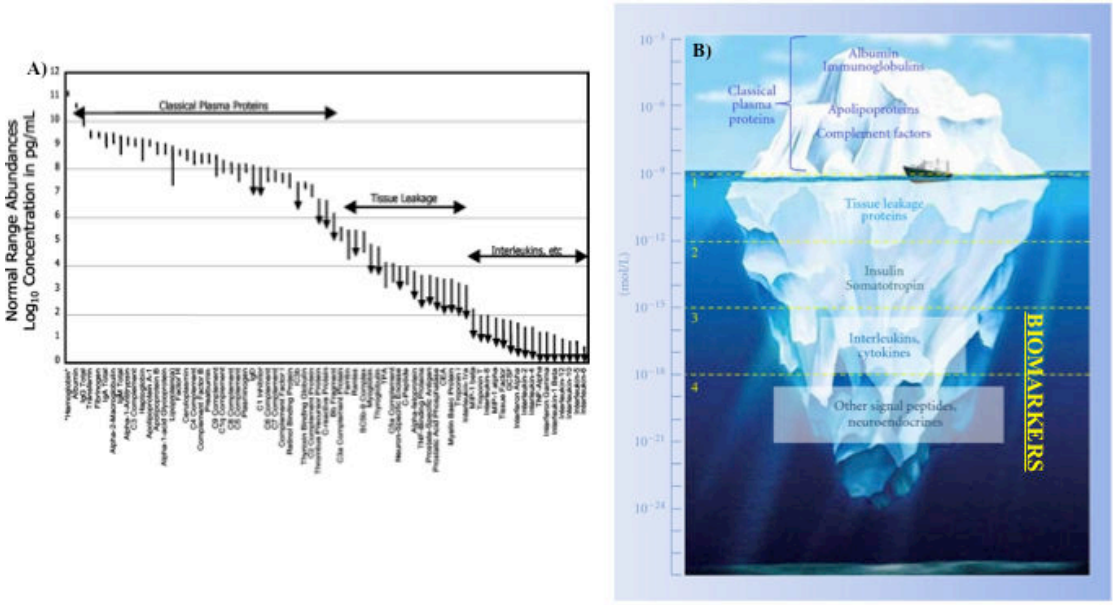


Figure 4 : Complexité protéomique du plasma sanguin

A) Distribution logarithmique des concentrations des protéines plasmatiques. Anderson et Anderson, 2002 B) Illustration en iceberg de la gamme dynamique de concentrations, les biomarqueurs en constituent la face cachée adapté de Finoulst et al. 2011

Parmi les nombreuses techniques d'analyse protéomique, la spectrométrie de masse de type *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight* (MALDI TOF) offre la possibilité de détecter de manière rapide et très sensible, un grand nombre de protéines en une seule analyse, sous la forme d'un spectre de masse. Brièvement, un échantillon biologique est co-déposé sur une surface conductrice avec une matrice acide. Sous l'effet d'une impulsion laser, la matrice transfère un proton aux protéines de l'échantillon qui sont alors désorbées et parcourent un tube de vol sous vide à l'extrémité duquel se trouve un détecteur. Le principe de base est de chronométrer le temps de vol, les plus petites protéines arrivant les premières, les plus lourdes ensuite. Dans le contexte de la recherche de biomarqueurs en protéomique clinique, nous avons pu montrer, au cours de ce travail, que l'utilisation de surfaces micro/nano structurées permet i) de focaliser l'analyse sur le protéome de bas poids moléculaire, ii) d'enrichir considérablement le signal et iii) de mettre en évidence dans les spectres de masse, de rapports m/z, donc de protéines, spécifiques de phénotypes moléculaires associés à la pathologie.

D'autre part, la spectrométrie de masse MALDI TOF/MS-MS peut également être utilisée pour l'analyse d'échantillons tissulaires. On parle d'imagerie MALDI. Pour ce faire, l'échantillon analysé n'est plus un fluide, mais une coupe de tissu. La machine parcourt l'échantillon de point en point dans un référentiel 2D de résolution définie par l'utilisateur et établit un profil protéomique à chaque point de l'échantillon. On remonte ainsi à la distribution des protéines dans le tissu. Cette approche est abordée plus en détails plus loin dans le manuscrit (voir publications). La stratégie prospective du laboratoire est, pour chaque patient, de ne pas concentrer l'analyse protéomique sur les marqueurs tissulaires ou circulants, mais de prendre l'histoire clinique dans son ensemble. Typiquement, en réalisant des prises de sang de manière longitudinale avant, au moment de, et après l'exérèse chirurgicale. Cela permet d'étudier, sans a priori, à grande échelle, l'évolution du profil sérique en fonction de l'état clinique qui peut ensuite être mis en corrélation avec ce que le tissu (biopsie ou pièce anatomique) fournit comme information. Il s'agit alors d'intégrer la complexité et d'établir des liens sur les rapports entre marqueurs centraux et marqueurs circulants. Ajoutons à cela que cette approche a été appliquée systématiquement, au cours de ce travail, dans les études précliniques, bien qu'une partie des résultats, notamment chez le macaque, soit toujours en cours d'analyse au moment de l'écriture.

c. *Infiltration tumorale et récidive.*

Comme mentionné précédemment, le traitement chirurgical de référence des GBM consiste, lorsque cela est possible, en une exérèse chirurgicale suivie d'un traitement de chimio et/ou radiothérapie. Parmi les enjeux majeurs de la prise en charge se situe la problématique de l'exérèse, de son degré d'extensivité et de la récidive. Du fait de leur caractère infiltrant, les GBM sont des tumeurs difficiles à opérer, à délimiter, et les taux de récidive sont considérables, de l'ordre de 90%. De très nombreuses études cliniques se sont intéressées aux facteurs de survie associés à cette problématique [41–43]. Dans les années 1950, des hémispherectomies complètes ont été pratiquées pour le traitement des gliomes, n'ayant pas enrayé la mécanique de récidive et traduisant le fait que des cellules tumorales puissent migrer à des distances très importantes de la masse initiale [44–46]. Il y a là une importante dichotomie, soit on considère que l'infiltration massive du parenchyme cérébral rend caduque la chirurgie d'exérèse, soit, au contraire, on maximise la zone de résection pour enrayer le mécanisme. Plusieurs critères cliniques de premier plan permettent de quantifier et d'apprécier les rapports entre la chirurgie d'exérèse et le devenir des patients. Ceux ci sont

brièvement présentés ici et seront à nouveau discutés dans les paragraphes suivants, au sujet de l'utilisation des modalités d'imagerie per opératoire.

- *Etendue de l'exérèse chirurgicale* : on parle d' Extent of Resection (EOR) ou de Gross Total Resection (GTR) lorsque l'exérèse est complète.
- *Volume Tumoral Residuel* : défini par des critères d'imagerie, notamment la prise de contraste IRM, on fait référence au Contrast-Enhancing Tumor Residual Volume (CE-RTV).
- *Survie sans récidive* : ou Free Progression Survival (FPS), fixée généralement à 6 mois après intervention chirurgicale.
- *Valeur Prédictive Positve ou Négative* : La Positive Predictive Value (PPV) correspond à l'identification correcte d'un traceur dans les territoires tumoraux. La Negative Predictive Value (NPV) correspond à l'absence de détection dans du tissu sain. Ces paramètres reflètent la spécificité du traceur.

Certaines études rétrospectives sur un large nombre de cas suggèrent qu'un EOR de plus de 78% est requis pour parvenir à une augmentation significative de la survie médiane des patients, et cette augmentation croît avec le pourcentage de résection [47–49]. Toutefois, toutes les études conduites à ce jour montrent qu'en dépit des efforts, et malgré des variations importantes de la FPS à 6 mois, il n'en demeure pas moins que la récidive est quasi systématiquement la règle. Cela sous-entend qu'il y a un enjeu thérapeutique considérable dans la prise en charge chirurgicale. Celui-ci est double. Premièrement, **il faut développer des solutions innovantes pour « opérer mieux »,** en étant à-même de distinguer et délimiter plus sensiblement les territoires tumoraux en visant la résection totale. Au cours de l'exérèse, de nombreuses approches ont été proposées pour améliorer la délimitation des marges. L'utilisation de traceurs fluorescents (voir paragraphe III.2) en est une très bonne illustration. Des modalités physiques comme la spectroscopie infrarouge [50], la spectroscopie RAMAN [51,52] ou l'imagerie optoacoustique [53] font également leur apparition. Le cahier des charges pour ces développements inclut de nombreux aspects en termes de performance, d'intégration dans l'environnement d'un bloc opératoire et de sécurité pour les patients. Tout cela mis bout à bout rend les développements technologiques longs et difficiles pour des ingénieurs qui se trouvent parfois trop loin du praticien et qui peinent à intégrer tôt ces contraintes.

Deuxièmement, **il faut investiguer les 2 à 3cm de tissu qui longent la marge d'exérèse.** C'est dans les marges d'exérèse que démarrent 85% des récidives de GBM [54], parfois même alors que le CE-RTV est nul. Des publications montrent que la marge d'exérèse, même

lorsqu'elle est saine au sens anatomopathologique du terme, contient des cellules (les *Tumor Initiating Cells ou Cancer Stem Cells*) qui présentent des profils d'expression moléculaire uniques, qui les distinguent des cellules de la masse tumorale initiale [55,56]. D'autre part, il a également été montré que le micro-environnement tumoral joue un rôle crucial dans l'initiation, la promotion, le maintien ou la répression d'un phénotype invasif : gradients de PO_2, fibres de collagène, expression des métalloprotéases, production et crinopexie des facteurs de croissance … sont autant de paramètres qui ont été décrits et dont il est difficile de faire un état de l'art ici.

Enfin, il faut mentionner le rôle important que peuvent jouer les autres types cellulaires en présence dans la région péri-tumorale, notamment les cellules du stroma, les macrophages, les péricytes … dont tous ont également été décrits comme pouvant participer à des phénomènes pro ou anti-tumoraux. Le concept qui émerge est donc celui d'une régulation capitale qui est exercée par des facteurs extrinsèques sur la masse tumorale, tout du moins, des facteurs parallèles, péri-tumoraux. Il est capital de poursuivre les investigations dans ce sens, en cherchant, à la manière de la neurochirurgie fonctionnelle, à établir une cartographie fine de cette hétérogénéité péri-tumorale afin de comprendre ce qui, dans les 3cm de marge, constitue des facteurs de récidive, ou non. Cela pourrait conduire également à repenser la thérapeutique en ciblant ou en modulant les phénomènes qui ont lieu dans les marges pour limiter la récidive, dans la droite ligne des travaux entrepris avec les patch de carmustine (Gliadel®) dont l'efficacité reste toujours discutée.

II.2 Neurogenèse, cellules souches et glioblastomes.

II.2.1 La zone sous-ventriculaire, territoire de neurogenèse.

En 1962, Joseph Altman montre qu'une lésion bilatérale des corps géniculés latéraux induit la formation de nouveaux neurones dans le cerveau adulte des mammifères révélée par une injection de thymidine tritiée [57,58]. Chez l'adulte, des niches de neurogenèse sont présentes dans la zone sous-ventriculaire (SVZ), le long de la paroi des ventricules latéraux et dans le gyrus denté de l'hippocampe. Les neuroblastes issus de la SVZ migrent vers le bulbe olfactif, tandis que ceux formés dans le gyrus denté s'intègrent localement au niveau de la couche granulaire. Ces processus sont amplifiés ou réduits dans de nombreux contextes

pathologiques, inflammatoires ou neurodégénératifs. D'autre part, la migration des neuroblastes peut être modifiée et dirigée vers des zones lésées [59].

L'architecture cellulaire de la niche de cellules souches au niveau de la paroi des ventricules a largement été étudiée. Chez le rongeur, qui demeure le modèle le plus répandu, des analyses immunohistochimiques ont autorisé le décryptage des composants cellulaires et des marqueurs moléculaires qui caractérisent le pool de progéniteurs. Même si des controverses persistent sur l'identité exacte des cellules souches, le modèle global qui fait consensus aujourd'hui est représenté par la figure 7. Les cellules de type B sont considérées comme des cellules souches. Elles expriment la *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP) et peuvent être en contact avec le LCR. Elles donnent naissance aux cellules de type C, immatures et prolifératives, qui expriment le récepteur à l'*Epidermal Growth Factor* (EGFR). Ces dernières se différencient en neuroblastes migrants ou cellules de type A qui expriment des marqueurs proneuraux comme la *Polysialilated Neural-Cell Adhesion Molecule* (PSA NCAM) et la Doublecortine (DCX). Ces derniers migrent le long du champ de migration rostral pour atteindre le bulbe olfactif où ils s'intègrent dans les réseaux neuronaux [60–64].

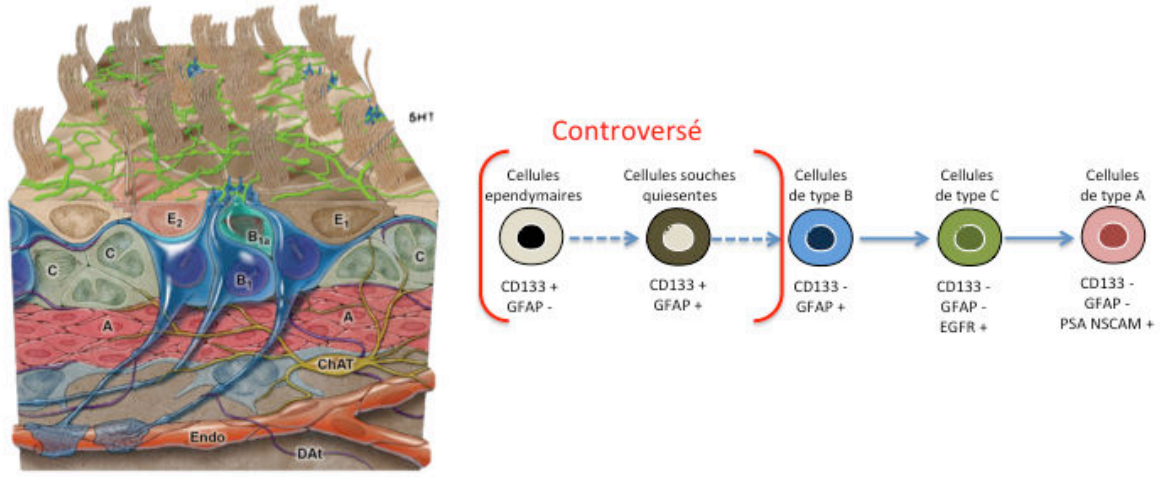


Figure 5 : Illustration schématique des composants de la SVZ (D'après Alvarez-Buylla A., 2002 et Doetsch, F. 1997)

II.2.2 Niches neurogéniques chez les grands mammifères.

Si l'existence, la structure et le fonctionnement des niches de neurogenèse (SVZ et couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe) sont désormais largement décrits dans la littérature chez le rongeur, assez peu de données sont disponibles sur leurs équivalents dans les espèces de grands mammifères, et chez l'Homme.

Chez le primate non humain, l'existence de cellules proliférantes dans la zone sous ventriculaire a été formellement démontrée par Kornack and Rakic en 2001 [65]. Par injection de bromdesoxyuridine (BrdU) et comarquages immunohistochimiques, ces auteurs ont pu montrer i) l'existence de phénomènes de prolifération dans la SVZ ii) la présence de phénomènes de migration de neuroblastes immatures en direction du bulbe olfactif et iii) la présence de neurones néo-formés dans le bulbe olfactif, 97 jours après la dernière administration de BrdU. La structure de la niche a été étudiée à très haute résolution en microscopie électronique à transmission et confirme l'existence du pool de progéniteurs et plus particulièrement celle du champ de migration rostral comme il a avait été décrit chez le rongeur [66].

Chez l'Homme, l'existence de la niche et du champ de migration est établie et décrite comme des mécanismes majeurs dans le cerveau en développement. Dans le cerveau adulte, des marquages immunohistochimiques ont permis de montrer la présence de cellules réactives au marquage contre le *Proliferating Cells Nuclear Antigen* (PCNA) au niveau de la paroi des ventricules latéraux mais également le long d'une voie de migration dirigée vers le cortex olfactif [67]. Toutefois, ces données ont été vivement contestées et semblent contradictoires avec les investigations conduites jusqu'alors sur l'anatomie fonctionnelle et les connexions possibles entre corne antérieure des ventricules latéraux et bulbe olfactif [68].

Des études plus récentes continuent cependant à explorer le cerveau humain adulte et la présence possible de marqueurs de plasticité. Les données ont été complétées notamment par deux publications dont les résultats confirment l'immunoréactivité à des antigènes de prolifération et de différenciation en neuroblastes ainsi que sur l'existence de voies de migration dont il reste difficile de dire si elles correspondent à des reliquats de neurogenèse développementale ou à des processus fonctionnels dans le cerveau adulte [69,70]. À l'évidence, il reste beaucoup à apprendre des mécanismes possibles de plasticité cérébrale liés à la présence de zones de neurogenèse. Ces phénomènes demeurent incompris en grande partie car il n'y a pas d'accès possible en dehors des indications chirurgicales (de biopsie ou d'exérèse) dont bien souvent les échantillons tissulaires restent dédiés à l'évaluation diagnostique, et des cerveaux disponibles dans les études *post mortem*. Pour autant, ces découvertes suscitent des espoirs immenses dans le champ de la thérapie cellulaire autologue.

II.2.3 Glioblastomes et zone sous ventriculaire.

Bien que suscitant un immense intérêt pour la thérapie cellulaire, dans le contexte des tumeurs cérébrales, la présence de cellules souches dans le cerveau adulte est considérée, par certains auteurs, comme une source potentielle de progéniteurs contribuant au processus tumoral. Cette hypothèse fait de la zone sous-ventriculaire une sorte de « Dr. Jekyll et Mr. Hyde de la neurobiologie». En effet, de nombreuses publications ont décrit des rapports étroits entre la SVZ et les glioblastomes.

En 2005, Glass *et al.* montrent chez le rongeur qu'un gliome expérimental peut attirer des progéniteurs de la SVZ [71]. Dans cette publication, les auteurs réalisent une greffe orthotopique de cellules (GL261) transduites pour l'expression de la *Red Fluorescent Protein (RFP)* dans un modèle transgénique exprimant constitutivement la *Green Fluorescent Protein (GFP)* sous contrôle du promoteur de la nestine. À quatorze jours après la greffe, le gliome expérimental est envahi de cellules GFP positives. Dans cet article, la présence de progéniteurs de la SVZ au niveau du gliome expérimental est associée à des tumeurs de plus petite taille ainsi qu'à une survie augmentée. En 2008, le même groupe rapporte que cet effet anti-tumoral est dépendant de l'âge et de l'état de prolifération dans la SVZ [72]. Ces deux publications, indépendamment du phénotype observé, montrent que des rapports existent entre tumeur et zone de prolifération.

Cependant, bien plus nombreuses sont les publications qui suggèrent que les interactions avec la SVZ participeraient à dégrader le pronostic des glioblastomes :

- la localisation périventriculaire d'un GBM est associée à un plus mauvais pronostic [73–76] ;
- la radiothérapie ciblant la région périventriculaire augmenterait la survie médiane [77–79] ;
- la SVZ serait un réservoir de cellules souches cancéreuses ? Il a été proposé que les divisions asymétriques dans la niche pourraient alimenter continuellement la tumeur en nouvelles cellules [80], [81]. D'autre part, les progéniteurs de la SVZ et les « cancer stem cells » partagent de nombreuses caractéristiques moléculaires [82,83]. Enfin, des

travaux récents montrent que l'inhibition du métabolisme dans la SVZ (par antagonistes dopaminergiques[1]) semble améliorer la prise en charge thérapeutique [84].

C'est en connaissance de ce faisceau d'arguments que l'une des idées premières de ce travail de thèse était d'aller explorer la SVZ, dans un premier temps chez le macaque, à l'aide d'un outil chirurgical invasif mais atraumatique permettant le recueil de matériel biologique et autorisant un décryptage moléculaire. L'objectif d'alors était de compléter les données disponibles sur les mécanismes de prolifération de la SVZ et de les analyser en les comparant aux données disponibles sur les « tumor stem cells ».

II.2.4 Le modèle des neurosphères.

In vitro, les cellules dissociées de la zone sous ventriculaire peuvent être cultivées en présence de facteurs de croissance, notamment l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) et le *basic Fibroblasts Growth Factor* (bFGF), et forment des sphères (auxquelles on réfèrera comme des « neurosphères ») autour du 4ème jour de culture. [85] Ces cellules sont i) capables d'auto-renouvellement et peuvent être entretenues pendant plusieurs passages dans un état indifférencié, ii) multipotentes, le sevrage en facteurs de croissance et/ou l'introduction de serum de veau fœtal et/ou leur ensemencement sur des surfaces préalablement traitées à la polylysine induit leur différenciation vers les trois lignages que sont les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes [86,87]. Ce modèle de culture primaire, appelé désormais *Neurosphere Assay*, illustré dans la figure 6, a été très utilisé et permet aujourd'hui d'identifier la présence de progéniteurs dans des explants tissulaires, de les entretenir en culture et d'analyser leurs phénotypes [88]. Il constitue un outil méthodologique puissant pour purifier les populations de cellules progénitrices, tant dans les zones de neurogenèse que dans

[1] Cet aspect fait référence à une importante littérature axée sur les rapports entre neurogenèse et signalisation dopaminergique. Brièvement, la substance noire pars compacta (SNpc) et l'aire tegmentale ventrale projettent, par la voie nigro-striée, de la dopamine au niveau du putamen et du noyau caudé, voisins de la SVZ. La dopamine libérée, via le récepteur D3, agit par des voies PKC dépendantes et induit la potentialisation des voies EGF dépendantes. Dans la maladie de Parkinson, la dégénérescence dopaminergique induit des diminutions des capacités neurogéniques, qui sont modulées par le traitement à la L-DOPA ou la stimulation cérébrale profonde. C'est de là que provient la notion de métabolisme dopaminergique de la SVZ. [153–160].

les biopsies tumorales. Ce modèle, comme tous les modèles, comporte néanmoins des limitations importantes qui résident dans :

- l'hétérogénéité phénotypique des cellules cultivées sous forme de sphères [89] ;
- l'impact que peuvent avoir les conditions de culture (composition des milieux, pression partielle en oxygène etc…) [90–93].

Il convient de rester prudent quant à l'interprétation des données moléculaires issues de ce type de cultures primaires.

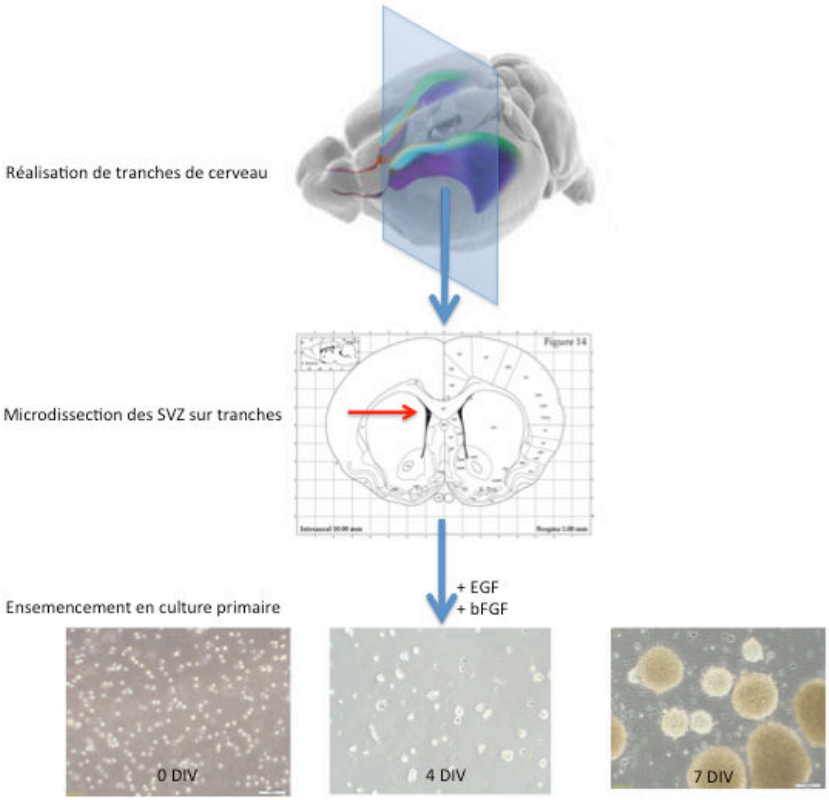


Figure 6: Principe schématique du Neurosphere Assay

Force est de constater qu'aujourd'hui, de très nombreux modèles servent l'étude des mécanismes impliqués dans les pathologies, la plasticité, la cognition etc. De la cellule aux grands mammifères, la neurobiologie, et plus particulièrement la neuro-oncologie, est une discipline qui tire profit des puissants outils dont elle dispose. Il n'en demeure pas moins que les résultats issus de ces modèles doivent nécessairement être confrontés à des données fonctionnelles issues de la clinique, pour faire de la recherche translationnelle une réalité. Dans ce contexte, il apparaît très nettement que la principale limitation est celle d'accéder à des échantillons en raison des limitations évoquées plus tôt dans le manuscrit (voir I.2). C'est

face à ce problème qu'un concept nouveau a émergé il y a quelques années dans le laboratoire. Ce dernier trouve son origine dans un contexte particulier, celui de la chirurgie de stimulation cérébrale profonde pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson.

II.3 La maladie de Parkinson et la stimulation cérébrale profonde.

Un point central dans ce travail de thèse trouve son origine dans les travaux du Pr. A.L. Bénabid et l'invention de la stimulation cérébrale profonde pour le traitement symptomatique de la maladie de Parkinson [94]. Cette maladie, provoquée par la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta*, se manifeste par un ensemble de symptômes cliniques bien identifiés qui constituent le "syndrome parkinsonien": tremblement de repos, akinésie, rigidité. En 1987, le Pr. Bénabid rapporte l'utilisation de la stimulation cérébrale à haute fréquence dans le noyau thalamique ventro-intermédiaire pour le traitement du tremblement essentiel [95]. Très rapidement, la stimulation cérébrale profonde (*Deep Brain Stimulation* (DBS)) s'étend comme technique chirurgicale de référence pour la maladie de Parkinson, et connaît également une extension à d'autres pathologies cérébrales comme les dystonies ou les troubles obsessionnels compulsifs [96]. Au delà du progrès thérapeutique majeur, cette technique chirurgicale introduit un nouveau paradigme de chirurgie invasive mais non lésionnelle, dont les effets sont complètement réversibles à l'arrêt de la stimulation. Les patients sont implantés de manière bilatérale avec des électrodes placées dans le noyau subthalamique connectées à un stimulateur externe en position pectorale sous-cutanée. Au moment de l'implantation, la trajectoire pour le placement final de l'électrode est tracée à l'aide d'un stylet chirurgical en inox. Les membres de l'équipe ont pu montrer qu'il permet de recueillir des micro-fragments de tissus exploitables pour l'analyse protéomique du tissu cérébral.

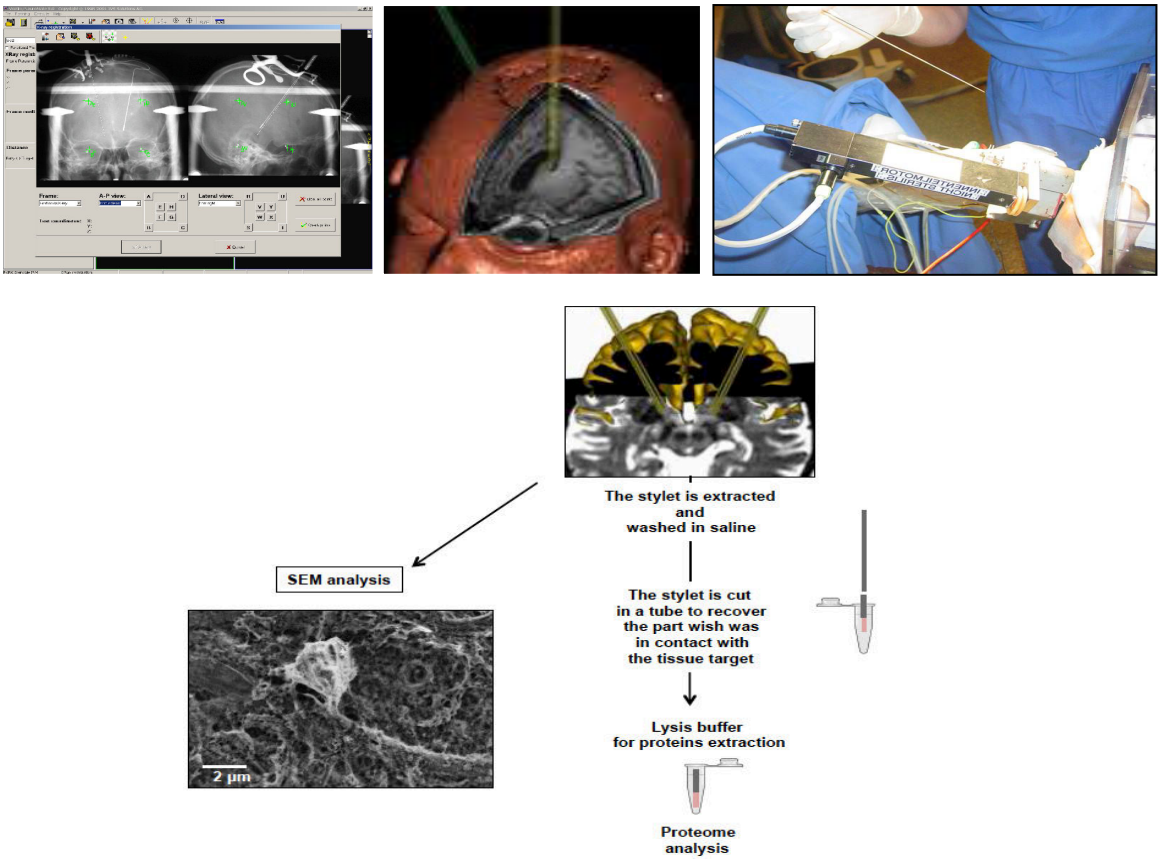


Figure 7: Illustration de la collecte de micro fragments tissulaires au cours d'une intervention de DBS

En nous rendant au bloc, nous avons collecté les stylets en inox qui étaient alors éliminés comme des déchets opératoires. En plongeant directement l'extrémité caudale de ces stylets soit dans du tampon de lyse pour la protéomique soit dans du fixateur, l'équipe a montré que **i) la DBS est un modèle d'accès non lésionnel à du tissu cérébral frais, dans des territoires profonds du cerveau, ii) l'inox chirurgical qui entre en contact avec le tissu est chargé de micro-fragments analysables en biologie, iii) ces micro-fragments sont significativement porteurs d'une information moléculaire associée à la pathologie.**

Devant cette opportunité unique, il paraissait évident d'optimiser un **dispositif dédié d'empreinte tissulaire** qui permette de standardiser la capture de fragments tissulaires et de prévenir la contamination par des fragments issus d'autres régions du système nerveux pouvant être collectés le long de la trajectoire et non dans les noyaux ciblés. Idéalement, ledit dispositif devrait permettre de capter du tissu et de conserver l'orientation spatiale de la zone ciblée. Pour cela, nous avons eu l'idée d'utiliser un nouveau matériau, le silicium chimiquement modifié. Une collaboration avec deux départements du CEA Léti à Grenoble, le département Technologie et Biologie pour la Santé (DTBS) et le département Technologies

Silicium (DTSi) a permis la réalisation d'un outil spécifique, utilisant une puce en silicium microstructuré et chimiquement modifié. Ce dispositif a fait l'objet d'un dépôt de brevets identifiés sous les numéros WO 2008/006871 et WO 2006/090220.

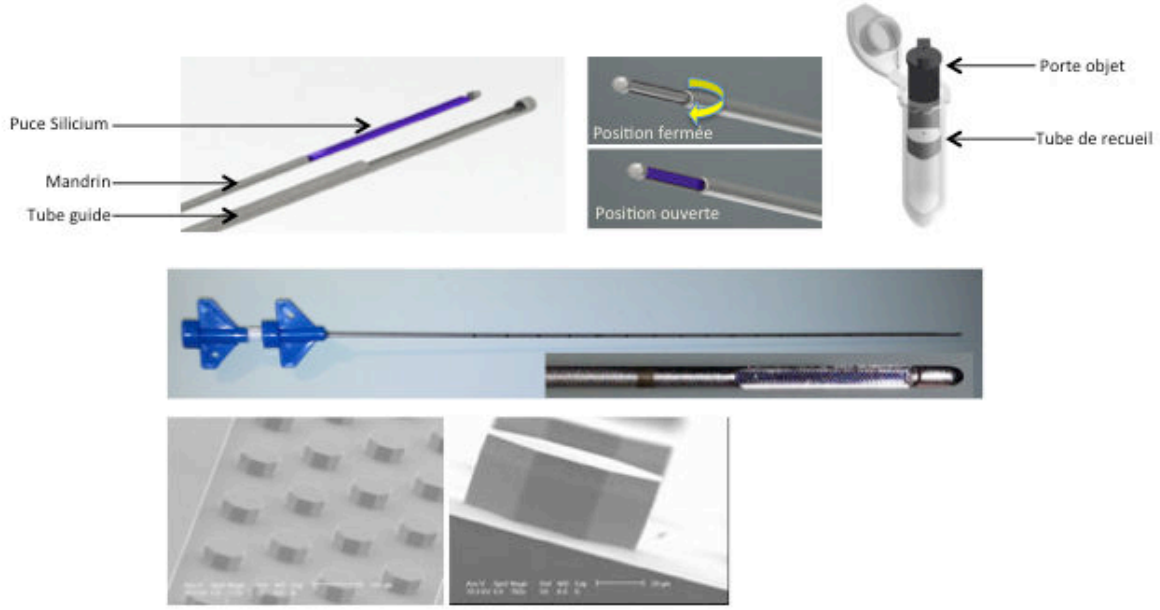


Figure 8: Description de l'outil d'empreinte

Cet outil reprend les dimensions du stylet opératoire précédemment évoqué, à savoir un tube-guide de diamètre externe 1200µm et de diamètre interne 700µm. Ce tube-guide comporte une fenêtre d'exposition de longueur variable, plusieurs versions ont été déclinées entre 0,4 et 2 cm de long (pour répondre à des besoins différents en fonction des structures ciblées). À l'intérieur du tube guide, s'engage un mandrin dont la partie terminale supporte une puce en silicium de 600µm de large par 2cm de long et **300µm d'épaisseur**. *Cette dernière cote est particulièrement importante et sera rediscutée ultérieurement dans ce travail au sujet de l'amincissement du silicium poreux.* Lorsque le mandrin est dans le tube-guide, par rotation, on obtient au niveau de la fenêtre d'exposition deux positions: fermée, la puce est protégée dans le dispositif, ouverte: la puce entre en contact avec le tissu.

Grâce à ce dessin, nous avons pu montrer i) l'efficacité du dispositif *in vitro* sur des pièces opératoires et *in vivo* chez le rongeur puis les grands mammifères, ii) l'absence de toxicité du dispositif lors de contacts aigus et chroniques du tissu nerveux avec le silicium, iii) la compatibilité des empreintes tissulaires obtenues avec une approche d'analyses

multimodales associant protéomique, transcriptomique, immunohistochimie et culture cellulaire [97].

L'ensemble de ces résultats a été complété par plusieurs tests de biocompatibilité règlementaires selon la norme ISO10993. Cette norme a été proposée par l'*International Normalization Organization (ISO)* pour standardiser l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, dans le but d'améliorer la sécurité des patients. La partie 1, en particulier, décrit les principes généraux sur lesquels repose l'évaluation biologique des dispositifs, et classe ces derniers en fonction de leur nature et des temps de contact avec les tissus.

Tout ceci a permis de déposer une demande d'autorisation d'essai clinique auprès de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM). Pour des raisons multiples et notamment éthiques, cette autorisation a été demandée pour évaluer dans un premier temps l'opérabilité clinique du dispositif dans le contexte des glioblastomes multiformes (GBM). Dans un second temps, cet essai clinique vise à explorer le compartiment péri-tumoral pour y décrypter les phénomènes moléculaires qui font l'hétérogénéité et constituent probablement le socle de la récidive post exérèse.

III. Explorer le tissu nerveux.

III.1 L'apport des micro et nano technologies.

Les deux dernières décennies ont vu l'essor considérable des micro et nanotechnologies au service de la santé. De très nombreuses stratégies de recherche et développement (R&D) ont été orientées vers l'utilisation des micro et nanotechnologies pour mieux diagnostiquer ou traiter les pathologies. Il est probablement vain de chercher à faire un état de l'art exhaustif de toutes les approches autour des micro et nano objets, dispositifs, particules … et de leurs applications. On peut tout de même citer d'importants développements autour des dispositifs implantables, de la recherche de biomarqueurs, de la délivrance localisée, de l'imagerie médicale, de la vectorisation des drogues et bien d'autres encore. Un grand nombre de revues ont décrypté les différents domaines applicatifs et convergent vers l'idée que ces nouveaux outils devraient ouvrir la voie à une véritable prise en charge médicale personnalisée dans des approches thérapeutiques et pronostiques, auxquelles on réfère aujourd'hui comme la « nanomédecine théranostique » [98,99].

Parmi les nombreux matériaux et polymères qui sont aujourd'hui à la base des procédés de nanofabrication, le silicium a plus particulièrement retenu notre attention au cours de ce travail de thèse. Le silicium (Si), élément chimique de la famille des métalloïdes est couramment utilisé pour la fabrication de semi-conducteurs en électronique. Dans l'industrie, il se présente sous la forme de galettes ou *wafers* qui peuvent faire des diamètres de 200, 300 ou 450mm selon les chaînes de production, pour une épaisseur de 750µm. Ce matériau avait été retenu au moment de la conception de l'outil d'empreinte (figure 4). Par ses propriétés, le silicium apporte de nombreux avantages :

- c'est un matériau inerte,
- il est modelable à façon, de nombreux procédés comme la lithographie, la gravure … permettent d'obtenir des structurations et des propriétés uniques d'un lot à l'autre,
- il est fonctionnalisable chimiquement,
- sa production sur des chaînes industrielles permet une reproductibilité inter-lot très importante et garantit la standardisation, pré-requis indispensable pour une utilisation à visée médicale.

Dans la version première du dispositif d'empreinte, les puces en silicium utilisées sont micro-structurées par photo lithogravure de manière à présenter des micro-picots octogonaux de 80µm de diamètre et de 50µm de hauteur. Cette structuration permet une augmentation de la surface développée d'un facteur 3, dont nous avons démontré qu'elle améliore considérablement l'efficacité de capture des fragments tissulaires. D'autre part, ces puces sont fonctionnalisées chimiquement, et exposent des fonctions chimiques carboxyles ($COOH/COO^-$) contribuant également à améliorer la quantité d'éléments biologiques recueillis.

Très tôt dans ce travail de thèse, nous avons défini pour objectif d'étendre le concept d' « empreinte tissulaire » à d'autres approches chirurgicales. Toutefois, le procédé de fabrication pose problème pour les développements ultérieurs envisagés ce qui nous a motivé à considérer plusieurs enjeux techniques :

- **s'affranchir de la micro-structuration** : pour aborder les noyaux cérébraux hautement fonctionnels ou d'autres tissus dans lesquels les picots pourraient créer des lésions ;
- **s'affranchir de la chimie de surface** : en permettant ainsi d'écarter le problème de stabilité de la chimie dans le temps et en ouvrant la possibilité de stériliser le dispositif par un autre procédé que l'oxyde d'éthylène, actuellement controversé [100] ;

- **diminuer les temps de contacts** requis pour la capture de tissu en visant un rendement optimal dans le plus court délai.

Répondre à ces contraintes ouvre la voie à plusieurs autres domaines de recherche biomédicale en oncologie. En particulier, il existe un besoin de caractérisation moléculaire extemporanée des tumeurs de la prostate en chirurgie coelioscopique, dont les marges de résection ne sont pas clairement identifiables et peuvent entraîner des déficits fonctionnels importants pour les patients (incontinence, impuissance). De même, une demande très forte existe pour utiliser cette approche au cours des biopsies pulmonaires ou hépatiques naviguées sous scanner pour compléter l'analyse anatomo-pathologique par de l'annotation moléculaire. À chacune de ces applications cliniques se présentent des contraintes particulières dont nous avons souhaité tenir compte en adaptant continuellement le design de l'outil d'empreinte, tout en conservant une stratégie unique au regard du matériau, clé de voûte du dispositif. Ainsi, nous avons déjà amorcé un processus de prototypage pour la chirurgie robotisée de la prostate, ayant conduit au dépôt d'une demande de brevet (WO 2014/207254). Le concept est également en cours d'extension pour l'otorhinolaryngologie avec un dispositif ultra miniaturisé pour investiguer les protéines de la périlymphe (liquide endocochléaire) dans les presbyacousies, et un brevet est à l'étude pour un dispositif souple qui permettrait l'analyse des tumeurs pulmonaires au détour des biopsies naviguées sous scanner.

Dans le paysage d'alors, un matériau avait été décrit comme présentant des propriétés toutes particulières pour l'analyse biologique, le silicium poreux. C'est en particulier dans les travaux conduits par le Pr. M. Ferrari à Houston que les premières démonstrations ont été faites. Les publications de ce groupe ont montré que l'utilisation de surfaces ou de nanostructures à base de silicium poreux permet le fractionnement de sérum humain. Ce procédé permet ainsi la déplétion des éléments de haute masse et l'enrichissement des fractions sériques en peptides, de petites masses et peu concentrés [101–103]. Ces premières démonstrations ouvraient la voie à l'étude des petites entités protéiques minoritaires du sang, contenant l'information associée à la pathologie [104]. Les contraintes techniques à franchir et le rationnel créé par ces travaux nous ont rapidement orienté vers la piste du silicium poreux (SiPo). Notre approche demeure cependant complètement différente, avant tout par l'utilisation du SiPo directement *in vivo*, intégré dans un dispositif chirurgical, et d'autre part en l'utilisant pour recueillir du tissu et des macromolécules qui sont analysés directement sur

la surface poreuse et non après élution. Ces éléments clés ont permis de breveter l'utilisation de puces de SiPo pour l'investigation tissulaire (WO 2013/098703).

Nous avons bénéficié au cours de ce travail d'un fort soutien du département Technologies Silicium du CEA Grenoble (DTSi) qui possédait tout le savoir-faire pour la production. Par une méthode photo-électro-chimique on peut obtenir différentes densités et tailles de pores qui conduisent à l'obtention de trois grandes familles de SiPo: le Si nanoporeux (taille des pores inférieure à 2nm), le Si mesoporeux (pores compris entre 2 et 50nm) et le Si macroporeux (pores supérieurs à 50nm). Brièvement, la porosification est obtenue par dissolution anodique de silicium monocristallin dans une solution d'acide fluorhydrique (HF). Le taux de porosité, la taille des pores et l'épaisseur de la couche poreuse sont dépendants des conditions techniques de porosification. Plusieurs facteurs entrent en ligne de compte: la nature du substrat silicium, (qui peut être fortement, modérément ou faiblement dopé au Bore), la concentration en HF de la solution et la densité de courant appliquée. La figure 7 illustre en microscopie électronique à balayage la diversité architecturale qui peut être obtenue.

