



HAL
open science

**Traitement intra-tumoral des gliomes malins par
infusion convective de bevacizumab, développement d'un
modèle de gliome chez le gros animal, étude anatomique
de la diffusion convective dans un encéphale humain.**

Laurent Selek

► **To cite this version:**

Laurent Selek. Traitement intra-tumoral des gliomes malins par infusion convective de bevacizumab, développement d'un modèle de gliome chez le gros animal, étude anatomique de la diffusion convective dans un encéphale humain.. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS040 . tel-01754045

HAL Id: tel-01754045

<https://theses.hal.science/tel-01754045>

Submitted on 30 Mar 2018

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIS - Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laurent SELEK

Thèse dirigée par **François BERGER**

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

Traitement intra-tumoral des gliomes malins par infusion convective de bevacizumab, développement d'un modèle de gliome chez le gros animal, étude anatomique de la diffusion convective dans un encéphale humain.

Intra-tumoral treatment of malignant glioma via convection-enhanced delivery of bevacizumab, development of the first model of glioma in a large animal, anatomical study of convection-enhanced delivery in a human brain.

Thèse soutenue publiquement le **19 janvier 2016**,
devant le jury composé de :

Monsieur François BERGER (EDISCE)

PU-PH, CHU Grenoble, Directeur de thèse

Monsieur Emmanuel GAY

PUPH, CHU Grenoble, Président

Monsieur Michel ZERAH

PU-PH, Hôpital NECKER enfants malades, INSERM U745, Rapporteur

Monsieur François DUCRAY

PH HDR, Hôpital Pierre Wertheimer, Inserm U1028, Rapporteur



SOMMAIRE

1 – Introduction

1.1 – Epidémiologie des gliomes

1.2 – La chirurgie

1.3 – La radiothérapie

1.4 – La chimiothérapie

1.5 – Anatomopathologie

1.6 – Barrière hémato-encéphalique

1.7 – L'infusion convective

1.7.1 – Définition du concept

1.7.2 – Facteurs influençant la qualité de l'injection

1.8 – Proposition d'un plan de travail

2 – Etude pharmacocinétique de l'injection de bevacizumab chez des souris porteuses de tumeurs cérébrales U 87.

2.1 – Introduction

2.2 – Matériels et méthodes

2.3 – Résultats

2.4 – Discussion

3 – Etude de l'efficacité thérapeutique de l'injection intra-tumoral de bevacizumab dans le traitement d'un modèle de tumeur cérébrale U87 chez la souris.

3.1 – Introduction

3.2 – Matériels et méthodes

3.3 – Résultats

3.4 – Discussion

4 – Mise au point d'un modèle porcin de gliome

4.1 – Introduction

4.2 – Matériels et méthodes

4.3 – Résultats

4.4 – Discussion

5 – Tests d’injection avec un cathéter prototype, avec un système externalisé dans un parenchyme sain puis avec un système implanté sur un modèle de gliome chez le porc

5.1 – Introduction

5.2 - Définitions de paramètres prédictifs d’une injection satisfaisante

5.2.1 – Matériels et méthodes

5.2.2 – Résultats

5.2.3 – Discussion

5.3 - Tests d’injection intra-tumorale avec un système implanté chez le porc

5.3.1 – Introduction

5.3.2 – Matériels et méthodes

5.3.3 – Résultats

5.3.4 – Discussion

6 – Etude anatomique d’une injection par infusion convective dans un encéphale humain.

6.1 – Etude anatomique d’une injection par infusion convective dans la corona radiata pariétale

6.1.1 - Introduction

6.1.2 – Matériels et Méthodes

6.1.3 – Résultats

6.1.4 – Discussion

6.2 - Etude anatomique d’une injection par infusion convective dans la corona-radiata pariétale à proximité immédiate du corps calleux

6.2.1 – Introduction

6.2.2 – Matériels et méthodes

6.2.3 – Résultats

6.2.4 – Discussion

7 – Conclusions générales

INTRODUCTION

Les gliomes sont des tumeurs primitives développées au sein du système nerveux central à partir des cellules de la glie que sont les astrocytes et les oligodendrocytes. Parmi ces tumeurs le glioblastome représente la forme la plus agressive. La prise en charge de ces tumeurs est pluri-disciplinaire. Elle associe si possible, une exérèse chirurgicale associée à une radio-chimiothérapie concomitante puis de la chimiothérapie adjuvante. Malgré l'ensemble de cette prise en charge les résultats sont décevants car cette pathologie reste constamment mortelle avec une médiane de survie approchant les 15 mois(1-3).

1.1 - Epidémiologie des gliomes

Le glioblastome est une pathologie rare. En effet, les tumeurs malignes cérébrales représentent 1% des cancers avec une incidence de l'ordre de 7 cas pour 100 000 habitants(4). Parmi ces tumeurs le glioblastome, qui représente une part importante avec une proportion de 45 % (une incidence d'un peu plus de 3 cas pour 100 000 habitants) apparaît comme un enjeu de santé publique devant sa gravité en étant constamment fatal.