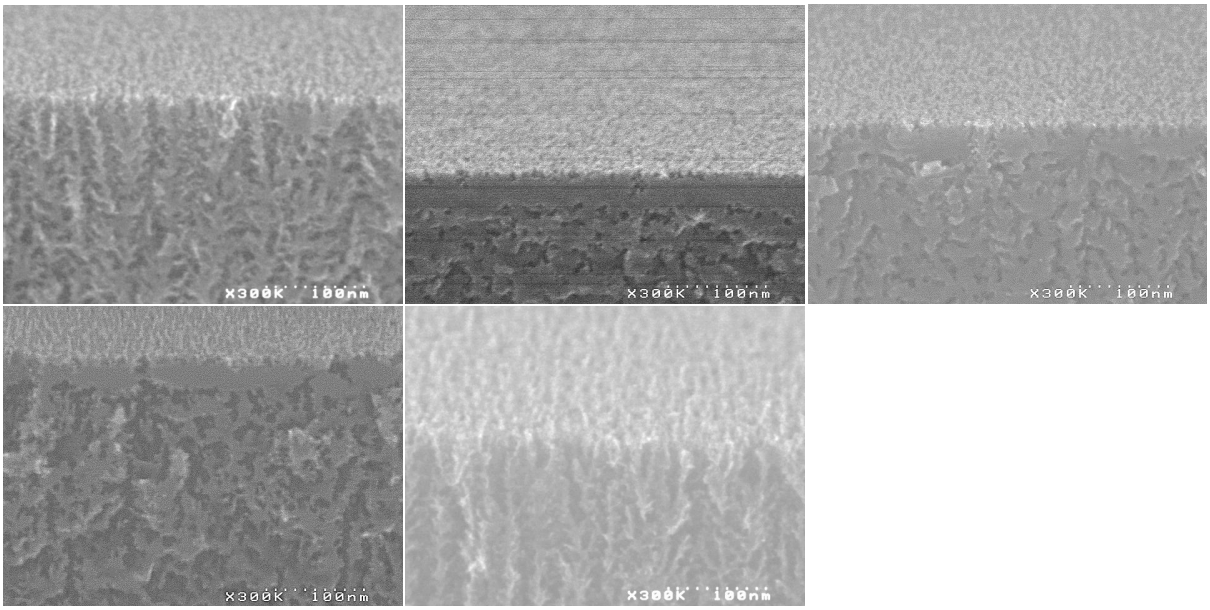


Figure 9: Diversité architecturale des silicium poreux, caractérisation en MEB

Nous avons pu tirer profit de cette grande diversité de structuration à l'échelle nanométrique en montrant que l'utilisation de ces différents SiPo offre des propriétés qui leur sont spécifiques pour l'analyse moléculaire des échantillons.

III.2 L'imagerie interventionnelle.

III.2.1 Les systèmes d'imagerie lourde.

Dans le contexte de la chirurgie d'exérèse des GBM, comme évoqué précédemment, des développements importants ont lieu autour de l'utilisation de traceurs pour l'imagerie, qu'elle soit pré, per voire intra ou post-opératoire. Avant d'évoquer plus spécifiquement la place des traceurs fluorescents, il faut mentionner les grands développements qui ont eu lieu :
- Pour l'IRM : des champs magnétiques toujours plus élevés (de 0,5 à 9 Tesla) avec des projets de réalisations d'aimants corps entier à 11Tesla. En parallèle, des travaux considérables pour améliorer la méthodologie, les séquences IRM et les traceurs (nanoparticules de gadolinium, sondes de pH…). Soulignons également la présence d'IRM intra-opératoires dans un certain nombre de centres neurochirurgicaux dans le monde, dont les applications sont particulièrement prometteuses mais dont le coût reste exorbitant.
- Pour la médecine nucléaire: le couplage de la tomographie par émission de positron (TEP) à d'autres modalités d'imagerie a permis de faire des cartographies physiopathologiques et fonctionnelles d'une précision remarquable à l'aide de traceurs comme le 18F-FDG, la C11-Choline ou le Galium68. Les machines ont considérablement évolué. Aujourd'hui les équipements couplent le PET ou le SPECT à des CT (PET-CT, SPECT-CT) ou des IRM (PET-IRM) et des systèmes SPECT-IRM sont dores et déjà commercialisés pour des applications précliniques petit animal.
- Pour la tomodensitométrie : de nombreux systèmes per-opératoires (Airo®, O-arm®, Visius iCT®, BodyTom®) font leur apparition sur un marché qui semble en pleine expansion et offrent également de très grandes possibilités pour la visualisation intra opératoire.

D'une manière générale, il est encore tôt pour connaître le gain qu'apportent ces systèmes dans des études rétrospectives avec un grand nombre de patients dans des essais randomisés, mais quelques publications font état de résultats préliminaires monocentriques plutôt favorables [105–107].

III.2.2 Les systèmes d'imagerie dédiés à la détection de fluorescence.

En marge de ces techniques « lourdes » d'imagerie, on retrouve de très nombreux traceurs fluorescents pour guider le geste chirurgical et viser la *Gross Total Resection*. Parmi ces traceurs, seulement trois sont autorisés dans le cadre d'essais cliniques et montrent des résultats : l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA ; Gliolan®), le vert d'indocyanine (ICG ; Infracyanine®) et la fluoresceine sodique (Fluoresceine FAURE®).

Le principe de base est toujours le même, quelques heures avant la chirurgie d'exérèse, le patient reçoit une injection intraveineuse (fluoresceine, ICG) ou absorbe le traceur par voie per os (cas du Gliolan). Au moment de l'exérèse, le chirurgien utilise un système de détection de fluorescence pour compléter l'exérèse en se basant sur le profil de fluorescence du tissu tumoral. De nombreuses publications ont rapporté que l'utilisation de ces traceurs permet i) d'atteindre une exérèse complète beaucoup plus souvent que dans les groupes opérés en lumière blanche [108,109] ii) une augmentation importante de la FPS à 6 mois iii) une augmentation variable de la survie médiane des patients [110–112]. Deux grands aspects demeurent discutés dans ces approches, d'une part, la sensibilité du système de détection et d'autre part, la spécificité du traceur lui-même.

Concernant les systèmes de détection, on peut citer de très nombreuses techniques qui ont été développées pour permettre la visualisation per opératoire des traceurs. Ces dernières, bien sûr, présentent toutes de nombreux avantages et/ou inconvénients dont il est difficile d'établir une liste exhaustive. Cependant, on peut résumer tout de même ces traits par les notions :
- de *coût*, avec des ordres de grandeur variant de quelques milliers d'euros à plusieurs centaines de milliers ;
- d'*encombrement* : du plus simple dispositif qui consiste à équiper une loupe binoculaire avec un jeu de filtres et un système d'excitation lumineuse déportée [113] à des systèmes très intégrés de type modules de fluorescence à même le microscope opératoire (Pentero®, Zeiss) ;
- de *résolution latérale* : elle varie de 0,1µm sur des systèmes de microscopie confocale et d'imagerie « non linéaire » à quelques millimètres sur des équipements d'imagerie de fluorescence spectrale ou de TEP;

- de *profondeur de champ* : typiquement de l'ordre de 100µm en épifluorescence, elle peut atteindre plusieurs centaines de microns (microscopie à 2 photons) voire 1mm pour la tomographie en cohérence optique ;
- de *sensibilité* : problématique majeure du domaine, la sensibilité est grandement conditionnée par les propriétés optiques du tissu d'intérêt, tout spécialement l'absorption et la diffusion de la lumière au sein de celui-ci. Ces paramètres varient considérablement en fonction de la longueur d'onde incidente, et conditionnent littéralement la sensibilité du système.

Les méthodes existantes sont nombreuses pour l'imagerie optique dans les tissus biologiques, en particulier le tissu nerveux, on citera l'épifluorescence, la microscopie confocale, l'imagerie spectrale et la micro endoscopie confocale [111]. Parmi ces dernières, deux feront plus particulièrement l'objet de discussion dans ce manuscrit, l'épifluorescence et la microendoscopie confocale.

III.2.3 Les fluorophores validés pour un usage clinique.

En marge des variables liées au système de détection, il existe un rationnel et des discussions sur la spécificité des traceurs utilisés pour la fluorescence per opératoire. Les molécules qui disposent d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) sont l'acide 5-aminolévulinique (Gliolan®), la fluorescéine sodique et le vert d'indocyanine. Cependant, les AMM de ces deux derniers ne sont pas délivrées pour un usage en neurochirurgie mais en ophtalmologie pour la fluoresceine, en ophtalmologie, hépatologie et mesure de volume sanguin circulant pour l'Infracyanine®.

a. Le Gliolan®.

Le 5-ALA est un traceur métabolique. Physiologiquement, l'acide δ-aminolevulinic est produit sous l'action de la ALA synthase mitochondriale (à partir du Succinyl-CoA et de la glycine) et entre dans la voie de biosynthèse de l'hème. Cette cascade enzymatique qui permet la production des noyaux tetrapyrroliques passe par la production d'une molécule clé, la protoporphyrine IX (PpIX). C'est cette dernière qui en fait le produit fluorescent que l'on observe au cours de la résection. Bien que l'on parle abusivement de la fluorescence du

Gliolan®, la dénomination exacte de cette technique est « fluorescence de la PpIX induite par le 5-ALA ». La figure 10 illustre la voie métabolique de synthèse de l'hème (a), le spectre d'émission absorption de la PpIX (b), des images interventionnelles d'exérèse sous Gliolan (c) [114], et la formulation du médicament en suspension buvable (e).

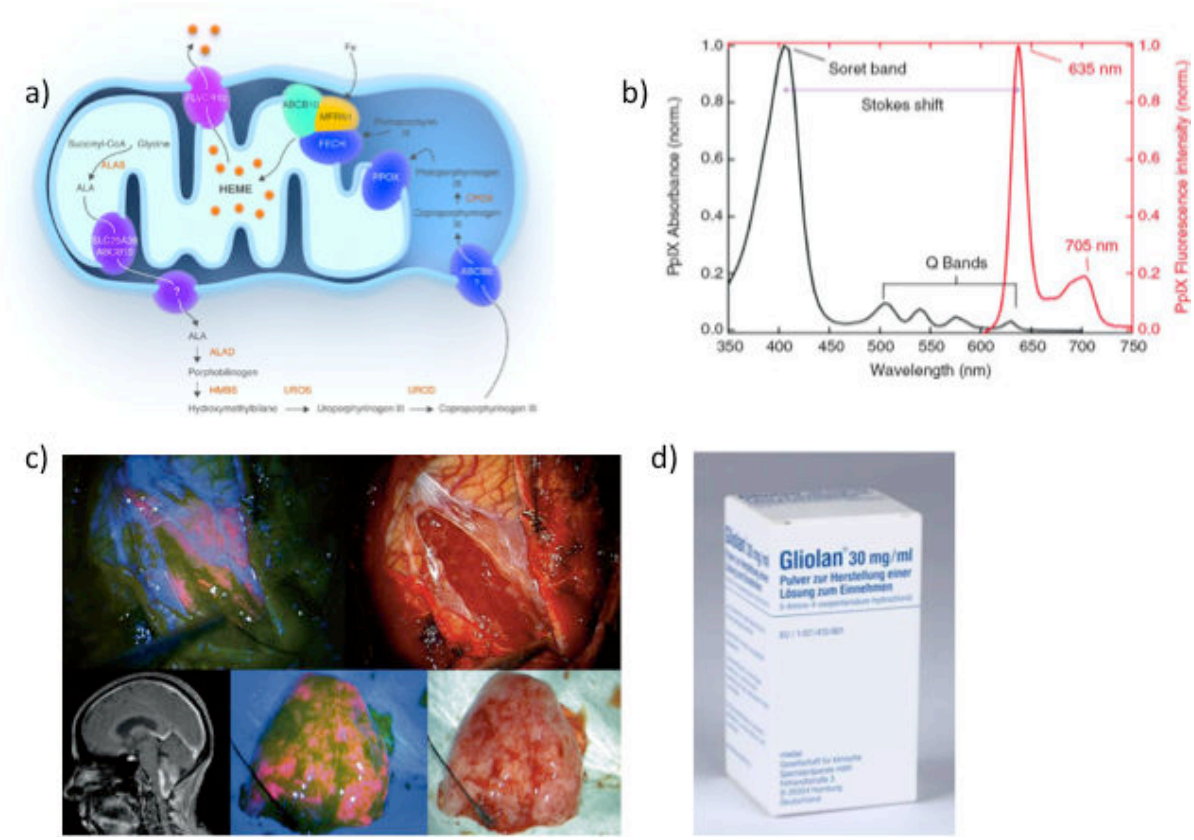


Figure 10: Principe d'utilisation du Gliolan

Les mécanismes qui expliquent l'important métabolisme du 5-ALA par les cellules de gliome font l'objet de très nombreuses études [115,116]. Toutefois, en raison des limitations qui sont associées aux systèmes standard de détection par épifluorescence (faible profondeur de champs et relativement mauvaise résolution latérale), comme le Pentero®, certains auteurs ont proposé des procédés de quantification absolue de la PpIX qui semblent produire une amélioration très significative de la sensibilité et de la spécificité [117–120]. Une autre approche consiste à prendre en considération le spectre d'émission de la PpiX dans son ensemble, c'est-à-dire en élargissant la mesure aux pics satellites, pas seulement la raie majoriataire à 634nm [121]. Il faut mentionner qu'un certain nombre de publications ont cependant contesté les résultats obtenus dans les études conduites sur l'utilisation du Gliolan® et parfois cherché à démontrer que le signal de fluorescence dans la tumeur pourrait ne pas être dû uniquement au

métabolisme des cellules tumorales [122,123]. Le Gliolan® qui est aujourd'hui le seul traceur fluorescent à avoir une AMM en neurochirurgie (depuis 2007), se révèle comme un agent tout à fait prometteur dont les mécanismes restent encore à explorer.

b. *La fluorescéine.*

Fluorophore par excellence, cette petite molécule (376Da) s'est imposée comme référence ces dernières années. Très peu coûteuse, ses propriétés d'absorption et d'émission (480/525nm respectivement) la rendent accessible à la détection sur tous les systèmes de microscopie. On trouve fréquemment cette molécule dans le commerce sous la dénomination « Fluorescein IsoThiocyanate » (FITC), dérivé de la fluorescéine qui offre un fort rendement quantique ($\Phi = \frac{\text{quantité de photons émis}}{\text{quantité de photons absorbés}}$). Le FITC est fréquemment complexé à des sucres (les dextrans) qui permettent d'augmenter son poids moléculaire et allongent ainsi sa demi-vie plasmatique en limitant son extravasation. La différence majeure entre le 5-ALA et la fluorescéine tient dans le fait que cette dernière ne s'accumule pas spécifiquement dans les tumeurs, elle y accède par effet de *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) [124], qui est généré par l'architecture défectueuse des vaisseaux tumoraux. La distribution de la fluorescéine dans la tumeur est donc un mécanisme passif. Elle présente également une propriété que n'a pas le Gliolan®, on peut la visualiser à travers la paroi vasculaire et au cours des saignements. La fluorescéine a été utilisée en neurochirurgie par quelques groupes dont les publications rapportent qu'elle permet d'atteindre la GTR dans 83% des cas contre 55% dans le groupes opérés en lumière blanche et que son efficacité semble corrélée à l'état de perméabilisation de la BHE [125,126].

c. *Le vert d'indocyanine (ICG) et les traceurs proche infrarouge.*

L'ICG, comme la fluorescéine, atteint la tumeur par effet EPR. Elle présente un spectre d'absorption/émisssion intéressant puisque cette molécule absorbe majoritairement autour de 800nm et émet dans le proche infrarouge (IR) à 845nm. De petit poids moléculaire (775Da) elle a beaucoup été utilisée en angiographie et pour l'imagerie du ganglion sentinelle dans les tumeurs gastro-intestinales, du sein et de la peau [127]. Du fait des longueurs d'ondes infrarouges, la profondeur de détection est importante, environ 20mm sous la surface. Ce

traceur a montré son utilité pour la résection des tumeurs cérébrales, tout particulièrement pour la vidéoangiographie dans la chirurgie des hémangioblastomes [128]. Très peu d'études ont directement utilisé l'ICG pour la résection des GBM. J'ai eu l'occasion, au cours de mon travail de thèse, de collaborer étroitement avec la société Fluoptics, pour évaluer l'intérêt d'un traceur, Angiostamp™, dans l'identification et la délimitation des GBM. Cette société développe et commercialise un couple traceur fluorescent/système de détection (Fluobeam™) qui autorise l'imagerie de fluorescence IR per opératoire.

L'Angiostamp est une molécule qui associe un fluorophore dérivé de la famille des cyanines, qui émet dans le proche IR, une ancre peptidique et un motif cyclique Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD) qui lui permet de cibler spécifiquement une molécule d'intérêt, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette intégrine a été décrite comme jouant un rôle important dans l'angiogenèse, et particulièrement dans l'angiogenèse tumorale. De nombreux traceurs pour l'imagerie médicale (TEP ou fluorescence) diagnostique ou le ciblage thérapeutique ont été développés ces dernières années et partagent ce motif RGD qui permet le ciblage [129]. Une démonstration de faisabilité à été rapportée en 2012 dans un modèle de gliome murin et montre que le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par un traceur infrarouge couplé au motif RGD permet une fixation spécifique et un intense signal de fluorescence dans le tissu [130]. Sur un principe similaire, nous avons entrepris de montrer le rationnel de l'utilisation de l'Angiostamp™ et du Fluobeam™ pour la détection des GBM (voir Résultats - section II.2)

IV. Les objectifs du travail de thèse.

IV.1 Nouvelle stratégie matériau.

Comme évoqué précédemment, l'une des grandes questions qui se posaient au démarrage de la thèse était celle de trouver un matériau de « deuxième génération » pour l'outil d'empreinte qui i) permette par simple contact de capturer du tissu, ii) présente une surface parfaitement plane, iii) n'ait pas besoin d'être chimiquement fonctionnalisé, et iv) puisse être stérilisé par un autre procédé que l'oxyde d'éthylène. Idéalement, trouver un matériau capable de stabiliser des espèces biologiques spécifiques (petites, grosses protéines, métabolites) et pouvant être miniaturisé en formats variés était un des challenges du cahier des charges.

Le concept d'empreinte moléculaire devait également être étendu à d'autres abords chirurgicaux, à la fois en neurochirurgie, ce qui a permis le transfert de cette technologie dans un essai clinique visant la caractérisation moléculaire des adénomes hypophysaires, mais également à d'autres applications, ce que nous avons initié pour l'urologie, l'otorhinolaryngologie et les pathologies hépatiques et pulmonaires. Nous avons bénéficié d'un fort soutien du réseau français des Instituts Carnot qui a largement financé ce programme, les débuts de cette thèse et bon nombre des développements effectués dans les procédés silicium. Il s'agissait non pas seulement de trouver une solution mais aussi de démarrer très en amont l'étude de biocompatibilité et d'opérabilité clinique du dispositif « 2.0 ».

Compte-tenu du rationnel existant dans les rapports entre zone sous ventriculaire, zones de prolifération cellulaire et gliomes, nous avons fait le choix également de lancer une étude plus fondamentale sur l'utilisation du SiPo comme outil servant à établir des cultures primaires. La caractérisation des interactions cellules/nanosurfaces fait l'objet de très nombreux travaux dont les résultats divergent, probablement du fait de l'importante variabilité qui existe sous le terme « nanosurfaces ». Aussi, une étude transcriptomique a été initiée pendant ce travail afin de comprendre l'impact que peut avoir le SiPo sur le phénotype des cellules qui sont à son contact. Les résultats du transcriptome sont toujours à l'étude car, devant les premiers résultats obtenus, nous avons souhaité rajouter des points d'analyse. Les résultats préliminaires sont présentés dans la partie résultats (I.2).

IV.2 Améliorer la localisation des empreintes.

L'une des problématiques liées à l'utilisation de l'outil d'empreinte réside dans le fait que cet outil, en inox, est incompatible avec une approche de guidage par IRM. Cette dernière trouve une solution dans l'utilisation de systèmes de guidage dans un référentiel d'imagerie 3D, typiquement comme la solution ROSA®, robot stéréotaxique développé par la société MEDTECH. Le système de planification de trajectoire du robot prend en compte des images scanner et IRM acquises dans un référentiel commun (des inserts osseux à la surface du crâne du patient), en assure la fusion, le recalage et propose une trajectoire qui est ensuite prise en charge par le bras robotisé. La position exacte de l'outil est par ailleurs vérifiée par des contrôles radiographiques.

Nous avons alors souhaité alors trouver une alternative pour guider le geste d'empreinte sans aide de systèmes d'imagerie externe. Ces dernières années, un concept émergent faisait sa place en parallèle, celui de biopsie optique. Ce terme, proposé par la

société MaunaKea Technologies, repose sur l'utilisation de sondes miniatures pour l'investigation tissulaire par micro-endoscopie confocale. Le principe de base est donc plutôt simple mais l'enjeu technologique considérable : faire de la microscopie confocale à l'extrémité d'un bundle de fibres optiques d'un diamètre compris entre 300 et 1500µm. En développant un tel système (une version de laboratoire pour la recherche préclinique existe également) qui répond à tous les standards des normes cliniques, en quelques années, cette société a ouvert la voie à un concept nouveau, observer les tissus, *in vivo*, avec une résolution cellulaire.

C'est en reprenant tous ces éléments que l'idée est venue d'implémenter le dispositif d'empreinte en le couplant au système de MaunaKea. Ainsi, le nouveau standard imaginé peut combiner l'exérèse chirurgicale guidée par fluorescence (5-ALA…) à l'aide de systèmes de détection macroscopiques, et l'investigation des territoires péri-tumoraux par une détection de fluorescence à l'échelle microscopique qui indique où faire des empreintes pour la caractérisation moléculaire. Sur la base de cette réflexion, nous avons fixé pour objectif de démontrer que le couplage de l'outil d'empreinte à un système de détection de fluorescence i) était possible, ii) était effectif, et iii) était transférable au lit du malade.

Enfin dans l'ensemble de ce travail, nous avons essayé de mettre en place en parallèle de l'approche biomédicale qui nous guidait, une approche industrielle, indispensable pour disposer *in fine* d'un objet compatible avec un essai clinique de preuve de concept. Nous avons donc tenté de protéger nos innovations par des brevets et de développer des procédés compatibles avec une industrialisation à un coût médico-économique pertinent. L'apport de l'industrie de l'électronique et du Léti a été déterminant pour cela.

Le manuscrit décrit dans l'ordre:

I. Les résultats concernant l'utilisation du silicium poreux pour la capture d'espèces biologiques;

II. Les résultats concernant le couplage à un dispositif optique;

III. Les brevets concernant les modifications de l'outil pour des versions futures.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Cultures cellulaires.

I.1 Entretien des lignées cellulaires.

a) Glioblastome murin F98 .

La lignée F98 a été commandée auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC Ref. CRL-2397). Les cellules sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; Gibco ; Life Technologies) supplémenté à 10% Serum de veau fœtal (SVF, Gibco, Life Technologies) et 1% GlutaMax^{TM} (Life Technolgies).

Les cultures sont maintenues en atmosphère humide à 37°C, sous 5% CO_2. Les cellules sont poussées à 80% de confluence dans des flasques de culture de 75cm^2. Les passages sont effectués par élimination du milieu puis rinçages en Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco, Life Technologies). La dissociation est réalisée par incubation avec 1mL d'une solution 0,25% trypsine EDTA (Gibco, Life Technologies) durant 5 minutes à 37°C. L'activité trypsique est stoppée par addition de milieu complet en excès. La suspension cellulaire ainsi obtenue est comptée sur un automate BIO-RAD TC20 après dilution ½ au bleu de trypan pour évaluer la viabilité. Les cellules sont ré-ensemencées à raison de 6500 cellules/cm^2 .

b) Glioblastome humain U87-MG.

La lignée U87-MG a été commandée auprès de l'ATCC (Ref. HTB-14). Les cellules sont cultivées selon un protocole identique à celui de la lignée F98.

I.2 Culture primaire de cellules souches neurales.

a) Etablissement de cultures primaires.

Des ratons Wistar Han IGS (Charles River Laboratories) âgés de 6 jours (P6) sont sacrifiés par décapitation. Après dissection des plans osseux et méningés, les cerveaux sont rapidement extrais et immergés dans du liquide cérébrospinal artificiel (aCSF) froid de composition : 125mM NaCl ; 2,5mM KCl ; 0,5mM $CaCl_2$; 7mM $MgCl_2$; 25mM $NaHCO_3$; 1,25mM NaH_2PO_4 ; 20mM Glucose et 4mM HEPES.

Après rinçage, des coupes de tissu de 250µm d'épaisseur sont réalisées sur un vibratome (de type Leica VT1200S). Les coupes de tissus contenant la région antérieure de la zone sous ventriculaire sont prélevées au pinceau et placées dans du milieu DMEM 10% SVF. Les murs ventriculaires et les SVZ sont prélevés par microdissection sous loupe binoculaire et transférés dans du Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, Life Technologies) froid. Les micro-fragments obtenus sont dissociés en cellules uniques par incubation dans une solution de trypsine EDTA. La suspension cellulaire est ensemencée en boite de Pétri 60mm dans un milieu DMEM ¾ F12 ¼ supplémenté extemporanément par de l'additif B27 1/50ème ; de l'EGF et du bFGF à 20ng.mL^{-1} .

Ce protocole qui constitue la méthode standard (Neurosphere Assay) est opposé à des cultures primaires initiées en apposant des puces de SiPo (25mm^2) directement sur les cerveaux, au niveau de coupe retenu pour la microdissection. Les puces sont laissées en contact 1,30 minutes avec le tissu et directement ensemencées en milieu supplémenté dans des boîtes de Pétri de 35mm (3 puces SiPo par boîte).

b) Mise en différenciation des Neurosphères.

Les milieu contenant les neurosphères flottantes est récolté et les boites de culture sont lavées trois fois au HBSS 1X. Après centrifugation (1200rpm, 5min), le surnageant est éliminé et les culots repris dans 300µL d'une solution de dissociation enzymatique Accumax™ (Sigma Aldrich). La dissociation est stoppée par addition de DMEM 10% SVF en excès. Après centrifugation le surnageant est éliminé et le culot repris en DMEM 10% SVF 1% GlutaMAX 1% Pénicilline Streptomycine.

Après comptage, les cellules sont ensemencées dans des chambres de culture LabTek™ (Nunc) ayant préalablement été traitées à la poly-L-lysine. Après 5 jours d'incubation, le milieu est remplacé par du DMEM ¾ F12 ¼ B27 1/50ème sans facteur de croissance. Une nouvelle période d'incubation de trois jours est respectée. A l'issue de celle-ci, le milieu est éliminé, les chambres de culture sont lavées trois fois en PBS 1X puis les échantillons sont fixés en paraformaldéhyde 4% pendant 1h.

I.3 Transduction lentivirale.

Les manipulations effectuées ont fait l'objet d'une demande auprès du Haut Commissariat aux Biotechnologies et ont donné lieu à une autorisation de projet couverte par l'agrément d'utilisation confinée d'OGM du laboratoire.

Afin de faciliter l'observation en microscopie des cellules et des empreintes tissulaires sur silicium, il est souvent fait recours à la transduction lentivirale. La première étape est l'établissement d'une courbe dose réponse à la puromycine, qui permet de déterminer la dose d'antibiotique utile (100% de mortalité sur le phénotype sauvage) à la sélection des clones cellulaires recombinants.

Les cellules sont ensemencées en plaque à 24 puits à des densités variables. Le jour de la transduction, un puits à 50% de confluence est sélectionné. Les particules lentivirales sont déposées en MOI =10 (multiplicity of infection) dans 1mL de milieu complet à 5µg.mL^{-1} de polybrène. Une incubation est réalisée sur 24h. Au delà, le milieu est remplacé par un milieu complet pour une période de 72h. Enfin, les cellules sont dissociées à la trypsine, et ré ensemencé en flasque de culture de 75 cm^2 en présence de l'antibiotique de sélection.

II. Techniques de microscopie.

II.1 Immunocytochimie de typage après différenciation des neurosphères.

Les échantillons fixés en paraformaldéhyde sont lavés 3 fois en PBS. La perméabilisation est faite dans une solution de PBS 0,1% triton X100 pendant 45 minutes. La saturation est faite dans une solution de PBS 10% normal donkey serum 1% BSA. Le marquage est réalisé avec le kit Human/Mouse/Rat Neural 3-Color (R&D System) contenant trois anticorps primaires directement couplés comme suit :

- Anti oligodendrocyte marker 04 conjugué NL-557 ;
- Anti βIII Tubulin conjugué NL637 ;
- Anti GFAP conjugué NL493.

L'incubation est faite sur 3h à température ambiante. Trois lavages sont réalisés en PBS 0,1% BSA. Les lames sont montées et lues sur un microscope confocal FV10 (Olympus).

II.2 Microscopie Electronique à balayage.

Pour atteindre des résolutions plus importantes, un certain nombre d'empreintes sur puces de silicium ont été préparées pour une observation en MEB. Les échantillons sont fixés en PAF4%. Ils sont déshydratés par des bains d'éthanol de 10 minutes à concentration croissante comme suit : EtOH 70% / 80% / 90% / 100%.
Le dernier bain est fait dans une solution de bis(trimethylsilyl)amine ou hexamethyldisilazane (HMDS, Sigma Aldrich). Les puces silicium sont ensuite placées une nuit en cloche sous vide pour garantir une déshydratation complète. Un dépôt Au/Pd de 200nm d'épaisseur est réalisé pour limiter les effets de charge avant l'observation qui est réalisée sur un système ULTRA55 (Zeiss).

III. Modèles Animaux.

Toutes les procédures d'expérimentation animale conduites au cours de cette thèse ont été réalisées dans le respect de la directive européenne 2010/63/EU de 2013. Les demandes d'autorisation de projet ont été soumises au ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur et ont reçu l'approbation du comité local d'Ethique en expérimentation animale.

III.1 Implantation stéréotaxique de cellules tumorales chez le rat.

Le modèle de tumeur F98 implanté chez le rat Fischer 344 (Charles River Laboratories, France) a été retenu car il présente des avantages certains. Ce modèle est syngénique, reproductible, bien caractérisé dans la littérature [131] et reproduit assez bien l'évolution rapide du glioblastome multiforme.

Le jour de la chirurgie, les cellules de la lignée F98 sont préparées en suspension concentrée à 2.10^6 cellules.mL^{-1} dans du milieu DMEM. Les animaux sont anesthésiés par

inhalation d'isoflurane (Vetflurane, Virbac) dans un mélange 60% air 40% O_2 (5% isoflurane pour l'induction de l'anesthésie générale, 2% pour le maintien).

L'animal est placé dans un cadre de stéréotaxie (Kopf) où la tête est fermement maintenue par les barres d'oreilles et la barre de gueule. Le crâne de l'animal est rasé et désinfecté par une solution de Vétédine (Vetoquinol). Après incision médiane du scalp et résection des plans sous cutanés, les sutures osseuses sont révélées par application d'une solution d'eau oxygénée 10%. Les coordonnées stéréotaxiques sont relevées et calculées par rapport à Bregma.

Pour une implantation de tumeur centrée dans le striatum les coordonnées choisies sont Bregma AP 0,2mm Lat. 3,5mm, Profondeur 5mm. L'injection de 10^4 cellules dans 5µL est faite à la seringue Hamilton 26Ga à raison d'$1\mu L.min^{-1}$. La seringue est rétractée 5min après la fin de l'injection pour limiter au maximum tout reflux de liquide. La plaie est suturée au fil Vicryl résorbable, désinfectée à la Vétédine et l'animal placé en réveil sous lampe chauffante dans une pièce dédiée.

La croissance tumorale est évaluée par suivi longitudinal en imagerie par résonance magnétique. Environ 15 jours après implantation les animaux portent des tumeurs ayant complètement envahi le striatum.

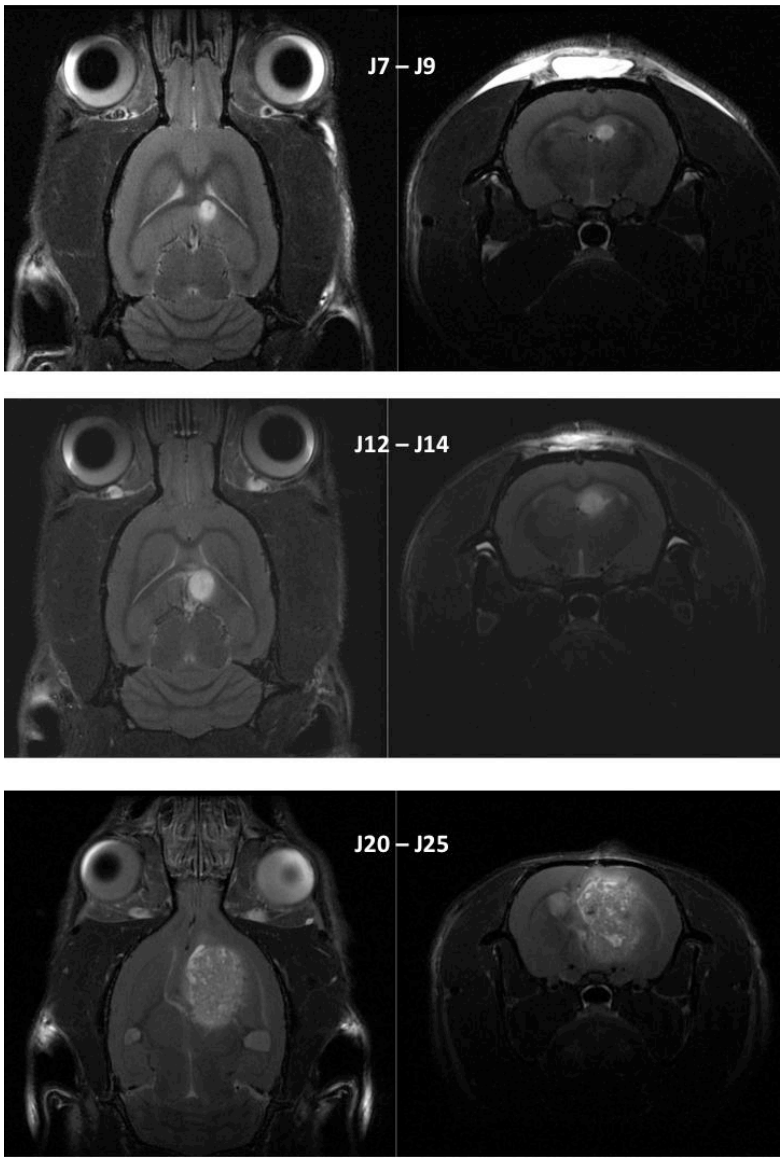


Figure 11: Illustration de la croissance tumorale suivie en IRM dans un modèle de glioblastome orthotopique syngénique chez le rat.

III.2 Xenogreffe ectopique de cellules tumorales chez la souris.

Le modèle retenu est l'injection sous cutanée de 10^6 cellules de la lignée U87 chez la souris immuodéficiente HSD :Athymic Foxn1$^{nu/nu}$ (Harlan Laboratories, France). Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'IsoFlurane (5% pour l'induction, 2% pour le

maintien). Les cellules sont injectées dans 200µL de DMEM, sur le flanc, en position sous cutanée. Après 10 minutes de maintien, les souris sont réveillées et remises en stabulation. La croissance tumorale est suivie par mesure de diamètre au pied à coulisse.

III.3 Chirurgie stéréotaxique chez le primate non humain.

Des macaques cynomolgus (*Macaca fasicularis,* SILABE, France) ont été utilisés pour ce travail. Les animaux sont hébergés en animalerie à statut sanitaire conventionnel. Ils sont soumis à un rythme d'alternance jour nuit 12h/12h et ont accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture.

a) Prélèvements de fluides biologiques avant et après chirurgie.

L'animal est immobilisé dans sa cage par traction du double fond et anesthésié par injection intra-musculaire de Kétamine Xylazine (10mg.Kg^{-1} 1mg.Kg^{-1}, Imalgen, CentraVet). Après tonte et désinfection, une prise de sang est effectuée en veine saphène pour préparer sérum et plasma. L'animal est ensuite installé pour la réalisation d'une ponction lombaire sous contrôle radiographique.

b) Analyse comportementale.

L'absence de lésions motrices induites par la chirurgie a été évaluée en quantifiant les mouvements de l'animal dans une cage sur des sessions de 30 minutes. Les enregistrements ont été effectués toujours aux mêmes heures et jours de semaine. La quantification a été effectuée grâce au logiciel de video tracking Noldus EthoVision. Deux paramètres ont été retenus, la vitesse moyenne du mouvement et la distance totale parcourue sur l'ensemble d'une session.

c) Procédure chirurgicale.

L'animal est mis à jeun la veille de la chirurgie. Il est anesthésié par injection intamusculaire de Kétamine Xylazine (10mg.Kg^{-1} 1mg.Kg^{-1}, Imalgen, CentraVet). L'animal est installé sur un système homéothermique et placé sous monitoring cardiorespiratoire. Une

antibiothéarpie prohylactique est pratiquée par administration intraveineuse d'Augmentin 20mg. Kg^{-1}. La tête de l'animal est immobilisée dans un cadre stéréotaxique (David Kopf Instruments). Le repérage anatomique est effectué en réalisant en ventriculographie par injection d'un agent de contraste dans la corne antérieure du ventricule latéral. Les positions des commissures antérieure (AC) et postérieure (PC) sont identifiées par des radiographies de face et de profil. Les coordonnées définitives de descente de l'outil d'empreinte sont calculées par fusion des données de l'atlas stéréotaxique du *Macaca fascicularis* (BrainInfo, University of Washington, http://braininfo.rprc.washington.edu), de la ventriculographie et des radios et IRM préopératoires.

d) Recueil des empreintes tissulaires sur silicium.

Les puces de silicium utilisées pour la réalisation des empreintes tissulaires sont immédiatement recueillies et plongées dans un tampon de stabilisation adéquat.
Pour l'analyse transcriptomique, les puces silicium sont immergées dans 800µL de tampon de lyse du kit d'extraction d'ARN MirVana (Life Technologies) et congelées immédiatement à -80°C. Pour l'immunocytochimie, elles sont placées en PAF 4% pendant 30 min et congelées.

IV. Préparation des échantillons pour l'analyse transcriptomique.

Pour comparer les phénotypes cellulaires des cultures primaires issues d'une méthode conventionnelle (dilacération puis dissociation enzymatique) ou d'empreintes tissulaires sur silicium, les cultures ont été arrêtées au 7ème jour *in vitro* en vue d'extraire les ARN pour la réalisation d'analyses sur puces d'expression Affymetrix® GeneChips Rat Genome 230 2.0 Array. Les ARN totaux sont extraits en utilisant le *MirVana*™ RNA Isolation Kit (Ambion®, Applied Biosystems).
Plusieurs problèmes se sont posés en mettant au point l'expérience car la mise en oeuvre du protocole proposé par le fabricant conduisait à l'extraction d'ARN totaux présentant une dégradation importante au moment du contrôle effectué sur Bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA). Quelques adaptations ont cependant permis de parvenir à l'obtention d'ARN de bonne qualité.
Au 7ème jour de culture, les cellules de neurosphères sont collectées dans leur milieu de

culture et transférées dans un tube propre. Le fond de la boite de Pétri est rincé et la suspension cellulaire est centrifugée 2 minutes à 800rpm. Le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est alors lysé puis traité selon les recommandations du fabricant. Le dosage et la qualité des ARN sont effectués sur puces Agilent® de type RNA pico ou RNA nano. Une étape d'amplification et de marquage des ARN avant hybridation sur puce est réalisée en suivant le protocole du fabricant pour le GenChip® 3' IVT Expression Kit Labelling Assay (Affymetrix). Les puces d'expression sont lues sur une station Affymetrix GeneChip Scanner 3000.

Le traitement des données et les résultats préliminaires de cette étude sont détaillés dans la section résultats.

RÉSULTATS

I. Capture tissulaire sur silicium poreux.

I.1 Publication en préparation: Mesoporous silica chips for safe deep brain proteomic investigation, a preclinical study.

Un peu plus de deux ans de travail ont été nécessaires pour évaluer la meilleure solution technique afin de remplacer l'utilisation de puces en silicium microstructuré et chimiquement modifié. De nombreux matériaux ont été testés mais rapidement, le silicium poreux a retenu notre attention. Sa biocompatibilité a été d'abord évaluée par des tests *in vitro* au sein du laboratoire, puis sa capacité à capter du matériel biologique a été testée par apposition extemporanée sur des tissus frais. C'est dans ce cadre que nous avons démarré des expériences d'élaboration de cultures primaires qui visaient à comparer les phénotypes cellulaires dans des cultures primaires soit "conventionnelles", issues de microdissection et de dissociation enzymatique, soit initiées par apposition sur silicium et ensemencement direct. Ceci est repris en fin de paragraphe, après la publication.

En parallèle, avec l'aide des collaborateurs des départements du CEA spécialisés dans la fabrication et les technologies du silicium, nous avons cherché à élaborer un procédé qui permette la fabrication, en salle blanche, de puces en silicium poreux dont le format soit compatible avec les dimensions de l'outil d'empreinte. En particulier, il s'agissait d'obtenir des puces de 20mm de long, 0,6mm de large et surtout de 0,3mm d'épaisseur. C'est cette dernière dimension qui a longtemps posé problème. En effet, les galettes de silicium ou *wafers*, qui sont utilisés à la base des procédés ont une épaisseur standard de 0,7mm. Une fois porosifiés par électrochimie ils deviennent cassants et ont posé de nombreux problèmes dans les machines de fabrication. Après de longs mois d'échanges, une stratégie associant plusieurs étapes de "wafer processing" a permis d'atteindre les spécifications. Le manuscrit de publication présenté dans les pages suivantes retrace les éléments clés associés à la fabrication et à l'assemblage de l'outil d'empreinte de deuxième génération. Ces prototypes ont pu être testés dans un modèle de primate non humain. Nous démontrons l'opérabilité clinique du dispositif, validons que la stratégie d'utilisation du silicium poreux est compatible avec une analyse multimodale des fragments de tissus recueillis, et l'absence de toxicité aiguë liée au dispositif.

Mesoporous silica chips for safe deep brain proteomic investigation, a preclinical study.

Matthieu Dreyfus[Δ‡], Adrien Mombrun[§‡], Laurent Selek[ΔT], Venera Aiello[#], Céline Leclec'h[§], Affif Zaccaria[Δ], Mylène D'Orchymont[§], Vincent Auboiroux[§], Frederic X. Gaillard[#], Ennio Tasciotti[Φ], Mauro Ferrari[Φ], François Berger[Δ], Ali Bouamrani[§*]

[§]Clinatec, CEA Léti, Grenoble, France

[Δ]Clinatec Translational Technology Laboratory, INSERM UA01, UJF, CHU, Grenoble, France

[#]Departement Technologies Silicium, CEA Léti, Grenoble, France

[T]Department of Neurosurgery, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

[Φ]Department of Nanomedicine, The Methodist Hospital Research Institute, Houston, Texas, USA

KEYWORDS silicon process, in vivo, bioharvesting, mass spectrometry imaging

ABSTRACT Getting *in vivo* access to deep brain tissue remains an exciting challenge for deciphering molecular mechanisms of human brain diseases. Due to their highly functional nature, many regions of the human brain are inaccessible to conventional biopsies, restraining their study to post mortem specimens. We present in that work an innovative strategy based on the use of mesoporous silicon chips integrated in a surgical device allowing deep brain

investigation and bio harvesting. We describe a new specifically designed silicon wafer process to produce small, thin and reproducible mesoporous silicon chips. The clinical operability of that approach was evaluated in a non-human primate model. On-chip harvested tissue micro fragments are compatible with a direct molecular and spatial distribution analysis, as demonstrated by the use of mass spectrometry imaging for proteomic profiling of the nervous tissue. Immediate postoperative MRI showed absence of surgical complications and post mortem histology showed a good short-term biocompatibility profile. Altogether, these findings are paving the way for a clinical use allowing *in vivo*, early investigations in deep nuclei implied in neurodegenerative diseases thus providing a unique opportunity to develop targeted therapy in a new biomedical procedure.

1.INTRODUCTION

Understanding the underlying molecular basis of human brain diseases today remains a challenge for number of them, partly because of the **lack of access to fresh tissue** at the onset of the clinical state. That issue constitutes a major bottleneck to develop targeted therapy in neurodegenerative diseases. Most studies are restrained to post mortem specimens in which molecular dysfunctions reflect the terminal stages of a given pathology. Post mortem interval and agonal state also dramatically impact the quality of the sample[1,2]. New tools are required for being able to sample tissues where classical biopsies are not possible and could produce surgical complications or cognitive impairments. It then appears a critical need for getting an *in vivo* access to the deep brain tissue at early stages of pathology in order to decipher the molecular basis associated to disease onset or progression. We previously described the use of a surgical, silicon chip/tissue contact based tool for deep brain molecular investigation[3]. Our technology relies on the neurosurgical paradigm introduced with the Deep Brain Stimulation approach invented by Pr. A.L. Benabid for the symptomatic treatment of Parkinson's disease[4].

A small stainless steel stylet can be safely introduced all along brain parenchyma to reach deep functional nuclei, providing the unique opportunity to harvest molecular and cellular information at the interface between the device and the nervous tissue. We introduced an innovative concept of **molecular and cellular imprint** allowing brain micro fragments bio harvesting compatible with polyomic analysis The key issue is to find a devoted material harboring optimal bioharvesting properties. Originally designed for brain tumors investigation, the device was based on the use of micro patterned and chemically modified silicon chips. New challenges arise for extending that approach to non tumoral pathologies, especially for getting access to deep brain nuclei such as the subthalamic nucleus or globus pallidus in Parkinson's disease[5] or the hippocampus in Alzheimer's disease[6,7]. Exploration of those structures and better knowledge about neurodegenerative diseases appear as key milestones for dealing with the exponential economic impact of them in the aging population. A non lesionnal targeting of functional deep brain nuclei with our innovative device suggests having flat contact surfaces, no chemical modification and ideally relies on very short contact time. Additionnaly, we aimed to develop a technique allowing on-chip spatial orientation of the harvested tissue fragments, then preserving the macro neuroanatomical organization with a cellular resolution. The group of Pr. M. Ferrari previously demonstrated the unique properties of porous silicon both for diagnostic analysis in biological fluids[8-10] and for drug delivery as well as the high biocompatibility of this multimodal material[11-13]. In the field of **biomarker** discovery, the last decades have seen the emergence of high throughput and large-scale analysis methods (neurogenetics, neuroproteomics)[14,15]. In that context, mass spectrometry is a powerful tool for investigation of the proteomic level. The very high sensitivity of the technique has led to a huge decrease of the required sample amount. New developments have also conducted to molecular imaging applications as illustrated By Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) imaging[16]. Molecular

imaging techniques are increasingly used to study the proteins' spatial distribution in tissue samples with a continuous decrease of the lateral resolution[17], bringing innovative concepts such as molecular microscopy or molecular assisted anatomopathology[18-20]. We integrated recent advances and the major biomedical needs resulting in an innovative surgical imprint device harboring a mesoporous silicon chip for safe *in vivo* bioharvesting. Fabrication process was adapted to the clinical and regulatory prerequisites, paving the way for a clinical transfer of that approach to patients' bedside. The present work shows that the use of PSi chips integrated in a surgical device allows a precise and spatially oriented tissue capture. This latter aspect is crucial to better understand the tissue micro heterogeneity leading to the identification of new therapeutic targets in their own local and regulated context.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 **Porous Silicon layer and chips fabrication**. Porous silicon (PSi) wafers are electrochemically generated in a hydrofluoric solution (HF) on a 200 mm diameter silicon substrate platform. The fully automated Semitool® 200 mm equipment is composed of a cleaning and an anodisation chambers. Anodic dissolution of silicon is performed in a double tank cell where the front and back sides of the silicon wafer are immersed in an electrolyte solution. This electrolyte is a hydrofluoric / isopropanol (IPA) mixture made of 3 volumes of HF (50 % weight), 3 volumes of IPA and 4 volumes of water. The porous silicon layer is obtained from a (100) boron-doped silicon with a 10-20 mOhm.cm^{-1} resistivity. Around 1 μm thick mesoporous layer has been realized at room temperature, in a galvanostatic mode.

After Si wafer anodisation, a sequence of technological steps has been developed to produce the desired 20 mm x 0.6 mm x 0.3 mm chips (Fig. 1). To prevent damages on the porous layer during the grinding process, a silicon oxide layer deposition at low temperature was realized

on the wafer top. Then the backside was mechanically grinded to reach the specified chip thickness (0.3 mm). The silicon oxide protective layer was chemically dissolved by front side immersion in a HF bath. Finally, the wafer was placed on U.V. tape and cut into 20 mm x 0.6 mm chips. All steps were performed in controlled environment of clean room, using automated equipment in pre industrial settings.

The surgical device consists in a 21cm long guide tube of 1,2mm outer diameter, in which a stainless steel stylet of 0,7mm diameter harboring the silicon chip is introduced. The bottom part of the guide tube comprises an exposition window that allows two different positions. During the tissue targeting, the device is in closed position, the chip is protected in the guide tube. When the final imprint coordinates are reached, by a rotation of the stylet inside the guide tube, the device is in opened position, the PSi chip gets in contact with the tissue. Tissue-chip contact is performed for 1,30 minute and the device is closed before withdrawal thus avoiding any contamination from other brain regions.

2.2 **In vivo experiments.**

a. Surgical procedure

Surgical procedure was conducted on a Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*, SILABE, Strasbourg, France). All procedures were conducted in accordance with the recommendations of the European Community Council Directives of 2013 (2010/63/EU). The local Committee on the Ethics of Animal Experiments approved experimental protocol. The animal was kept with other congeners in standard housing conditions (23°C, 65% humidity) under a 12h/12h light/dark cycle and had *ad libitum* access to food and water. On surgery day, deep anesthesia was induced by intramuscular injection of a ketamine (Imalgene, Alcyon, France) - xylazin (Rompun, Alcyon, France) mixture respectively at 10mg.Kg^{-1} and 0,5mg.Kg^{-1}. Animal was then intubated and kept under volatile anesthesia (IsoFlo, Alcyon, France) at 2% in 1L.min^{-1}

oxygen. The monkey's head was placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tunjunga, CA, USA). Cardio-respiratory function was monitored throughout the surgical procedure. Analgesia was provided by administering a subcutaneous injection of morphine (0.1 mg/kg) before cutting the skin.

The operating site and an extensive area surrounding it were disinfected with a povidone-iodine solution immediately prior to draping. A 6 cm longitudinal incision was made on the midline, 2cm posterior to the torus supraorbitalis, and descending to the pericranium. The muscles were retracted. The skull was drilled 5 mm to the right of the midline, on the anterior commissural plane. Two others holes were drilled with a distance of 4 mm and 8mm posterior from the first one. The dura-mater was then pierced with a needle. Imprint devices were placed on a prototype holder allowing simultaneous imprints on three different trajectories and sampling sites and positioned 15 mm deep from the skull in order to place the middle of the chip in the head of the caudate nucleus for the anterior device and at the junction of thalamus and the body of the caudate for the others. The devices were gradually withdrawn from the brain and the bone hole was closed by applying Horsley wax. The incision was closed with separated stitches. Postoperative analgesia was performed with intramuscular injection of ketoprofen (Ketofen, Alcyon, France) at $2mg.Kg^{-1}$.

b. Post operative MRI examination

MRI acquisitions were performed right after the surgery at 4.7 T using a dedicated volume/surface cross coil configuration (Biospec 47/40, Bruker Biospin, Wissembourg, FR). All MR experiments were performed under general anesthesia: the same protocol as for the surgery was used for induction and the maintenance was ensured using a 2.5 % isoflurane in a 30% O_2 in air mix. During each session, T_1, T_2 and T_2^*-weighted acquisitions were performed to assess potential surgical complications such as deeply-seated bleeding (T_1-weighted

MDEFT sequence: $T_E/T_R/T_I$ = 4/2000/800 ms, N_A = 2, 16 slices with FOV = 10x10 cm^2, matrix = 256x256 and voxel size = 0.39x0.39x1.5 mm^3 –T_2w TurboRARE sequence: T_E/T_R = 42/5500 ms, NA = 6, RARE factor = 8, same geometry as T_1 sequence – T_2^*w GRE sequence: TE/TR = 20/450 ms, 16 slices with FOV = 12x12 cm^2, matrix = 256x256 and voxel size = 0.46x0.46x2 mm^3)

c. Animal follow up and sacrifice

The global clinical state of the animal was daily assessed all along the postoperative period and no sign of neither cognitive nor locomotor impairments appeared. Three weeks after surgery, the animal, in a perfect welfare state, was sacrificed by terminal injection of sodium pentobarbital (Dolethal, Alcyon, France). The brain was extracted from the skull and quickly frozen in liquid nitogen vapors.

2.3 Immunohistochemistry on silicon chips. After 3 washes in PBS, the tissue imprints on silicon chips were fixed in 4% paraformaldehyde solution overnight. Immunostaining was then realized using primary coupled antibodies directed to GFAP and βIII Tubulin (Neural cells IHC kit, R&D Systems, Lilles, France) according to the manufacturer's recommendations. All fluorescence images have been acquired on a FV10 confocal microscope (Olympus, Hamburg, Germany).

2.4 Mass spectrometry Imaging

Materials

LC-MS grade Water, Methanol (99.9%), Ethanol (99.9%), Isopropanol (99.9%) and trifluoroacetic acid (99%) were obtained from Sigma-Aldrich. ITO slides, 2,5-

Dihydroxybenzoic acid, α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid and calibration standard mix (BTS) were purchased from Bruker-Daltonics.

Sample Preparation for MALDI IMS

Fresh brain tissue imprint on porous silicon chip was quickly rinsed in phosphate buffer saline and dehydrated in 70% and 95% isopropanol for 1 minute each then vacuum dried for 30 minutes. The primate brain was cryosectioned at -20°C into 10 μm thick sections on a cryostat (Leica Mirosystems, Nussloch, GmbH), and thaw mounted onto 75x50 mm ITO slides. The slides were then vacuum dried for 30 minutes, washed in 70% and 95% isopropanol (LC-MS grade, Sigma Aldrich) for 1 minute each, and kept under vacuum for 15 minutes. Automated matrix deposition (2,5-dihydroxybenzoic acid, 30mg/ml in methanol/water/trifuloroacetic acid 50:49,8:0,2 v/v/v) was performed using the ImagePrep system (Bruker Daltonics), following standard protocol. A custom MALDI target was designed and machined to hold the silicon chip.

Sample preparation for porous silicon stability to sterilization assessment

Porous silicon chips (5x5mm) were sonicated for 3 min in 100% acetone, dried in air and autoclaved for 10 min at 134°C. Silicon CultureWell™ removable chambered coverglass (Sigma-Aldrich) of 3 mm in diameter were placed onto each silicon chip. 10 μl of diluted human plasma sample (hplasma/water/acetonitrile 50:45:5 v/v/v) was deposited onto each well, and incubated in a humid environment for 10 minutes. Plasma was then removed and the silicon chips were washed three times by vigorously pipetting up and down 100% LC-MS grade water onto the porous surface. PSi chips were then dried under vacuum for 15 minutes, culture wells removed, and 1,5 μl of α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (10mg/ml in

acetonitrile/water/trifluoroacetic acid 50:49,8:0,2 v/v/v) deposited onto each PSi chip. MALDI profiling was then performed.

MALDI IMS experiment

MALDI mass spectrometry imaging was performed on an Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipped with a Smart-beam laser operating at 1000 Hz pulse rate. Ions were detected in positive linear mode at +25 kV accelerating potential, in the mass range of m/z 1000-20000 with ion suppression up to 950 Da. The lateral resolution was set at 150 μm for the brain slice and 50 μm for the silicon chip with 300 laser shots accumulated per spot for each acquisition.

MALDI profiling of the autoclaved PSi chips for stability assessment was performed using the same method as for MALDI-MSI and by accumulating 5000 spectra per chip.

MALDI-MSI statistical analysis

Spectra were preprocessed (baseline removal via tophat and smoothed) and normalized by total ion current (TIC) in SCiLS lab 2D (v2015a). Spatial segmentation was performed using bisecting K-means, correlation distance and high denoising parameters. Principal Component Analysis (PCA) was performed using 7 components, with TIC normalization and unit variance scaling.

2.5 SEM experiments. After MALDI Imaging acquisition, 2,5-DHB was removed from the sample by immersion in 100% methanol. The sample was then dehydrated in successive ethanol baths (50, 70, 80 and 96°, 10 minutes each) and immersed 10 minutes in a hexamethyldisilazane solution (Sigma Aldrich, Isle d'Abeau, France). A 20nm thick Au/Pd

layer deposition was performed before acquisitions on an ULTRA55 scanning electron microscope (Zeiss, Jena, Germany).

2.4 **Histology and immunohistochemistry**. Horizontal 30μm thick brain sections were realized and stained with hematoxylin eosin. Glial scar and microglial recruitment around the tracks left by the devices were evaluated using antibodies against GFAP and Iba1. Briefly, brain sections were permeabilized with a PBS 0,5%Triton X100 10% goat serum solution. Saturation was performed in a PBS 3% Bovine Serum Albumin solution. Anti GFAP (chicken polyclonal, diluted 1:500, Millipore, Fontenay sous Bois, France) and anti Iba1 (rabbit polyclonal, diluted 1:500, Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany) were incubated at 4°C overnight. AlexaFluor 488 (anti chicken) and 546 (anti rabbit) conjugated secondary antibodies (goat polyclonal, diluted 1:500, Life Technologies, Saint Aubin, France) were incubated for 1 hour at room temperature in PBS 3% BSA solution. Nuclei were counterstained using propidium iodine (diluted 1:1000, Sigma Aldrich, Isle d'Abeau, France) in PBS for 5 minutes before the last three washes.

3. RESULTS

As resumed in Figure 1, device development led to the set up of a complete wafer process inside the clean rooms, which can be compatible with good medical practices for devices production in the context of a clinical proof of concept. Figure 1a schematically summarizes the key technical wafer processing steps (electrochemical etching, protective oxide layer deposition, backside wafer grinding and chemical de oxidation) that have been assembled to reach the desired Psi chips (Fig1c) production at the specified dimensions (length 20mm, width 0,6mm, thickness 0,3mm). The obtained porous layer (Fig1b) presents a columnar structure with a 20nm median pore size with 40-50% of porosity. We further checked that the different steps of the process had no impact on MALDI profiles of molecular imprints. PSi chips were assembled on the imprint device in a clean room environment using a validated biocompatible glue (Fig1d) and the whole device underwent sterilization process. We checked that the sterilization process had no effect on the molecular harvesting capacities of the PSi (Supplementary data figure S1). This technical validation now allows high throughput and reproducible production of the device.

Figure 2 illustrates the surgical set up. Thanks to a specifically designed stereotaxic holder, three tissue imprints were simultaneously performed in the head of the caudate nucleus for the first one, and at the junction of the thalamus and caudate nucleus for the others. Radiographic images allowed an accurate localization of the device during the positioning phase as illustrated in Figure 2 (a-b). After withdrawal of the devices, PSi chips were quickly removed from the device and specifically processed for each analyzing method e.g. mass spectrometry imaging or immunofluorescence.

Immediate MRI examination was conducted three days after surgery to evaluate possible surgical complications induced by the devices. MRI examination, as histological

characterization, was conducted on the whole trajectories height for assessing the tissue reaction all along the device. The top part (illustrated in figure 2 b-c) creates stainless steel /tissue interface while the bottom functional part of the device (illustrated in figure 2 c-d) relies on a mesoporous silicon/ tissue interface. While T_1 and T_2 images allow a very good localization of the three tracks all along the trajectories and absence of hyper and hyposignals due to the imprint devices, T_2^* images showed no sign of bleeding or edema induced by the device. Immediately after surgery, two PSi chips were processed for immunohistochemistry (figure 3) and one for MALDI-MS imaging (Figure 4 and supplementary data figure S3 and S4). Altogether, those results indicate that tissue short term response confirms the good biocompatibility profile of the device and validates that tit's dimensions are fully compatible with deep brain nuclei targeting.

Tissue imprints characterization

On chip direct cellular immunofluorescence phenotyping conducted on the tissue imprint is illustrated in **Figure 3**. Strong reactivity for the astrocyte marker GFAP (3b & 3f) was found. Fibrilar shape of the staining confirms the presence of intact astrocytes on the chip. In addition, we detected a diffuse but intense fluorescence signal for the neuronal marker βIII Tubulin (3c & 3g), confirming the co existence of neurons in the micro sample. Those results demonstrate that PSi chips allowed the sampling of the different cellular components of the targeted tissue. These cells are spread on the surface and can easily be identified on the basis of their specific lineage markers.

MALDI-MS imaging was also performed on the third PSi chip to assess the coverage and the molecular signature of the tissue imprint. Figure 4-A shows quality average spectrum consisting of 122 detected peaks from 3889 spectra acquired with a 50 μm lateral resolution, confirming that the PSi and the harvested biomaterial are compatible with MALDI-MSI. The

m/z images found on the PSi chip reveal various spatial distributions suggesting the tissue imprint conserved the histology of the exposed tissues (Figure 4-B). To further investigate the capacity of the PSi chip imprint technique to conserve the histology of the harvested tissue, we looked for a combination of m/z ions that could differentiate the different regions of the brain the PSi chip was exposed to. We first graphically aligned and placed the chip on the coronal section of the MRI with the trajectory of the tool (figure 4-D) and on the corresponding stereotaxic atlas section (figure 4-C). We then delimited, in the MSI analysis software SCiLS lab 2D, three major theoretical regions to be found on the silicon chip: white matter, grey matter and the central grey nuclei respectively colored in green, blue and red on figure 4-C/D). We then used the tools from SCiLS lab 2D, and more specifically the "find co-localized m/z values", on those delimited regions. Results returned three m/z ions strongly co-localized with grey matter (ion 4569.2 Da), white matter (ion 7348.2 Da) and the central nuclei region (ion 2600.6 Da). A principal component analysis (PCA) of these specific regions on the PSi chip confirmed the overall specificity of their molecular profiles (Supplementary data figure S3). PCA shows a strong separation of the spectra groups of each region delimited on the PSi chip. These results demonstrate the capacity of the PSi chip to conserve the spatial distribution of the harvested tissues. Furthermore, because MALDI-MSI is highly sensitive to blood contamination, especially hemoglobin which causes loss of sensitivity, we were able by selecting the m/z ion 15085 Da (hemoglobin subunit-α) to confirm that no major blood signal was found on the PSi chip, either on the mean spectrum and on the m/z images generated on the PSi chip (Figure 4-A/B).

Scanning Electron Microscopy of the chip performed after MALDI MSI allowed studying at high resolution the tissue fragments caught by the chip. Tissue harvesting occurs unequally on the mesoporous surface (supplementary data figure S5), higher magnification revealed cell bodies and spread cellular processes corresponding to axons kept in extracellular matrix.

Tissue short-term response to the device

Figure 5-I shows histological findings and immunofluorescence analysis of glial scar along the tracks. Frozen sections were stained using classical hematoxylin eosin coloration and revealed an acute hyper cellular response at the tracks sites. Immunofluorescence staining to GFAP and pan-microglial marker Iba1 showed identical patterns on the three tracks. Tissue damages were limited to small areas with diameters that were lower than the outer one of the device itself (1200μm). Borders of tracks were systematically surrounded by a hyper fluorescence signal from GFAP traducing a local glial activation and scar. Microglial cells, identified by Iba1 immunoreactivity, were also detected around the tracks. The brain sections used for histology and MALDI-IMS in figure 5 corresponds to the bottom part of the trajectories, where the imprint device allowed a mesoporous silicon-tissue contact. All the sections heights studied from the surface of the cortex to the bottom tip of the device in deep brain areas showed similar results. As a supplementary tool to investigate possible unconventional toxicity inherent to PSi material, beyond classical neuropathology, we investigated the modifications on the proteomic profile around the trajectory. On subsequent tissue slices, MALDI-MS imaging as a visual tool for tissue modifications was investigated (Figure 5II and supplementary data figure S2). Using the spatial segmentation tool in SCiLS lab 2D, regions specific to the trajectories were visualized. Figure S2 shows how the area around the trajectories was segmented: 87 spectra overlapping the glial scar and 50 spectra overlapping the hyper cellular response. The mean spectra from each region can be seen in figure S2-C. From each class in the cluster tree, two separate regions corresponding to the glial scar (green) and the hyper cellular response (red) were created, and peaks specific to each region were listed in figure S2-B. Figure 5-II shows as an example the most intense and specific masses for each region: m/z 4734 which was specifically detected on the periphery of

the trajectory, with similar pattern as the GFAP immunostaining shown in figure 5-I, and m/z 4623 which highlights the center of the trajectory and is strongly aligned with the hyper cellular response described in figure 5-I. The inner section formed by ion 4623 Da was measured to be around 1200μm in diameter. Most of the intense pixels of ion 4734 Da are drawing a ring around the hyper cellular response shown by ion 4623 Da. Few pixels can be seen as far as 1500 μm outside the main ring, of relatively low intensity and without forming any clusters.

4. DISCUSSION

Wafer process development has led to a **low cost, high throughput** (more than 2000 chips per 200mm wafer) and **reproducible mesoporous silicon chip** production. Porous silicon substrates are known for being difficult to handle once thickened, mainly because thin wafers are easily broken inside industrial production machines. We here present a process that allows multiple processing and non-conventional cutting at various sizes. Standardization of the fabrication process is a prerequisite for industrial transfer of the production and clinical use. In addition, use of mesoporous silicon allows autoclave sterilization process that wasn't possible with the previously described tool using chemically modified and micro patterned silicon chips, due to the susceptibility of the chemical functions. This result will ease the industrial production of the device in accordance with GMP processes. This device allows a significative decrease of the contact time required for getting qualitative tissue imprints. Moreover, this silicon-tissue nano interface is easy to integrate into several kind of surgical devices, allowing a large extension of the technique to other surgical approaches such as endoscopy or coelioscopic surgery for which surgeons encounter strong need for multiple, atraumatic sampling for extemporaneous diagnosis.

The present work introduces an innovative surgical device allowing deep brain molecular investigation. Our data demonstrates that ***in vivo*** **use of mesoporous silicon is efficient for brain tissue bioharvesting**. Spatial orientation and structural integrity of the harvested tissue, can be used as a "histological stamp" compatible with standard IHC protocols as well as molecular profiling and imaging. On-chip direct use of MALDI mass spectrometry imaging allows specific proteomic profiling of the nervous tissue. Thus the technique could be used for prospective investigation and information banking (erranet nanomed/collection dans le neuroDG) as well as in the surgical time for extemporaneous diagnosis, new challenge for biomedical research[21,22]. Biocompatibility evaluation demonstrates that tissue is very slightly damaged and silicon tissue contact did not produce massive or chronic inflammation process (figure à 1 an post op). Tissue response to the device creates the same glial scar for stainless steel (surgical standard) or silicon interface trending to confirm pre existing data about porous silicon safety. We further demonstrate that MALDI-MSI is a reliable technique for non-targeted evaluation of the tissue modification to assess its tolerance when exposed to innovative surgical devices, and is concordant with classical anatomopathological methods. Altogether, these data provides complementary results with required normalized ISO norms allowing transfer at the patient's bedside improving safety for patients.

ASSOCIATED CONTENT

Supplementary Data.docx

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Correspondence should be addressed to Ali Bouamrani: ali.bouamrani@cea.fr

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally.

Funding Sources

The french Carnot Institutes Network, InnabioSanté foundation; Ligue contre le Cancer and region Rhône Alpes supported this work.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Christophe Gaude and Dr. David Ratel and for their great help in histology analysis and critical reading of the manuscript.

ABBREVIATIONS

PSi: porous silicon; MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MSI: Mass spectrometry imaging

REFERENCES

1. Tomita, H. et al. Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. Biol. Psychiatry 55, 346–352 (2004).

2. Ferrer, I. et al. Brain Protein Preservation Largely Depends on the Postmortem Storage Temperature. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66, 35–46 (2007).

3. Zaccaria, A. et al. A micro-silicon chip for in vivo cerebral imprint in monkey. ACS Chem. Neurosci. 4, 385–92 (2013).

4. Benabid, A. L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S. & de Rougemont, J. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. Appl. Neurophysiol. 50, 344–6 (1987).

5. Benabid, A. L., Chabardes, S., Mitrofanis, J. & Pollak, P. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. Lancet. Neurol. 8, 67–81 (2009).

6. Mirzadeh, Z., Bari, A. & Lozano, A. M. The rationale for deep brain stimulation in Alzheimer's disease. J. Neural Transm. (2015). doi:10.1007/s00702-015-1462-9

7. Laxton, A. W. et al. A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. Ann. Neurol. 68, 521–34 (2010).

8. Terracciano, R. et al. Selective binding and enrichment for low-molecular weight biomarker molecules in human plasma after exposure to nanoporous silica particles. Proteomics 6, 3243–50 (2006).

9. Gaspari, M. et al. Nanoporous Surfaces as Harvesting Agents for Mass Spectrometric Analysis of Peptides in Human Plasma. J. Proteome Res. 5, 1261–1266 (2006).

10. Bouamrani, A. et al. Mesoporous silica chips for selective enrichment and stabilization of low molecular weight proteome. Proteomics 10, 496–505 (2010).

11. Martinez, J. O. et al. Degradation and biocompatibility of multistage nanovectors in physiological systems. J. Biomed. Mater. Res. A 102, 3540–9 (2014).

12. Minardi, S. et al. PLGA-Mesoporous Silicon Microspheres for the in Vivo Controlled Temporospatial Delivery of Proteins. ACS Appl. Mater. Interfaces 7, 16364–73 (2015).

13. Tanaka, T. et al. In vivo evaluation of safety of nanoporous silicon carriers following single and multiple dose intravenous administrations in mice. Int. J. Pharm. 402, 190–7 (2010).

14. Choudhary, J. & Grant, S. G. N. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. Nat. Neurosci. 7, 440–5 (2004).

15. Mirnics, K. & Pevsner, J. Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. Nat. Neurosci. 7, 434–9 (2004).

16. Gessel, M. M., Norris, J. L. & Caprioli, R. M. MALDI imaging mass spectrometry: Spatial molecular analysis to enable a new age of discovery. J. Proteomics 107, 71–82 (2014).

17. Zavalin, A., Yang, J., Hayden, K., Vestal, M. & Caprioli, R. M. Tissue protein imaging at 1 μm laser spot diameter for high spatial resolution and high imaging speed using transmission geometry MALDI TOF MS. Anal. Bioanal. Chem. 407, 2337–42 (2015).

18. Schwamborn, K. & Caprioli, R. M. Molecular imaging by mass spectrometry--looking beyond classical histology. Nat. Rev. Cancer 10, 639–646 (2010).

19. Seeley, E. H. & Caprioli, R. M. Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 105, 18126–31 (2008).

20. Van de Plas, R., Yang, J., Spraggins, J. & Caprioli, R. M. Image fusion of mass spectrometry and microscopy: a multimodality paradigm for molecular tissue mapping. Nat. Methods 12, 366–372 (2015).

21. Shankar, G. M. et al. Rapid Intraoperative Molecular Characterization of Glioma. JAMA Oncol. 1, 662–7 (2015).

22. Calligaris, D. et al. MALDI mass spectrometry imaging analysis of pituitary adenomas for near-real-time tumor delineation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 9978–83 (2015).

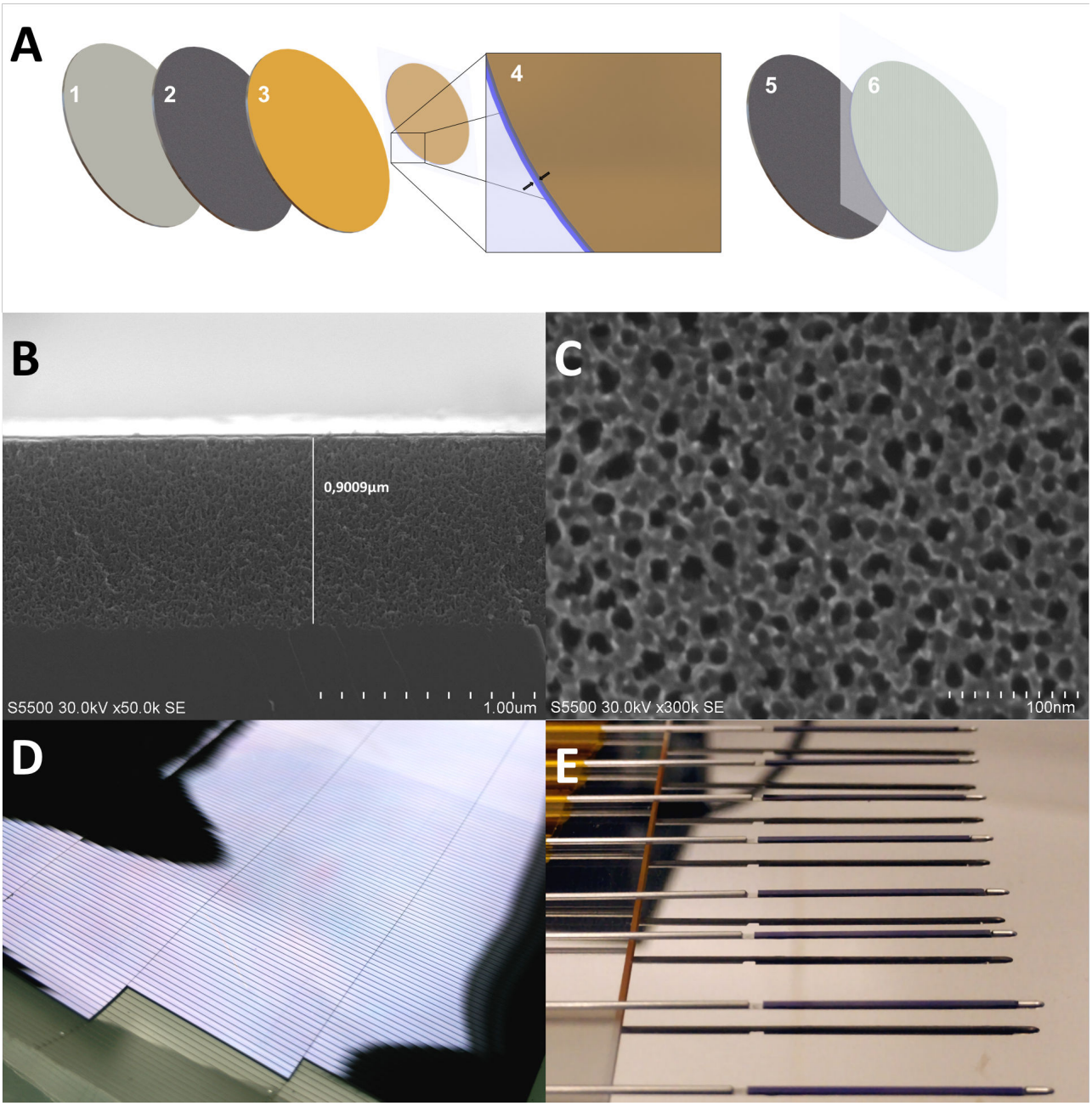


Figure 1: Schematic illustration of the porous silicon chips processing: 1-200mm, 0,75m thick Wafer. 2-Electrochemical etching. 3-Protective oxide layer deposition 4-Wafer grew thin 300µm thickness 5-Removal of the oxide protective layer 6-Wafer placed on U.V. tape and cut into 20x0,6x0,3mm porous silicon chips. B-C – SEM analysis of the porous layer: A- Lateral section of the silicon chip showing a 0.9 µm thick porous layer. B- Top view of the porous layer showing 20nm pores. D – Photography of the silicon wafer cut in 20x0.6x0.3mm. E – Photography of the production of the complete devices.

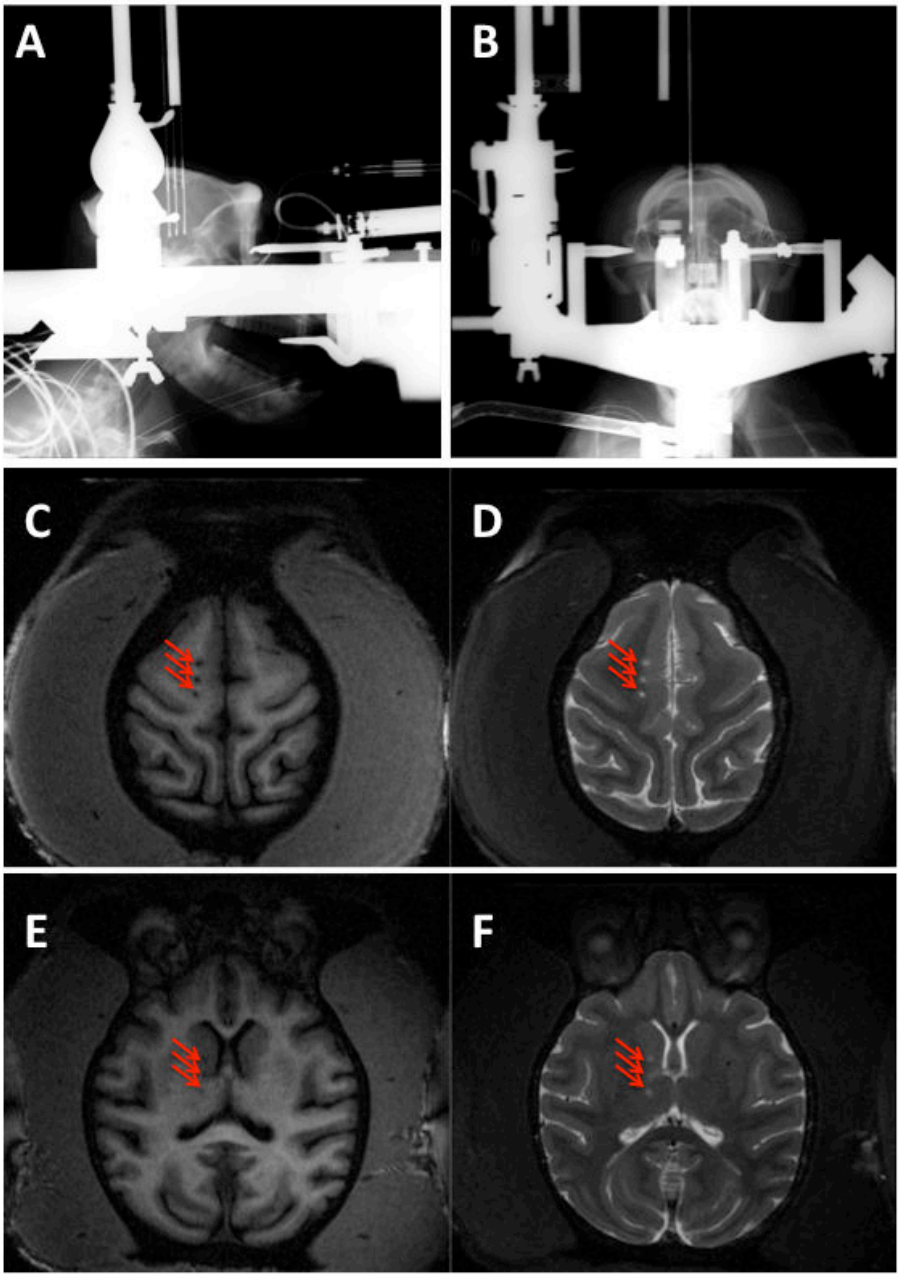


Figure 2: Visualisation of the tissue imprints. Sagittal (A) and coronal (B) radiographic views of the imprint process. T1 (C) and T2-weighted (D) MRI acquisitions in an axial plane located at the stainless steel tissue interface. T1 (E) and T2-weighted (F) MRI acquisitions in an axial plane located at the silicon tissue interface

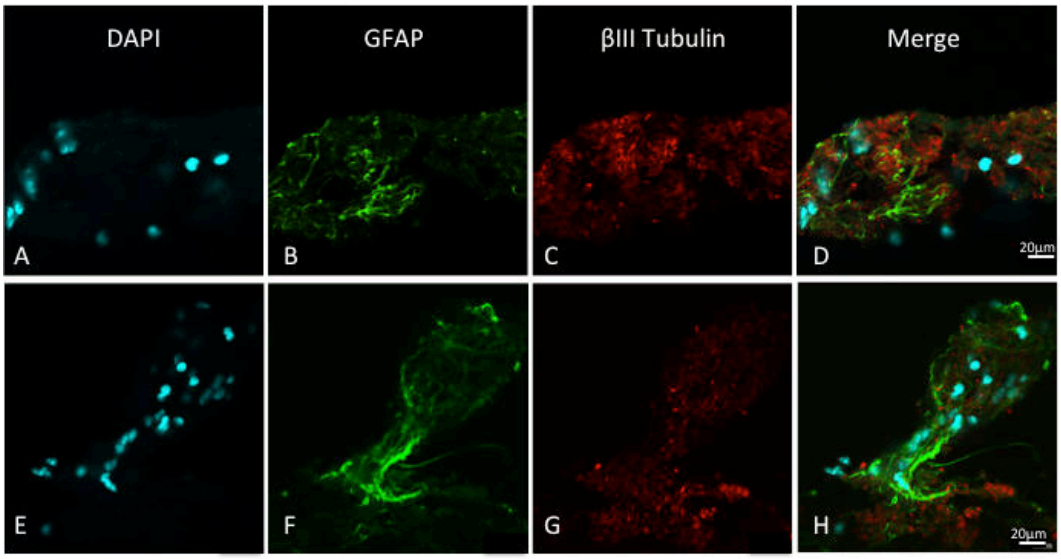


Figure 3 : Immunophenotyping of the on chip harvested tissue fragments. Strong GFAP (B,F)and diffuse βIII Tubulin (C,G) signals are found on the PSi chips confirming astrocytes and neurons bioharvesting.

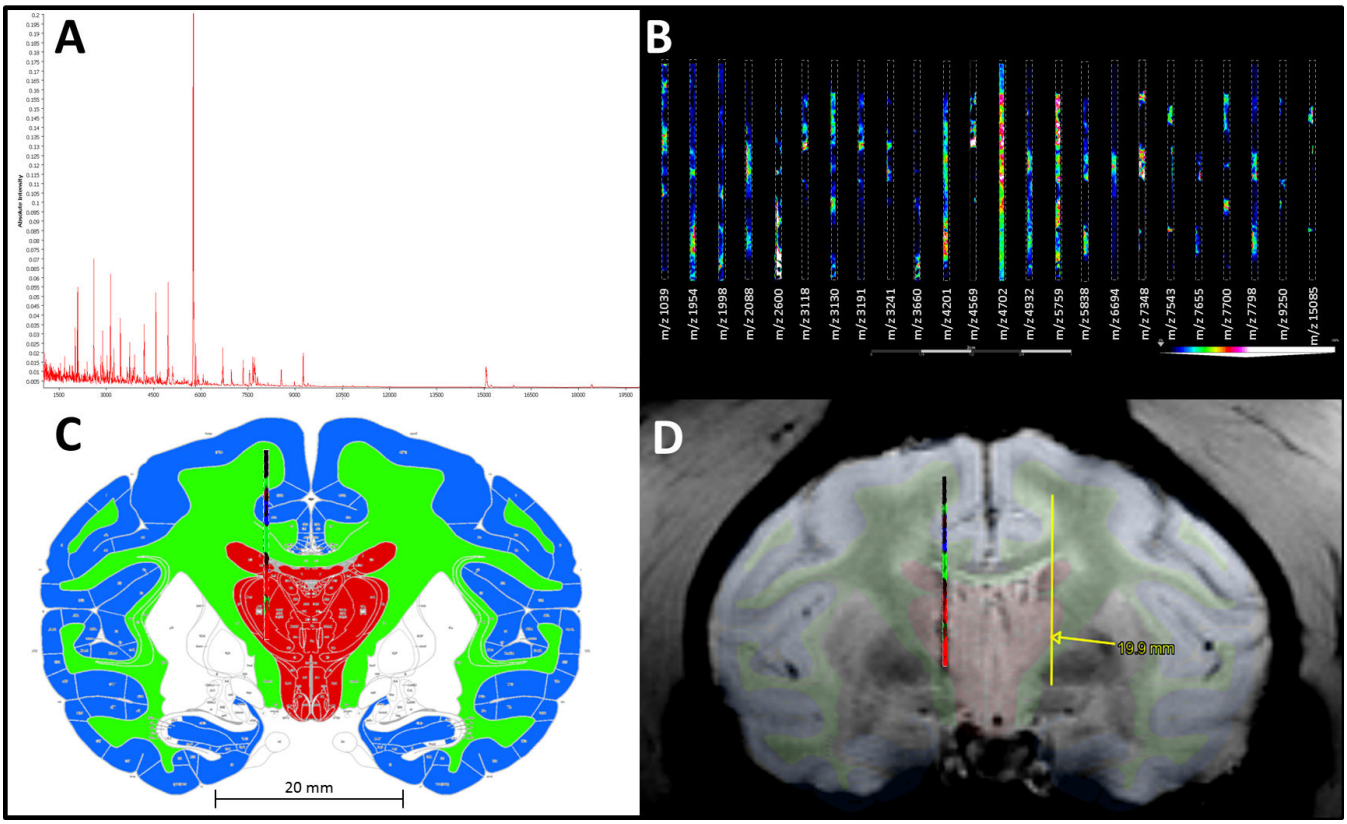


Figure 4 : MALDI-IMS analysis of the porous silicon chip: A – Mean spectrum of the whole silicon chip. B – Examples of 24 m/z intervals showing different protein distribution. C – Correlation of 3 m/z intervals (blue: 4569.2 Da, red: 2600.6 Da, green: 7348.2 Da) with post-operative MRI and primate stereotaxic atlas

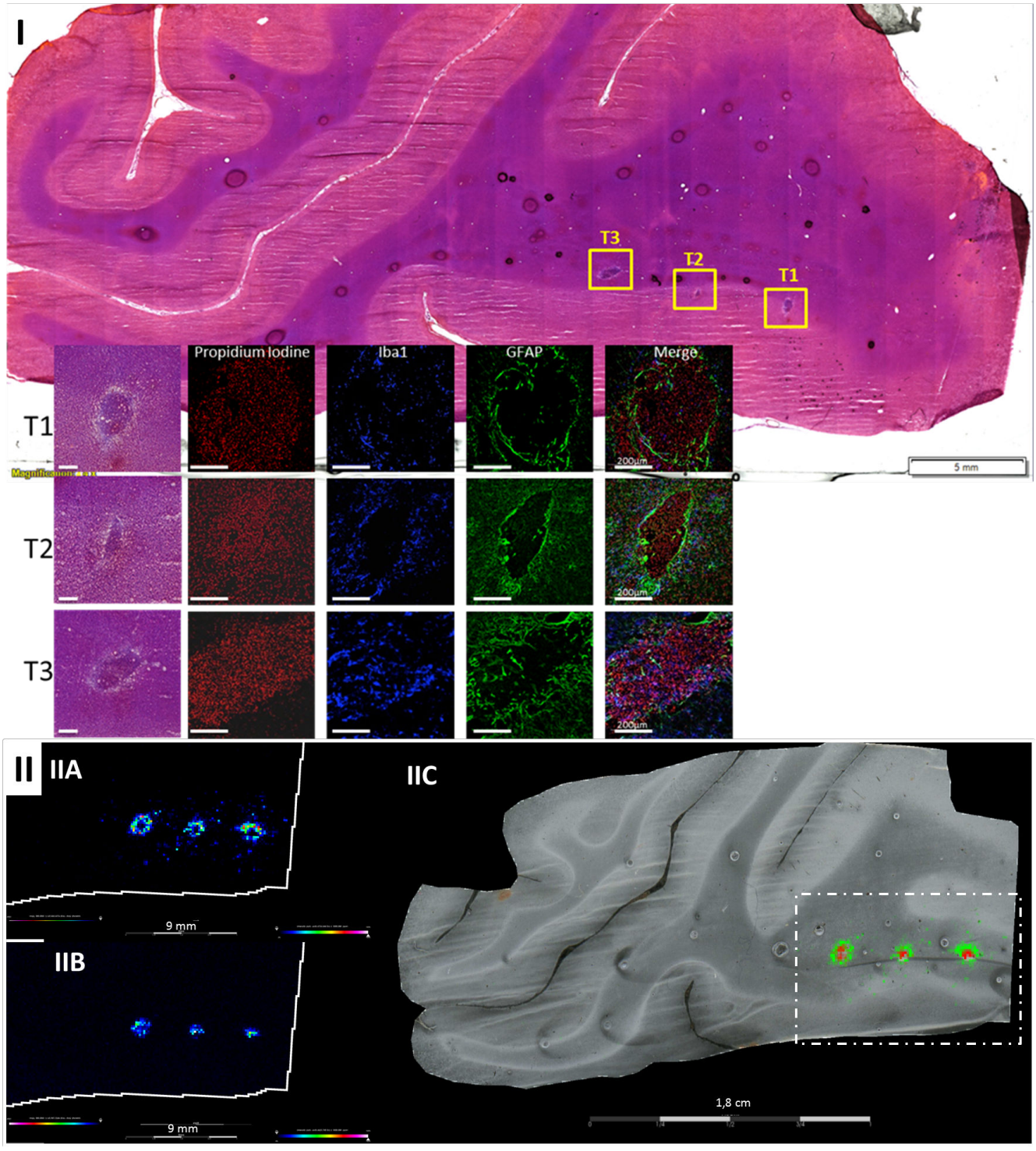


Figure 5 : I - Post mortem evaluation of short-term tissue reaction. H&E staining of the entire hemisphere and focus on the three tracks. Tracks are surrounded by GFAP hypersignal and slight Iba1 signal, traducing local glial scar. Acute cellular response is observed in the inner part of the track.
II – MALDI-IMS analysis of a brain transverse section: IIA and IIB – Ion signal of respectively m/z interval 4734 Da and 4623 Da. IIC – Color coded merging of ions 4734 Da (green) and 4623 Da (red) with the optical image of the raw tissue section.