Il existe des facteurs de risques intrinsèques de développement d'un glioblastome, principalement des syndromes de prédispositions comme la neurofibromatose de type 1, le syndrome de Turcot ou le syndrome de Li-Fraumeni. Le principal problème épidémiologique actuel se situe au niveau des facteurs de risques extrinsèques, en effet si les radiations ionisantes ont clairement démontrées qu'elles représentaient un facteur de risque(5), il n'y a pas d'autres facteurs de risques établis même si certains alimentent la controverse (radiations non ionisantes, pesticides...).

La répartition de cette pathologie montre un sex-ratio de 1,68. L'incidence augmente nettement à partir de la cinquième décennie et touche particulièrement le sujet âgé. Du fait du vieillissement de la

population, il est logique d'estimer que le nombre de cas à traiter évoluera vers un plus grand nombre.

1.2 - La chirurgie

La chirurgie tend à être la plus large possible avec comme objectif de permettre un diagnostic anatomopathologique, de réduire l'effet de masse et l'hypertension intra-crânienne induite par le contingent tumoral, de diminuer au maximum le nombre de cellules tumorale avant le

début des traitements associés. Il est maintenant démontré qu'une exérèse macroscopiquement complète (retrait de l'ensemble de la prise de contraste) est un facteur pronostic majeur.

Ceci a été démontré initialement par Bricolo en 1990(6), donc avant l'avènement de la radio-chimiothérapie concomitante, plusieurs études sont venues conforter cet élément, en le précisant, notamment l'étude de Lacroix(7) retrouvant un bénéfice sur la survie globale à partir de 94% d'exérèse de la prise de contraste. La problématique était de savoir si ce bénéfice persistait après introduction de la radio-chimiothérapie dans la prise en charge de cette pathologie. L'essai 26981 de l'EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) publié en 2005(3) répond à cette question ; en effet les patients ayant bénéficiés d'une exérèse macroscopiquement complète associée à une radio-chimiothérapie ont une survie moyenne supérieure aux patients ayant reçus le même traitement mais avec une exérèse incomplète. De plus, si l'on compare l'efficacité de la radio-chimiothérapie concomitante avec une irradiation sans chimiothérapie la survie est augmentée en moyenne de 1,8 mois dans le groupe « exérèse incomplète » alors qu'elle est de 4,1 mois dans le groupe exérèse macroscopiquement complète, il s'avère donc qu'une exérèse la plus large possible est un facteur de bon pronostic robuste et qu'il augmente l'avantage procuré par la radiothérapie et chimiothérapie.

Afin d'optimiser l'exérèse des gliomes de haut grade, il a été développé une technique de fluorescence per-opératoire permettant de mieux visualiser les limites entre la lésion gliale et le parenchyme en périphérie(8). Cette technique fonctionne en utilisant la protoporphyrine 9 qui est le résultat de la dégradation de l'acide 5-aminolevulinique par les cellules tumorales, administré 3 heures avant l'induction de l'anesthésie. Cette technique permet de doubler le nombre d'exérèse macroscopiquement complète, comparé à une chirurgie en « lumière blanche(9) ».

La chirurgie peut aussi avoir un rôle important dans la gestion des complications hydrodynamiques engendrée par la tumeur (hydrocéphalie).

1.3 - La radiothérapie

La radiothérapie est le traitement historique des glioblastomes, en effet dès 1976 Sheline et al(10), ont montré une majoration de la survie des patients irradiés après exérèse chirurgicale (24 % de survivant à un an dans le groupe irradié contre 8% dans le groupe non irradié). Le volume d'irradiation était initialement une irradiation panencéphalique. En ce qui concerne la dosimétrie de ces irradiation deux écoles existaient, une école britannique avec des irradiations de 45 Gy en 20 fractions alors qu'aux Etats Unis les schémas standards était de 60 Gy en 30 fractions. Salazar et al(11) ont montré qu'il existait une relation entre la dose administrée et l'efficacité du traitement avec des survies meilleurs dans les groupes avec des doses reçues importantes (de 60 à 75 Gy contre 50 Gy), la première étude randomisées concluant à la supériorité d'efficacité des doses supérieures est l'étude de Bleehen en 1991(12) qui montre une survie supérieure du groupe irradié selon un schéma de 60 Gy en 30 fractions contre un schéma de 45 Gy en 20 fractions. Les conventions d'irradiation se basent sur la prise de contraste du glioblastome avec une marge de 25 mm pour définir le volume cible afin de traiter l'infiltration tumorale maximale en périphérique de la masse tumorale elle-même.

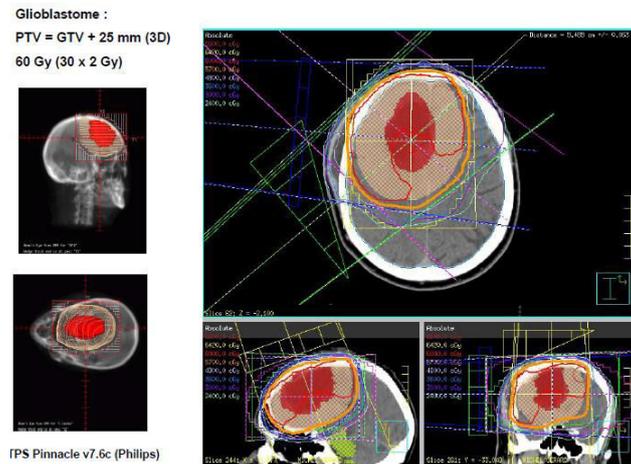


Figure 1 : Exemple de planning d'irradiation (en rouge le volume tumoral cible, en orange le volume traité), S Vinceller .