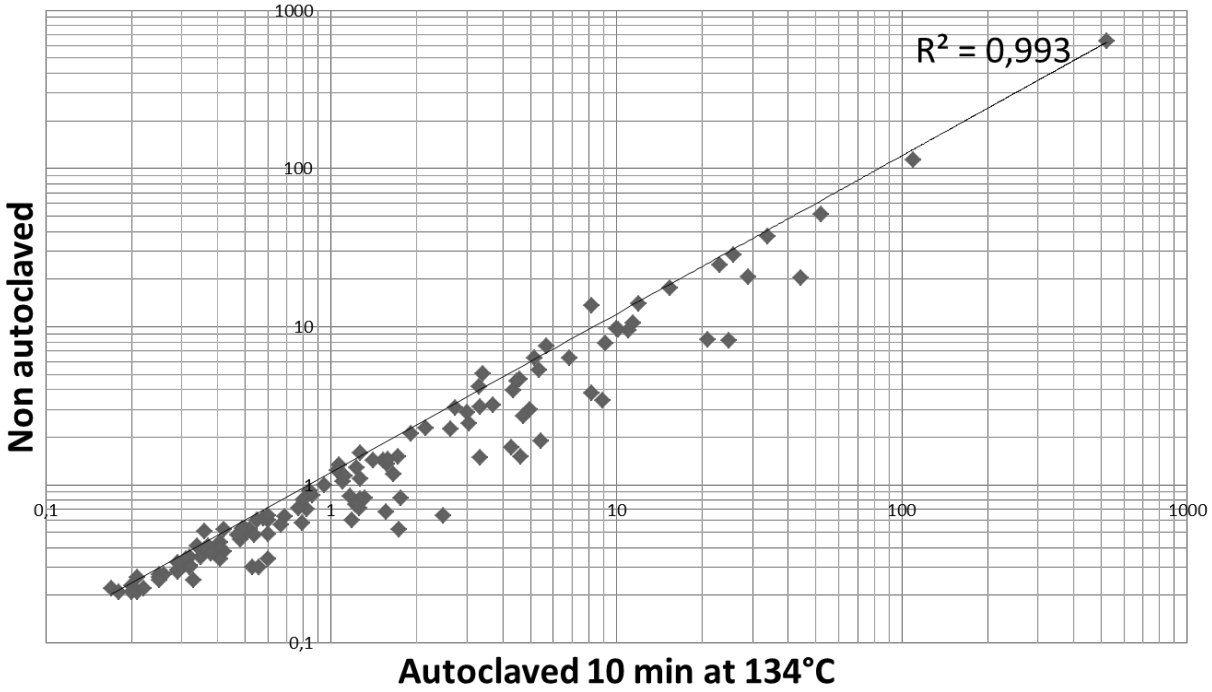
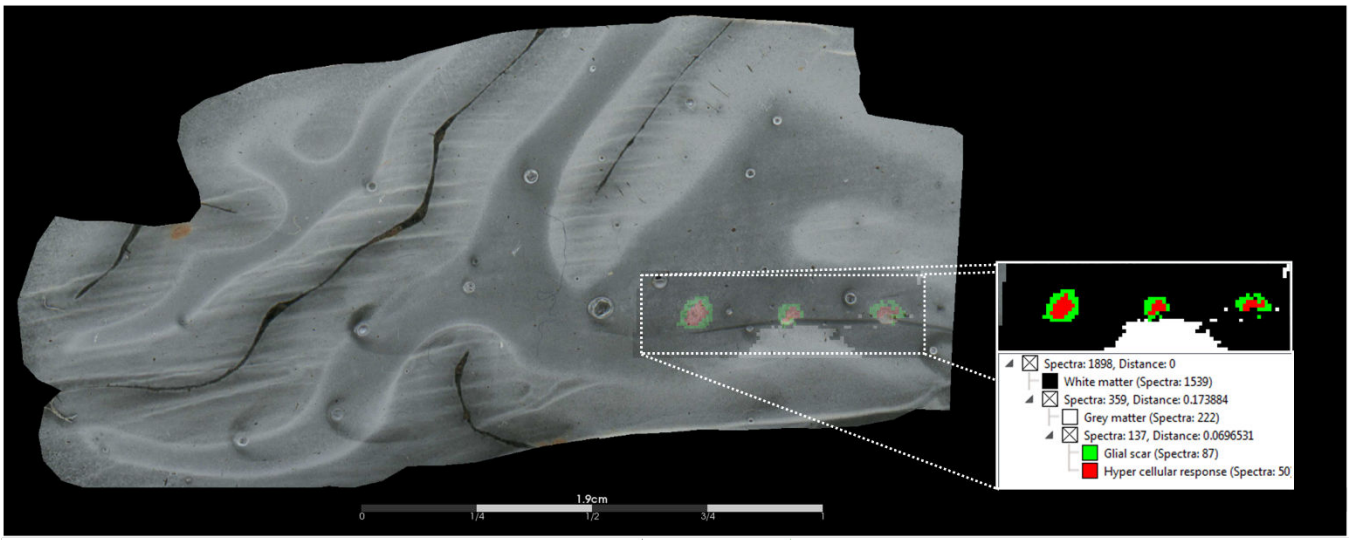


Figure S1: Correlation of a human plasma proteome captured in the Psi with or without sterilization in an autoclave at 134°C for 10 minutes

A



B

Masses [m/z]	Maximum intensity in interval - Glial scar specific
4734.792	2.189
2978.340	1.38512
3147.905	1.29221

Masses [m/z]	Maximum intensity in interval - Inner cell proliferation specific
4623.758	1.48079
4661.729	0.328696
4772.097	0.318968
4524.499	0.223076
6158.943	0.219876
4444.226	0.16182
4644.932	0.139662
4497.951	0.139551
6653.771	0.123963
4310.902	0.117453
5796.688	0.111219
5621.628	0.110701
4230.241	0.110354
4139.288	0.0938133
4683.211	0.0795188
4172.494	0.0794494
3877.611	0.0772893
4830.917	0.0763036
6063.184	0.0666026
7221.913	0.0519068
11307.134	0.0361175
11349.586	0.0242694
13804.640	0.0202838
13911.554	0.0146486

C

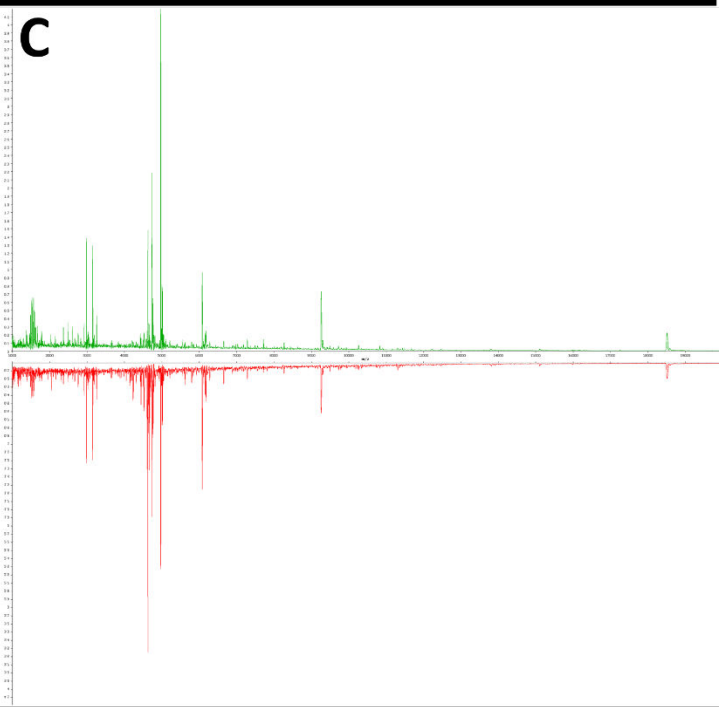


Figure S2: Statistical analysis and segmentation of the tissue scars: A – Spatial segmentation of the area where the tool was introduced. B – Peak list of the most intense and specific masses to the glial scar and the inner cell proliferation. C – Mean spectra of the glial scar (green) and the hyper cellular response (red)

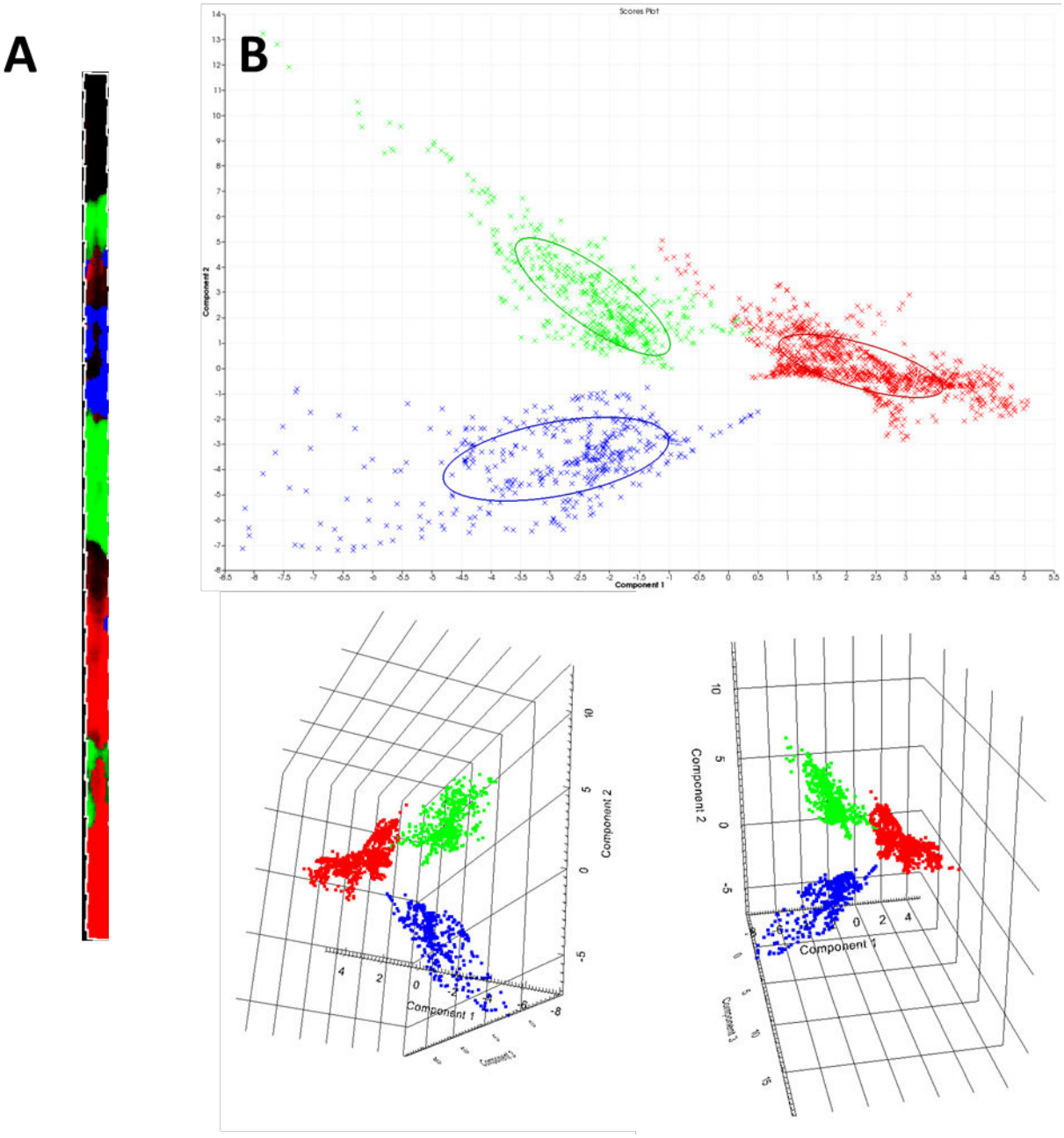


Figure S3: A – porous silicon chip colour coded with regions correlated with white matter (green) grey matter (blue) and central nuclei region (red). B - PCA of these 3 regions in 2D with 50% error ellipses, and 3D.

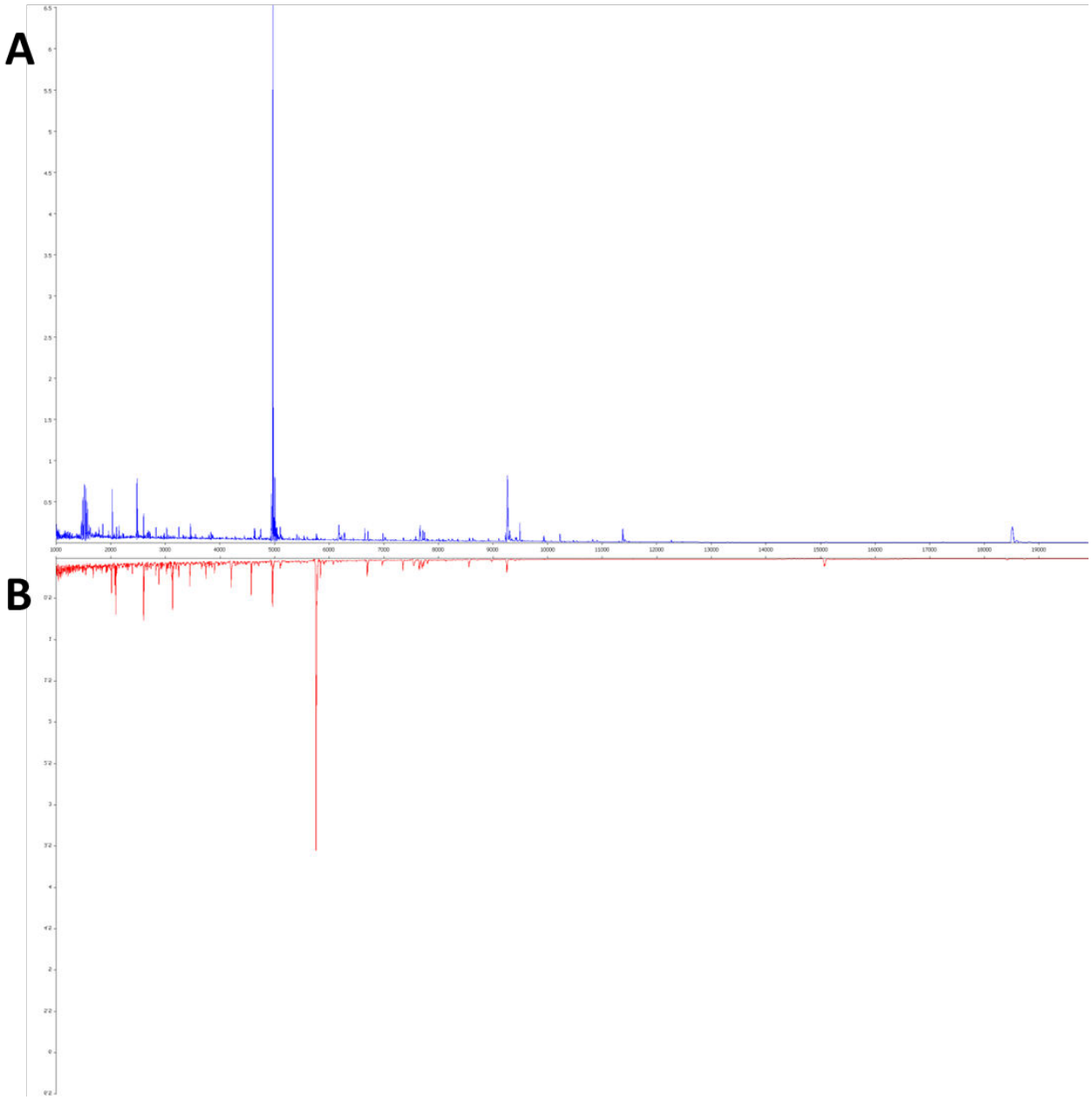


Figure S4: MALDI IMS mean spectra of A – whole brain section, B – tissue imprint on the porous silicon chip

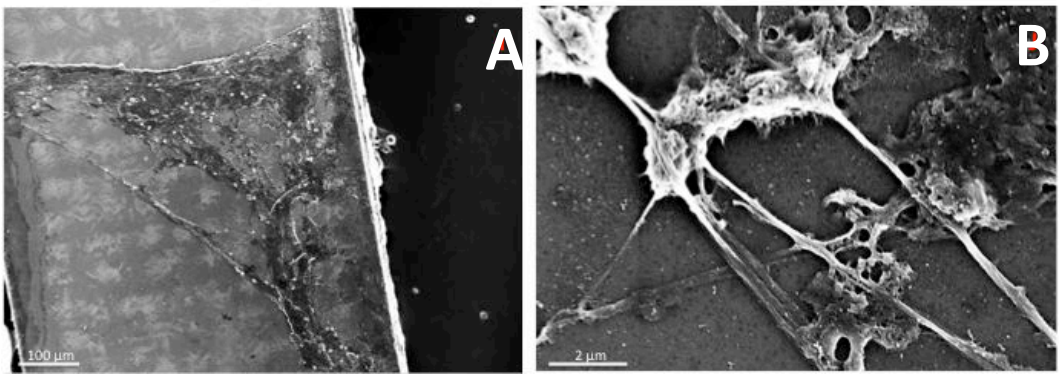


Figure S5 : SEM analysis of the porous silicon chip post MALDI-IMS

I.2 Résultats complémentaires *in vitro* .

Si la publication rapportée ci-avant décrit les résultats obtenus *in vivo* chez le primate, de nombreuses expériences de caractérisation *in vitro* ont également été entreprises. En particulier, nous avons souhaité établir des cultures primaires de cellules à partir des empreintes sur silicium, comparées à des primo cultures établies de manière conventionnelle, par dilacération mécanique des tissus suivie d'une dissociation enzymatique. La question posée est de savoir si la présence de matériau nanostructuré au contact des cellules engendre des modifications du phénotype cellulaire, comme cela a précédemment été suggéré dans quelques publications [132–134].

Intéressés par la question des rapports pouvant exister entre cellules souches neurales et cellules souches cancéreuses, nous avons retenu le modèle du neurosphere assay à partir de cerveaux de rats nouveaux nés pour i) montrer que les empreintes sur silicium poreux peuvent servir à l'établissement de cultures primaires, ii) comparer par analyse transcriptomique les phénotypes cellulaires dans chacune des deux conditions, iii) produire les datasets permettant de les comparer par la suite avec les données disponibles sur les cancer stem cells. Au delà de l'analyse transcriptomique, nous avons également vérifié que les neurosphères obtenues dans chacune des conditions présentent le même comportement de différenciation induit par l'introduction de sérum de veau dans les milieux de culture.

a) Etablissement de cultures primaires à partir d'empreintes sur silicium.

Comme décrit dans la section Matériel & Méthodes , des cultures de cellules souches neurales sont initiées soit par microdissection et dissociation des progéniteurs de la paroi ventriculaire, soit par apposition de puces de silicium poreux directement sur la région d'intérêt. Les cultures sont examinées à 4 puis 7 jours de culture.

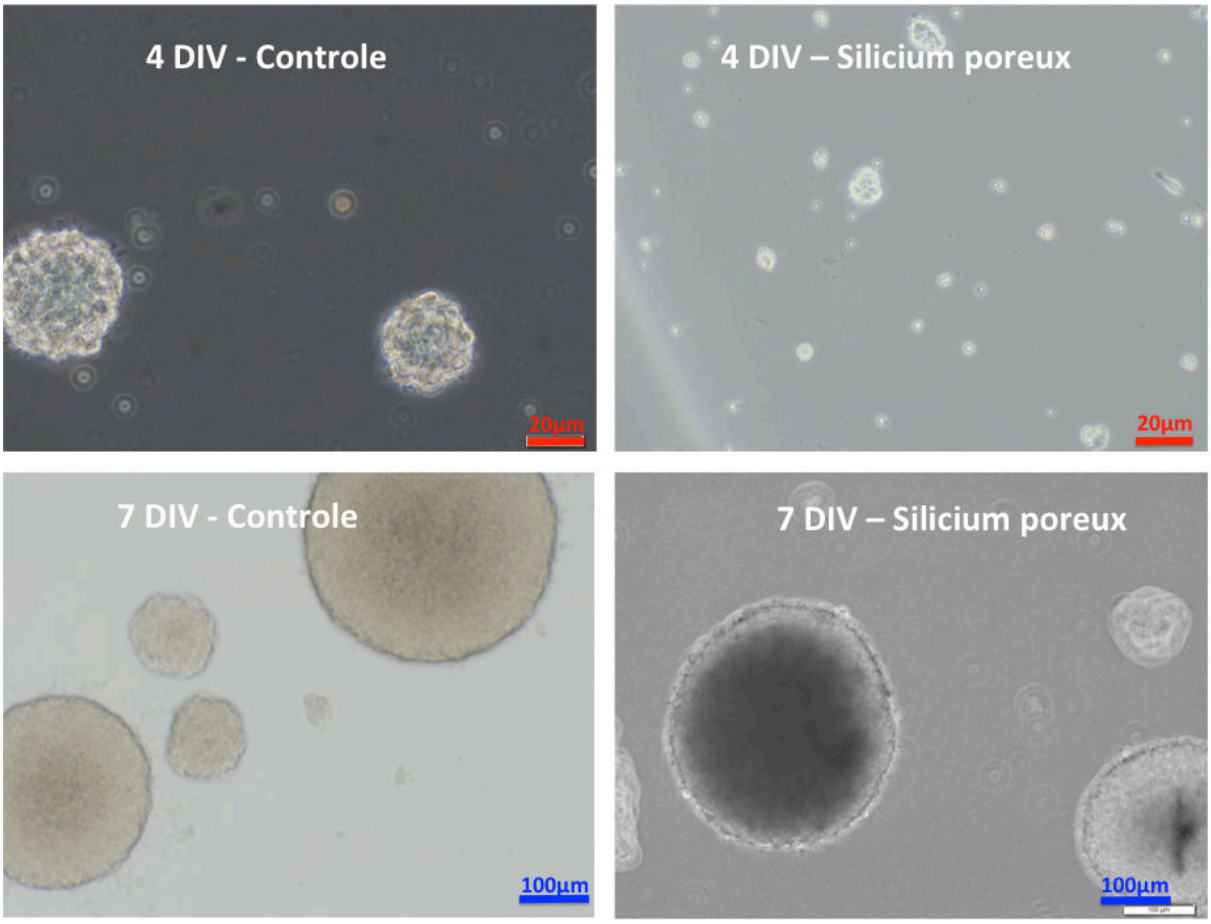


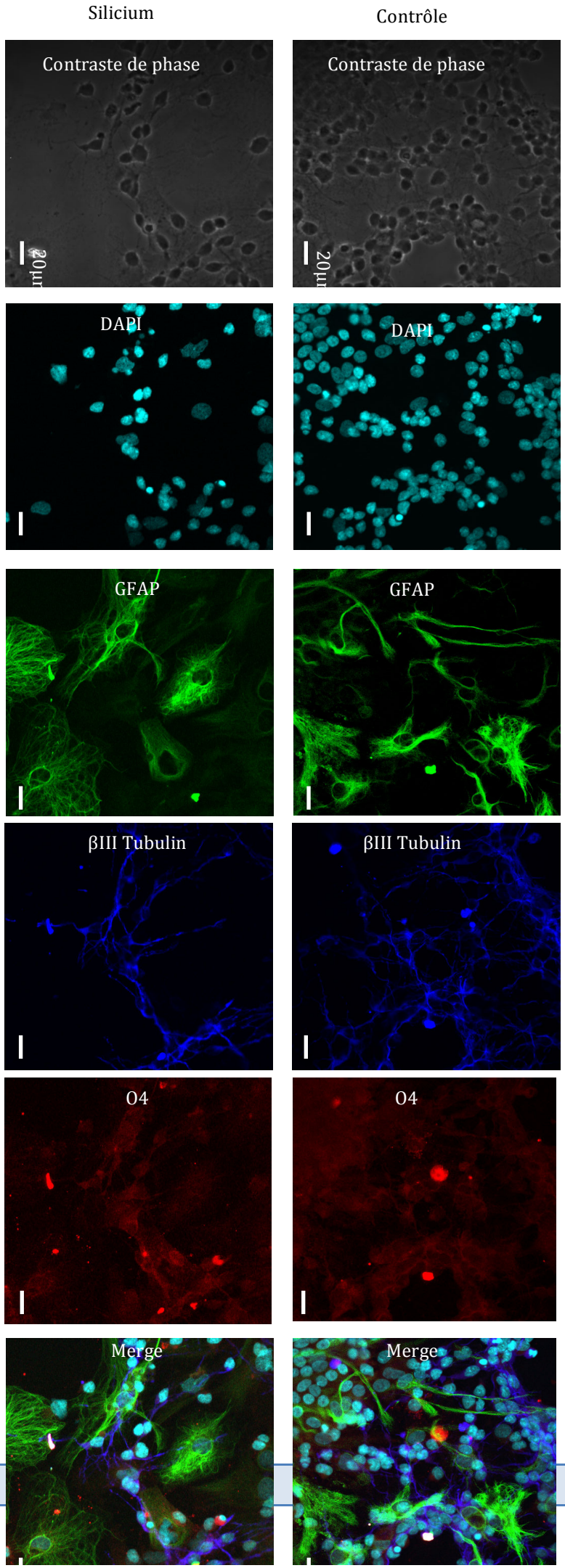
Figure 12: Neurosphere assay à 4 ou 7 jours de culture (DIV)

La figure 12 montre des photographies en contraste de phase des culture primaires à 4 ou 7 jours de culture. Les sphères formées dans les deux conditions de culture présentent qualitativement des diamètres et des morphologies équivalentes. Ceci est également vérifié à 7 jours. Par ailleurs, il a été vérifié que les cellules de neurosphères dissociées peuvent être entretenues sur plusieurs passages en conservant leurs capacités de prolifération, toujours sous forme de sphéroïdes.

b) Evaluation du caractère multipotent en réponse au sérum de veau.

Le caractère multipotent des cellules souches cultivées dans chacune des conditions expérimentales a été vérifié par introduction de serum de veau dans le milieu de culture et en observant la différenciation de ces cellules en astrocytes, oligodendrocytes et neurones [135]. Une illustration des résultats obtenus est présentée dans la figure 13.

Figure 13 (P.90): Différenciation des cellules souches issues des primo cultures en réponse au serum de veau foetal.


Silicium
Contrôle
Contraste de phase
Contraste de phase
20µm
20µm
DAPI
DAPI
GFAP
GFAP
βIII Tubulin
βIII Tubulin
O4
O4
Merge
Merge

D'une manière qualitative, nous avons pu observer que les cellules souches cultivées dans les 2 conditions (silicium ou contrôles), présentent bien un caractère de multipotence et peuvent, en réponse au sérum de veau foetal, cesser de proliférer et s'engager dans une différenciation. L'analyse immunohistochimique pour identifier les populations cellulaires générées par la différenciation montrent un engagement dans les lignages neuronal et astrocytaire, révélé par de forts signaux de fluorescence liés respectivement à la βIII Tubuline et à la GFAP. La détection des oligodendrocytes par l'antigène O4 n'a pas permis une identification représentative de ces cellules dans ces conditions expérimentales. Au delà d'un important bruit de fond, quelques noyaux cellulaires semblent colocaliser avec des "points chauds" de fluorescence rouge, liée à cet anticorps. Ce dernier résultat soulève une double question. Il conviendra d'abord de vérifier la spécificité et le bon fonctionnement de cet anticorps dans les conditions de marquage mises en oeuvre ici.

Au delà des aspects techniques, on peut discuter le fait que l'antigène O4 est un marqueur qui apparaît plutôt tardivement dans le lignage oligodendrocytaire issu de progéniteurs exprimant la PSA NCAM, la vimentine ou la nestine. S'ajoute à cela que certains noyaux marqués ne correspondent à aucun des marquages (GFAP, βIII Tubuline, O4). Ceci invite à reproduire ces expériences pour investiguer la présence de cellules immatures, soit indifférenciées ayant persisté, soit ayant subi une différenciation plus lente et se trouvant donc par exmple à des stades de type oligodendrocyte progenitor cells (OPC), expliquant l'absence d'expression de O4, mais typiquement identifiées par l'antigène A2B5.

c) Analyse transcriptomique des cultures primaires issues d'empreintes sur silicium.

Après lecture de la puce d'expression, la discrimination des deux groupes est effectuée par un test de Mann & Whitney avec un seuil de significativité fixé à 5%. Le choix du test est adapté à un petit nombre d'échantillons ne suivant pas une distribution normale. Les intensités des différents "probsets" sont filtrées pour ne prendre en compte que celles qui sortent du bruit de fond existant sur la puce[136].

Sur la base de ces paramètres d'analyse, 1143 gènes présentent des ratios significatifs inférieurs à 0,6 (661 gènes) ou supérieurs à 1,7 (482). La liste de ces gènes est analysée grâce au logiciel *Ingenuity Pathways Analysis*® (www.ingenuity.com), qui permet de mettre en évidence les voies de signalisation cellulaire qui impliquent ces derniers.

Les figures 14 à 16 illustrent les résultats préliminaires en cours de traitement. Les gènes significativement régulés dans les deux conditions de cultures primaires (silicium ou contrôle) sont regroupés en "cellular and molecular functions", "canonical pathways" ou "interaction networks". La figure 14 montre la liste des fonctions cellulaires dans lesquelles ces gènes sont impliqués. Parmi les mécanismes les plus significatifs on retrouve les phénomènes associés à l'expression des gènes, à la prolifération et à la régulation du cycle cellulaire.

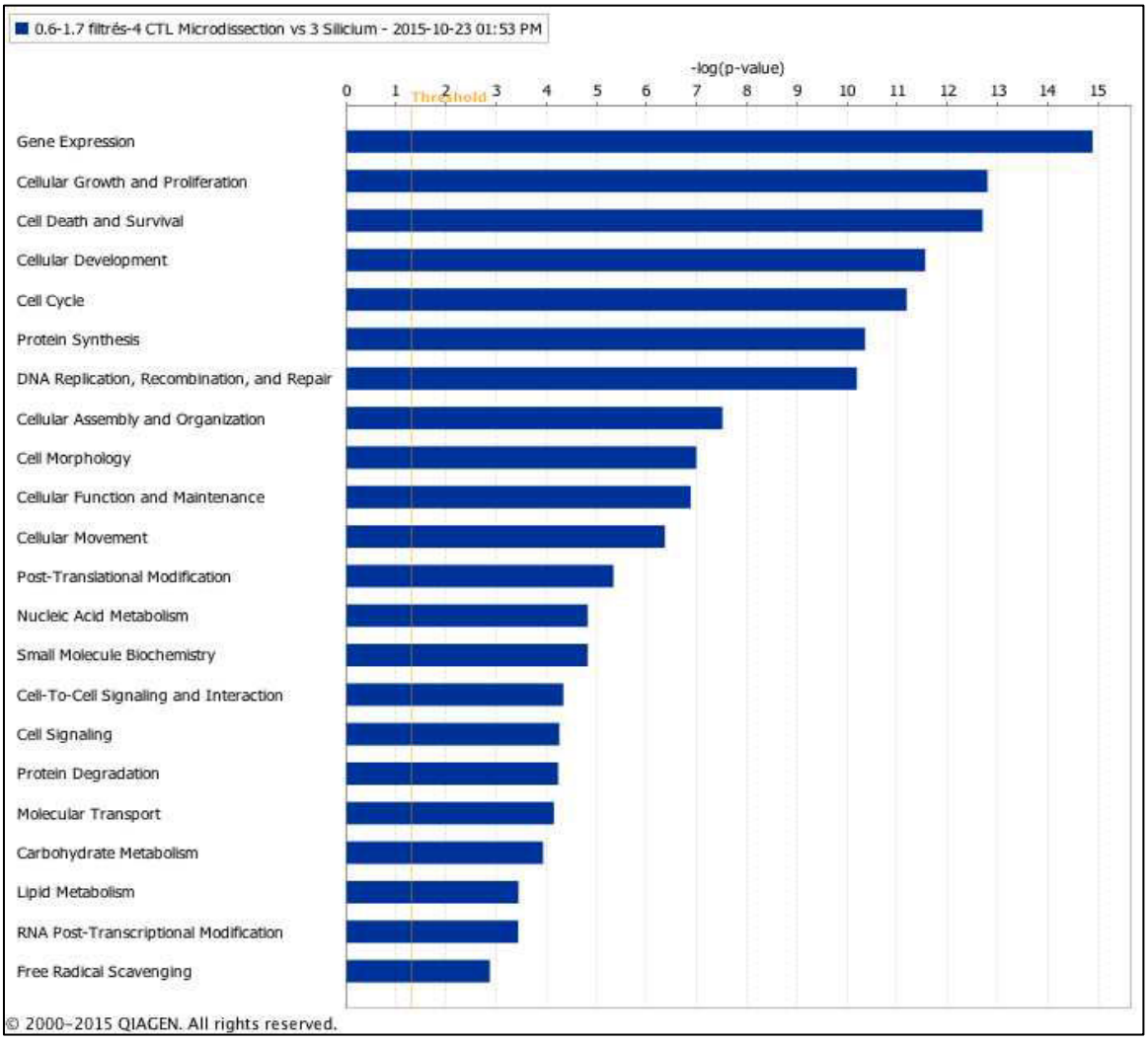


Figure 14: Liste des fonctions cellulaires différemment régulées.

Deux exemples de "Canonical Pathways" identifiées sont montrés en Figures 15 et 16. Les gènes régulés dans les jeux de données issus du transcriptome sont entourés et annotés par couleur en fonction d'une régulation positive ou d'une répression.
Les voies de signalisation (prolifération et régulation du cycle cellulaire) représentées ci-dessous font l'objet d'une attention toute particulière puisqu'elles mettent en évidence, entre autres, une expression différentielle des gènes codants pour le récepteur à l'EGF (EGFR), la

kinase AKT, le facteur de transcription SOX2 mais également de régulateurs du contrôle du cycle cellulaire comme le facteur de transcritpion E2F ou les kinases dépendantes des cylines (CDK).

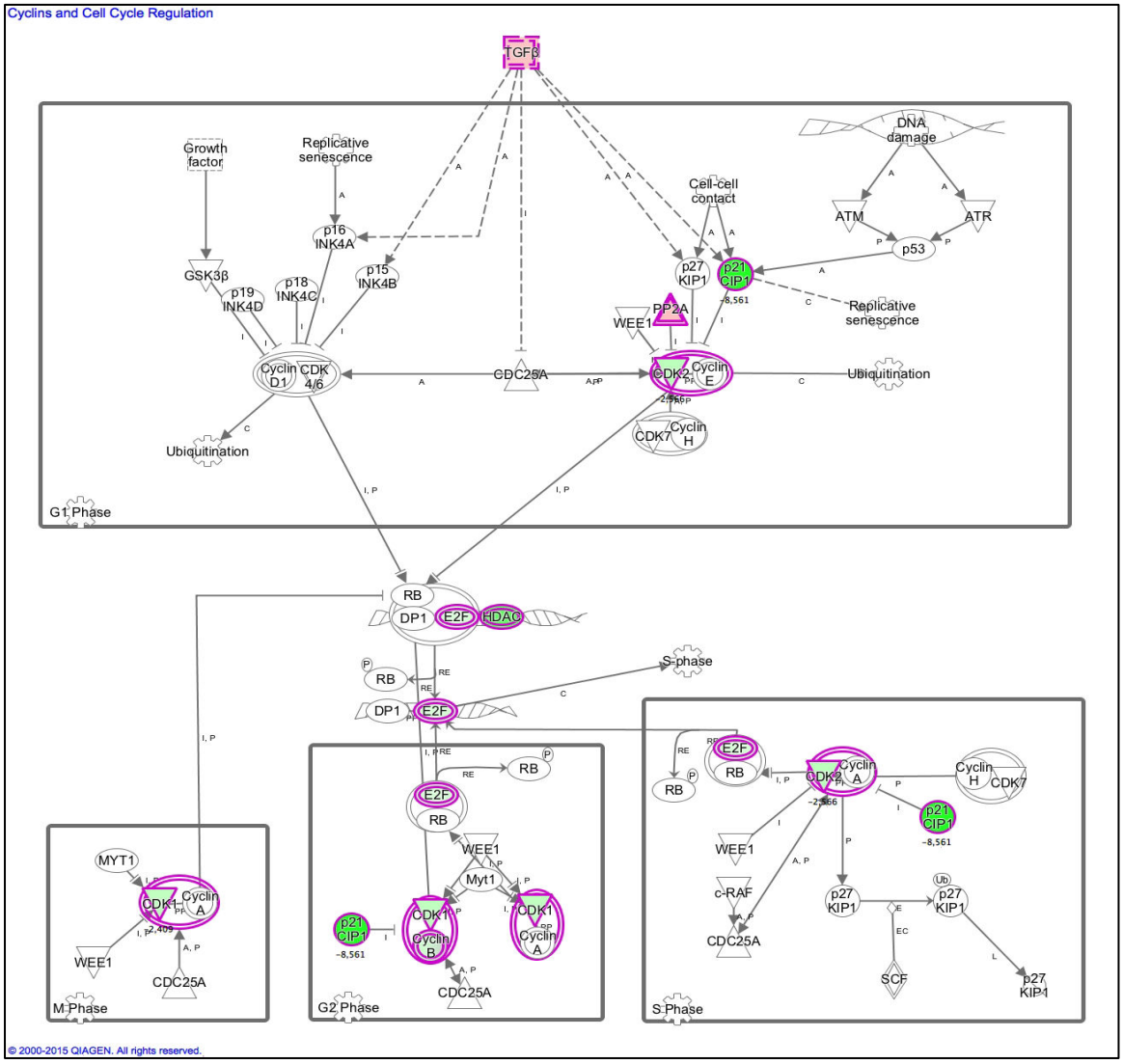


Figure 15: Gènes régulés identifiés dans la voie de signalisation "Cyclins and cell cycle regulation".

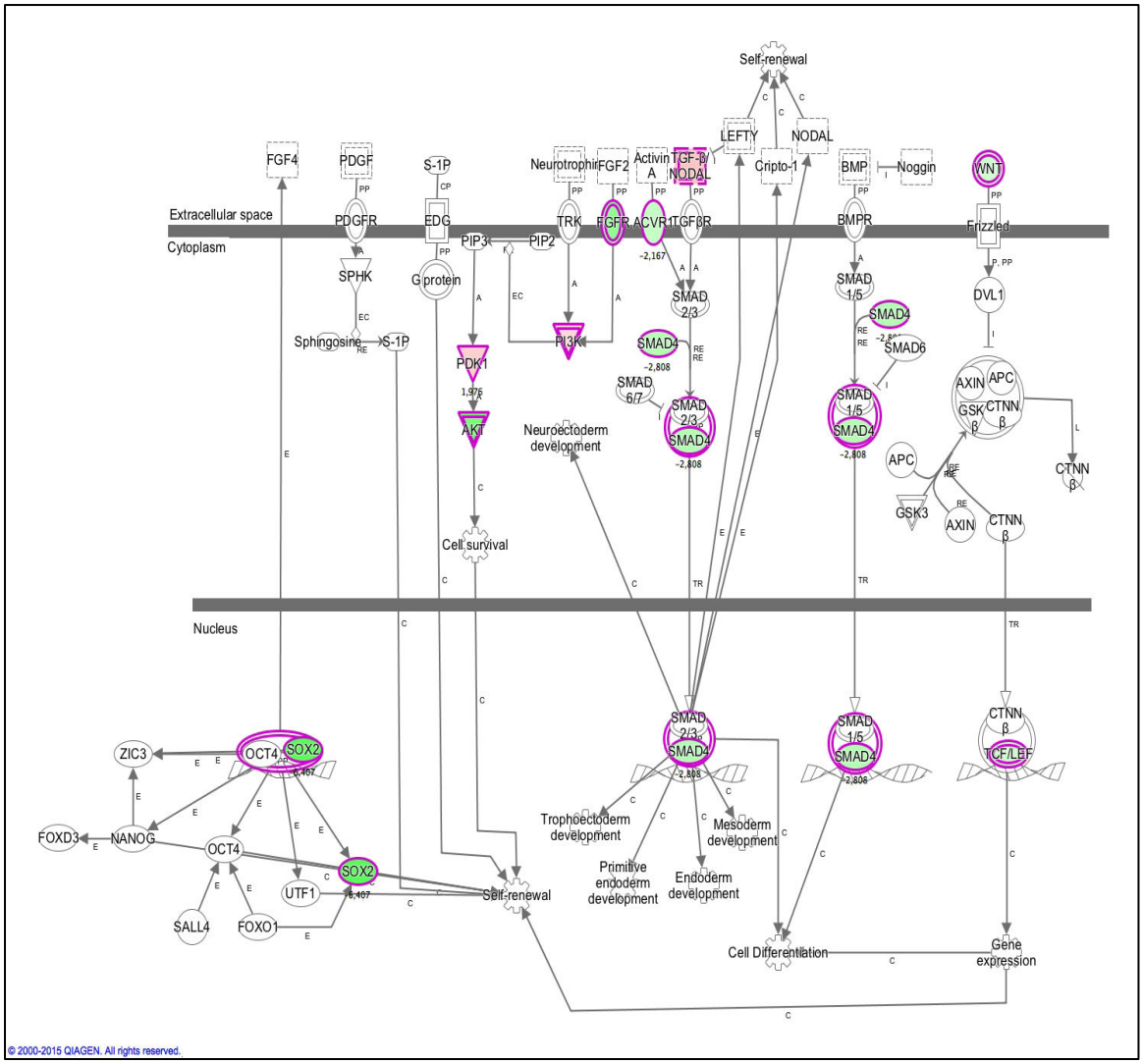


Figure 16: Gènes régulés identifiés dans la voie de signalisation "Stem Cell Pluripotency"

Ensemble, ces éléments suggèrent que des phénomènes différentiels de prolifération ont lieu dans les deux conditions, et que d'important déterminants du phénotype "souche"[137–140] sont différemment exprimés.

Il conviendra tout d'abord d'augmenter le nombre de points expérimentaux dans chacune des conditions (3 contrôles et 3 silicium à ce jour), d'évaluer les réplicats, puis de confirmer les cibles par PCR quantitative. Les prochaines manipulations comprendront également l'ajout d'une condition expérimentale consistant à établir une primo culture "conventionnelle" tout en ajoutant dans la boîte de culture une surface égale de silicium (à celle de la culture initiée par empreinte sur celui-ci) de manière à discriminer fermement l'effet lié au matériau.

Quelques publications ont déjà montré que des surfaces nanostructurées peuvent avoir un impact sur la prolifération des cellules souches et le maintien du phénotype multipotent[141–144]. Nous souhaitons poursuivre afin de comprendre ce que le contact des cellules avec le silicium

poreux (nano, meso ou macroporeux), dans le contexte de la culture primaire, a comme conséquences moléculaire et phénotypique.

I.3 Conclusion sur les résultats de la partie I.

Cette première partie des résultats fait la synthèse des données obtenues sur l'utilisation du silicium poreux pour la capture d'espèces biologiques. Les expériences conduites *in vitro* ont permis de montrer que la mise en contact de puces en silicium poreux avec des tissus permet de capter des cellules et qu'elles peuvent être mises en culture à même le matériau. Nous avons entrepris de caractériser le phénotype des cellules ainsi cultivées par rapport à des approches conventionnelles de microdissection, dilacération et dissociation enzymatique.