Ainsi, à ce jour, le schéma classique d'irradiation des glioblastomes est un schéma de 60 Gy en 30 fractions, il a cependant été développé un protocole d'irradiation hypofractionné pour les sujets âgés de 40 Gy en 15 fractions, Roa et al en 2004(13) ont montré une meilleur compliance et moins de désagrément chez le sujet de plus de 60 ans avec 90 % des irradiations menées à terme (contre 74 % pour un schéma classique) et 23 % des patients ayant nécessités une majoration de la corticothérapie pendant l'irradiation contre 49 % dans l'autre bras de traitement avec une survie comparable.

1.4 - La chimiothérapie

Les premières études prospectives testant l'efficacité d'agents cytotoxiques dans les glioblastomes datent des années 1970 sont donc antérieures à la publication de la classification OMS utilisée depuis, les premiers essais doivent être étudiés avec précautions, car incluant des gliomes de grade 3 en plus des glioblastomes (les gliomes de grade 3 possédant une chimiosensibilité différente).

Les premières molécules utilisées sont des nitroso-urée dont fait partie la carmustine. Elles ont été choisies pour leur liposolubilité favorisant le passage de la barrière hémato-encéphalique. Les

premières études randomisées, prospectives sont assez décevantes. Elles ne permettent pas d'objectiver une efficacité thérapeutique statistiquement significative du BCNU(14, 15). Un des problèmes était la séquence temporelle de l'utilisation de la chimiothérapie par rapport à la radiothérapie. Il faut attendre 2002, pour que la réponse soit donnée, une étude démontra alors un effet bénéfique clair d'une association concomitante du témozolomide et de la radiothérapie sur une irradiation exclusive dans la prise en charge des glioblastomes au diagnostic(16). Depuis, peu de molécules ont prouvé un bénéfice de survie.

Les sels de platines ont été utilisés, notamment le carboplatine permettant une réponse ou une stabilisation à la récurrence dans 50% des cas(17). Le tamoxifène a été proposé comme traitement à la récurrence avec des résultats modestes(18). Cependant l'utilisation d'une radiochimiothérapie concomitante par témozolomide puis poursuite du traitement par témozolomide seul reste la référence avec une utilisation « anecdotique » des autres chimiothérapies à ce jour. Le traitement le plus utilisé à la récurrence sous témodal est une association d'irinotécan et d'une thérapie ciblée contre le VEGF : le bévacizumab.

Le bévacizumab est un anticorps anti-VEGFA ayant montré une efficacité sur la survie sans récurrence avec un taux de réponse intéressant lors de la rechute (environ 28%) sans pour autant démontrer une amélioration nette de la survie globale des patients(19). L'utilisation du bévacizumab en association avec l'irinotécan est discutée du fait d'une efficacité non négligeable du bevacizumab seul(20).

Un des effets secondaires suspecté, du traitement par anti-angiogénique, est la transformation de phénotype vers une tumeur moins vascularisée mais plus invasive, ce qui pourrait expliquer l'absence de gain sur la survie globale alors que les résultats radiologiques sont particulièrement marqués, notamment sur l'imagerie injectée. Ce point a conduit à la modification des critères de réponse aux traitements anti-angiogéniques prenant en compte la surface de la tumeur lors de l'imagerie IRM en séquences en T2 et Flair (nouveaux critères du RANO)(21).

Cette absence d'effet sur la survie globale lors de son utilisation à la récurrence a été l'initiateur de deux études prospectives simultanées avec introduction de bévacizumab en première intention conjointe au protocole Stupp (Avaglio(22) et RTOG-0625(23)) , étude réalisée en double aveugle, contre placebo.

Ces deux études n'ont pas permis de montrer un avantage en termes de survie de l'introduction d'antiangiogénique à la prise en charge des glioblastomes à la phase initiale. De plus l'étude RTOG-0625 montrerait une dégradation de la qualité de vie dans le groupe bevacizumab.

Il existe de nombreuses thérapies ciblées faisant l'objet d'études de phase I, avec des résultats contradictoires, comme l'erlotinib par exemple(24, 25) (Inhibiteur des récepteurs aux tyrosines kinases afin de bloquer l'action de l'EGFR, fréquemment muté dans les glioblastomes) cependant à ce jour, aucune de ces molécules visant une voie de signalisation n'a pu faire clairement la preuve de son efficacité.

1.5 - Anatomopathologie

Les gliomes sont des tumeurs rares, du système nerveux central, ce sont des tumeurs dérivées des cellules gliales : astrocytes et oligodendrocytes, cellules de soutien des neurones. Les classifications historiques sont basées sur le sous-type cellulaire prédominant au sein de la tumeur, devant correspondre selon cette classification au clone tumoral impliqué dans la genèse de la tumeur. Une des premières classifications est celle de Bailey et Cushing publiée en 1926(26). Il est intéressant de voir qu'au sein de cette classification les principaux gliomes que sont les astrocytomes et les oligodendrogliomes sont issus de cellules précurseurs différentes, les astrocytomes dérivent d'un « spongioblaste » primitif du neuro-épithélium alors que les oligodendrogliomes étaient considérés comme une forme différenciée de médulloblastome.

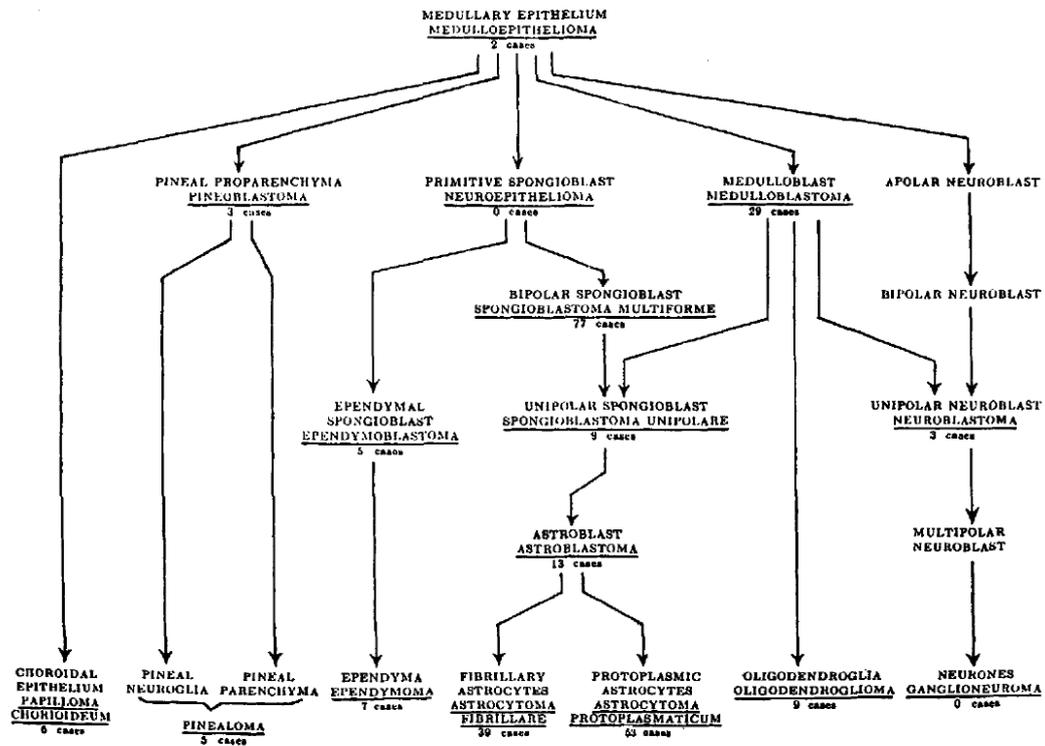


Figure 2: reproduction de l'organigramme illustrant la classification anatomopathologique de Cushing et Bailey (1926).

Cette classification a été simplifiée secondairement par Bailey et Bucy quelques années plus tard grâce à l'utilisation de coloration développée par Rio-Hortega, permettant de réintégrer les oligodendrogliomes au sein des tumeurs de lignées gliales.

Ce n'est qu'avec la classification de Kernohan et Sayre en 1950 qu'apparue la notion de grades de malignité et qu'au cours des années 1970 qu'une classification homogène et consensuelle a vu le jour. Celle-ci est issue du travail commun des neuropathologistes travaillant dans le cadre de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (première version publiée en 1980 par Zülch(27)). Cette classification lève certaines controverses qui persistaient sur le typage cellulaire tumoral et définit une gradation de malignité précise permettant à l'ensemble des intervenants (pathologistes, neurochirurgiens, oncologues et radiothérapeutes) d'avoir des définitions communes, base

essentielle pour une harmonisation des prises en charges. Cette classification a été révisée en 1993 par Kleihues, Burger et Scheithauer(28) La mise à jour suivante a été publiée en 2007 par Louis et al(29). La gradation histo-pronostic de malignité est définie par la présence de plusieurs facteurs comme la densité cellulaire, les atypies cyto-nucléaires, le nombre de mitoses, la présence de nécrose ou la prolifération endothélio-capillaire permettant de définir 4 grades de malignités croissants de I pour une tumeur bénigne à IV pour une malignité maximale. Daumas-Duport(30) a ajoutée à cette description morphologique des informations concernant l'organisation structurale de ces tumeurs, décrivant les interactions qui existent entre la tumeur et le parenchyme adjacent. Les tumeurs classées en 3 types. Les tumeurs de type I sont développées sous la forme de masse tumorale sans infiltration du parenchyme périphérique. Les tumeurs de type II sous la forme d'une masse tumorale et d'une couronne de cellules infiltrantes en périphéries. Le type III quant à lui est formé d'un amas de cellules indépendantes ne formant pas de masse tumorale à proprement parlé.