Dans le contexte du *Neurosphere Assay*, qui permet de cultiver des cellules souches sous forme de sphéroïdes flottants, nous démontrons que les cellules issues de cultures initiées grâce à des empreintes tissulaires peuvent être entretenues sur plusieurs passages, et présentent bien un caractère multipotent. L'introduction de facteurs favorisant l'adhérence (SVF et/ou surfaces traitées) stoppe la prolifération et provoque la différenciation. D'une manière globale, il n'y a pas de différences macroscopiques observées d'une culture à l'autre. En revanche, les analyses transcriptomiques initiées pour comparer le profil global d'expression génique souligne des différences associées à des fonctions telles que la prolifération, le contrôle du cycle cellulaire (qui y est directement lié), ou les capacités d'auto-renouvellement. Ces données préliminaires seront à vérifier en étoffant le nombre d'échantillons et en ajoutant une condition supplémentaire (culture conventionnelle en présence du matériau). L'hétérogénéité intrinsèque des cultures de sphères flottantes, la variabilité liée à l'expérience et la confirmation en qPCR n'étant pas réalisée imposent pour l'instant de rester prudent quant aux conclusions de l'étude transcriptomique.

Les expériences conduites *in vivo* dans un modèle de primate non humain établissent formellement la preuve de concept. De la salle blanche au bloc opératoire, nous avons construit un procédé de fabrication et de découpe des puces, d'assemblage et de stérilisation du dispositif qui permet l'utilisation chirurgicale de l'outil d'empreinte pour l'investigation moléculaire du tissu nerveux. Nous démontrons que le silicium poreux capte des cellules (astrocytes, neurones) mais également des protéines en conservant l'orientation spatiale des

entités biologiques par rapport à leur origine tissulaire. Les empreintes tissulaires sont compatibles avec différentes techniques d'analyses biologiques, ouvrant la voie à un décryptage multi échelle: cellulaire, protéomique, transcriptomique ou génomique. Cette nouvelle stratégie matériau permet d'envisager de faire des empreintes dans des régions du cerveau où une biopsie serait inenvisageable, et vient compléter la version première de l'outil utilisant des puces micro structurées, adaptées à l'exploration des tumeurs. Nous tirons profit du modèle pour montrer qu'aucun retentissement cognitif et locomoteur n'a été décelé après avoir effectué simultanément trois empreintes dans les noyaux gris centraux. L'analyse tissulaire post mortem à court terme ne montre pas de signes de toxicité aiguë liée au dispositif.

Ensemble, ces résultats préparent un socle de données encourageantes pour initier le transfert de cette technologie vers l'usage clinique.

II. Un dispositif d'empreinte "optiquement guidé".

II.1 Publication 2: "Optimprint : a new optico-molecular device for brain tumor theranostic investigation."

L'une des idées directrices était de trouver un système alternatif qui permettrait de localiser précisément le territoire tissulaire où l'empreinte est faite, sans aide externe d'un système d'imageur médical. Le dispositif étant usiné en inox, il est incompatible avec le guidage IRM et produit de gros artefacts en TDM. L'utilisation de la fluorescence per opératoire et le couplage du dispositif d'empreinte à un système de détection de fluorescence se sont donc très rapidement présentés comme une solution technique de choix. Nous avons alors décidé de tester l'association de notre outil à l'utilisation du dispositif de micro endoscopie confocale fibrée CellVizio® de MaunaKea Technologies. Dans cette configuration, l'outil d'empreinte devient un dispositif « optiquement actif ». Le manuscrit de publication rapporté ci-après présente l'étude de faisabilité et le prototype intégré actuellement envisagé.

OPTIMPRINT : A new optico-molecular device for brain tumor theranostic investigation.

Matthieu Dreyfus[Δ], Adrien Mombrun[§], Affif Zaccaria[Δ], Céline Leclec'h[§], Mylène D'Orchymont[§], Vincent Auboiroux[§], Pierre Durand[Δ], Emmanuel Gay[Ŧ], Dominique Hoffmann[Ŧ], Laurent Selek[Ŧ], Didier Wion[Δ] , Ali Bouamrani[§], François Berger[Δ]*

[§]Clinatec, CEA Léti, Grenoble, France

[Δ]Clinatec Translational Technology Laboratory, INSERM UA01, UJF, CHU, Grenoble, France

[Ŧ]Department of Neurosurgery, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France

KEYWORDS glioblastoma surgery, per operative fluorescence, tumor microenvironment, molecular characterization

ABSTRACT Despite considerable efforts in the development of therapeutic and surgical strategies, glioblastoma relapse remains the rule. Intraoperative fluorescence detection in the context of glioblastoma surgery appears as a promising way to improve the extent of resection and patients' short-term outcome. Nevertheless, new approaches should take into account not only the problem of tumor removal but also the study of the molecular mechanisms occurring in the resection margins constituting the basis of relapse. This work evaluates the feasibility to combine a fluorescence detection system with a minimally invasive surgical tool dedicated to deep brain investigation and bioharvesting. We developed an innovative concept of surgical device and demonstrated the possibility to use it in preclinical models of glioblastoma.

INTRODUCTION Glioblastoma Multiforme (WHO grade IV) are the most common brain tumors in adults with a very poor prognosis of 15 months after diagnosis[1,2]. Current therapeutic strategy consists, when it is possible, in a surgical resection followed by radio and/or chemotherapy. Despite extensive progress in the field of tumor characterization at the genomic level as well as the introduction of numerous innovative targeted therapies, most clinical trials failed to modify the deadliness of glioblastoma prognosis. Recent bevacizumab failure in a phase III trial illustrates the current challenges[3]. As Glioblastoma are highly infiltrative tumors, achieving a complete surgical resection remains hardly attainable and relapse rates are very important[4,5]. In the last decade, several groups have reported clinical trials using imaging techniques, in peculiar fluorescence guided surgery to improve the extent of surgical resection, then talking of Gross Total Resction (GTR)[6,7]. It has been reported that the percentage of GTR correlates with the evolution of two clinical outcomes i) progression free survival (FPS) at 6 months and ii) median survival[6,8-11]. All these results strongly suggest that achieving a GTR leads to clinical improvement. Photonics interventional explorations are a unique opportunity to perform the macroscopic tumor delineation that is crucial for achieving complete tumor removal. Few fluorescent probes are approved for clinical use. Three molecules constitute the basis of the clinical practice, δ-aminolevulinic acid (Gliolan®), indocyanin green (ICG) and sodium fluorescein. A lot of technical solutions have been developed for intra operative fluorescence detection, from very customized to highly integrated systems such as ZEISS Pentero® fluorescence detection modules[12-14]. Nevertheless, all the developed and reported devices for intra operative fluorescence detection are limited to a **macroscopic scale**, then omitting the exploration of peritumoral areas invaded by few number of infiltrative tumoral cells. New techniques such as confocal laser endomicroendoscopy (CLE) are increasingly used to decipher the microscopic and cellular architecture of pathologic tissues. This latter has already been FDA approved for the clinical

exploration of digestive, urinary tract or lung diseases[15-18]. On-going studies are highlighting the interest to use CLE as a powerful tool for deep brain real time and microscopic examination[19,20].

Additionally, as relapse usually appears in the 3 centimeters lining the resection margins of the primary tumor, new approaches should use fluorescence detection not only to help the surgeon in tumor bulk resection, but also for elaborating innovative strategies allowing for molecular characterization of the processes occurring in the resection margins, a mandatory research for finding the relevant targets to neutralize glioblastoma relapse[21-24]. Infiltrative cells detection thanks to fluorescent dyes does not mean that those cells will initiate the relapse process. Finding a technology that can exploit photonic detection of the cells coupled to a non lesional bioharvesting approach for polyomics characterization is an unmet objective. Mapping and functional annotation of the micro heterogeneity of the peritumoral zone now constitutes the new milestone for development of a personalized post surgical "anti relapse therapy".

Recently, we developed and patented a micro invasive, non-lesional surgical device for deep brain tissue exploration and bio harvesting. This device has been validated *in vivo* in a non-human primate model and is now under validation in a clinical trial for glioblastoma patients. The principle resides in the ability to expose a silicon chip which gets in contact with tissues and catches a monolayer of cells in their native microenvironment, further referred to as tissue imprints, compatible with polyomic characterization approaches[25].

This work introduces a modified bi functional device, associating *in situ* fluorescence detection and biomolecular harvesting. By coupling CLE technique to our previously developed tissue imprint device, we show that exploration of brain tumors through fluorescence detection and simultaneous atraumatic tissue sampling is possible. In this study, we demonstrate that our device i) allows confocal endomicroscopy detection through a guide

tube inserted in the brain, ii) can simultaneously provide a tissue imprint on a silicon chip that can be analyzed with different characterization methods. Regulatory validation of the prototype and clinical transfer of the method could allow the exploration of the infiltrative peritumoral component of glioblastoma. Coupled to the innovative tissue imprint concept, this could help to decipher the molecular changes that occur in the peritumoral zone and design new strategies to target glioblastoma relapse.

MATERIAL & METHODS

1) Cell culture

F98 cell lines were purchased from American Type Culture Collection (ATCC number CRL-2397, LGC Standards, France). Constitutive expression of the Green Fluorescent Protein (GFP) was obtained by lentiviral transduction of the cell line using commercial lentiviral suspension (Mission Control Transduction Particles, Sigma Aldrich, France). Cells were propagated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco, Life Technologies, France) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum, 1% penicillin streptomycin and 4µg.mL^{-1} puromycin for selection, under 37°C and 5% CO_2 atmosphere.

2) In vivo experiments

All procedures were conducted in accordance with the recommendation of the European Community Council Directives of 2010 (2010/63/UE), and have been approved by the local Ethics Committee. Animals were housed with 12h-12h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water.

Glioblastoma cells implantation

Male Fischer 344 rats (300-350g, Charles River laboratories, France) were anesthetized by inhalation of Isoflurane (Vetflurane, Alcyon, France) in a 70% air 30% 0_2 mixture (5% for

induction, 2% for maintenance of anesthesia). Rats were immobilized in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) and placed under monitoring for blood oxygen saturation and body temperature. Intra striatal injection of 10^4 cells in 5µL of DMEM was performed using a 26Ga Hamilton syringe. Cell suspension was injected at a $1\mu L.min^{1}$ flow rate using a stereotaxic syringe pusher. Stereotaxic coordinates were Bregma AP 0,02mm; Lat. 2,6mm and 5mm under the skull[26].

MRI longitudinal assessment of tumor growth

MRI acquisitions were performed 14 days after stereotactic surgery at 4.7 T using a dedicated volume/surface cross coil configuration (Biospec 47/40, Bruker Biospin, Wissembourg, FR). All MR experiments were performed under general anesthesia: the induction was performed using a 5 % Isoflurane in a 30% O_2 in air mix and maintained using a 2.5 % Isoflurane mix. During each session, T_1 and T_2-weighted acquisitions were performed along axial and coronal orientations before and after the intravenous injection of contrast agent (Dotarem, Guerbet, France) in order to assess the tumor size and position (T_1-weighted MDEFT sequence: $T_E/T_R/T_I$ = 3.33/3000/1000 ms, N_A = 3, 10 slices with FOV = 3.4x3.4 cm^2, matrix = 256x256 and voxel size = 0.13x0.13x1 mm^3 – T_2w TurboRARE sequence: T_E/T_R = 36/2200 ms, NA = 5, RARE factor = 8, 15 slices with FOV = 3.8x3.8 cm^2, matrix = 384x384, voxel size = 0.1x0.1x0.7 mm^3)

Deep brain imaging & bio harvesting

Based on the MRI examination, tumor-bearing animals were anesthetized as described above and placed in the stereotaxic frame. A large craniotomy was performed allowing passage of

the optically active bioharvesting tool. The device was attached to a stereotaxic holder thus ensuring i) a slow and controlled descent in the nervous tissue and ii) a limited bleeding.

Images were acquired with a MaunaKea DualBand CellVizio® (MaunaKea Technologies, Paris France) using a S300B ProFlex inserted in the guide tube. The system is composed of a laser scanning unit with two excitation wavelenghts at 488nm and 660nm with respective collection bands at 502 - 633nm and 673 - 800nm, that can be plugged to several kind of optic fibers bundles. In the presented work, the bundle comprises 3000 fibers with an external diameter of 0,3mm.

Animals were sacrificed at the end of the imaging and bioharvesting session by decapitation still under general anesthesia. Brains were removed from the skull and quickly snap frozen in liquid nitrogen vapors.

3) Silicon chips processing

Histochemistry analysis

Chips were fixed in a 10% neutral buffered formalin solution. A permeabilization step was performed in a PBS-0,1% Triton solution. Nuclei were counterstained using propidium iodine (diluted 1:1000, Sigma Aldrich, Isle d'Abeau, France). After three wahes in PBS, silicon chips were mounted and observed on FV10 confocal microscope (Olympus, Hamburg, Germay).

MALDI Imaging Sample Preparation

Fresh brain tissue imprints on microstructured silicon chips were quickly rinsed in phosphate buffer saline and dehydrated in 70 then 100% ethanol for 1 minute each and vacuum dried for 15 minutes. Automated matrix deposition (2,5-dihydroxybenzoic acid, 30mg/ml in

methanol/water 50:50 v/v with 0,2% trifluoroacetic acid) was performed using the ImagePrep system (Bruker Daltonics), following standard protocol.

Rat brains was cryosectioned at -20°C into 10 µm thick sections on a cryostat (Leica Mirosystems, Nussloch, GmbH), and thaw mounted onto 75x50 mm ITO slides. The slides were then vacuum dried for 30 minutes, washed in 70% and 95% isopropanol (LC-MS grade, Sigma Aldrich) for 1 minute each, and kept under vacuum for 15 minutes. Automated matrix deposition (2,5-dihydroxybenzoic acid, 30mg/ml in methanol/water/trifuloroacetic acid 50:49,8:0,2 v/v/v) was performed using the ImagePrep system (Bruker Daltonics), following standard protocol. A serried frozen section of the whole brain was systematically prepared for histology analysis and stained with a conventional Hematoxylin-Eosin staining protocol.

MALDI mass spectrometry imaging was performed on an Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipped with a Smart-beam laser operating at 1000 Hz pulse rate. Ions were detected in positive linear mode at +25 kV accelerating potential, in the mass range of *m/z* 2000-20000 with ion suppression up to 1900 Da. The lateral resolution was set to 75 µm and 300 laser shots were accumulated per spot.
Spectra were preprocessed and normalized by Total Ion Current (TIC). Preprocessing, visualization and statistical analyses were performed using the integrated tools in SCiLS lab® Software.

4) Human tissue samples analysis by CLE

Fresh glioblastoma tissue samples were collected during 5-ALA (GLIOLAN) assisted curative resectional surgery in the Neurosurgery division of Grenoble hospital. All patients enrolled in the GLIOLAN trial provided written informed consent (RESECT protocol,

RECF1913). We followed strict ethical guidelines given by the Comite Consultatif National d'Ethique (The French National Review Committee). The study was approved by the Biological Resource Center Ethics Review Board (Centre de Ressources Biologiques, Grenoble Hospital). Feasibility of 5-ALA induced protoporphyrin IX fluorescence detection by CLE in human glioblastoma samples was investigated using the MaunaKea Technologies CellVizio Dualband® confocal microscope. Tissues were scanned using a MiniZ® probe (MaunaKea Technologies, Paris, France) with a 3,5µm resolution and 100µm working distance. Fluorescence images acquisition and relative intensity quantification were performed using repsepctively the proprietary DualViewer® and ICViewer® Softwares (MaunaKea Technologies, Paris, France).

RESULTS

In order to evaluate the feasibility of concomitant optical fluorescence detection by CLE and *in vivo* bioharvesting, Fischer rats were implanted with F98-GFP expressing cells. Figure 1 illustrates the surgical set up. Pre operative MRI showed an important tumor mass spread in the striatum at 14 days after stereotaxic inoculation (1a-d). Animals were then placed in a stereotaxic frame. The optical fibers bundle is introduced in the guide tube of the imprint device and slowly inserted into the brain. The depth coordinate for performing tissue imprints is determined by GFP fluorescence detection.

In vivo fluorescence images obtained as the device is inserted along the depth z-axis are illustrated in Figure 2 (a-c). Customized system allowed to detect fluorescence signal from the GFP expressing tumoral cells while reaching the tumorsite. Once intense GFP fluorescence signal was detected, the optical bundle was withdrawn from the guide tube and replaced by stainless steel stylets harboring a silicon chip. This silicon chip is exposed to the tissue and masked by internal rotation in the guide, allowing protection of the on-chip tissue imprint before the withdrawal of the whole device (stylet and guide tube).

Silicon chips are then separated from the device and immediately processed for biological characterization of the harvested material. Direct histochemical analysis conducted on the chip is illustrated in figure 2 d-m. A first step of multiple image alignment (MIA) is performed (Figure 2M) thanks to a large scale (10X objective) quick preview of all the fields of view acquired for each fluorescence channel (488 and 561nm). The MIA allows further to aim the analysis at the different regions of interest. Silicon chips present a micropattern consisting in reguliar micro pillars of 50µm height. z-stack acquistions were performed in order to evaluate tissue microfragments ditribution on the top part of the pillars (D-F), at mid distance of the pillars height (G-I) or on the bottom flat part of the chip between different

pillars (J-L). Harvested tissue microfragments confocal analysis reveals a strong fluorescence signal in the 488nm channel, corresponding to the GFP emission spectrum. Furthermore, propidium iodine staining showed a large number of spherical shaped cell nuclei. Taken together, those results confirmed that GFP expressing tumoral cells were specifically harvested on the micro patterned silicon chip, thanks to adequate determination of the imprint coordinates through the CLE scanning.

In order to investigate the molecular profile of the tissue imprints, mass spectrometry imaging (MSI) was directly conducted on an *in vivo* and fluorescence guided tissue imprint and compared to frozen sections of rat brains. We first evaluated the MS profiles of the tissue sections coming from two different tumor bearing rat brains. Figure S1-G and S1-H show the mean spectra obtained for each rat brain. The segmentation of the tumor regions performed on both MSI acquisitions using SCiLS lab 2D analysis software (figure S1-C and S1-E) relied on the same m/z values, thus demonstrating the ability of MSI to detect a tumor specific MS profile. To confirm the pathologic status of the areas highlighted by the segmentation, we overlaid serial HE stained sections (Fig S1-B and S1-E) and the corresponding pre operative T2 MRI images (Fig S1-A and S1-B). We further performed tissue imprint MSI and investigated the correlations between tissue imprint and tumor region of the frozen tissue sections. Highly similar MS profiles presented in Figure 3-D show the qualitative correlation obtained between the samples. Most representative m/z ions allowing the selective segmentation of the tumor region are colocalized on tissue sections coming from two different rat brains and on the Si imprint. As illustrated in figure 3 A-C, three m/z ions at 4973Da (A), 6655Da (B), and 4941Da (C) are highly selective for the brain tumor region in both tissue samples and are distributed along the tissue imprint. This result indicates that harevested tissue micro fragments contain proteins coming from the targeted region in the brain.

Taken together, those results show that molecular profile of the tissue imprint is identical to the targeted region in the brain. The use of *in vivo* fluorescence guidance led to a well-localized imprint and subsequently to tumor specific protein sampling.

In that preliminary feasibility study, in order to rapidly validate the concept while avoiding potential technical issues, we performed a biphasic approach with at first, optical investigation, depth measurement, and then tissue imprint. We further designed a specific prototype comprising the modification of the inner part of the device. The actual integrated device is presented in figure 4. It includes a dedicated slot in the inner stainless steel stylet that will house the optical fibers bundle. A devoted optical upgrade at the detection end is under development for optimizing the fluorescence detection yield and effective field of view. As it is now conceived, further experiments will definitely allow, by a simple rotation of the inner stylet inside the guide tube, simulatneous optical detection and targeted bioharvesting.

In the perspective of a regulatory validation of the prototype and clinical transfer of our "optimprint" device, we finally decided to evaluate the technical feasability to use the CellVizio® Dualband microscope for 5-ALA induced PPIX fluorescence detection in human glioblastoma surgical specimens. We show that strong PPIX fluorescence signal can be detected with our instrument. Fresh tissue samples were examined and presented multiple hotspots of fluorescence (Fig.5 A-B). A large Region of Interest (ROI) was placed in the central detection area of the bundle and a relative intensity fluorescence profile in that latter was plotted thanks to the manufacturer's software ICViewer® (Fig.5 C). The plot shows important relative intensities variation along the time, while the bundle is slowly moved at the surface of the sample, thus illustrating the heterogeneity of the fluorescence signal within the

sample. These data confirms that all the technological bricks are available and secured for engaging a regulatory validation process in order to transfer the technology in surgery rooms.

DISCUSSION

Performing an optimized tumor resection in the context of glioblastoma surgery constitutes a key challenge for improving patients' outcome. Use of per operative fluorescence detection helps neursurgeons in achieving a more complete removal of the tumor. The use of 5-ALA induced PpIX fluorescence clearly demonstrated the power of photonic exploration to enhance the extent of resection with a direct impact on survival . However the limitation of brain surgery remains the impossibility to remove all the infiltrative tumor cells because of pending cognitive impairments. Moreover, recent cell biology concepts clearly demonstrated the need for a Copernican revolution in the field of tumor relapse mechanisms study. Detecting tumor cells is not synonymous of tumor metastasis when detected in the blood circulation or of local recurrence when detected at the resection margins. Tumor metastasis or local relapse results from the interaction between a latent tumor initiating cell phenotype and a local microenvironment. Glioblastoma relapse is observed in 90% of cases within the 2/3cm lining the resection margins. These cells are yet inaccessible for molecular characterization, probably explaining our failure to cure glioblastoma.

Deciphering the peritumoral area at the microscopic level, discriminating the latent tumor initiating cell phenotype as well as the local microenvironment properties favoring relapse is a key objective to find new molecular targets to cure glioblastoma. Photonic detection and clinically approved fluorescent dyes are a unique opportunity to detect infiltrative tumor cells. Optical detection at the microscopic level has been developed for the endoscopic detection of urinary tract, bladder and lung cancers, supporting the concept of

“optical biopsy”. More recently, confocal detection has been also implemented for an intra tissular diagnostic approach of pancreatic tumor. More specific targeting of molecular actor such as integrins through innovative fluorescent probes, as well as dualband fluorescecne detection are under investigation.

Our idea was to combine the so-called "optical biopsy" to our tissue imprint strategy. We describe a new biomedical procedure with a device devoted to tissue micro fragments bioharvesting through a brief contact with dedicated micro patterned material. Thus, we show that the harvested tissue microfragments obtained thanks to fluorescence detection guidance are exploitable for -omics analysis and that so collected information is concordant with the observed molecular entities in the root tissue.

Beyond conventional fluorescence detection systems, many spectroscopic methods has already been reported as promising technologies for identification of brain tumors, determination of tumor grade or infiltrative component[27-30]. Thanks to the continuous miniaturization of technologies, the presented strategy virtually has not any limitations on the future possibilities to explore pathologic tissues thanks to label-free physico optic methods, always combined to a complex molecular annotation. In that aim, new protocols should associate macroscopic conventionnal fluorescence detection systems (such as the Pentero® microscope) and new non-lesionnal tools to decipher the microscopic cellular and tissular organization. Altogether, these developments should lead to an improved knowledge of brain tumors' mechanistic and help to improve patients' outcome.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Correspondence should be addressed to François Berger: françois.berger@cea.fr

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank InnabioSanté foundation; Ligue contre le Cancer and region Rhône Alpes for financial support. Authors thank MaunaKea Technologies for their precious help in experimental design.

ABBREVIATIONS

MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MSI: Mass spectrometry imaging

REFERENCES

1. Alifieris, C. & Trafalis, D. T. Glioblastoma Multiforme: Pathogenesis and Treatment. *Pharmacol. Ther.* **152,** 63–82 (2015).

2. Jhanwar-Uniyal, M., Labagnara, M., Friedman, M., Kwasnicki, A. & Murali, R. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers (Basel).* **7,** 538–55 (2015).

3. Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370,** 699–708 (2014).

4. Lacroix, M. *et al.* A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* **95,** 190–8 (2001).

5. Lacroix, M. & Toms, S. A. Maximum safe resection of glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* **32,** 727–8 (2014).

6. Smith, L. G. F. & Nakano, I. Fluorescence-Guided Brain Tumor Surgery. *World Neurosurg.* **78,** 559–564 (2012).

7. Li, Y., Rey-Dios, R., Roberts, D. W., Valdés, P. A. & Cohen-Gadol, A. A. Intraoperative fluorescence-guided resection of high-grade gliomas: a comparison of the present techniques and evolution of future strategies. *World Neurosurg.* **82,** 175–85

8. Jacquesson, T. *et al.* [Surgery of high-grade gliomas guided by fluorescence: a retrospective study of 22 patients]. *Neurochirurgie.* **59,** 9–16 (2013).

9. Badaoui, N. *et al.* Patterns of care and survival of glioblastoma patients: a comparative study between 2004 and 2008 in Lyon, France. *Rev. Neurol. (Paris).* **170,** 222–7 (2014).

10. Hadjipanayis, C. G., Widhalm, G. & Stummer, W. What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas? *Neurosurgery* (2015). doi:10.1227/NEU.0000000000000929

11. Su, X., Huang, Q.-F., Chen, H.-L. & Chen, J. Fluorescence-guided resection of high-grade gliomas: a systematic review and meta-analysis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **11,** 451–8 (2014).

12. Kuroiwa, T., Kajimoto, Y., Furuse, M. & Miyatake, S. A surgical loupe system for observing protoporphyrin IX fluorescence in high-grade gliomas after administering 5-aminolevulinic acid. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **10,** 379–81 (2013).

13. Hide, T., Yano, S., Shinojima, N. & Kuratsu, J. Usefulness of the indocyanine green fluorescence endoscope in endonasal transsphenoidal surgery. *J. Neurosurg.* **122,** 1185–92 (2015).

14. Schebesch, K.-M. *et al.* Sodium fluorescein-guided resection under the YELLOW 560 nm surgical microscope filter in malignant brain tumor surgery--a feasibility study. *Acta Neurochir. (Wien).* **155,** 693–9 (2013).

15. Konda, V. J. A. *et al.* A pilot study of in vivo identification of pancreatic cystic neoplasms with needle-based confocal laser endomicroscopy under endosonographic guidance. *Endoscopy* **45,** 1006–13 (2013).

16. Rzouq, F. *et al.* In-class didactic versus self-directed teaching of the probe-based confocal laser endomicroscopy (pCLE) criteria for Barrett's esophagus. *Endoscopy* (2015). doi:10.1055/s-0034-1393118

17. Wu, K. *et al.* Dynamic real-time microscopy of the urinary tract using confocal laser endomicroscopy. *Urology* **78,** 225–31 (2011).

18. Hassan, T., Piton, N., Lachkar, S., Salaün, M. & Thiberville, L. A Novel Method for In Vivo Imaging of Solitary Lung Nodules Using Navigational Bronchoscopy and Confocal Laser Microendoscopy. *Lung* **193,** 773–8 (2015).

19. Foersch, S. *et al.* Confocal Laser Endomicroscopy for Diagnosis and Histomorphologic Imaging of Brain Tumors In Vivo. *PLoS One* **7,** e41760 (2012).

20. Martirosyan, N. L. *et al.* Use of in vivo near-infrared laser confocal endomicroscopy with indocyanine green to detect the boundary of infiltrative tumor. *J. Neurosurg.* **115,** 1131–8 (2011).

21. Lemée, J.-M. *et al.* Characterizing the peritumoral brain zone in glioblastoma: a multidisciplinary analysis. *J. Neurooncol.* **122,** 53–61 (2015).

22. Piccirillo, S. G. M. *et al.* Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br. J. Cancer* **107,** 462–8 (2012).

23. Sottoriva, A. *et al.* Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** 4009–14 (2013).

24. Gill, B. J. *et al.* MRI-localized biopsies reveal subtype-specific differences in molecular and cellular composition at the margins of glioblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** 12550–5 (2014).

25. Zaccaria, A. *et al.* A micro-silicon chip for in vivo cerebral imprint in monkey. *ACS Chem. Neurosci.* **4,** 385–92 (2013).

26. Mathieu, D., Lecomte, R., Tsanaclis, A. M., Larouche, A. & Fortin, D. Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can. J. Neurol. Sci.* **34,** 296–306 (2007).

27. Uckermann, O. *et al.* Label-free delineation of brain tumors by coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy in an orthotopic mouse model and human glioblastoma. *PLoS One* **9,** e107115 (2014).

28. Karabeber, H. *et al.* Guiding Brain Tumor Resection Using Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles and a Hand-Held Raman Scanner. *ACS Nano* **8,** 9755–9766 (2014).

29. Pointer, K. B., Zhang, R. R., Kuo, J. S. & Dempsey, R. J. Detecting brain tumor with Raman scattering microscopy. *Neurosurgery* **74,** N12–4 (2014).

30. Ji, M. *et al.* Rapid, label-free detection of brain tumors with stimulated Raman scattering microscopy. *Sci. Transl. Med.* **5,** 201ra119 (2013).

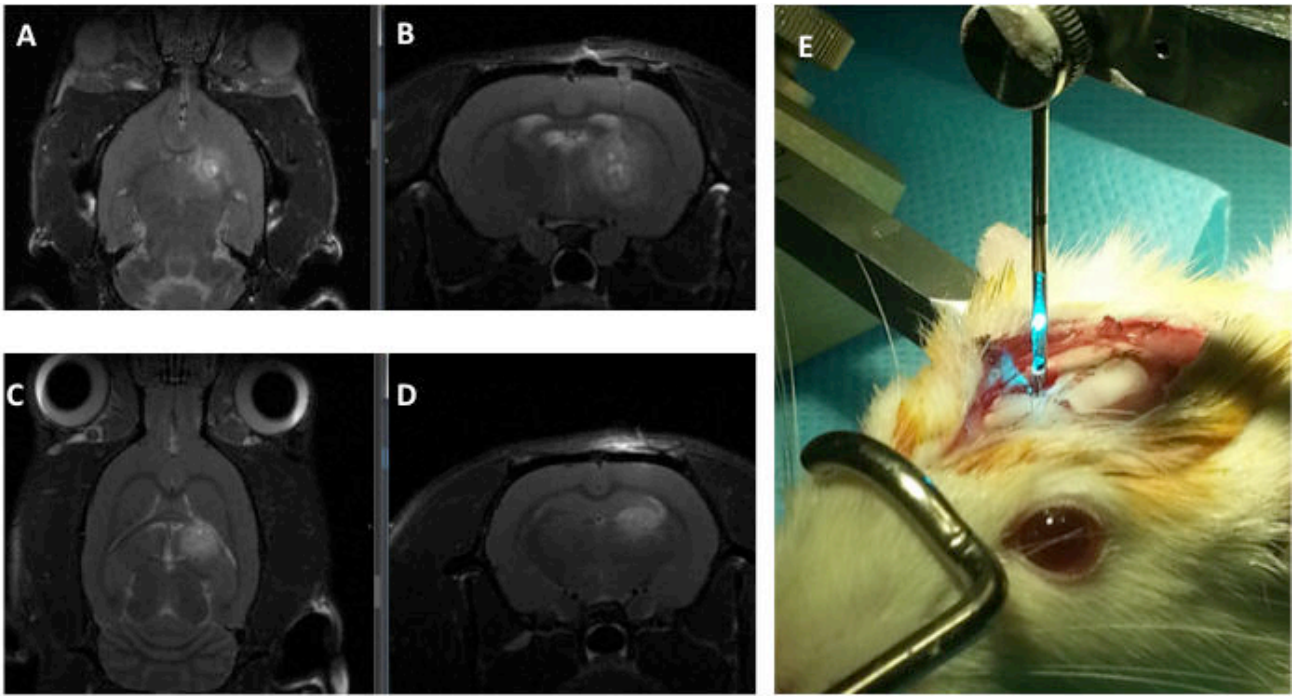


Figure 1: In vivo set up of the experiment. Transversal (A,C) and Coronal (B,D) MRI images of the developed glioblastoma. E - illustration of the device.

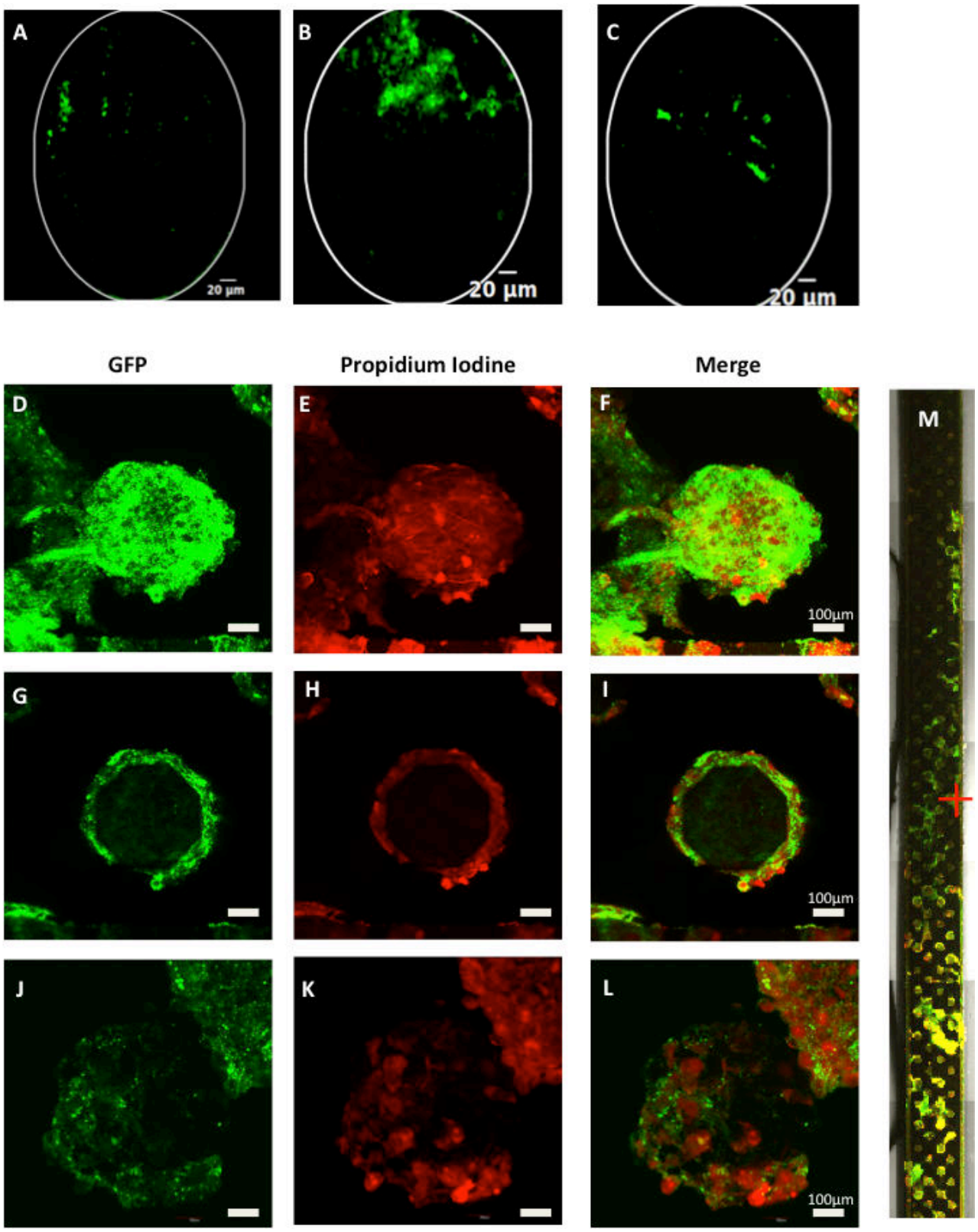


Figure 2: *In vivo* and on chip fluorescence detection. GFP fluorescence detection from the optical fibers bundle through the guide tube in the animal brain (A-C). Multiple Image Alignment reconstruction of the chip (M). Confocal scan of the harvested tissue on the silicon chip (D-L).

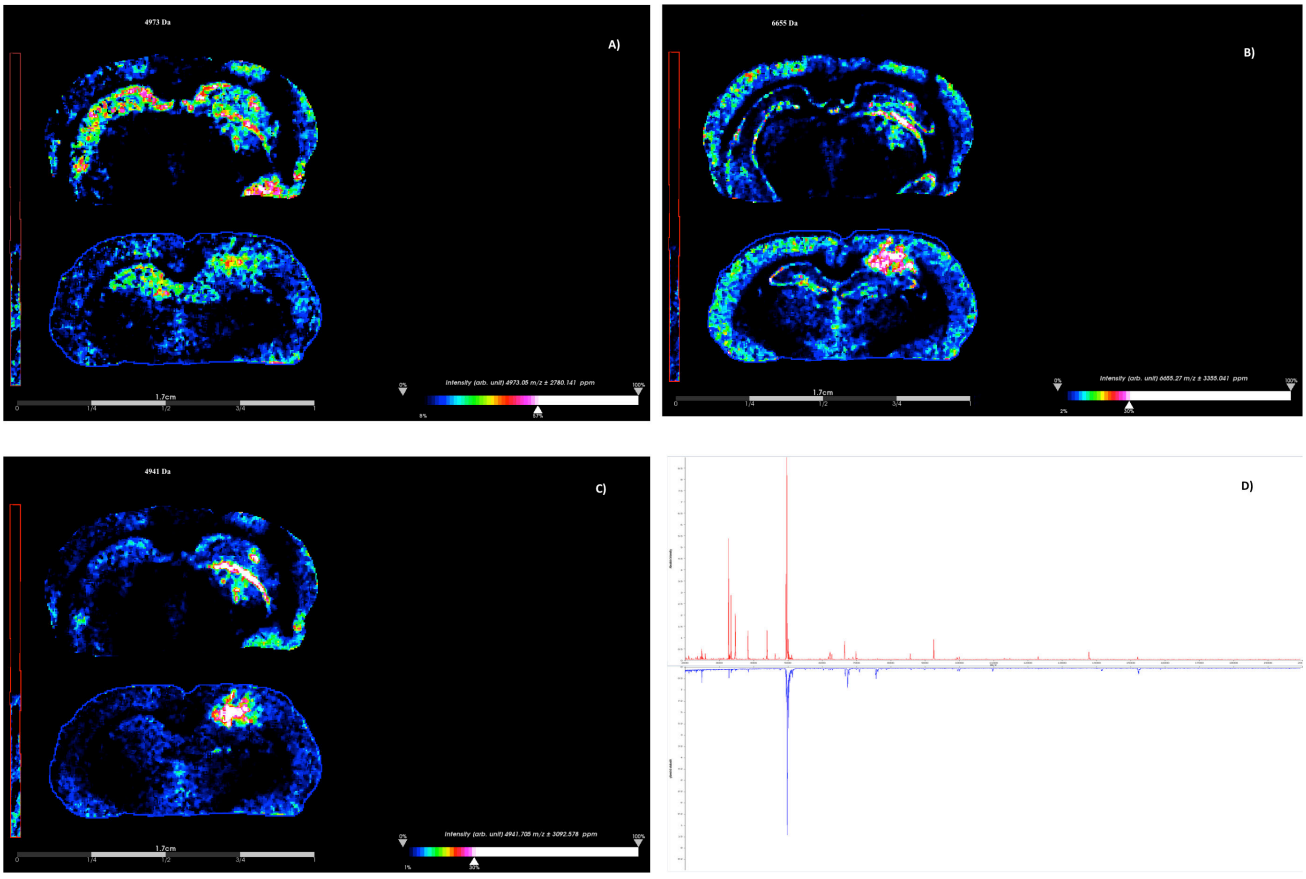


Figure 3: IMS analysis of the silicon chip and tissue samples. A) spatial ditribution of the m/z ions 4973Da (A) 6655Da (B) and 4941Da (C)on both tissue samples and Si Chip. Silicon chip (bottom blue line) and tissue sample (top red line) mean spectra alignment showing high similarities(D).

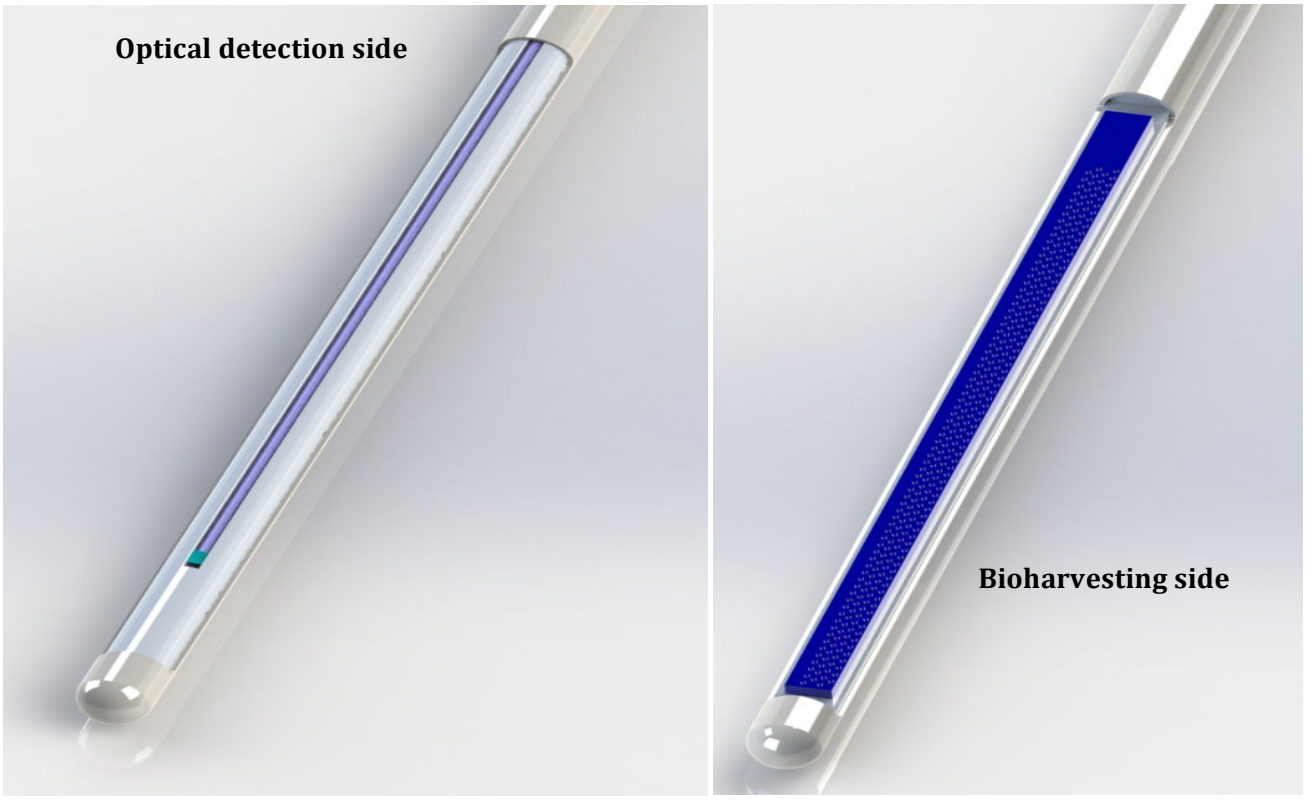


Figure 4: prototype design for an integrated version of the device.