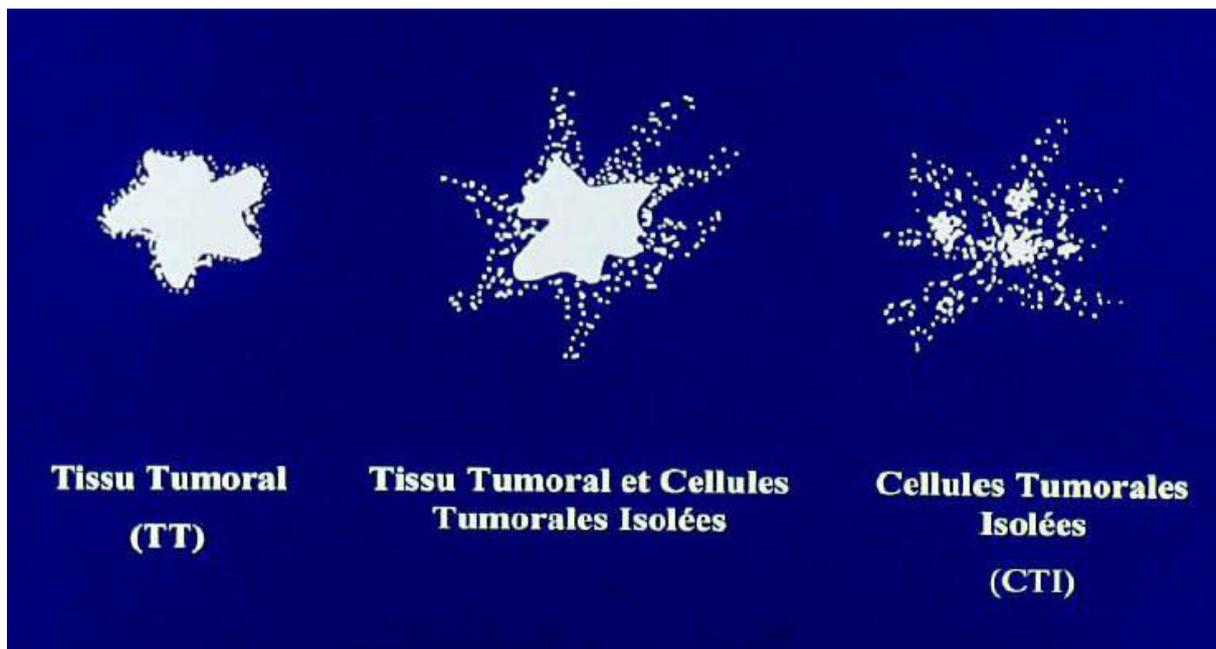


Figure 3 : Représentation des 3 formes d'organisation spatiale des gliomes (Daumas-Duport)

La classification OMS admet cependant plusieurs limites, le principal problème étant la reproductibilité inter et intra-observateur. En effet certaines études ont démontrée qu'il existe 30 % d'erreur de classification pour le même fragment entre 2 observateurs ou entre un même observateur lors de deux lectures à distance(31). La deuxième problématique est l'hétérogénéité de ces tumeurs conduisant à un facteur de risque supplémentaire d'erreur de sous estimation de la malignité, notamment au niveau des zones d'infiltrat tumoral.

Un deuxième type de classification a été développé au sein de l'hôpital Saint-Anne, Paris(32), cette classification fait intervenir des critères morphologiques histologiques auxquels s'ajoutent des critères radiologiques tel que la prise de contraste. Cette classification fait émerger un nouveau type tumoral, la tumeur glioneuronale. Cette classification reconnaît un contingent neuronal proliférant au sein de ces tumeurs. Cette classification simplifie le nombre d'entité avec une grande majorité de tumeur oligodendrogliale qui sont de deux types : A si la tumeur ne prend pas le contraste et qu'il n'existe pas de prolifération endothélio-capillaire, B si un de ces deux critères est présent. Les tumeurs de grade maximum de malignité sont la tumeur glioneuronale maligne (TGNM) et le glioblastome qui passe de tumeur la plus fréquente dans la classification OMS à une fréquence très rare selon cette classification.

1.6 - Barrière hémato encéphalique

Le cerveau est un organe dont l'homéostasie se doit d'être régulée finement, en effet la grande spécificité d'organisation des réseaux neuronaux, associé à la capacité limitée des neurones de se diviser nécessite un microenvironnement extracellulaire protégé : apport suffisant en nutriment, évacuation des déchets, protection des substances neurotoxiques circulantes. Cette stabilité de l'environnement extracellulaire est indispensable pour une neurotransmission efficace. La barrière hémato-encéphalique(33) , décrite par Ehrlich en 1885, est le principal élément de régulation de délivrance des drogues au sein du système nerveux central. Ses propriétés de régulation sont une

conjonction de caractéristiques physiques (jonctions serrées au niveau de l'endothélium), biologiques (transcytoses sélectives) et activités métaboliques (dégradation de substances potentiellement nocives). La barrière physique est constituée d'un endothélium avec des jonctions serrées : la zonulae occludentes, celui-ci est entouré d'une lame basale au sein de laquelle on retrouve les péricytes et contre laquelle s'appuie les pieds astrocytaires complétant cette barrière.