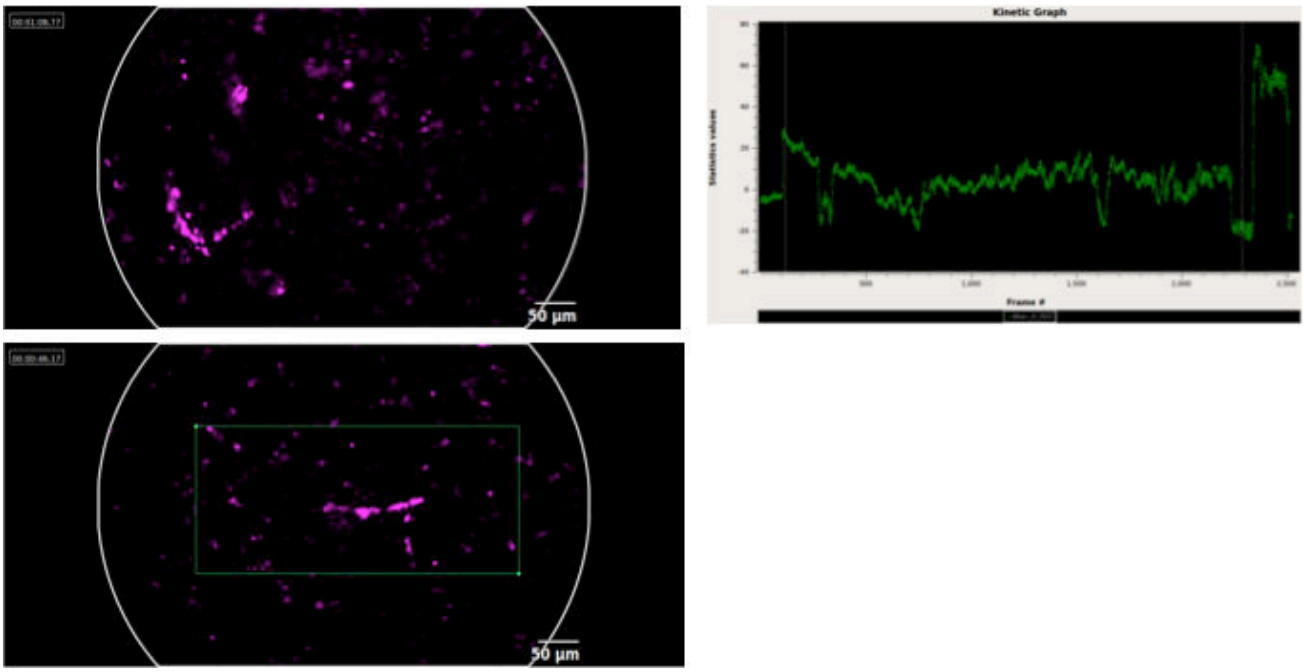


Figure 5: CLE analysis on human glioblastoma samples from a patient operated under 5-ALA assisted fluorescence detection.

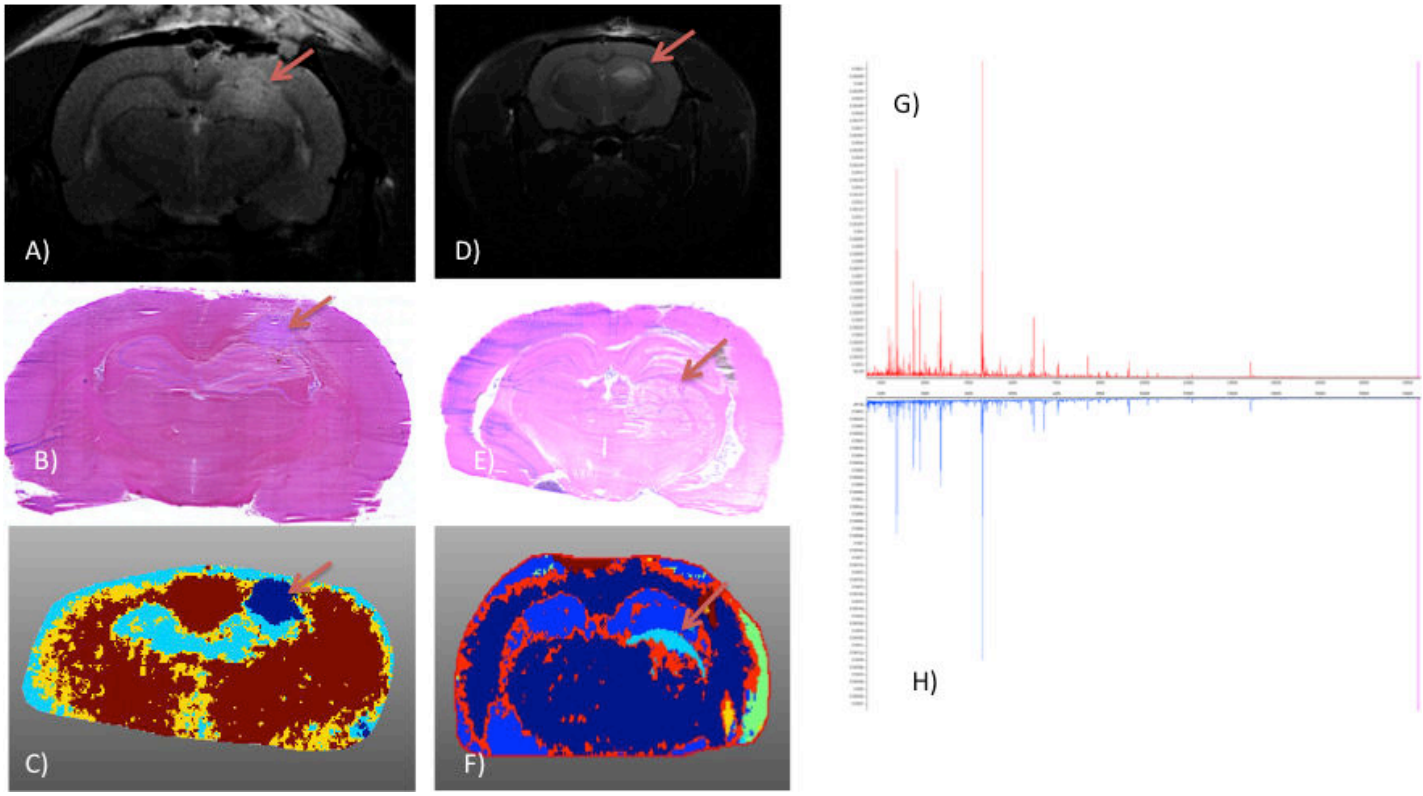


Figure S1: Multimodal examination of tumor tissue samples. T2 MRI images of the tumors in two independent experiments (A,B). Hematoxylin Eosin staining of the frozen sections studied by IMS (B, E). SCiLS Lab Software segmentation from IMS spectra (C,F). Mean spectrum of the independent samples from IMS experiment.

II.2 Vers l'utilisation de nouveaux traceurs fluorescents.

J'ai eu l'occasion, au cours de mon travail de thèse, de collaborer avec la société Fluoptics (www.fluoptics.com) qui a mis au point et validé, pour un certain nombre d'applications cliniques dans le domaine de l'oncologie, un traceur fluorescent proche infrarouge, AngioStamp™, et un imageur dédié, le Fluobeam®.

L'AngioStamp™ est un peptide lié à un traceur fluorescent qui émet dans le proche infrarouge, ciblant spécifiquement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et permettant l'étude des zones de néoangiogénèse. Cette molécule qui appartient à la famille des protéines d'adhérence est exprimée dans les glioblastomes et dans les petits vaisseaux sanguins. L'inhibition de son expression, basée sur le ciblage par un motif peptidique de type Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD sequence), a été proposée comme une stratégie antitumorale[145–147]. Des essais thérapeutiques ont été conduits en ciblant cette intégrine (Cilengitide) mais n'ont pas montré d'effet dans un essai clinique randomisé de phase 3[148]. Pour autant, de nombreuses approches ont été et sont encore développées pour l'imagerie en oncologie, soit en fluorescence, soit en médecine nucléaire[130,149–151].

Compte tenu de notre intérêt pour des stratégies innovantes de marquage fluorescent dans les glioblastomes, nous avons entrepris d'évaluer le rationnel à l'utilisation de l'AngioStamp™ pour l'imagerie de fluorescence dans des modèles précliniques de glioblastome. Nous avons choisi de faire cette évaluation dans différents modèles, 2 modèles d'allogreffes orthotopiques (F98 et 9L) et un modèle de xenogreffe ectopique (U87-MG sous cutané chez la souris immunodéficiente). Un modèle adapté de tumeurs implantées dans le cortex après réalisation d'un volet osseux a été ajusté pour permettre de faciliter les sessions d'imagerie avec la caméra de fluorescence externe. Toutes ces expériences ont été conduites en injectant, 24 heures avant la session d'imagerie, soit le traceur fluorescent, soit son contrôle dont la séquence de ciblage est mutée (RAD-AngioStamp). Les résultats sont brièvement présentés dans la figure 17 ci-dessous.

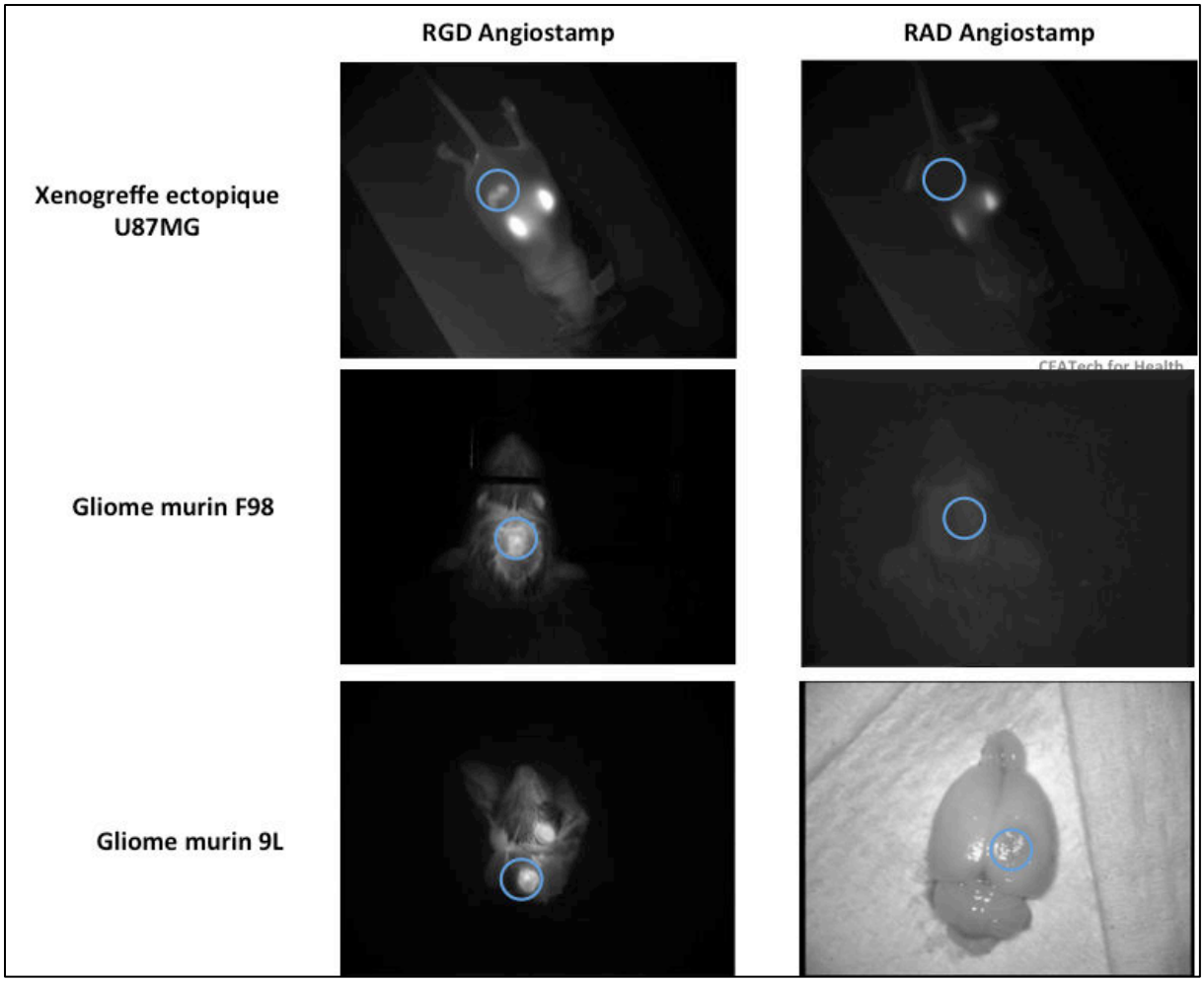


Figure 17: Imagerie de fluorescence des gliomes par un traceur proche infrarouge, AngioStamp™

Dans des expériences pilotes, nous avons pu mettre en évidence un très fort potentiel applicatif à l'utilisation de l'AngioStamp™ pour l'imagerie de fluorescence des tumeurs cérébrales. Nous avons montré que le signal est particulièrement intense dans le tissu tumoral, mais que le bruit de fond est nul dans les tissus sains, suggérant une très grande spécificité du traceur. Dans les images obtenues à une échelle "corps entier", on peut noter la présence d'un signal résiduel (24 heures après injection) dans les reins et l'oeil. Ce signal est lié à la biodistribution et la cinétique d'élimination du produit qui ont été largement caractérisées par le fabricant.

Nous avons souhaité poursuivre ce travail en le mettant en relation avec les expériences de détection de fluorescence *in situ* à l'aide de la microendoscopie confocale fibrée. Des rats ont été implantés avec des cellules de gliome de la lignée F98 la croissance tumorale a été évaluée par IRM. La veille de la chirurgie les animaux ont reçu une injection d'AngioStamp™, et une

heure avant l'intervention, une injection de fluorescéine sodique dans l'idée de produire un double marquage *in vivo*. Les résultats sont brièvement présentés dans la figure 18.

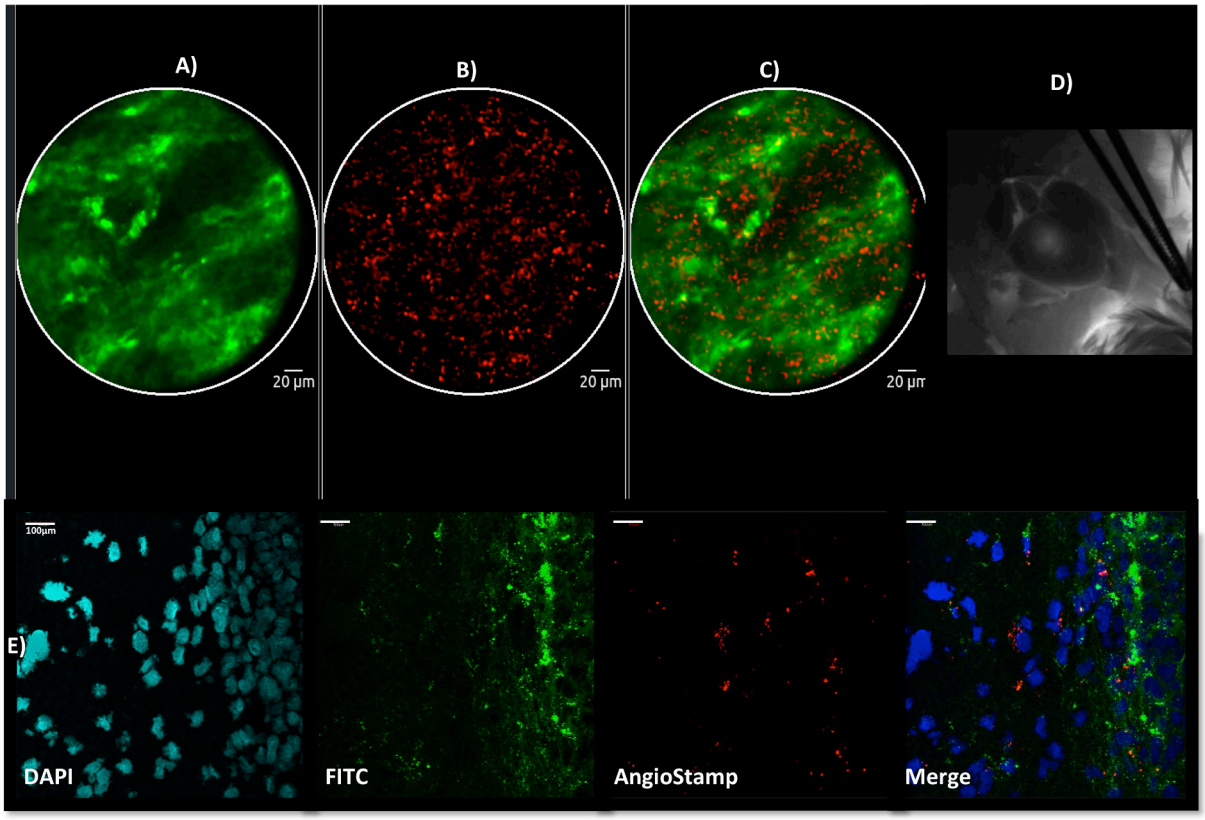


Figure 18: Utilisation de l'AngioStamp™ et de la fluoresceine sodique pour l'imagerie de fluorescence des tumeurs cérébrales.

Les encarts a) b) et c) correspondent respectivement à la visualisation de la fluorescéine, de l'AngioStamp™ et de la superposition grâce au microscope confocal fibré CellVizio® (MaunaKea Technologies). L'encart d) correspond à l'image du cerveau entier obtenue avec le Fluobeam montrant un fort signal dans l'hémisphère tumoral. Immédiatement après l'expérience, les animaux sont euthanasiés, les cerveaux sont prélevés et congelés pour une analyse histologique. L'encart e) montre l'analyse en microscopie confocale conventionnelle d'une coupe de tissu de 20µm d'épaisseur. Les noyaux sont marqués au DAPI. L'analyse post mortem confirme bien la présence d'un signal de fluorescence lié à chacun des deux fluorophores. Des études complémentaires sont envisagées pour entrer en détail dans la caractérisation de la localisation de l'AngioStamp™ en colocalisant sa présence avec les antigènes de prolifération, de la paroi vasculaire etc.

Devant ces résultats encourageants, un dossier de demande de financement a été sélectionné dans le cadre du 18ème appel à projet du Fonds Unique Interministériel (FUI) et labellisé par Lyon Biopôle. Le projet baptisé "GliomTracker", finance à hauteur de 2,3M€ un réseau de partenaires associant Fluoptics™, la société ERASLabo qui assurera la production de lots GMP du traceur, et CLINATEC (CEA Léti, Inserm, Université Grenoble Alpes, CHU de Grenoble). Le but du projet est de démontrer l'opérabilité clinique du couple AngioStamp™ / FluoBeam dans un modèle de tumeur cérébrale chez le porc développé au laboratoire[152], assurer la production de lots cliniques du traceur et démontrer son utilité pour la chirurgie assistée par fluorescence (appliquée au glioblastome multiforme) dans un essai clinique à l'horizon 2017.

II.3 Conclusion sur les résultats de la partie 2.

Ce travail de thèse a été l'occasion de mettre au point une stratégie nouvelle de guidage de l'outil d'empreinte sur la base d'une détection de fluorescence. Les récents développements autour, notamment, du 5-ALA et des méthodes pour le voir et le quantifier confirment l'intérêt grandissant pour ces approches de chirurgie assistée. En tirant partie du concept princeps et de l'environnement technologique, nous avons pu démontrer la faisabilité de localiser les territoires tissulaires marqués par la fluorescence grâce au couplage à la microendoscopie confocale. En tenant compte des contraintes techniques imposées par cette alliance, nous avons imaginé un prototype entièrement intégré qui puisse répondre à tous les besoins, et amorcé le travail de réalisation de ce prototype avec une société grenobloise de micro usinage. Bénéficiant également d'un important soutien du CEA, ces expériences établissant une preuve de concept technologique ont servi de base pour le dépôt d'un brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI), présenté dans la troisième partie ci-après.

En parallèle, le travail amorcé avec Fluoptics a permis de montrer que d'autres traceurs fluorescents peuvent présenter un grand intérêt pour l'imagerie des gliomes. La reconnaissance de ce travail par l'obtention d'un important financement pour emmener l'AngioStamp jusqu'à l'essai clinique constitue une belle perspective de travail. Les expérimentations sur minipigs ont déjà commencé et le projet avance à l'heure de la rédaction de ce manuscrit.

III. Les dispositifs d'empreinte « 3.0 » .

Plusieurs demandes de brevet ont été déposées ou sont en cours de dépôt concernant des évolutions, des déclinaisons de l'outil d'empreinte de manière à l'adapter à de nouvelles problématiques biomédicales. Deux demandes sont intégrées ici, l'une au sujet du guidage optique par détection de fluorescence, l'autre sur un design complètement modifié de manière à transférer le concept dans la chirurgie coelioscopique. La statégie de valorisation et les déploiements futurs seront plus largement discutés directement dans au chapitre Discussion du manuscrit.

III.1 Brevet concernant un dispositif d'empreinte guidé par détection de fluorescence.

Comme décrit dans la deuxième publication intégrée précédemment, le concept du dispositif d'empreinte moléculaire « optiquement guidé » a fait l'objet du dépôt d'une demande de brevet auprès de l'Institut National de la Propriété Industrielle (INPI). La demande de brevet incluant les revendications est rapportée ci-après.

(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) **EP 2 888 990 A1**

(12) **DEMANDE DE BREVET EUROPEEN**

(43) Date de publication:
01.07.2015 Bulletin 2015/27

(21) Numéro de dépôt: **14200532.1**

(22) Date de dépôt: **30.12.2014**

(51) Int Cl.:
A61B 1/00 *(2006.01)* ***A61B 1/07*** *(2006.01)*
A61B 1/06 *(2006.01)* ***A61B 5/00*** *(2006.01)*
A61B 10/02 *(2006.01)* ***A61B 10/04*** *(2006.01)*
A61B 10/00 *(2006.01)*

(84) Etats contractants désignés:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
Etats d'extension désignés:
BA ME

(30) Priorité: **30.12.2013 FR 1363695**

(71) Demandeur: **COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES**
75015 Paris (FR)

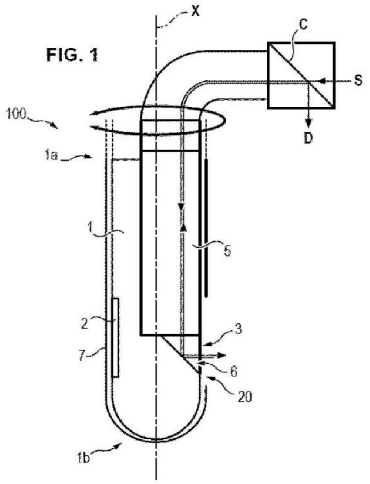
(72) Inventeurs:
- **Dreyfus, Matthieu**
  38000 GRENOBLE (FR)
- **Berger, François**
  38240 MEYLAN (FR)
- **Bouamrani, Ali**
  38000 GRENOBLE (FR)
- **Mombrun, Adrien**
  38000 GRENOBLE (FR)

(74) Mandataire: **Regimbeau**
139, rue Vendôme
69477 Lyon Cedex 06 (FR)

(54) **Dispositif de prélèvement d'un tissu biologique**

(57) L'invention concerne un dispositif (100) de prélèvement d'un tissu biologique comprenant :
- une tige (1) s'étendant selon un axe longitudinal (X) entre une extrémité proximale (1 a) et une extrémité distale (1 b),
- une surface de capture (2) portée par la tige (1), destinée à être appliquée contre un tissu biologique, ladite surface de capture étant nanoporeuse ou présentant des protubérances adaptées pour prélever un tissu biologique par microabrasion,
- une fenêtre d'observation (3) transparente à la lumière visible, agencée dans la surface externe de la tige (1),
- un logement (4) s'étendant dans la tige, parallèlement à l'axe longitudinal, de l'extrémité proximale (1a) jusqu'à la fenêtre d'observation (3), ledit logement étant apte à recevoir un faisceau de fibres optiques.

FIG. 1



Printed by Jouve, 75001 PARIS (FR)

EP 2 888 990 A1

Description

DOMAINE DE L'INVENTION

[0001] La présente invention concerne un dispositif de prélèvement d'un tissu biologique.

ARRIERE PLAN DE L'INVENTION

[0002] Le prélèvement de tissus biologiques dans certains organes d'un être vivant se révèle particulièrement complexe du fait des risques de lésion de l'organe dans lequel est effectué le prélèvement.

[0003] Tel est le cas par exemple des tumeurs du cerveau, qui sont peu accessibles à la biopsie compte tenu des risques encourus en termes de lésions cognitives irréversibles.

[0004] Le document WO 2006/082344 décrit un dispositif de prélèvement minimalement invasif, qui comprend une tige et une surface de capture portée par la tige, destinée à être appliquée contre un tissu biologique.

[0005] Le document WO 2013/098703 décrit un dispositif similaire, dans lequel la surface de capture comporte un matériau nanoporeux, et en particulier du silicium nanoporeux.

[0006] Par simple contact entre la surface de capture - qui est avantageusement micro-structurée ou poreuse - et le tissu, on obtient une capture de cellules et de macromolécules dans des territoires du système nerveux inaccessibles par chirurgie.

[0007] Compte tenu du fait que la taille de la tumeur peut être faible, il est nécessaire que la surface de capture soit amenée de manière précise au niveau de la tumeur afin de prélever les cellules et macromolécules d'intérêt.

[0008] Cependant, il est relativement complexe de localiser précisément la zone anatomique où est effectué le prélèvement au moyen de ce dispositif, le praticien ne pouvant visualiser directement l'organe dans lequel il est introduit.

[0009] A cet effet, une possibilité est de rendre le dispositif de prélèvement compatible avec l'imagerie par résonance magnétique (IRM) - c'est-à-dire typiquement en le réalisant dans des matériaux non magnétiques -, ce qui permet d'observer par cette technique d'imagerie l'introduction du dispositif de prélèvement dans l'organe et de vérifier l'emplacement de la surface de capture.

[0010] Cependant, la mise en oeuvre du prélèvement sous IRM pose des difficultés en termes de disponibilité de l'équipement.

[0011] Il serait donc souhaitable de pouvoir procéder à un prélèvement de tissus biologiques dans une zone précise d'un organe en s'affranchissant de l'imagerie par résonance magnétique.

BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

[0012] Un but de l'invention est de concevoir un dispositif de prélèvement de tissus biologiques minimalement invasif qui permette de localiser avec une précision améliorée l'emplacement de la zone dans laquelle est effectué le prélèvement, sans impliquer de système d'imagerie externe tel que l'IRM.

[0013] Conformément à l'invention, il est proposé un dispositif de prélèvement d'un tissu biologique comprenant :

- une tige s'étendant selon un axe longitudinal entre une extrémité proximale et une extrémité distale,
- une surface de capture portée par la tige, destinée à être appliquée contre un tissu biologique,
- une fenêtre d'observation transparente à la lumière visible, agencée dans la surface externe de la tige,
- un logement s'étendant dans la tige, parallèlement à l'axe longitudinal, de l'extrémité proximale jusqu'à la fenêtre d'observation, ledit logement étant apte à recevoir un faisceau de fibres optiques,

ledit dispositif étant caractérisé en ce que la surface de capture est nanoporeuse ou présente des protubérances adaptées pour prélever un tissu biologique par microabrasion.

[0014] De manière avantageuse, la fenêtre d'observation et la surface de capture sont agencées à une même distance de l'extrémité distale de la tige et angulairement espacées.

[0015] Selon un mode de réalisation, ledit logement du faisceau de fibres optiques comprend une rainure agencée dans la surface externe de la tige.

[0016] Selon un mode de réalisation, le dispositif comprend en outre :

- un faisceau de fibres optiques disposé dans le logement de la tige de telle sorte qu'une extrémité distale dudit faisceau soit agencée au voisinage de la fenêtre d'observation et
- un système optique de renvoi adapté pour réaliser un couplage optique entre l'extrémité distale du faisceau et la fenêtre d'observation.

[0017] Selon une forme d'exécution, le système optique de renvoi comprend une lame réfléchissante orientée d'un angle compris entre 40 et 50° par rapport à l'axe longitudinal de la tige.

[0018] De manière avantageuse, ladite lame réfléchissante fait partie d'un prisme.

[0019] Selon un mode de réalisation, le prisme comprenant ladite lame réfléchissante est solidaire de l'extrémité distale du faisceau de fibres optiques.

[0020] De manière alternative, le système optique de renvoi consiste en une extrémité distale biseautée des fibres optiques formant le faisceau.

[0021] Le dispositif peut en outre comprendre un tube guide dans lequel la tige est apte à coulisser, ledit tube guide comprenant une ouverture latérale agencée de telle sorte que lorsque la tige est introduite dans le tube

guide la surface de capture et la fenêtre d'observation viennent en vis-à-vis de ladite ouverture latérale selon l'orientation angulaire respective du tube guide et de la tige.

[0022] La surface de capture est avantageusement située dans une région distale de la tige.

[0023] Selon un mode de réalisation, la surface de capture est revêtue d'une couche de fonctionnalisation.

[0024] La tige est par exemple en inox ou en PEEK.

[0025] Selon une forme d'exécution avantageuse, la tige présente une section décroissante de son extrémité proximale vers son extrémité distale.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

[0026] D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre, en référence aux dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 est une vue en coupe d'un dispositif de prélèvement selon un mode de réalisation,
- la figure 2 est une vue de face de l'extrémité proximale de la tige du dispositif de prélèvement,
- la figure 3 est une vue en perspective de côté de la tige,
- la figure 4 est une vue en perspective de la région de la fenêtre d'observation dans la tige,
- la figure 5 est une vue en perspective de la tige dans le tube guide, en position d'observation des tissus,
- la figure 6 est une vue en perspective de la tige dans le tube guide, en position de prélèvement d'un tissu biologique,
- la figure 7 est une vue en perspective de la tige selon une forme d'exécution particulière de l'invention.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

[0027] La figure 1 est une vue en coupe d'un mode de réalisation d'un dispositif 100 de prélèvement de tissus biologiques conforme à l'invention.

[0028] Le dispositif 100 comprend une tige 1 qui s'étend selon un axe longitudinal X entre une extrémité proximale 1a et une extrémité distale 1b. Par convention, on désigne par « proximal » le côté le plus proche de la main du praticien et par « distal » le côté le plus éloigné, destiné à entrer en contact avec les tissus.

[0029] La tige 1 est réalisée en un matériau biocompatible. La tige 1 peut ainsi être réalisée en acier inoxydable, ou encore en un matériau plastique, tel que le PEEK (polyétheréthercétone), qui présente, par rapport à l'inox, d'être compatible avec l'IRM.

[0030] Le diamètre de la tige est typiquement compris entre 500 μm et 2000 μm, de préférence entre 800 μm et 1200 μm. Avantageusement, un diamètre de 1200 μm permet une insertion correcte dans un tube guide existant.

[0031] De préférence, la section transversale de la tige 1 décroit entre son extrémité proximale et son extrémité distale. Par exemple, comme illustré sur la figure 7, lorsque la tige présente une section circulaire, le diamètre D2 de l'extrémité distale est inférieur au diamètre D1 de l'extrémité proximale. De préférence, le diamètre (ou la diagonale lorsque la section n'est pas circulaire) de l'extrémité distale est trois fois inférieur au diamètre (ou la diagonale) de l'extrémité proximale. Cela permet une meilleure prise en main de la tige par un opérateur, au niveau de l'extrémité proximale.

[0032] La tige 1 porte une surface de capture 2 qui est destinée à être appliquée contre un tissu biologique au niveau duquel on souhaite effectuer un prélèvement.

[0033] La surface de capture 2 est généralement une surface plane et de contour rectangulaire, bien qu'elle ne soit pas limitée à cette seule forme. La longueur de la surface de capture est de préférence agencée parallèlement à l'axe longitudinal.

[0034] La tige 1 peut présenter un méplat agencé à la périphérie de la tige et sur lequel on solidarise la surface de capture, par exemple par collage ou par tout autre moyen. La liaison de la surface de capture vis-à-vis de la tige peut être amovible ou non. Le méplat est avantageusement conçu pour que lorsque la surface de capture 2 est assemblée sur la tige 1, elle soit inscrite dans la section circulaire de la tige et ne présente pas de protubérance par rapport à la surface périphérique de la tige.

[0035] Tout en étant plane à l'échelle macroscopique, la surface de capture peut être micro-structurée de sorte à présenter des protubérances permettant de prélever un tissu biologique par micro-abrasion. Par exemple, lesdites protubérances peuvent consister en des piliers hexagonaux de 50 μm de hauteur et 80 μm de diamètre.

[0036] De manière alternative, la surface de capture peut être la surface d'un matériau nanoporeux.

[0037] Le silicium est fréquemment employé comme matériau de surface de capture, quel que soit le mode de réalisation considéré.

[0038] Par ailleurs, la surface de capture 2 peut être revêtue d'une couche de fonctionnalisation favorisant le greffage d'analytes d'intérêt. Dans le présent texte, le terme « analyte » désigne une espèce chimique ou biologique, en particulier une protéine ou une cellule. La couche de fonctionnalisation peut notamment être anionique.

[0039] De préférence, la surface de capture 2 est située dans une région distale de la tige 1.

[0040] Par ailleurs, la tige 1 comprend une fenêtre d'observation 3 et un logement 4 s'étendant dans la tige depuis l'extrémité proximale 1a jusqu'à ladite fenêtre d'observation. Comme on le verra en détail plus bas, ledit logement 4 est destiné à recevoir un faisceau de fibres optiques.

[0041] Par « fenêtre » on entend dans le présent texte une surface adaptée pour transmettre la lumière visible entre l'environnement extérieur et le logement 4. Ladite fenêtre est donc obtenue en pratiquant une ouverture entre la surface externe de la tige et le logement 4. La fenêtre peut éventuellement être matérialisée par un ma-

tériau transparent à la lumière visible, ce matériau pouvant être organique (tel que du plexiglas) ou inorganique (tel que du verre). Cependant, la présence d'un tel matériau n'est pas indispensable et la fenêtre peut simplement consister en un espace libre entre la surface externe de la tige 1 et le logement 4.

[0042] Selon un mode de réalisation, le logement 4 peut consister en un perçage pratiqué dans l'épaisseur de la tige.

[0043] De manière alternative, le logement 4 peut consister en une rainure pratiquée dans la surface externe de la tige 1, qui est généralement plus facile à réaliser par usinage. Ladite rainure peut présenter par exemple une section carrée ou rectangulaire.

[0044] Les dimensions de ladite rainure sont adaptées à celles du faisceau de fibres optiques, de sorte à permettre l'insertion dudit faisceau dans ladite rainure. De préférence, le faisceau de fibres optiques est agencé de manière amovible dans le logement ; il est par exemple retenu par serrage dans le logement 4. Le faisceau peut être inséré partiellement dans la rainure, c'est-à-dire qu'une partie du faisceau s'étend au-delà des parois de la rainure ; de manière alternative, le faisceau est entièrement logé dans la rainure, sa surface externe ne dépassant pas de l'enveloppe définie par les parois de la rainure.

[0045] Lorsque le faisceau de fibres optiques est inséré en totalité dans la rainure, l'espace laissé libre dans la rainure autour du faisceau peut être comblé au moyen d'un polymère biocompatible appliqué à l'état liquide puis durci de manière à constituer un confinement du faisceau de fibres. De préférence, ledit polymère assure en outre une continuité de la surface externe de la tige pour conserver sa section circulaire. Ledit polymère est de préférence un alginate, qui est biocompatible et permet un comblement réversible de la rainure. En effet, cet alginate peut ensuite être dissous dans un bain d'un solvant approprié, ce qui permet de retirer le faisceau de fibres optiques de la rainure.

[0046] Le faisceau de fibres optiques 5 comprend avantageusement de l'ordre de 3000 fibres optiques agencées en un faisceau de section circulaire de 0,3 mm de diamètre. Un tel faisceau est celui équipant l'endoscope distribué par la société Mauna Kea Technologies sous la référence Cellvizio™.

[0047] Les fibres optiques sont choisies de sorte à guider toute longueur d'onde permettant la caractérisation spectrale des tissus biologiques. Typiquement, les fibres optiques doivent guider une plage de longueur d'onde comprise entre l'ultraviolet et l'infrarouge, ce dernier présentant une bien meilleure pénétrance dans les tissus.

[0048] Le faisceau 5 présente une extrémité proximale qui est reliée à un système d'excitation et de détection, et une extrémité distale qui, lorsque le faisceau est dans sa position d'utilisation dans la tige 1, est agencée au voisinage de la fenêtre d'observation 3.

[0049] Le dispositif 100 comprend par ailleurs un système optique de renvoi 6 adapté pour réaliser un couplage optique entre l'extrémité distale du faisceau et la fenêtre d'observation. A cet effet, ledit système 6 est agencé au voisinage de la fenêtre 3. Le système de couplage optique peut être solidaire de la tige (il peut par exemple être formé d'un prisme collé à l'extrémité distale de la rainure formant le logement 4, en vis-à-vis de la fenêtre d'observation 3) ou bien du faisceau de fibres, auquel cas il est fixé à l'extrémité distale de ce faisceau.

[0050] Selon un mode de réalisation, le système de couplage optique est constitué par l'extrémité du faisceau qui est taillée en biseau, l'angle du biseau étant de l'ordre de 40 à 50°, de préférence 45°. Selon ce mode de réalisation, l'extrémité du faisceau forme un plan incliné ; ainsi, chaque fibre du faisceau est apte à collecter un signal lumineux dont l'angle d'incidence est incliné par rapport à l'axe longitudinal du faisceau.

[0051] Selon un autre mode de réalisation, le système de renvoi optique est une lame réfléchissante, orientée d'environ 40 à 50°, de préférence 45°, par rapport à l'axe longitudinal X.

[0052] Ladite lame réfléchissante peut appartenir à un prisme, ledit prisme étant solidaire de l'extrémité distale du faisceau de fibres optiques, par exemple par sertissage, par collage ou par tout autre moyen. Le prisme présente typiquement une section carrée dont la longueur est égale au diamètre du faisceau de fibres optiques.

[0053] De préférence, le système de renvoi optique est configuré de façon à dévier la lumière émise par le faisceau de fibres selon une direction sensiblement orthogonale à l'axe longitudinal X. Dans ce cas, le faisceau est apte à collecter, par son extrémité distale, une lumière dont l'angle d'incidence est orthogonal à l'axe longitudinal X.

[0054] Le dispositif 100 comprend avantageusement un tube guide 7 à l'intérieur duquel la tige 1 peut coulisser. Le tube guide comprend une ouverture latérale 70 de telle sorte que lorsque la tige est insérée dans le tube, l'ouverture 70 est en vis-à-vis de la portion de la tige qui porte la surface de capture et dans laquelle est ménagée la fenêtre d'observation 3. La tige 1 est alors libre en translation et en rotation dans le tube guide 7. Cela permet de placer, alternativement, la fenêtre 3 ou la surface de capture 2 face à l'ouverture 70, comme détaillé dans l'exemple décrit ci-après. Le tube guide 7 a pour fonction de protéger la tige et la surface de capture, qui peuvent coulisser dans le tube sans être en contact avec les tissus. Le tube guide est en un matériau biocompatible tel que de l'inox. Le diamètre intérieur du tube guide est typiquement compris entre 1000 et 3000 μm, par exemple 1200 μm.

[0055] Lorsque la tige présente une section décroissante de son extrémité proximale vers son extrémité distale (mode de réalisation illustré sur la figure 7), la forme du tube guide peut être adaptée en conséquence. Ainsi, l'ouverture du tube guide, au niveau de son extrémité proximale, est plus large qu'au niveau de son extrémité distale. La géométrie externe du tube guide peut égale-

ment être discontinue, le diamètre (ou la diagonale dans le cas d'une section non circulaire) externe de l'extrémité proximale étant supérieur au diamètre (ou la diagonale) au niveau de l'extrémité distale.

[0056] La figure 2 est une vue de face de l'extrémité proximale de la tige 1.

[0057] Le logement 4 est dans ce cas une rainure de section rectangulaire dans laquelle le faisceau de fibres optiques 5 est entièrement contenu. Un prisme 6 de base carrée solidaire du faisceau est agencé à l'extrémité distale de la rainure, en vis-à-vis de la fenêtre d'observation (non représentée ici). Diamétralement opposé à la rainure 4 est agencé un méplat portant la surface de capture 2, qui est ici micro-structurée au moyen de plots saillants.

[0058] La figure 3 est une vue de côté de la tige, le logement 4 étant une rainure diamétralement opposée à la surface de capture 2.

[0059] La figure 4 est une vue de l'extrémité distale de la rainure, qui contient le faisceau 5 et un système optique de renvoi 6 agencée à l'extrémité du faisceau.

[0060] Revenant maintenant à la figure 1, le système d'excitation et de détection comprend typiquement une source de lumière L (par exemple un laser) et un photodétecteur D (de préférence un photodétecteur matriciel). La source de lumière émet une lumière à une longueur d'onde d'excitation. Le photodétecteur est agencé pour détecter une lumière à une longueur d'onde d'émission, cette dernière étant notamment produite par un tissu biologique en réponse à la lumière d'excitation. L'extrémité proximale du faisceau, la source de lumière et le photodétecteur sont avantageusement couplés par un système optique de couplage C, par exemple un miroir dichroïque.

[0061] Le photodétecteur est de préférence couplé à un filtre, par exemple un filtre interférentiel, dont la bande passante est centrée sur la longueur d'onde de fluorescence (longueur d'onde d'émission). Ce filtre peut être disposé sur le miroir dichroïque, ou entre ce dernier et le photodétecteur.

[0062] Pour la mise en oeuvre d'une opération de prélèvement, on agence la tige 1 dans le tube guide 7 de sorte que la fenêtre d'observation soit en vis-à-vis de l'ouverture 70 (cf. figure 5).

[0063] Le faisceau étant en position dans son logement de la tige, les fibres optiques collectent le signal lumineux d'excitation émis par la source lumineuse L qui est couplée à l'extrémité proximale du faisceau jusqu'à l'extrémité distale du faisceau. Le signal est dévié par le système de renvoi optique 6 et transmis vers l'environnement extérieur du tube à travers la fenêtre d'observation 3. Ainsi, le signal vient exciter des marqueurs fluorescents qui ont préalablement été injectés au patient qui doit subir le prélèvement, ou des marqueurs fluorescents endogènes, naturellement présents dans les tissus biologiques.

[0064] Lesdits marqueurs émettent alors un signal de fluorescence, qui est transmis au travers de la fenêtre d'observation 3, dévié par le système de renvoi optique 6 et conduit par les fibres optiques jusqu'au photodétecteur D au travers du système optique de couplage C, selon le trajet inverse de celui du signal d'excitation.

[0065] Le faisceau de fibres optiques assure ainsi deux fonctions :

- d'une part, l'illumination des tissus éclairés au travers de la fenêtre d'observation 3;
- d'autre part, la collection d'un signal de fluorescence émis par les tissus éclairés.

[0066] Le photodétecteur est adapté pour détecter un signal de fluorescence émis par les tissus et par conséquent indicateur de la présence ou non des tissus d'intérêt, ces derniers générant un signal de fluorescence détectable par le photodétecteur D.

[0067] Si l'analyse effectuée par le photodétecteur montre que le dispositif est situé dans une région propice, le praticien amène la surface de capture 2 en vis-à-vis de l'ouverture 70 pour la mettre au contact des tissus (cf. figure 6).

[0068] De préférence, la fenêtre d'observation 3 est située à la même position longitudinale de la tige que la surface de capture mais décalée angulairement. Ce décalage angulaire est par exemple de 180° (la surface de capture et la fenêtre d'observation étant diamétralement opposées) mais tout autre angle peut être choisi. De manière avantageuse, le dispositif comprend un système d'indexation angulaire qui lui permet de positionner aisément soit la fenêtre d'observation 3 soit la surface de capture 2 en vis-à-vis de l'ouverture 70 du tube guide 7. Ainsi, une fois que le dispositif est en place dans une région propice au prélèvement, le praticien immobilise le tube guide 7 et se contente de faire pivoter la tige 1 pour amener la surface de capture 2. Il est ainsi certain d'effectuer le prélèvement dans la même région que celle qu'il a observée et choisie.

[0069] Le cas échéant, plusieurs prélèvements peuvent être effectués dans la même région : il suffit à cet effet de retirer du tube guide la tige portant la surface de capture sur laquelle un échantillon a été prélevé et d'insérer une nouvelle tige portant une surface de capture vierge.

[0070] Par ailleurs, une fois que le tube guide a été positionnée dans la région souhaitée, il est possible de retirer le faisceau de fibres optiques de la tige et d'insérer dans le tube guide la tige pourvue uniquement de la surface de capture.

[0071] Enfin, on a mentionné ci-dessus la manipulation du dispositif de prélèvement par un chirurgien mais il est également possible que le dispositif soit manipulé par un robot.