Le transport passif des molécules à travers cette barrière est conditionné par la nature de la double couche lipidique de la membrane cellulaire endothéliale, qui permet le passage des molécules gazeuses tel l'oxygène et le dioxyde de carbone. Il en est de même pour les molécules lipophiles (représentant la plupart des drogues à destination du système nerveux). Au niveau du système vasculaire périphérique, les jonctions entre les cellules endothéliales sont suffisamment lâches pour permettre un passage libre de la plupart des molécules. Les jonctions serrées de l'endothélium cérébral impose l'utilisation de transporteurs spécifiques (plus d'une vingtaine décrits), ces transporteurs spécifiques sont retrouvés aussi bien sur le versant endo-luminal de la barrière que sur le versant cérébral. Ils sont capables de faire traverser activement la barrière à de petites molécules. Pour les molécules plus volumineuses un système de transport vésiculaire est nécessaire, l'un via des récepteurs spécifiques (endocytose) l'autre non spécifique (transcytose). Cette barrière physique et biologique est le principal obstacle à l'efficacité des traitements cytotoxiques, nécessitant d'importantes doses systémiques, permettant d'obtenir une concentration efficace, mais alors responsable d'effets secondaires importants. Le développement de molécules actives doit prendre en compte les caractéristiques physico-chimiques de cette barrière en plus de la sensibilité in vitro des cellules tumorales.

1.7 L'infusion convective

1.7.1 Définition du concept

La faible efficacité des traitements médicaux peuvent laisser supposer qu'une des raisons de cet échec est la faible biodisponibilité des agents thérapeutiques administrés par voie systémiques du fait de la barrière hémato-encéphalique.

Pour les molécules de gros poids moléculaire le passage à travers la BHE est faible. Deux stratégies ont historiquement été proposée pour passer outre cet obstacle : l'injection au sein du liquide cérébro-spinal (LCS) ou l'injection directe au sein du parenchyme cérébral. En ce qui concerne l'injection directe au sein du LCS, la pénétration depuis les espaces sous arachnoïdiens vers le parenchyme cérébral est faible. Pour des molécules dont les caractéristiques de diffusion sont optimales(34), cette stratégie ne semble pas à privilégier pour traiter une tumeur intra-parenchymateuse. La seconde alternative est l'injection directe au sein du parenchyme cérébral, l'injection directe doit cependant faire face à deux difficultés : la faible diffusion au sein du parenchyme cérébral pour les molécules de grosses tailles et un passage rapide de l'interstitium vers le secteur vasculaire pour les molécules de petite taille.

La diffusion fait intervenir le poids moléculaire, conditionnant la diffusivité de la molécule. Ce mécanisme de transfert passif fait intervenir la loi de Fick conditionnant les transferts massiques :

$$\vec{j}_A = -D_{AB} \cdot \overrightarrow{\text{grad}} C_A$$

Avec :

\vec{J}_A (molécule $s^{-1}m^{-2}$) le « vecteur densité de courant de particules » des particules de A

D_{AB} (m^2s^{-1}) est le coefficient de diffusion de A dans le milieu B considéré

C_A est la concentration de A en un point donné

Cette loi explique le fait que des molécules de poids moléculaire important aient une diffusion très lente, de l'ordre de 3 jours pour une diffusion d'un rayon d'un millimètre pour une IgG (environ 150 000 Daltons)(35).

La diffusion passive semblant une voie de faible rendement pour obtenir une distribution adéquate au sein du parenchyme cérébral, il existe une autre voie de transport des molécules au sein de l'interstitium : il s'agit de la convection. Ce mode de transport utilise un flux liquidien basé non plus sur un gradient de concentration comme la diffusion, mais sur l'existence d'un gradient de pression. Ces situations surviennent en physiologie et pathologie(36), notamment en présence d'un œdème vasogénique. Ce gradient de pression, à l'origine d'un flux liquidien au sein de l'interstitium, est créé lors d'une injection directe au sein du parenchyme cérébral. Le concept d'infusion convective décrite par Bobo en 1994(37) est une optimisation du transport des molécules au sein de l'interstitium par une injection continue permettant de conserver un gradient de pression pendant une période prolongée (allant au-delà de la période d'injection elle-même).

Le transport d'une molécule au sein de l'interstitium cérébral est donc régi par deux mécanismes : une diffusion passive des molécules, dépendant du gradient de concentration et de son coefficient de diffusion et d'autre part, par la convection dépendant essentiellement de l'existence d'un gradient de pression.

L'infusion convective (convection-enhanced delivery ou CED) est un mode de délivrance où une injection continue à faible débit au sein du parenchyme cérébral est le générateur de pression nécessaire permettant de rendre la convection le mode principal de transport.