REFERENCES

[0072]

WO 2006/082344

WO 2013/098703

Revendications

1. Dispositif (100) de prélèvement d'un tissu biologique comprenant :

   - une tige (1) s'étendant selon un axe longitudinal (X) entre une extrémité proximale (1a) et une extrémité distale (1b),
   - une surface de capture (2) portée par la tige (1), destinée à être appliquée contre un tissu biologique,
   - une fenêtre d'observation (3) transparente à la lumière visible, agencée dans la surface externe de la tige (1),
   - un logement (4) s'étendant dans la tige, parallèlement à l'axe longitudinal, de l'extrémité proximale (1a) jusqu'à la fenêtre d'observation (3), ledit logement étant apte à recevoir un faisceau de fibres optiques,

   ledit dispositif (100) étant **caractérisé en ce que** la surface de capture est nanoporeuse ou présente des protubérances adaptées pour prélever un tissu biologique par microabrasion.

2. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel la fenêtre d'observation (3) et la surface de capture (2) sont agencées à une même distance de l'extrémité distale de la tige et angulairement espacées.

3. Dispositif selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel ledit logement (4) comprend une rainure agencée dans la surface externe de la tige.

4. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 3, comprenant :

   - un faisceau (5) de fibres optiques disposé dans le logement (4) de la tige de telle sorte qu'une extrémité distale dudit faisceau soit agencée au voisinage de la fenêtre d'observation (3) et
   - un système optique de renvoi (6) adapté pour réaliser un couplage optique entre l'extrémité distale du faisceau et la fenêtre d'observation.

5. Dispositif selon la revendication 4, dans lequel le système optique de renvoi comprend une lame réfléchissante orientée d'un angle compris entre 40 et 50° par rapport à l'axe longitudinal (X) de la tige.

6. Dispositif selon la revendication 5, dans lequel la lame réfléchissante fait partie d'un prisme.

7. Dispositif selon la revendication 6, dans lequel le prisme comprenant la lame réfléchissante est solidaire de l'extrémité distale du faisceau de fibres optiques.

8. Dispositif selon la revendication 4, dans lequel le système optique de renvoi consiste en une extrémité distale biseautée des fibres optiques formant le faisceau.

9. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 8, comprenant en outre un tube guide (7) dans lequel la tige (1) est apte à coulisser, ledit tube guide comprenant une ouverture latérale (70) agencée de telle sorte que lorsque la tige est introduite dans le tube guide la surface de capture et la fenêtre d'observation viennent en vis-à-vis de ladite ouverture latérale (70) selon l'orientation angulaire respective du tube guide et de la tige.

10. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 9, dans lequel la surface de capture est située dans une région distale de la tige (1).

11. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 10, dans lequel la surface de capture est revêtue d'une couche de fonctionnalisation.

12. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 11, dans lequel la tige (1) est en inox ou en PEEK.

13. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 12, dans lequel la tige (1) présente une section décroissante de son extrémité proximale (1a) vers son extrémité distale (1b).

FIG. 1

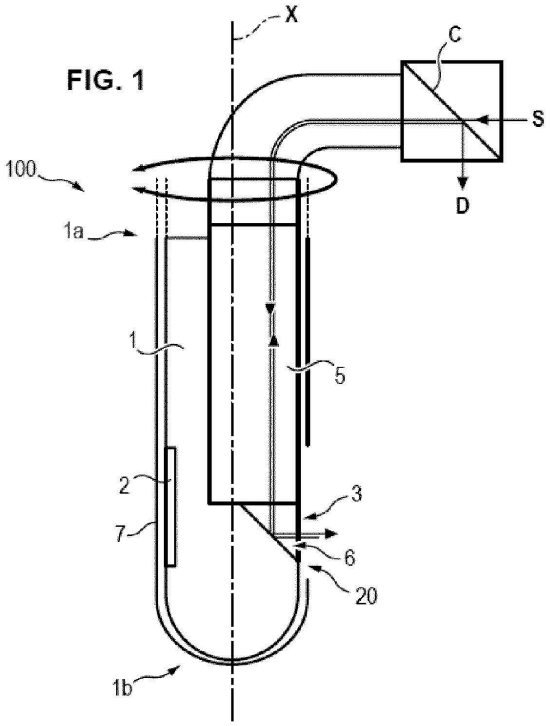
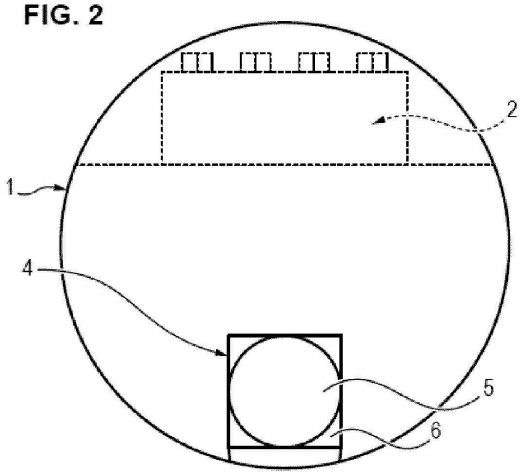


FIG. 2



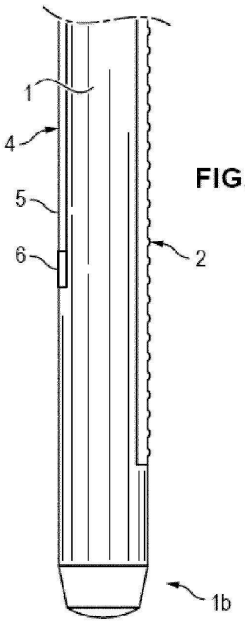


FIG. 3

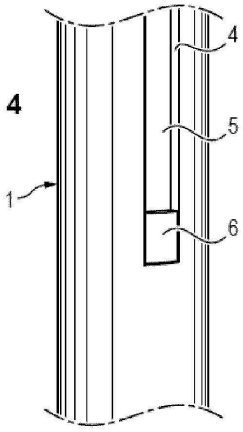


FIG. 4

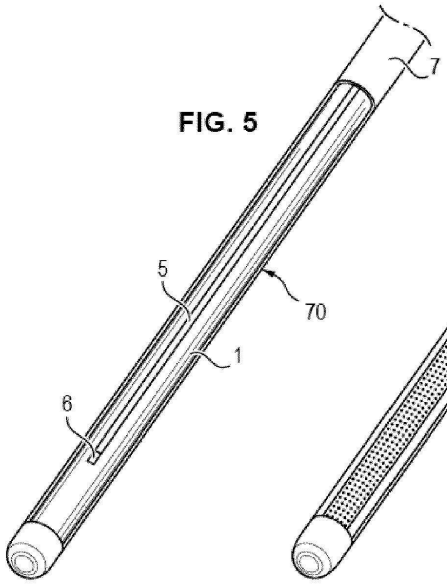


FIG. 5

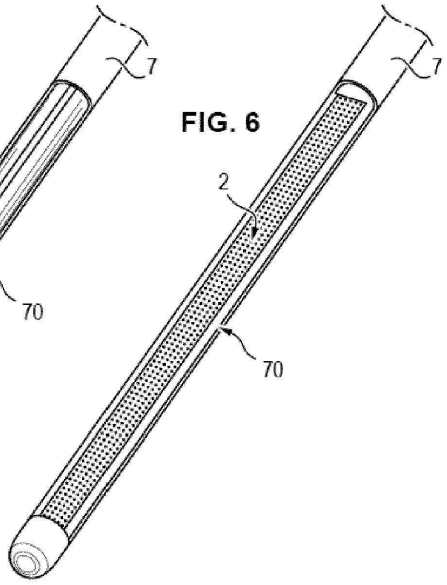


FIG. 6

III.2 Brevet concernant un dispositif d'empreinte tissulaire sur silicium pour la chirurgie coelioscopique.

Souhaitant étendre le concept d'empreinte tissulaire sur silicium à d'autres applications que la neurochirurgie, et tenant compte de nouvelles problématiques biomédicales, plusieurs dessins et brevets sont à l'étude. Parmi les plus significatifs en terme de challenge technologique, le brevet présenté ci-après décrit le concept d'empreinte tissulaire sur silicium appliqué à des abords chirurgicaux par coelioscopie. Plusieurs raisons ont motivé cette approche, et seront rediscutées dans le chapitre Discussion du manuscrit.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **3 007 634**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **13 56289**

(51) Int Cl[8] : ***A 61 B 10/02*** *(2013.01), G 01 N 33/68, C 12 Q 1/00*

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 28.06.13.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 02.01.15 Bulletin 15/01.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Se reporter à la fin du présent fascicule*

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

( ) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** BOUAMRANI MOHAMED-ALI, BERGER FRANCOIS, DREYFUS MATTHIEU et MOMBRUN ADRIEN.

(73) **Titulaire(s) :** COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE ET AUX ENERGIES ALTERNATIVES.

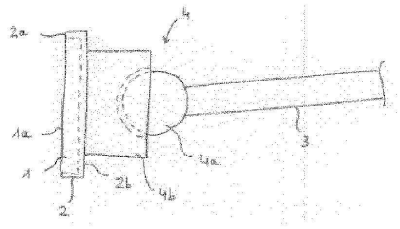
(74) **Mandataire(s) :** REGIMBEAU.

(54) DISPOSITIF DE PRELEVEMENT IN VIVO D'ESPECES BIOLOGIQUES ET PROCEDE AUTOMATISE D'ANALYSE D'ESPECES BIOLOGIQUES CAPTUREES AU MOYEN D'UN TEL DISPOSITIF.

(57) L'invention concerne un dispositif de prélèvement in vivo d'espèces biologiques, comprenant :

- un support de capture (1) en un matériau nanoporeux, présentant une surface (1a) de capture desdites espèces,
- une tige de préhension (3),
- une articulation (4) comprenant un premier membre (4a) couplé à la tige de préhension (3) et un second membre (4b) couplé au support de capture (1), de sorte que la surface (1a) de capture est orientable par rapport à la tige de préhension (3).

L'invention concerne également un procédé automatisé d'analyse d'espèces biologiques capturées au moyen d'un tel dispositif.



FR 3 007 634 - A1

DISPOSITIF DE PRELEVEMENT IN VIVO D'ESPECES BIOLOGIQUES ET PROCEDE AUTOMATISE D'ANALYSE D'ESPECES BIOLOGIQUES CAPTUREES AU MOYEN D'UN TEL DISPOSITIF

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne un dispositif de prélèvement in vivo d'espèces biologiques, ainsi qu'un procédé automatisé d'analyse d'espèces biologiques capturées au moyen d'un tel dispositif.

ARRIERE PLAN DE L'INVENTION

L'analyse tissulaire est le meilleur indicateur pour accéder aux informations biologiques pertinentes provenant directement d'un foyer pathologique.

L'exploration micro-invasive repose principalement sur la ponction-biopsie, qui peut être réalisée sous une voie d'abord endoscopique ou cœlioscopique.

De nombreux dispositifs miniaturisés ont ainsi été développés pour atteindre les organes profonds et le tissu cible en passant de manière atraumatique par les voies naturelles, comme le tube digestif, le système cardiovasculaire, l'appareil urinaire ou l'appareil respiratoire.

Ces biopsies entraînent cependant un risque hémorragique ou infectieux qui n'est pas négligeable du fait des lésions tissulaires occasionnées.

De ce fait, de nombreux territoires pathologiques, tels que la région péri-tumorale laissée en place par le chirurgien restent donc inaccessibles.

De plus, l'important polymorphisme mutationnel requiert un échantillonnage extensif de la tumeur, incompatible avec les approches biopsiques micro-invasives.

D'autre part, en raison de leur coût et du temps requis pour leur mise en œuvre, les procédures actuelles sont difficilement compatibles avec le besoin de disposer d'analyses extemporanées, c'est-à-dire réalisées au bloc opératoire pendant une intervention chirurgicale, afin d'aider les décisions du chirurgien.

L'invention a pour objectif de remédier aux inconvénients des dispositifs existants et de permettre un recueil de molécules pathologiques mais aussi de cellules qui n'occasionne pas de lésion des tissus et qui soit en outre compatible avec des analyses extemporanées.

BREVE DESCRIPTION DE L'INVENTION

Conformément à l'invention, il est proposé un dispositif de prélèvement in vivo d'espèces biologiques, comprenant :

- un support de capture en un matériau nanoporeux, présentant une surface de capture desdites espèces,

- une tige de préhension,

- une articulation comprenant un premier membre couplé à la tige de préhension et un second membre couplé au support de capture, de sorte que la surface de capture est orientable par rapport à la tige de préhension.

On entend par « matériau nanoporeux » un matériau cristallin ou amorphe, d'un seul tenant et de préférence de composition homogène, présentant des pores dont le diamètre moyen est inférieur à un micromètre et en particulier inférieur ou égal à 100 nm. On distingue notamment, parmi les matériaux nanoporeux, les matériaux microporeux, (pores de diamètre moyen compris entre 0,2 et 2 nm), les matériaux mésoporeux (pores de diamètre moyen compris entre 2 et 50 nm) et les matériaux macroporeux (pores de diamètre moyen compris entre 50 et 1000 nm).

De préférence, la porosité dudit matériau, à savoir le rapport entre le volume des pores par rapport au volume total du matériau, est supérieure ou égale à 10%.

Les espèces biologiques susceptibles d'être adsorbées sur ledit matériau nanoporeux peuvent être des cellules (dont le diamètre est compris entre 1 µm et 50 µm environ), des bactéries, des virus, des vésicules circulantes comme les exosomes (diamètre compris entre 20 et 200 nm environ), mais aussi des molécules ou des macromolécules, telles que des protéines (diamètre compris entre quelques nanomètres et quelques dizaines de nanomètres), des peptides (taille de l'ordre du nanomètre), des métabolites. La « taille » de ces molécules s'entend comme leur plus grande dimension.

Le dispositif selon l'invention permet de s'affranchir du prélèvement d'un fragment de tissu en capturant des espèces biologiques par simple contact entre la surface de capture nanoporeuse et le tissu d'intérêt.

Ledit dispositif permet donc de réaliser une empreinte moléculaire et cellulaire s'intégrant aux explorations endoscopiques ou cœlioscopiques, notamment lors de l'abord exploratoire de tissus ou d'organes non biopsiables.

En effet, la surface de capture nanoporeuse a la capacité, au contact du tissu vivant, de capturer une couche de cellules superficielles, de manière non lésionnelle, tout en conservant la structure histologique du tissu ciblé. Ladite surface permet en outre de retenir les espèces moléculaires présentes dans le liquide interstitiel du tissu.

D'autre part, le matériel biologique capturé sur la surface nanoporeuse peut être directement analysé au moyen de techniques histologiques classiques (coloration, immuno marquage), mais aussi par spectrométrie de masse MALDI (imagerie et/ou profilage). Par « directement », on entend que l'analyse est effectuée directement sur le matériel biologique présent sur le support de capture, sans le séparer dudit support.

De manière particulièrement avantageuse, le premier et le second membres de l'articulation sont séparables de sorte à détacher le support de capture de la tige de préhension.

Selon un mode de réalisation, le support de capture est porté par un plateau couplé au second membre de l'articulation.

De préférence, le support de capture est encastré dans le plateau, ledit plateau présentant un rebord affleurant avec la surface de capture, de sorte que seule la surface de capture dudit support soit en contact avec des tissus lors du prélèvement in vivo.

De manière avantageuse, le plateau est démontable du second membre de l'articulation.

De préférence, le plateau est en un matériau électriquement conducteur, ce qui permet de le conserver solidaire du support de capture pour des analyses de type MALDI.

Selon un mode de réalisation, l'articulation est une rotule.

Selon une forme d'exécution de l'invention, le matériau du support de capture est du silicium nanoporeux.

De manière avantageuse, la surface de capture est inscrite dans un cercle de moins de 10 mm de diamètre.

Le dispositif peut en outre comprendre un dispositif d'orientation du support de capture, comprenant un câble s'étendant le long de la tige de préhension et couplé au second membre de l'articulation.

Un autre objet concerne un procédé automatisé d'analyse d'espèces biologiques capturées au moyen d'un dispositif tel que décrit ci-dessus, comprenant :

- la fourniture d'une pluralité de supports de capture comprenant des espèces biologiques adsorbées sur la surface de capture de chaque support,
- la fourniture d'un support de mesure présentant la forme d'une plaque électriquement conductrice comprenant une pluralité de logements dont la forme et les dimensions sont adaptées à celles des supports de capture pour permettre un contact électrique entre le support de mesure et chaque support de capture,
- la mise en place de chaque support de capture dans un logement correspondant du support de mesure,
- le dépôt automatisé d'une matrice organique sur chaque surface de capture,
- l'acquisition automatisée de mesures de spectrométrie de masse sur chaque surface de capture.

Selon une forme d'exécution de l'invention, chaque support de capture est encastré dans un plateau électriquement conducteur, ledit plateau présentant un rebord affleurant avec la surface de capture, et l'on met en place, dans chaque logement du support de mesure, le support de capture et le plateau dans lequel il est encastré.

Selon un mode de réalisation particulier, le support de mesure comprend 96 logements pour des supports de capture.

BREVE DESCRIPTION DES DESSINS

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention ressortiront de la description détaillée qui va suivre, en référence aux dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 est un schéma de principe d'un dispositif de prélèvement selon un mode de réalisation de l'invention,
- les figures 2A à 2D illustrent de manière schématique différentes étapes de l'utilisation d'un tel dispositif de prélèvement,
- la figure 3A est une vue en perspective d'un support de mesure pour l'analyse automatisée d'une pluralité de supports de capture ; la figure 3B est une vue en coupe d'un logement d'un tel support dans lequel sont agencés un support de capture et le plateau dans lequel il est encastré,
- la figure 4 montre des spectres de masse de protéines et de peptides du liquide céphalo-rachidien humain capturés au moyen d'un support de capture en silicium nanoporeux et d'un support de référence lisse,
- la figure 5 montre des spectres de masse obtenus pour deux zones d'une même prostate résultant d'une exérèse.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

La figure 1 illustre de manière schématique un dispositif de prélèvement selon un mode de réalisation de l'invention.

Ledit dispositif comprend un support de capture 1 dont une surface est destinée à former la surface de capture 1a des espèces biologiques à prélever.

La surface de capture 1a peut présenter une forme rectangulaire, circulaire ou toute autre forme.

La surface de capture 1a est généralement plane.

De préférence, la surface de capture 1a est inscrite dans un cercle de moins de 10 mm de diamètre, de sorte à pouvoir être insérée, selon les cas, dans un trocart de cœlioscopie ou un canal opérateur d'endoscopie conventionnel pour être amenée jusqu'aux tissus dans lesquels on souhaite effectuer un prélèvement.

La plus grande dimension de la surface de capture 1a est généralement supérieure à l'épaisseur du support 1.

A titre purement indicatif, la surface de capture peut être un carré de 5 mm de côté, tandis que l'épaisseur du support de capture peut être comprise entre 100 µm et 2 mm, par exemple de l'ordre de 750 µm.

Le support de capture 1 est en un matériau nanoporeux.

Selon un mode de réalisation préféré, le matériau nanoporeux est du silicium nanoporeux.

Avantageusement, ledit silicium nanoporeux peut présenter au moins l'une des propriétés suivantes, et préférentiellement l'ensemble de ces propriétés :

- des pores de structure dendritique,
- des pores de diamètre moyen compris entre 1 et 100 nm,
- une porosité comprise entre 40% et 65% sur une profondeur comprise entre 10 nm et 100 µm.

Un avantage du silicium nanoporeux est qu'il ne nécessite pas de fonctionnaliser la surface de capture pour adsorber des espèces biologiques.

Un autre avantage du silicium nanoporeux est qu'il supporte les traitements de stérilisation classiquement appliqués aux instruments chirurgicaux, en particulier par autoclave.

Du silicium nanoporeux (et plus particulièrement mésoporeux) peut être obtenu par anodisation électrochimique de silicium dopé p+ de conductivité de 10 à 20 mΩ.cm dans une solution d'acide fluorhydrique (HF) à environ 15%. Pour ce faire, le matériau est trempé dans un bain d'HF et soumis à une électrolyse, ce procédé étant en lui-même connu. On obtient de cette façon un matériau présentant une porosité de structure dendritique ; cela signifie que les pores n'ont pas un axe rectiligne et qu'ils s'étendent dans la profondeur du matériau selon une direction discontinue et peuvent se croiser. Cette structure dendritique favorise la succion. La porosité est comprise entre 40 et 65%. La porosité s'étend sur une profondeur d'environ 6 µm ; au-delà, on retrouve le silicium massif. D'une façon générale, pour un support de capture utilisable dans l'invention, la porosité du matériau s'étend sur une profondeur pouvant être comprise entre 10 nm et 100 µm.

Naturellement, c'est une surface poreuse dudit matériau qui est employée comme surface de capture.

En faisant varier les paramètres de fabrication (concentration en HF, temps d'anodisation, densité de courant, type de silicium), on peut faire varier les caractéristiques du silicium nanoporeux.

En variante, il est possible de fabriquer du silicium nanoporeux présentant une structure ordonnée au moyen d'un procédé de lithographie électronique.

Naturellement, tout autre procédé d'obtention de silicium nanoporeux pourrait être utilisé sans pour autant sortir du cadre de la présente invention.

D'autre part, l'invention n'est pas limitée au silicium nanoporeux et l'homme du métier pourrait également choisir un autre matériau nanoporeux, par exemple un copolymère block, un matériau de type sol-gel, un matériau de type SiOCH rendu poreux. De tels matériaux sont notamment rendus poreux par le recours à des agents porogènes, selon des procédés connus.

De manière avantageuse, le support de capture 1 est porté par un plateau 2.

De préférence, ledit plateau 2 présente un logement pour le support, ledit logement étant délimité par un rebord 2a dont la hauteur est sensiblement égale à l'épaisseur du support 1.

Ainsi, la surface de capture 1a affleure avec le rebord 2a du plateau, de sorte que seule la surface de capture 1a est en contact avec les tissus lors du prélèvement.

On évite ainsi que les bords du support de capture, qui sont susceptibles d'être coupants, n'endommagent les tissus.

Par ailleurs, les formes extérieures du plateau 2 sont conçues de sorte à ne pas être agressives pour les tissus ; en particulier, elles ne présentent de préférence pas d'angle vif.

L'encombrement extérieur du plateau 2 est de préférence aussi réduit que possible, de sorte à faciliter son insertion jusqu'au site de prélèvement.

Le plateau est avantageusement en métal ; comme on le verra plus bas, le fait que le plateau soit électriquement conducteur permet de conserver le support de capture 1 dans le plateau 2 pour des analyses de spectrométrie de masse.

Cependant, ce mode de réalisation n'est pas limitatif et l'on peut choisir pour le plateau 2 tout autre matériau approprié susceptible d'être stérilisé.

Le support de capture 1 est maintenu dans son logement par tout moyen, amovible ou non.

Ledit moyen peut comprendre de la colle, notamment une colle biocompatible, un encliquetage, etc.

De manière avantageuse, le plateau peut présenter une forme parallélépipédique ou cylindrique, ce qui facilite son utilisation lorsqu'il est destiné à maintenir le support de capture lors d'analyses ultérieures.

En particulier, si le plateau 2 présente un fond 2b plat, il peut être posé de manière stable sur une table et mis en contact avec un support de mesure plan.

Le dispositif de prélèvement comprend en outre une tige de préhension 3 permettant la manipulation du support de capture 1 lors de son introduction dans le corps et du prélèvement sur les tissus d'intérêt.

Si les tissus sont abordés par cœlioscopie, la tige 3 est rigide, ce qui facilite son insertion au travers d'un trocart.

Si les tissus sont abordés par endoscopie, la tige 3 est flexible, de sorte à pouvoir emprunter des canaux opérateurs.

L'homme du métier est en mesure de sélectionner le matériau approprié pour la tige 3 selon l'application prévue, en tenant compte des contraintes liées à la stérilisation du dispositif.

Le diamètre de la tige est adapté pour le passage au travers d'un trocart ou d'un canal opérateur d'endoscopie.

La longueur de la tige 3 est variable selon le mode de manipulation envisagé.

Si la tige est destinée à être manipulée depuis l'extérieur du corps, sa longueur est supérieure à la distance entre les tissus d'intérêt et l'extérieur du corps.

La tige peut alors présenter une longueur de quelques dizaines de centimètres.

Eventuellement, la tige peut être télescopique.

La tige peut en revanche être plus courte si elle est portée par une pince ou un robot jusqu'au site de prélèvement ; dans ce cas, une longueur de quelques centimètres est suffisante.

La surface de capture 1a est orientable par rapport à la tige 3 par l'intermédiaire d'une articulation 4.

De préférence, ladite articulation est une rotule, car elle autorise le plus grand nombre de degrés de liberté pour l'inclinaison de la surface de capture.

Il est cependant possible de choisir une autre articulation, par exemple une charnière.

L'articulation 4 comprend un premier membre 4a couplé à la tige 3 et un second membre 4b couplé au support de capture, le premier et le second membre étant orientables l'un par rapport à l'autre.

Si l'articulation est une rotule, le premier membre est une bille et le second membre est une coupelle présentant un logement sphérique pour la bille, ou inversement.

De manière optionnelle, les premier et second membres sont séparables l'un de l'autre, par exemple en leur conférant une élasticité suffisante pour permettre une ou plusieurs séquences d'encliquetage et de décliquetage.

L'homme du métier choisit un matériau approprié pour les deux membres de l'articulation, en tenant compte notamment des contraintes de stérilisation et éventuellement de démontage.

Le premier membre 4a est couplé à la tige 3 par tout moyen approprié, amovible ou non.

Ledit premier membre 4a est par exemple collé à l'extrémité de la tige 3, notamment au moyen d'une colle biocompatible.

De manière alternative, le premier membre 4a peut faire partie intégrante de la tige 3, c'est-à-dire fabriqué en une seule pièce avec celle-ci.

Le second membre 4b de l'articulation est couplé au plateau 2, soit en faisant partie intégrante de celui-ci, soit en étant solidarisé à celui-ci, de manière amovible ou non.

Dans le mode de réalisation illustré sur la figure 1, le second membre 4b est représenté comme un composant distinct du plateau 2.

La liaison entre le plateau 2 et le second membre 4b est avantageusement démontable, par exemple par encliquetage, vissage, etc.

Dans ce cas, il n'est pas nécessaire que l'articulation 4 elle-même soit démontable.

De manière alternative, la liaison entre le plateau 2 et le second membre 4b n'est pas démontable.

Le fait de pouvoir séparer le plateau 2 portant le support de capture 1 de la tige 3 (soit en désolidarisant les deux membres 4a, 4b de l'articulation, soit en désolidarisant le plateau 2 du second membre 4b de l'articulation) permet de remplacer un support déjà utilisé par un nouveau support, porté par un nouveau plateau.

On peut ainsi réaliser successivement des prélèvements sur un même site en utilisant la même tige et en y attachant successivement plusieurs supports de capture.

La conception permettant de désolidariser le plateau 2 de l'ensemble constitué de la tige 3 et des deux membres 4a, 4b de l'articulation est préférable car elle permet de conserver le mécanisme le plus complexe pour le réutiliser et de remplacer simplement le plateau, dont la géométrie est généralement plus simple et qui est moins onéreux.

De préférence, on choisit une liaison entre le plateau 2 et le second membre 4b de l'articulation qui soit aisée et rapide à démonter, de préférence sans nécessiter d'outils.

Naturellement, pour des raisons de sécurité, toute liaison démontable dans le dispositif de prélèvement doit être suffisamment forte pour éviter toute désolidarisation intempestive d'un élément vis-à-vis du reste du dispositif, notamment lorsque celui-ci est à l'intérieur du corps.

De préférence, les liaisons démontables sont réalisées par un encliquetage suffisamment rigide pour être convenablement solidarisé au reste du dispositif.

Selon un mode de réalisation (non illustré), la surface de capture 1a est orientable par un utilisateur depuis l'extérieur.

Le dispositif de prélèvement comprend à cet effet un dispositif d'orientation connecté au second membre de l'articulation et actionnable de l'extérieur.

Par exemple, ledit dispositif d'orientation comprend un câble fixé au second membre de l'articulation et s'étendant le long de la tige de préhension 3.

On va maintenant décrire un mode opératoire du dispositif de prélèvement, en référence aux figures 2A à 2D.

D'une manière générale, le dispositif peut être utilisé pour prélever des espèces biologiques dans tout organe ou tissu abordé par endoscopie ou cœlioscopie.

Par exemple, et de manière non limitative, ledit dispositif peut être utilisé pour des prélèvements dans la prostate, dans la vessie, dans l'estomac, etc.

Une fois le support de capture connecté à l'extrémité de la tige de préhension par l'intermédiaire de l'articulation, le dispositif est introduit dans un trocart ou dans un canal opérateur d'endoscopie 5 (figure 2A).

Si la tige de préhension n'est pas suffisamment longue pour être manipulée directement par l'utilisateur depuis l'extérieur, elle est tenue par une pince actionnée manuellement ou par un robot (non illustrée).

Le trocart ou le canal opérateur 5 protège la surface de capture 1a au cours de son insertion puis de son retrait.

Il n'est donc pas nécessaire de munir le dispositif de prélèvement d'une protection spécifique de la surface de capture.

Lorsque le support de capture 1 se trouve au niveau du tissu 6 dans lequel on souhaite faire des prélèvements, on ajuste l'orientation de la surface de capture 1a de sorte à la rendre sensiblement parallèle à la surface 6a du tissu dans la zone de prélèvement (figure 2B), puis on applique la surface de capture contre le tissu, à la manière d'un tampon (figure 2C).

Il n'est pas nécessaire à cet effet d'exercer une pression sur le support de capture, un contact étant suffisant pour permettre la capture des espèces biologiques.

La surface de capture en matériau nanoporeux est lisse au toucher et ne présente pas d'aspérité significative, ce qui minimise les risques de lésion des tissus.

Le prélèvement des espèces biologiques n'est donc pas réalisé par micro-abrasion ni par fonctionnalisation chimique mais par un effet de succion dû aux nanopores.

Cet effet conduit à une fixation préférentielle des peptides et des « petites » molécules, présentant une taille de l'ordre de 1 à 5 nm environ et/ou une masse comprise entre 200 et 20000 Da environ.

Cette propriété est avantageuse car ces petites molécules sont généralement plus utiles en tant que marqueurs que des molécules de plus grandes dimensions.

L'effet de succion explique également l'adhésion des cellules, qui sont trop grandes pour pénétrer dans les pores.

En termes d'usage, le maniement du dispositif est différent d'un dispositif de biopsie tel que décrit dans le document WO 2006/082344, dans lequel la surface de capture est agencée sur une portion de la tige en s'étendant dans un plan parallèle à l'axe longitudinal de la tige.

En effet, dans ce dispositif connu, le geste de l'utilisateur consiste à manipuler la tige tangentiellement au tissu dans lequel on souhaite effectuer un prélèvement, de sorte à y apposer la surface de capture.

Cette nécessité d'une approche tangentielle de la tige peut poser des problèmes d'accessibilité vis-à-vis de certains organes, la longueur de la tige étant susceptible d'empêcher l'accès à des régions de petites dimensions.

Au contraire, avec un dispositif orientable selon l'invention, l'utilisateur manipule la tige dans une direction qui n'est pas nécessairement tangentielle au tissu mais qui peut être inclinée par rapport à celui-ci, en orientant la surface de capture de sorte à ce qu'elle vienne en contact du tissu parallèlement à celui-ci.

Grâce à cette faculté d'orienter sélectivement uniquement le support de capture 1a et le second membre 4b de l'articulation, qui présentent des dimensions réduites, par

rapport à la tige 3, il est possible d'accéder plus facilement aux tissus d'intérêt, même lorsque la zone de prélèvement est de petites dimensions.

Comme indiqué plus haut, l'orientation de la surface de capture 1a par rapport à la tige peut être réalisée par un dispositif d'orientation incorporé au dispositif de prélèvement.

Par exemple, s'il s'agit d'un câble, une traction de l'utilisateur permet de faire varier l'inclinaison du second membre de l'articulation par rapport au premier.

Cependant, le dispositif de prélèvement peut également être passif, c'est-à-dire ne pas comprendre lui-même de moyen permettant d'ajuster l'orientation de la surface de capture depuis l'extérieur.

Dans ce cas, et comme illustré sur la figure 2B, l'orientation de la surface de capture 1a est réalisée en manipulant le second membre 4b de l'articulation au moyen d'une pince 7 introduite au niveau du site de prélèvement par un autre trocart ou canal opérateur 8, ladite pince 7 étant manipulée par l'autre main de l'utilisateur, par un autre utilisateur ou par un robot, jusqu'à ce que la surface de capture 1a soit orientée de manière adéquate par rapport au tissu 6.

Une fois que le prélèvement a été effectué, l'utilisateur retire le dispositif de prélèvement par le trocart ou le canal opérateur par lequel il a été introduit.

En vue d'analyser les espèces capturées, on sépare le support de capture 1a (éventuellement solidaire du plateau 2 et/ou du second membre de l'articulation) du reste du dispositif de prélèvement (cf. figure 2D).

Si d'autres prélèvements sont à effectuer, il suffit de remettre en place un support de capture vierge (éventuellement solidaire d'un nouveau plateau et/ou d'un nouveau second membre de l'articulation) pour un nouveau prélèvement.

Un rinçage du support de capture permet de retirer les espèces qui n'auraient pas été adsorbées sur la surface de capture et/ou des impuretés qui se seraient déposées sur celle-ci.

On analyse ensuite les espèces biologiques capturées dans le support de capture.

De préférence, cette analyse est effectuée de manière extemporanée, c'est-à-dire au bloc opératoire, afin d'éclairer rapidement le chirurgien sur la poursuite de l'intervention chirurgicale.

Par exemple, dans le cas de la prostatectomie, le chirurgien effectue des empreintes tissulaires au niveau de la région qu'il a déjà retirée, et le résultat des analyses lui permet de déterminer s'il subsiste des tissus cancéreux à retirer ou s'il peut cesser l'intervention.

Ceci permet d'éviter de retirer plus de tissus que nécessaire et minimise ainsi les risques de séquelles (incontinence, impuissance) pour le patient.

De manière particulièrement avantageuse, le support de capture peut être utilisé directement pour réaliser ces analyses, sans qu'il soit nécessaire de désorber les espèces du matériau nanoporeux pour les en séparer.

Ainsi, le support de capture, éventuellement solidaire du plateau, peut être introduit dans un appareillage de mesure adapté pour analyser les espèces capturées.

Typiquement, les analyses peuvent être effectuées par spectrométrie de masse avec désorption laser, de type MALDI ou SELDI.

Le profil protéique obtenu est en effet spécifique de la nature pathologique ou non du tissu étudié et constitue un complément à l'analyse histologique clinique.

Pour la mise en œuvre de la spectrométrie de masse directement sur le support de capture, le matériau nanoporeux doit être de préférence électriquement conducteur, ce qui est le cas du silicium nanoporeux.

De manière alternative, si le matériau nanoporeux n'est pas électriquement conducteur, le support de capture doit être suffisamment fin pour permettre une analyse de type MALDI ou SELDI. Dans un tel cas, il est déposé sur un matériau électriquement conducteur.

De manière avantageuse, si le plateau est également électriquement conducteur, le support de capture peut être maintenu dans le plateau et l'ensemble est introduit dans le spectromètre de masse.

Au préalable, on dépose sur la surface de capture une matrice organique appropriée qui co-cristallise avec les espèces adsorbées et permet ensuite leur désorption par le laser.

Cette technique étant connue de l'homme du métier, elle ne sera pas décrite en détail ici.

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, il est possible d'analyser de manière automatisée une pluralité de supports de capture.

A cet effet, comme illustré sur la figure 3A, l'invention propose un support de mesure 9 dont les dimensions sont adaptées pour son introduction dans le spectromètre de masse et qui présente un logement 9a ou une pluralité de logements 9a adaptés pour recevoir les supports de capture (éventuellement encastrés dans les plateaux précités).

Le support de mesure présente avantageusement la forme d'une plaque et est réalisé en un matériau électriquement conducteur.

Chaque logement 9a présente une forme et des dimensions sensiblement identiques à celles de la surface de capture 1a (ou, le cas échéant, de la forme extérieure du plateau 2), de sorte que le support de capture 1 et, le cas échéant le plateau 2, soit encastrés dans le support de mesure, de sorte à assurer un contact électrique entre le support de mesure et le support de capture.

La figure 3B est une vue en coupe du support de mesure 9 dans lequel un support de capture 1 et le plateau dans lequel il est encastré sont reçus dans un logement 9a.

De préférence, la surface de capture 1a est affleurante avec la surface du support de mesure 9.

De manière particulièrement avantageuse, le support de mesure comprend 96 logements agencés de sorte à rendre ledit support de mesure compatible avec les dispositifs automatisés existants de traitement des échantillons (notamment de dépôt de la matrice organique) et d'analyse.

En variante ou en complément, on peut effectuer des analyses par imagerie, notamment imagerie de fluorescence ou colorimétrie.

Il est également possible d'acquérir des images de microscopie électronique en balayage de la surface de capture.

Il est également possible d'analyser directement les espèces capturées par la surface de capture au moyen de techniques histologiques classiques (coloration, immuno marquage) sur tissu frais, ce qui n'est pas réalisable sur un tissu prélevé par biopsie conventionnelle, pour lequel il est nécessaire au préalable de figer le tissu (par exemple par congélation, fixation et/ou inclusion en paraffine) afin de générer des coupes histologiques.

Validations expérimentales

Un support de capture en silicium nanoporeux a été testé au moyen d'un essai ex vivo consistant à déposer 10 µl de liquide céphalo-rachidien humain directement sur la surface de capture.

Ensuite, la surface a été rincée deux fois à l'aide d'un tampon acide (acétate de sodium 100 mM, pH 4,0) pendant 1 minute. Ce rinçage permet d'éliminer les espèces n'ayant pas adhéré à la surface de capture et/ou des impuretés (résidus de tissu, sang, etc.). Ensuite, la surface a été rincée encore une fois dans l'eau, puis elle a été séchée à l'air libre. Une matrice organique (acide sinapinique pour l'analyse des protéines, ou CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) pour l'analyse des peptides) a été déposée sur la surface de capture, qui a ensuite été soumise à une analyse au moyen d'un spectromètre de masse SELDI du commerce (Biorad PCS 4000).

Les paramètres de lecture ont été réglés en fonction de l'échelle de masse des espèces à détecter. Les conditions optimales ont été déterminées manuellement sur quelques spots avant de lancer l'acquisition automatique sur 583 impacts laser répartis régulièrement pour chaque échantillon :

- pour les peptides (bas poids moléculaire), on a utilisé une intensité de 1000 nJ et une atténuation du signal de matrice à 500 Da,
- pour les protéines (haut poids moléculaire), on a utilisé une intensité de 2200 nJ et une atténuation du signal de matrice à 1000 Da.

La même analyse a été réalisée à titre comparatif et avec le même protocole en utilisant comme support de capture un porte-substrat du type normalement utilisé en spectrométrie de masse, à savoir une barrette métallique lisse sur laquelle est déposé un polymère, dont la référence est Biorad CM10.

Les résultats sont représentés sur la figure 4, où les graphiques supérieurs ont été obtenus avec le porte-substrat lisse de référence et les graphiques inférieurs avec le support de capture en silicium nanoporeux.

Concernant les protéines (graphes de droite), on observe que les « petites » protéines sont fixées efficacement sur la surface de capture de silicium nanoporeux tandis que les « grandes » protéines, et notamment l'albumine sont sensiblement éliminées.

La différence entre les deux supports est encore plus nette dans le cas des peptides (graphes de gauche : ces derniers sont largement éliminés par rinçage dans le cas du support lisse alors que dans le cas du support de capture nanoporeux on observe un spectre très riche.

Un autre essai a été mis en œuvre ex vivo pour caractériser la capacité du support de capture nanoporeux employé dans l'invention à fournir des informations différenciées en fonction de la zone de prélèvement sur un même organe.

A cet effet, le dispositif de prélèvement comprenant un support de capture en silicium nanoporeux a été employé pour réaliser une empreinte extemporanée d'un tissu de prostate sur une pièce d'exérèse fraîche.

A cet effet, le tissu frais a été apposé sur la surface de capture, puis la surface de capture a été rincée deux fois avec de l'éthanol 100% pendant 1 minute.

Ensuite, la surface de capture a été rincée rapidement dans de l'eau et a été laissée à sécher à l'air libre.

Une matrice organique (1 à 2 µl de CHCA) a été déposée sur la surface de capture, puis une analyse MALDI a été effectuée directement sur la surface de capture.

Le dispositif utilisé est un équipement MALDI TOF TOF Ultraflex Extreme de Bruker, les paramètres étant : énergie Laser comprise entre 60 et 70 %, atténuation du signal de matrice (Déflecteur) à 500 Da, en mode linéaire.

Les deux graphes de la figure 5 montrent le profilage protéique (intensité en fonction du rapport m/z) obtenu par spectrométrie MALDI pour deux zones différentes de la prostate.

On observe que les profils sont différents d'une zone à l'autre, ce qui montre que le support de capture permet de rendre compte des spécificités des tissus de deux zones d'un même organe.

Enfin, il va de soi que les exemples que l'on vient de donner ne sont que des illustrations particulières en aucun cas limitatives quant aux domaines d'application de

l'invention, notamment en ce qui concerne les indications médicales et les espèces à analyser.

REFERENCES

WO 2006/082344

REVENDICATIONS

1. Dispositif de prélèvement in vivo d'espèces biologiques, comprenant :

- un support de capture (1) en un matériau nanoporeux, présentant une surface (1a) de capture desdites espèces,

- une tige de préhension (3),

- une articulation (4) comprenant un premier membre (4a) couplé à la tige de préhension (3) et un second membre (4b) couplé au support de capture (1), de sorte que la surface (1a) de capture est orientable par rapport à la tige de préhension (3).

2. Dispositif selon la revendication 1, caractérisé en ce que le premier (4a) et le second (4b) membres de l'articulation (4) sont séparables de sorte à détacher le support de capture (1) de la tige de préhension (3).

3. Dispositif selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le support de capture (1) est porté par un plateau (2) couplé au second membre (4b) de l'articulation.

4. Dispositif selon la revendication 3, caractérisé en ce que le support de capture (1) est encastré dans le plateau (2), ledit plateau (2) présentant un rebord (2a) affleurant avec la surface (1a) de capture, de sorte que seule la surface (1a) de capture dudit support soit en contact avec des tissus lors du prélèvement in vivo.

5. Dispositif selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que le plateau (2) est démontable du second membre (4a) de l'articulation.

6. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le plateau (2) est en un matériau électriquement conducteur.

7. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'articulation (4) est une rotule.

8. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le matériau du support de capture (1) est du silicium nanoporeux.

9. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la surface (1a) de capture est inscrite dans un cercle de moins de 10 mm de diamètre.

10. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un dispositif d'orientation du support de capture, comprenant un câble s'étendant le long de la tige de préhension et couplé au second membre de l'articulation.