Dans leur étude princeps Bobo et al ont comparé la répartition de deux molécules : la transferrine marquée (In^{111} -transferrine), molécule avec une masse moléculaire importante (80 000 Da) donc avec un coefficient de diffusion faible et le sucrose marqué (C^{14} -sucrose) de faible masse moléculaire (359 Da). L'injection est faite au sein de la corona radiata desur un modèle de chats. L'injection est faite 5 minutes après introduction du cathéter, le débit est augmenté progressivement de 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ jusqu'à 4 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour une injection totale de 600 μl (300 μl par hémisphère), les pressions au sein de la ligne d'injection et de la grande citerne sont enregistrées pendant toute l'injection.

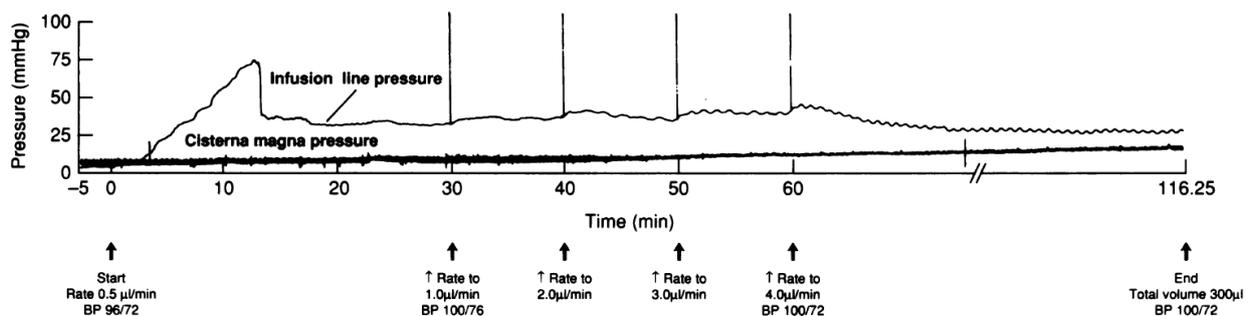


Fig 4 : Evolution de la pression de la ligne d'injection et de la grande citerne au cours de l'injection au sein de la corona radiata du chat (Bobo et al.).

L'étude des profils d'injection met en évidence plusieurs points : lors de l'introduction du cathéter il faut environ 5 minutes pour que la pression se stabilise au sein de la ligne d'injection. A la phase initiale la pression augmente progressivement jusqu'à des valeurs très importantes de l'ordre de 75 mmHg pour ensuite chuter rapidement et atteindre un plateau que les modifications de débits affecteront peu.

Les auteurs analysent le pic de pression puis la chute rapide comme l'éjection du bouchon de parenchyme à l'extrémité de l'aiguille.

On observe également que l'augmentation de pression relativement importante à la sortie de la ligne d'injection entraîne très peu de modification de la pression intra-crânienne mesurée au niveau de la grande citerne. Ceci permet de créer le gradient de pression à la base des phénomènes de convection et ce, même pour des débits très faibles. La faible majoration de la pression intra-crânienne constitue un élément favorable à la bonne tolérance de l'injection.

La distribution est ensuite analysée par autoradiographie, les résultats sont assez proches en terme de couverture de l'hémisphère (>1% de la concentration initiale) avec environ 50 % de la coupe coronale centrée sur l'hémisphère couverte à la fin de l'injection.