5

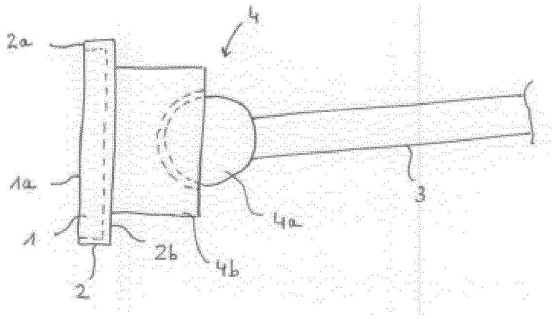


FIGURE 1

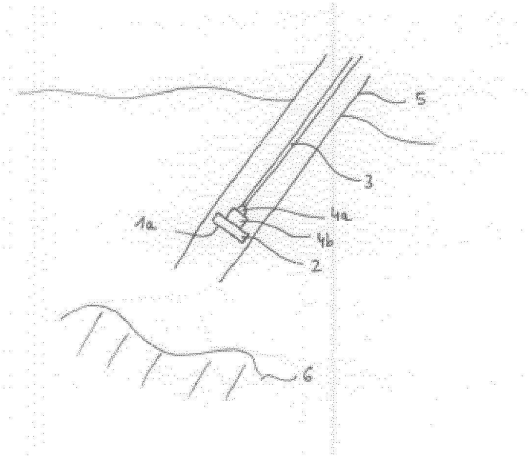


FIGURE 2A

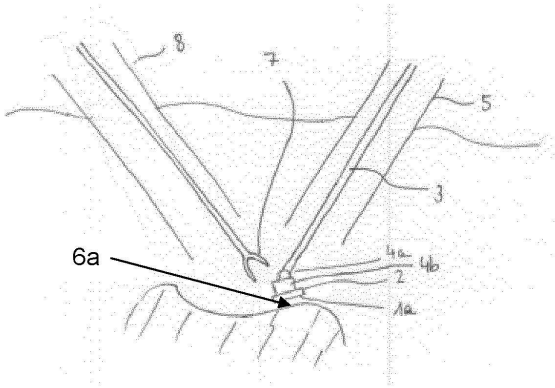


FIGURE 2B

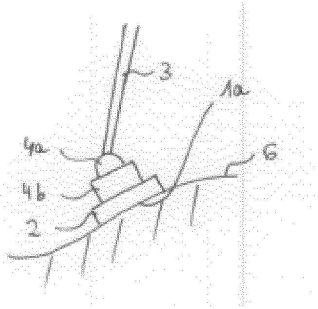


FIGURE 2C

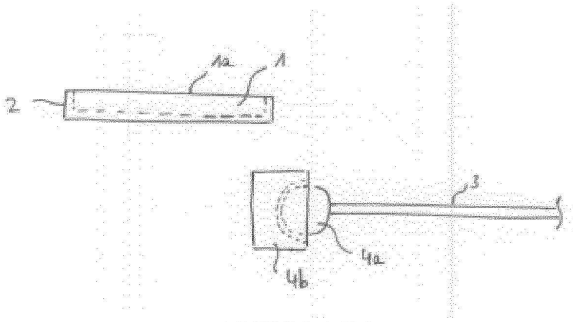


FIGURE 2D

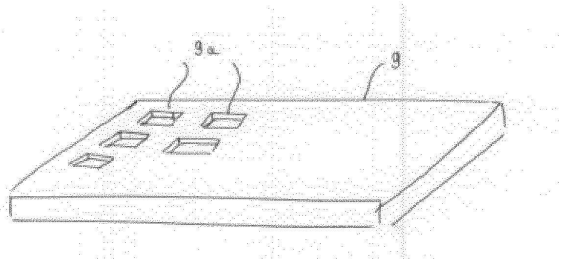


FIGURE 3A

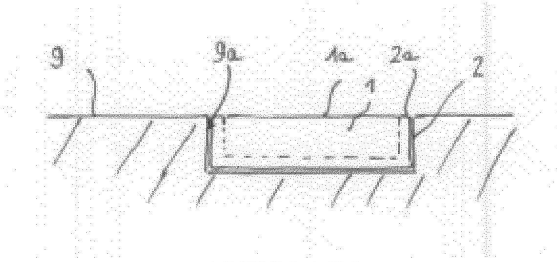


FIGURE 3B

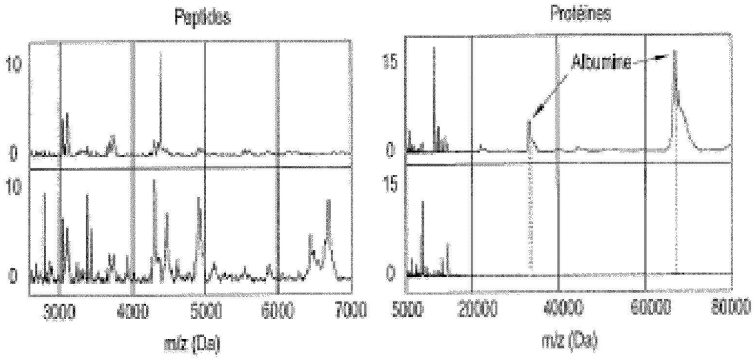


FIGURE 4

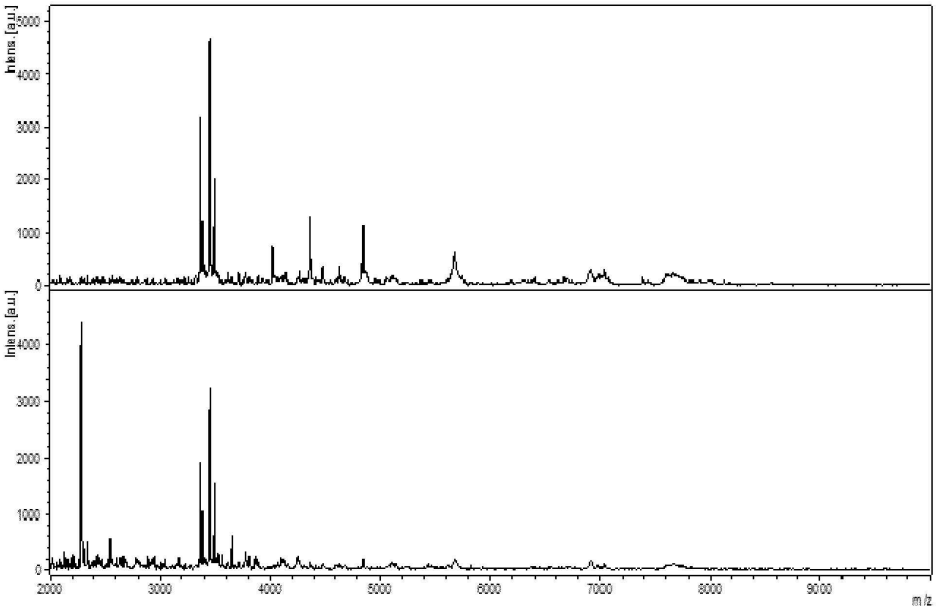


FIGURE 5

DISCUSSION

Tout au long de la thèse, un travail coordonné impliquant des équipes pluridisciplinaires associant un panel de compétences variées (médecine, biologie, technologies de fabrication, optique, mécanique...) a permis de mettre au point un procédé robuste de fabrication de silicium poreux à usage médical. Ce travail de longue haleine démarre d'une problématique biomédicale, se déplace par va et vient entre les salles blanches, les laboratoires de biologie, la plateforme préclinique, les ateliers d'usinage ... et retourne à la clinique.

Ainsi, nous montrons aujourd'hui qu'un matériau connu historiquement pour ses propriétés dans le domaine de la micro électronique constitue également une voie d'avenir pour l'exploration fonctionnelle du tissu nerveux. L'intégration des puces de silicium poreux dans un dispositif médical miniaturisé (1,2mm de diamètre externe) permet d'accéder à l'information biologique contenue dans les tissus, et jusqu'alors inaccessible par des approches conventionnelles comme la biopsie. Dans cet esprit de synergie multidisciplinaire, nous avons souhaité prendre en compte, dès les phases les plus en amont de la R&D, l'ensemble des contraintes règlementaires et pratiques autour des dispositifs médicaux (DM). Le procédé établi met en avant le grande maîtrise des départements du Léti autour des savoirs-faire de fabrication de micro-nano surfaces et objets en silicium. Aujourd'hui, une production reproductible à large échelle (plus de 2000 puces sur un *wafer* de 200mm), entièrement automatisée et à des coûts relativement faibles (pour le marché de la santé) est possible. Le fait d'avoir développé ces procédés dans l'environnement extrêmement contrôlé des salles blanches, à l'aide de machines dédiées à la réalisation de pré-séries, sur le site de Grenoble sera sans nul doute un facilitateur du transfert de cette production à un format industriel.

Nous considérons dès le design expérimental non seulement les prérequis apportés par les normes, ISO10993 (évaluation de la biocompatibilité des DM) ou ISO13485 (normes de fabrications) mais également les aspects purement pratiques, pragmatiques, qui rendent le dispositif compatible avec un usage dans une routine clinique déjà établie. L'écoute des praticiens hospitaliers et les nombreuses itérations tout au long de la conception doivent garantir que les dispositifs développés soient simples d'utilisation et idéalement "presse bouton".

Au travers des expériences réalisées dans ce travail, nous montrons que le silicium poreux, au contact des tissus biologiques, capte des micro fragments qui sont pleinement exploitables pour des analyses biologiques multimodales. La démonstration d'opérabilité

clinique effectuée chez le primate non humain montre l'absence de toxicité aiguë et souligne une caractéristique unique du dispositif, sa capacité à conserver la distribution spatiale des espèces biologiques recueillies par rapport à leur origine tissulaire. Il faut souligner ici l'importance de l'utilisation des gros animaux en recherche biomédicale quand on sait la discussion sociétale sur le sujet. Une grosse part de mon travail a été de maîtriser cette recherche préclinique en dimensionnant à chaque fois le besoin par rapport aux questions posées et en mettant en place des protocoles en adéquation avec la règlementation en vigueur qui respectent le bien-être de l'animal de laboratoire. De plus, la problématique de l'analyse de la biocompatibilité des nanomatériaux est majeure. Nous introduisons des paramètres nouveaux qui complètent fortement les explorations classiques demandées par les agences réglementaires. L'analyse fine en protéomique ou transcriptomique des modifications induites à l'interface instrument/tissu sont autant de nouvelles approches analytiques qui renforcent les données que nous avons obtenues sur la sécurité de son utilisation dans le cerveau.

La compatibilité de notre approche avec des techniques d'analyse à grande échelle, comme la spectrométrie de masse MALDI TOF, rend possible un décryptage prospectif pouvant conduire à l'identification de candidats biomarqueurs reflétant la physiopathologie tissulaire.

La poursuite des travaux initiés sur l'effet cellulaire induit par le contact avec les matériaux nanostructurés laisse penser qu'au-delà de l'effet d'adhésion, qui permet de capter du tissu, il est tout à fait possible que la nanostructuration soit en elle-même un facteur de modulation du phénotype cellulaire. La compréhension de ces effets met en lumière une possible utilisation de ce matériau comme une stratégie de thérapie anti invasive. Une étude par microscopie de force atomique est envisagée pour caractériser les propriétés mécaniques de l'interface entre cellules et nanomateriau. Des expériences de séquençage protéomique viendront également enrichir les informations dont nous disposons pour comprendre comment le phénotype cellulaire peut être influencé par le matériau, en fonction de sa nanostructuration.

Ce travail a également permis de mettre au point et de montrer la faisabilité de guider le geste d'empreinte par la détection de fluorescence. Les expériences préliminaires ont établi la preuve de concept et servi de base pour dresser le cahier des charges d'un prototype intégrant la réponse à tous les problèmes techniques recensés. Les briques technologiques associées à ce dernier ont été sécurisées dans une demande de brevet. Avoir démontré que

notre solution peut détecter *in situ* des traceurs fluorescents à usage clinique (validés ou en cours de validation) nous permet d'envisager de tester au plus vite cette solution dans un essai clinique de phase précoce.

Nous considérons cette stratégie d'investigation moléculaire des tissus comme un complément de choix aux approches conventionnelles d'imagerie interventionnelle macroscopique (épifluorescence, TDM per-opératoire, IRM intra opératoire). L'exploration des tumeurs cérébrales doit intégrer une vision régionale multimodale associant l'IRM, la médecine nucléaire et le décryptage moléculaire, lui aussi multi-échelle. C'est un pré-requis indispensable pour avoir une vision globale de l'hétérogénéité tumorale et des mécanismes en jeu dans la récidive au niveau des berges d'exérèse. Cela impliquera de disposer d'outils d'analyse et de traitement de données nous permettant de passer du "big data" au "smart data" pour extraire les constituants moléculaires responsables de la dynamique de récidive. Les outils que nous développons devraient aider à apporter rapidement de précieuses informations sur ces mécanismes.

Le concept d'empreinte tissulaire initialement conçu pour l'investigation des tumeurs cérébrales a fait son chemin depuis les premières phases de conception jusqu'à sa validation en cours dans un essai clinique visant l'exploration tissulaire dans le contexte du glioblastome multiforme. L'opérabilité clinique du dispositif princeps et l'absence de toxicité ont été démontrées chez l'Homme sur un petit nombre de malades dans un environnement médico-chirurgical hautement sécurisé, et l'essai clinique s'ouvre aujourd'hui à une phase multicentrique pour accélérer la validation règlementaire. Cette dernière aboutira dans un futur proche à l'obtention du marquage CE et à la commercialisation de l'outil. Dans cette optique, un projet de création d'une startup émanant du laboratoire a vu le jour. Ce projet a été récompensé en 2014 par le premier prix du concours Biovision Catalyzer soutenu par Lyon Biopôle. Plus récemment, il a été soumis dans le cadre du 17ème concours national d'aide à la création d'entreprises innovantes (iLAB 2015) et a été primé par le grand prix du jury. La visibilité et l'aide financière ainsi obtenues ont permis d'aboutir à la réalisation de ce projet, et la startup "Medimprint" déposera ses statuts à la chambre de commerce et d'industrie de l'Isère dans les mois qui viennent. La concrétisation de ce projet permettra, dans un futur proche, d'assurer la continuité logique de développement du concept princeps et de soutenir la R&D pour les versions ultérieures du dispositif, appliquées à d'autres pathologies. En effet, avec le vieillissement global de la population, l'incidence des maladies

neurodégénératives et des cancers connaît une hausse considérable, faisant de ces maladies des enjeux de santé publique de premier ordre. Nous avons réalisé, en interagissant avec les cliniciens, à quel point le concept que nous avons mis au point est universel et peut s'intégrer à la caractérisation de nombreuses autres pathologies.

Parmi ces dernières, les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson) rencontrent un besoin crucial et urgent d'outils permettant d'accéder au tissu et de comprendre les phénomènes moléculaires qui sous-tendent la pathologie. Ces pathologies, comme décrit dans le premier manuscrit de publication rapporté dans cette thèse, sont aujourd'hui ciblées par la neurostimulation pour leur traitement symptomatique. De fait, les développements que nous avons conduits autour de l'utilisation du silicium poreux pour capter du tissu rendent abordable la perspective d'introduire notre outil d'empreinte dans ces paradigmes chirurgicaux pour réaliser des empreintes chez les patients atteints par ces troubles. Nous pourrions ainsi construire une large banque moléculaire prospective permettant l'analyse moléculaire des noyaux profonds qui dégénèrent.

Pour parvenir à cela, quelques étapes de validation règlementaires restent à effectuer avant de demander une autorisation d'essai clinique. Dans le but de soutenir cette démarche, une demande de financement a été soumise et acceptée dans le cadre de l'appel d'offre européen EuroNanomedII. Le projet Brainomics (*Nanoporous Silicium for molecular fingerprinting in neurodegenerative disorders*) vise l'utilisation du silicium nanoporeux pour un décryptage "polyomic" des pathologies neurodégénératives. Il regroupe un réseau international d'industriels, de centres de neurochirurgie, de biologie à grande échelle, d'expertise en traitement de données de type BigData et d'experts en éthique pour réfléchir à l'impact sociétal du développement de la nanomédecine. La conduite de ce projet financera les dernières étapes règlementaires de validation et la réalisation d'un essai clinique multicentrique international. Dans le cadre des pathologies neurodégénratives, la stratégie d’empreinte moléculaire se justifie au décours des approches de neurostimulation. Elle devrait permettre de recueillir de l’information moléculaire indispensable au décryptage des mécanismes qui provoquent la dégénérescence. Cet aspect est un pré requis indispensable pour entrer enfin, comme en cancérologie, dans l’aire des thérapies ciblées. Après notre essai clinique, l’empreinte moléculaire pourrait ainsi devenir l’équivalent de la biopsie en cancérologie, et être indiquée indépendamment de la DBS pour rechercher les cibles et prescrire de façon personnalisée une thérapeutique à visée neuroprotectrice.

Au-delà des pathologies cérébrales, nous adressons également à présent la problématique de déclinaison du concept d'empreinte tissulaire aux pathologies pulmonaires, hépatiques et prostatiques. Deux axes de recherche se dégagent ainsi.

D'une part, pour les pathologies pulmonaires et hépatiques, le standard actuel de biopsie par section des tissus peut générer fréquemment des complications (saignements, pneumothorax...). Apporter dans ce contexte des solutions d'analyse complémentaires rejoint la problématique de mieux annoter la complexité des territoires tumoraux, et peut s'avérer un outil précieux en complément de l'analyse anotomopathologique. Pour parvenir à une intégration optimale du dispositif dans les différentes spécialités, en particulier pour le poumon, nous avons établi un réseau de proximité qui implique les différents services du CHU de Grenoble, le pôle de radiologie, les anatomopathologistes, la startup Medimprint, une entreprise de micro usinage et Clinatec. Ensemble, nous avons élaboré plusieurs dossiers de demandes de financements dont nous attendons un retour prochain.

Nous visons la réalisation prototypique d'un dispositif d'empreinte usiné dans un matériau flexible, pouvant s'adapter aux contraintes mécaniques exercées sur l'organe cible du fait des mouvements respiratoires pendant la réalisation de l'empreinte tissulaire. Ceci permettrait de limiter considérablement la survenue de complications liées au geste. Nous avons de plus une collaboration avec la société IMACTIS spécialisée dans la radiologie interventionnelle assistée par ordinateur. Notre idée est d'implémenter sur le dispositif d'empreinte un système de marquage radiologique qui permette de calculer *a priori*, et en tenant compte des contraintes mécaniques et du module de déformation de l'instrument, la trajectoire optimale pour atteindre la région de l'organe ciblée, ou la correction à appliquer en temps réel sous contrôle scanner.

D'autre part, pour adresser la problématique des tumeurs de la prostate, nous avons breveté un dessin permettant d'intégrer des puces de silicium poreux (dans un nouveau format) à des instruments de chirurgie coelioscopique. Les tumeurs de la prostate représentent une très importante proportion des cancers dans la population. La prostatectomie radicale constitue un paradigme emblématique puisque la question de l'extensivité de l'exérèse a pour pendant des conséquences symptomatiques dramatiques comme l'impuissance et l'incontinence, chez des sujets parfois jeunes. La mise au point d'une méthode de profilage

moléculaire extemporané sur silicium pourrait aider le chirurgien, dans le temps opératoire, à décider d'épargner ou de réséquer les bandelettes neurovasculaires, limitant ainsi les déficits fonctionnels pour les patients. Nous avons initié ce travail en montrant que des données protéomiques peuvent être obtenues par apposition de silicium poreux sur des pièces opératoires. D'une manière générale, une démonstration réussie dans ce contexte ouvre de nouveau la voie à de nombreuses autres applications puisque la chirurgie coelioscopique est aujourd'hui très largement pratiquée pour les indications digestives et gynécologiques. Ceci sous entend qu'à moyen terme, de nombreux autres organes pourraient être abordés grâce à la technologie que nous avons développée.

D'une manière générale, nous mettons en évidence au travers de ce travail l'immense potentiel de la technique d'empreinte tissulaire. De grandes orientations stratégiques sont possibles et apportent de nombreuses questions scientifiques à adresser dans le futur. Les briques technologiques "silicium poreux" et "couplage optique" permettent d'envisager de répondre à de nombreuses problématiques biomédicales majeures. Ces développements favorisent la création de réseaux entre l'hôpital, le laboratoire et les industriels, dans le but d'apporter rapidement des solutions technologiques dans l'intérêt des patients, faisant de la recherche translationnelle une réalité de terrain.

Winston Churchill me permet ici de terminer la réflexion pour mieux la poursuivre...

"Now this is not the end. It is not even the beginning of the end.
But it is, perhaps, the end of the beginning."

BIBLIOGRAPHIE

1. The Human Brain Project - Human Brain Project. at <https://www.humanbrainproject.eu/>

2. Damasio, H., Grabowski, T., Frank, R., Galaburda, A. M. & Damasio, A. R. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* **264,** 1102–5 (1994).

3. Augustinack, J. C. *et al.* H.M.'s contributions to neuroscience: A review and autopsy studies. *Hippocampus* (2014). doi:10.1002/hipo.22354

4. Mirnics, K. & Pevsner, J. Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat. Neurosci.* **7,** 434–9 (2004).

5. Choudhary, J. & Grant, S. G. N. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nat. Neurosci.* **7,** 440–5 (2004).

6. Rhein, M. *et al.* DNA methylation results depend on DNA integrity-role of post mortem interval. *Front. Genet.* **6,** 182 (2015).

7. Koppelkamm, A., Vennemann, B., Lutz-Bonengel, S., Fracasso, T. & Vennemann, M. RNA integrity in post-mortem samples: influencing parameters and implications on RT-qPCR assays. *Int. J. Legal Med.* **125,** 573–80 (2011).

8. Stan, A. D. *et al.* Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Res.* **1123,** 1–11 (2006).

9. Barton, A. J., Pearson, R. C., Najlerahim, A. & Harrison, P. J. Pre- and postmortem influences on brain RNA. *J. Neurochem.* **61,** 1–11 (1993).

10. Webster, M. J. Tissue preparation and banking. *Prog. Brain Res.* **158,** 3–14 (2006).

11. Kulkarni, A. V, Guha, A., Lozano, A. & Bernstein, M. Incidence of silent hemorrhage and delayed deterioration after stereotactic brain biopsy. *J. Neurosurg.* **89,** 31–5 (1998).

12. Hall, W. A. The safety and efficacy of stereotactic biopsy for intracranial lesions. *Cancer* **82,** 1749–55 (1998).

13. Shakal, A. A. S. & Mokbel, E. A. H. Hemorrhage after stereotactic biopsy from intra-axial brain lesions: incidence and avoidance. *J. Neurol. Surg. A. Cent. Eur. Neurosurg.* **75,** 177–82 (2014).

14. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114,** 97–109 (2007).

15. Zülch K.J. Histological typing of tumours of the central nervous system. *World Heal. Organ.* (1979).

16. Daumas-Duport, C. *et al.* Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. *J. Neurooncol.* **34,** 61–78 (1997).

17. Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P. & Fallet-Bianco, C. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann. Pathol.* **20,** 413–28 (2000).

18. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* **285,** 1182–6 (1971).

19. Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. & Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* **133,** 275–88 (1971).

20. Gilbert, M. R. *et al.* A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **370,** 699–708 (2014).

21. Tanaka, S. *et al.* Stereotactic radiosurgery for intracranial gliomas. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **24,** 605–12 (2013).

22. Beccaria, K. *et al.* Opening of the blood-brain barrier with an unfocused ultrasound device in rabbits. *J. Neurosurg.* **119,** 887–98 (2013).

23. Coluccia, D. *et al.* First noninvasive thermal ablation of a brain tumor with MR-guided focused ultrasound. *J. Ther. ultrasound* **2,** 17 (2014).

24. Dervishi, E. *et al.* Transcranial high intensity focused ultrasound therapy guided by 7 TESLA MRI in a rat brain tumour model: a feasibility study. *Int. J. Hyperthermia* **29,** 598–608 (2013).

25. Phillips, W. T., Bao, A., Brenner, A. J. & Goins, B. A. Image-guided interventional therapy for cancer with radiotherapeutic nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **76,** 39–59 (2014).

26. Phillips, W. T. *et al.* Rhenium-186 liposomes as convection-enhanced nanoparticle brachytherapy for treatment of glioblastoma. *Neuro. Oncol.* **14,** 416–25 (2012).

27. Sottoriva, A. *et al.* Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** 4009–14 (2013).

28. Van den Bent, M. J. Interobserver variation of the histopathological diagnosis in clinical trials on glioma: a clinician's perspective. *Acta Neuropathol.* **120,** 297–304 (2010).

29. Coons, S. W., Johnson, P. C., Scheithauer, B. W., Yates, A. J. & Pearl, D. K. Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* **79,** 1381–93 (1997).

30. Bruner, J. M., Inouye, L., Fuller, G. N. & Langford, L. A. Diagnostic discrepancies and their clinical impact in a neuropathology referral practice. *Cancer* **79,** 796–803 (1997).

31. Aldape, K. *et al.* Discrepancies in diagnoses of neuroepithelial neoplasms: the San Francisco Bay Area Adult Glioma Study. *Cancer* **88,** 2342–9 (2000).

32. Shankar, G. M. *et al.* Rapid Intraoperative Molecular Characterization of Glioma. *JAMA Oncol.* **1,** 662–7 (2015).

33. Calligaris, D. *et al.* MALDI mass spectrometry imaging analysis of pituitary adenomas for near-real-time tumor delineation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112,** 9978–83 (2015).

34. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* **69,** 89–95 (2001).

35. Dunn, G. P. *et al.* Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev.* **26,** 756–84 (2012).

36. Gállego Pérez-Larraya, J. *et al.* Diagnostic and prognostic value of preoperative combined GFAP, IGFBP-2, and YKL-40 plasma levels in patients with glioblastoma. *Cancer* **120,** 3972–80 (2014).

37. Yue, X. *et al.* Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. *J. Neurosurg.* 1–7 (2015). doi:10.3171/2015.1.JNS141577

38. Tumilson, C. A., Lea, R. W., Alder, J. E. & Shaw, L. Circulating microRNA biomarkers for glioma and predicting response to therapy. *Mol. Neurobiol.* **50,** 545–58 (2014).

39. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* **1,** 845–67 (2002).

40. Reiber, H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin. Chim. Acta.* **310,** 173–86 (2001).

41. Grabowski, M. M. *et al.* Residual tumor volume versus extent of resection: predictors of survival after surgery for glioblastoma. *J. Neurosurg.* **121,** 1115–23 (2014).

42. Bricolo, A. *et al.* Experience in 'radical' surgery of supratentorial gliomas in adults. *J. Neurosurg. Sci.* **34,** 297–8 (1990).

43. Lacroix, M. *et al.* A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J. Neurosurg.* **95,** 190–8 (2001).

44. CORDERO, R. & LICHTENBERG, F. [Left cerebral hemispherectomy for glioma in a 5-month-old boy]. *Bol. Asoc. Med. P. R.* **50,** 18–29 (1958).

45. HILLIER, W. F. Total left cerebral hemispherectomy for malignant glioma. *Neurology* **4,** 718–21 (1954).

46. Demuth, T. & Berens, M. E. Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J. Neurooncol.* **70,** 217–28 (2004).

47. Lacroix, M. & Toms, S. A. Maximum safe resection of glioblastoma multiforme. *J. Clin. Oncol.* **32,** 727–8 (2014).

48. Oppenlander, M. E. *et al.* An extent of resection threshold for recurrent glioblastoma and its risk for neurological morbidity. *J. Neurosurg.* **120,** 846–53 (2014).

49. Sanai, N., Polley, M.-Y., McDermott, M. W., Parsa, A. T. & Berger, M. S. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J. Neurosurg.* **115,** 3–8 (2011).

50. Distinguishing and grading human gliomas by IR spectroscopy. - PubMed - NCBI. at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14587069>

51. Desroches, J. *et al.* Characterization of a Raman spectroscopy probe system for intraoperative brain tissue classification. *Biomed. Opt. Express* **6,** 2380–97 (2015).

52. Jermyn, M. *et al.* Intraoperative brain cancer detection with Raman spectroscopy in humans. *Sci. Transl. Med.* **7,** 274ra19 (2015).

53. Taruttis, A., van Dam, G. M. & Ntziachristos, V. Mesoscopic and Macroscopic Optoacoustic Imaging of Cancer. *Cancer Res.* **75,** 1548–1559 (2015).

54. Petrecca, K., Guiot, M.-C., Panet-Raymond, V. & Souhami, L. Failure pattern following complete resection plus radiotherapy and temozolomide is at the resection margin in patients with glioblastoma. *J. Neurooncol.* **111,** 19–23 (2013).

55. Glas, M. *et al.* Residual tumor cells are unique cellular targets in glioblastoma. *Ann. Neurol.* **68,** 264–9 (2010).

56. Piccirillo, S. G. M. *et al.* Fluorescence-guided surgical sampling of glioblastoma identifies phenotypically distinct tumour-initiating cell populations in the tumour mass and margin. *Br. J. Cancer* **107,** 462–8 (2012).

57. Altman, J. Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. - PubMed - NCBI. (1962). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13860749>

58. Altman, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? - PubMed - NCBI. (1962). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13860748>

59. Cayre, M., Canoll, P. & Goldman, J. E. Cell migration in the normal and pathological postnatal mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* **88,** 41–63 (2009).

60. Alvarez-Buylla, A., Seri, B. & Doetsch, F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res. Bull.* **57,** 751–8 (2002).

61. Coskun, V. *et al.* CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 1026–31 (2008).

62. Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D. A., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97,** 703–16 (1999).

63. Doetsch, F., García-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* **17,** 5046–61 (1997).

64. García-Verdugo, J. M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D. A. & Alvarez-Buylla, A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J. Neurobiol.* **36,** 234–48 (1998).

65. Kornack, D. R. & Rakic, P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 4752–7 (2001).

66. Gil-Perotin, S., Duran-Moreno, M., Belzunegui, S., Luquin, M. R. & Garcia-Verdugo, J. M. Ultrastructure of the subventricular zone in Macaca fascicularis and evidence of a mouse-like migratory stream. *J. Comp. Neurol.* **514,** 533–54 (2009).

67. Curtis, M. A. *et al.* Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* **315,** 1243–9 (2007).

68. Sanai, N., Berger, M. S., Garcia-Verdugo, J. M. & Alvarez-Buylla, A. Comment on 'Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension'. *Science* **318,** 393; author reply 393 (2007).

69. Nogueira, A. B. *et al.* Existence of a potential neurogenic system in the adult human brain. *J. Transl. Med.* **12,** 75 (2014).

70. Cave, J. W., Wang, M. & Baker, H. Adult subventricular zone neural stem cells as a potential source of dopaminergic replacement neurons. *Front. Neurosci.* **8,** 16 (2014).

71. Glass, R. *et al.* Glioblastoma-induced attraction of endogenous neural precursor cells is associated with improved survival. *J. Neurosci.* **25,** 2637–46 (2005).

72. Walzlein, J.-H. *et al.* The antitumorigenic response of neural precursors depends on subventricular proliferation and age. *Stem Cells* **26,** 2945–54 (2008).

73. Adeberg, S. *et al.* Glioblastoma recurrence patterns after radiation therapy with regard to the subventricular zone. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **90,** 886–93 (2014).

74. Adeberg, S. *et al.* A comparison of long-term survivors and short-term survivors with glioblastoma, subventricular zone involvement: a predictive factor for survival? *Radiat. Oncol.* **9,** 95 (2014).

75. Jafri, N. F., Clarke, J. L., Weinberg, V., Barani, I. J. & Cha, S. Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro. Oncol.* **15,** 91–6 (2013).

76. Young, G. S. *et al.* Longitudinal MRI evidence for decreased survival among periventricular glioblastoma. *J. Neurooncol.* **104,** 261–9 (2011).

77. Evers, P. *et al.* Irradiation of the potential cancer stem cell niches in the adult brain improves progression-free survival of patients with malignant glioma. *BMC Cancer* **10,** 384 (2010).

78. Elicin, O., Inac, E., Uzel, E. K., Karacam, S. & Uzel, O. E. Relationship between survival and increased radiation dose to subventricular zone in glioblastoma is controversial. *J. Neurooncol.* **118,** 413–9 (2014).

79. Chen, L. *et al.* Increased subventricular zone radiation dose correlates with survival in glioblastoma patients after gross total resection. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **86,** 616–22 (2013).

80. Berger, F., Gay, E., Pelletier, L., Tropel, P. & Wion, D. Development of gliomas: potential role of asymmetrical cell division of neural stem cells. *Lancet. Oncol.* **5,** 511–4 (2004).

81. Quiñones-Hinojosa, A. & Chaichana, K. The human subventricular zone: a source of new cells and a potential source of brain tumors. *Exp. Neurol.* **205,** 313–24 (2007).

82. Vik-Mo, E. O. *et al.* A comparative study of the structural organization of spheres derived from the adult human subventricular zone and glioblastoma biopsies. *Exp. Cell Res.* **317,** 1049–59 (2011).

83. Barami, K. Biology of the subventricular zone in relation to gliomagenesis. *J. Clin. Neurosci.* **14,** 1143–9 (2007).

84. Kast, R. E., Ellingson, B. M., Marosi, C. & Halatsch, M.-E. Glioblastoma treatment using perphenazine to block the subventricular zone's tumor trophic functions. *J. Neurooncol.* **116,** 207–12 (2014).

85. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. - PubMed - NCBI. at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608856>

86. Mokrý, J., Subrtová, D. & Němecek, S. Differentiation of epidermal growth factor-responsive neural precursor cells within neurospheres. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **39,** 7–20 (1996).

87. Zhang, S. C., Lundberg, C., Lipsitz, D., O'Connor, L. T. & Duncan, I. D. Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells. *J. Neurocytol.* **27,** 475–89 (1998).

88. Gil-Perotín, S. *et al.* Adult neural stem cells from the subventricular zone: A review of the neurosphere assay. *Anat. Rec.* **296,** 1435–1452 (2013).

89. Bez, A. *et al.* Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.* **993,** 18–29 (2003).

90. Pastrana, E., Silva-Vargas, V. & Doetsch, F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* **8,** 486–98 (2011).

91. Wan, F. *et al.* The utility and limitations of neurosphere assay, CD133 immunophenotyping and side population assay in glioma stem cell research. *Brain Pathol.* **20,** 877–89 (2010).

92. Wion, D., Christen, T., Barbier, E. L. & Coles, J. A. PO(2) matters in stem cell culture. *Cell Stem Cell* **5,** 242–3 (2009).

93. Bourseau-Guilmain, E. *et al.* In vitro expansion of human glioblastoma cells at non-physiological oxygen tension irreversibly alters subsequent in vivo aggressiveness and AC133 expression. *Int. J. Oncol.* **40,** 1220–9 (2012).

94. Parkinson, J. An Essay on the Shaking Palsy. *J. Neuropsychiatr.* **14,** 223–236 (2002).

95. Benabid, A. L., Pollak, P., Louveau, A., Henry, S. & de Rougemont, J. Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl. Neurophysiol.* **50,** 344–6 (1987).

96. Chen, X. L., Xiong, Y. Y., Xu, G. L. & Liu, X. F. Deep brain stimulation. *Interv. Neurol.* **1,** 200–12 (2013).

97. Zaccaria, A. *et al.* A micro-silicon chip for in vivo cerebral imprint in monkey. *ACS Chem. Neurosci.* **4,** 385–92 (2013).

98. Sakamoto, J. H. *et al.* Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacol. Res.* **62,** 57–89 (2010).

99. Chow, E. K.-H. & Ho, D. Cancer nanomedicine: from drug delivery to imaging. *Sci. Transl. Med.* **5,** 216rv4 (2013).

100. Mendes, G. C. C., Brandão, T. R. S. & Silva, C. L. M. Ethylene oxide sterilization of medical devices: a review. *Am. J. Infect. Control* **35,** 574–81 (2007).

101. Gaspari, M. *et al.* Nanoporous Surfaces as Harvesting Agents for Mass Spectrometric Analysis of Peptides in Human Plasma. *J. Proteome Res.* **5,** 1261–1266 (2006).

102. Terracciano, R. *et al.* Selective binding and enrichment for low-molecular weight biomarker molecules in human plasma after exposure to nanoporous silica particles. *Proteomics* **6,** 3243–50 (2006).

103. Hu, Y. *et al.* Tailoring of the nanotexture of mesoporous silica films and their functionalized derivatives for selectively harvesting low molecular weight protein. *ACS Nano* **4,** 439–51 (2010).

104. Liotta, L. A., Ferrari, M. & Petricoin, E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature* **425,** 905 (2003).

105. Olubiyi, O. I. *et al.* Intraoperative Magnetic Resonance Imaging in Intracranial Glioma Resection: A Single-Center, Retrospective Blinded Volumetric Study. *World Neurosurg.* **84,** 528–36 (2015).

106. Kubben, P. L. *et al.* Intraoperative magnetic resonance imaging versus standard neuronavigation for the neurosurgical treatment of glioblastoma: A randomized controlled trial. *Surg. Neurol. Int.* **5,** 70 (2014).

107. Napolitano, M. *et al.* Glioblastoma surgery with and without intraoperative MRI at 3.0T. *Neurochirurgie.* **60,** 143–50 (2014).

108. Acerbi, F. *et al.* Fluorescein-guided surgery for malignant gliomas: a review. *Neurosurg. Rev.* **37,** 547–57 (2014).

109. Stummer, W. *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* **7,** 392–401 (2006).

110. Aldave, G. *et al.* Prognostic value of residual fluorescent tissue in glioblastoma patients after gross total resection in 5-aminolevulinic Acid-guided surgery. *Neurosurgery* **72,** 915–20; discussion 920–1 (2013).

111. Behbahaninia, M. *et al.* Intraoperative fluorescent imaging of intracranial tumors: a review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **115,** 517–28 (2013).

112. Jacquesson, T. *et al.* [Surgery of high-grade gliomas guided by fluorescence: a retrospective study of 22 patients]. *Neurochirurgie.* **59,** 9–16 (2013).

113. Kuroiwa, T., Kajimoto, Y., Furuse, M. & Miyatake, S. A surgical loupe system for observing protoporphyrin IX fluorescence in high-grade gliomas after administering 5-aminolevulinic acid. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **10,** 379–81 (2013).

114. Stummer, W. *et al.* Predicting the 'usefulness' of 5-ALA-derived tumor fluorescence for fluorescence-guided resections in pediatric brain tumors: a European survey. *Acta Neurochir. (Wien).* **156,** 2315–24 (2014).

115. Colditz, M. J., Leyen, K. van & Jeffree, R. L. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: theoretical, biochemical and practical aspects. *J. Clin. Neurosci.* **19,** 1611–6 (2012).

116. Colditz, M. J. & Jeffree, R. L. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies. *J. Clin. Neurosci.* **19,** 1471–4 (2012).

117. Roberts, D. W. *et al.* Coregistered fluorescence-enhanced tumor resection of malignant glioma: relationships between δ-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, magnetic resonance imaging enhancement, and neuropathological parameters. Clinical article. *J. Neurosurg.* **114,** 595–603 (2011).

118. Valdés, P. A. *et al.* δ-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: the need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy. *Neuro. Oncol.* **13,** 846–56 (2011).

119. Hefti, M. *et al.* 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence in high-grade glioma surgery: a one-year experience at a single institutuion. *Swiss Med. Wkly.* **138,** 180–5 (2008).

120. Valdés, P. A. *et al.* Quantitative fluorescence in intracranial tumor: implications for ALA-induced PpIX as an intraoperative biomarker. *J. Neurosurg.* **115,** 11–7 (2011).

121. Montcel, B., Mahieu-Williame, L., Armoiry, X., Meyronet, D. & Guyotat, J. Two-peaked 5-ALA-induced PpIX fluorescence emission spectrum distinguishes glioblastomas from low grade gliomas and infiltrative component of glioblastomas. *Biomed. Opt. Express* **4,** 548–58 (2013).

122. Bi, W. L. & Laws, E. R. Searching for the light: fluorescence guidance in glioma resection. *World Neurosurg.* **82,** 54–5 (2014).

123. Masubuchi, T. *et al.* Experimental study to understand nonspecific protoporphyrin IX fluorescence in brain tissues near tumors after 5-aminolevulinic acid administration. *Photomed. Laser Surg.* **31,** 428–33 (2013).

124. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J. Control. Release* **65,** 271–284 (2000).

125. Chen, B. *et al.* Gross total resection of glioma with the intraoperative fluorescence-guidance of fluorescein sodium. *Int. J. Med. Sci.* **9,** 708–14 (2012).

126. Koc, K., Anik, I., Cabuk, B. & Ceylan, S. Fluorescein sodium-guided surgery in glioblastoma multiforme: a prospective evaluation. *Br. J. Neurosurg.* **22,** 99–103 (2008).

127. Schaafsma, B. E. *et al.* The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J. Surg. Oncol.* **104,** 323–32 (2011).

128. Kim, E. H., Cho, J. M., Chang, J. H., Kim, S. H. & Lee, K. S. Application of intraoperative indocyanine green videoangiography to brain tumor surgery. *Acta Neurochir. (Wien).* **153,** 1487–95; discussion 1494–5 (2011).

129. Danhier, F., Le Breton, A. & Préat, V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol. Pharm.* **9,** 2961–73 (2012).

130. Huang, R. *et al.* Integrin αvβ3-targeted IRDye 800CW near-infrared imaging of glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **18,** 5731–40 (2012).

131. Mathieu, D., Lecomte, R., Tsanaclis, A. M., Larouche, A. & Fortin, D. Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can. J. Neurol. Sci.* **34,** 296–306 (2007).

132. Ravichandran, R. Effects of nanotopography on stem cell phenotypes. *World J. Stem Cells* **1,** 55 (2009).

133. McMurray, R. J. *et al.* Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat. Mater.* **10,** 637–644 (2011).

134. Schürmann, M. *et al.* Interaction of adult human neural crest-derived stem cells with a nanoporous titanium surface is sufficient to induce their osteogenic differentiation. *Stem Cell Res.* **13,** 98–110 (2014).

135. Gage, F. H. & Temple, S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* **80,** 588–601 (2013).

136. Irizarry, R. A. *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4,** 249–64 (2003).

137. Hsieh, J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev.* **26,** 1010–21 (2012).

138. Azim, K. *et al.* Transcriptional Hallmarks of Heterogeneous Neural Stem Cell Niches of the Subventricular Zone. *Stem Cells* **33,** 2232–42 (2015).

139. Glickstein, S. B., Monaghan, J. A., Koeller, H. B., Jones, T. K. & Ross, M. E. Cyclin D2 is critical for intermediate progenitor cell proliferation in the embryonic cortex. *J. Neurosci.* **29,** 9614–24 (2009).

140. Liu, K. *et al.* The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell. Signal.* **25,** 1264–71 (2013).

141. Lavenus, S. *et al.* Cell differentiation and osseointegration influenced by nanoscale anodized titanium surfaces. *Nanomedicine (Lond).* **7,** 967–80 (2012).

142. Hofmann, M.-C. Stem cells and nanomaterials. *Adv. Exp. Med. Biol.* **811,** 255–75 (2014).

143. McMurray, R. J. *et al.* Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. *Nat. Mater.* **10,** 637–644 (2011).

144. Gobaa, S. *et al.* Artificial niche microarrays for probing single stem cell fate in high throughput. *Nat. Methods* **8,** 949–55 (2011).

145. Reardon, D. A., Nabors, L. B., Stupp, R. & Mikkelsen, T. Cilengitide: an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide with promising activity for glioblastoma multiforme. *Expert Opin. Investig. Drugs* **17,** 1225–35 (2008).

146. Abdollahi, A. *et al.* Inhibition of alpha(v)beta3 integrin survival signaling enhances antiangiogenic and antitumor effects of radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11,** 6270–9 (2005).

147. Gladson, C. L. Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **55,** 1143–9 (1996).

148. Stupp, R. *et al.* Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* **15,** 1100–8 (2014).

149. Lopez-Rodriguez, V. *et al.* Preparation and preclinical evaluation of (66)Ga-DOTA-E(c(RGDfK))2 as a potential theranostic radiopharmaceutical. *Nucl. Med. Biol.* **42,** 109–14 (2015).

150. Dearling, J. L. J. *et al.* Specific uptake of 99mTc-NC100692, an αvβ3-targeted imaging probe, in subcutaneous and orthotopic tumors. *Nucl. Med. Biol.* **40,** 788–94 (2013).

151. Alsibai, W. *et al.* Fluorescent non-peptidic RGD mimetics with high selectivity for αVβ3 vs αIIbβ3 integrin receptor: novel probes for in vivo optical imaging. *J. Med. Chem.* **57,** 9971–82 (2014).

152. Selek, L. *et al.* Imaging and histological characterization of a human brain xenograft in pig: the first induced glioma model in a large animal. *J. Neurosci. Methods* **221,** 159–65 (2014).

153. Baker, S. a., Baker, K. A. & Hagg, T. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur. J. Neurosci.* **20,** 575–579 (2004).

154. Coronas, V. *et al.* Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J. Neurochem.* **91,** 1292–1301 (2004).

155. Höglinger, G. U. *et al.* Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* **7,** 726–735 (2004).

156. Lelan, F. *et al.* Effects of Human Alpha-Synuclein A53T-A30P Mutations on SVZ and Local Olfactory Bulb Cell Proliferation in a Transgenic Rat Model of Parkinson Disease. *Parkinsons. Dis.* **2011,** 987084 (2011).

157. Winner, B. Mutant alpha synuclein exacerbates age-related decrease of neurogenesis. *Neurobiol. Aging* **29,** 997–1003 (2008).

158. O'Keeffe, G. C. *et al.* Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106,** 8754–8759 (2009).

159. Winner, B. *et al.* Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp. Neurol.* **219,** 543–552 (2009).

160. Khaindrava, V. *et al.* High frequency stimulation of the subthalamic nucleus impacts adult neurogenesis in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* **42,** 284–91 (2011).