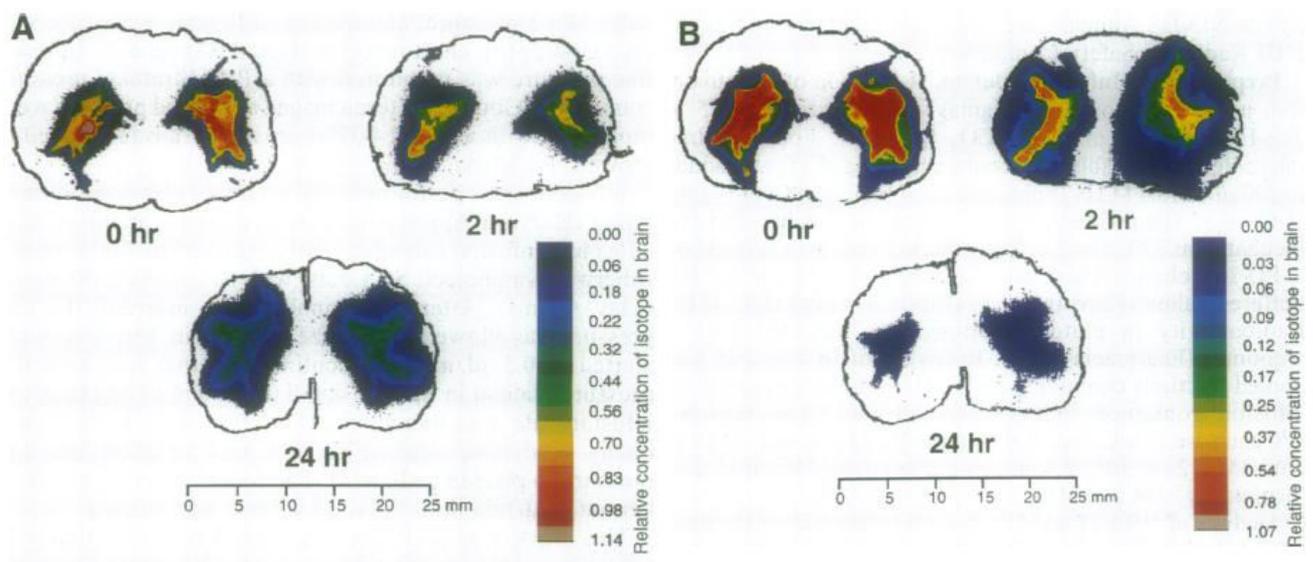


Figure 5 : autoradiographies de la répartition de la transferrine (A) et sucrose (B) à la fin de l'injection, 2 heures et 24 heures plus tard.

Nous remarquons qu'à la fin de l'injection la répartition est assez similaire entre les deux molécules confirmant que la qualité de la convection n'est que peu affectée par la masse moléculaire de l'agent utilisé. On remarquera qu'à 2 heures de l'injection la transferrine a peu diffusé au sein du parenchyme contrairement au sucrose. Ceci appuie l'hypothèse qu'une fois le gradient de pression disparu c'est un phénomène de diffusion qui prend le relais, cette diffusion est limitée pour les grosses molécules.

Un autre point remarquable est qu'à 24 heures de l'injection alors que la transferrine s'est répartie sur la quasi totalité de l'hémisphère, le sucrose a quasiment disparu du fait de la perte trans-vasculaire.

Les concentrations systémiques mesurées lors de cette expérience sont inférieures à 1% de la concentration intracérébrale.

Ces résultats sont en faveur de l'utilisation de molécules de haut poids moléculaires pour cette indication afin d'optimiser le temps de contact avec le tissu tumoral et privilégier une diffusion lente mais pérenne due au faible passage trans-vasculaire.

1.7.2 Facteurs influençant la qualité de l'injection

Afin d'obtenir une couverture maximale du volume tumoral par l'agent thérapeutique utilisé, il est important de contrôler les différents facteurs pouvant conduire aux deux principaux écueils de cette technique : la fuite et le reflux.

Un des articles princeps de l'étude de ces facteurs est celui de Chen(38) qui a étudié la qualité d'une injection au sein du striatum de rats en fonction : du débit d'injection, du temps entre la mise en place du cathéter et le début de l'injection, de la concentration du produit utilisé et du diamètre du cathéter.

L'agent utilisé était de l'albumine de sérum bovin marqué au carbone-14 dilué dans du PBS (phosphate-buffered saline), le rapport entre quantité injectée et volume de distribution été calculé par autoradiographie.

Les facteurs retrouvés comme influençant la qualité de l'injection et la survenue d'un reflux ont été le débit d'injection, avec des injections plus efficaces à des débits de 0,1 et 0,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ qu'à des valeurs de 1 et 5 $\mu\text{l}/\text{min}$, où les reflux étaient plus fréquents.

Le deuxième facteur était le diamètre de la canule d'injection : il existait moins de reflux avec une aiguille de 32 gauge qu'avec des aiguilles plus petites de 28 et 22 gauge.

Les différentes concentrations testée ainsi que le temps de latence entre l'insertion de l'aiguille et le début de l'injection ne semblent pas influencer la survenue de reflux.

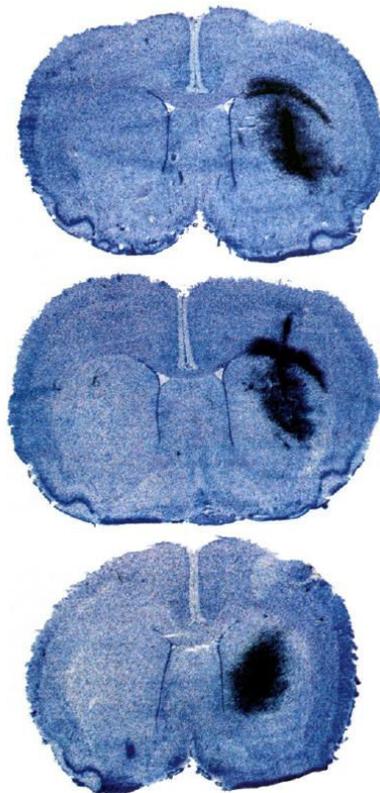


Figure 6 : Coupe d'injection faites avec des aiguilles de 22 gauge pour la coupe supérieure, 28 gauge pour l'image médiane et 32 gauge pour celle du bas. Alors que le traceur reste localisé au sein du striatum pour la dernière, il existe une fuite au sein du corps calleux pour l'injection avec l'aiguille de 28 et 32 gauge (Chen et al).

Pour optimiser l'injection et diminuer le reflux autour du cathéter, il est nécessaire de comprendre les modifications anatomiques en périphérie du site d'injection, la modélisation de cette injection a été décrite par Morrison(39). Il expose le fait que lors de l'injection la pression hydrostatique créée déplace les tissus en périphérie de l'extrémité du cathéter pour donner, non pas une source de flux sphérique(40) mais un volume annulaire autour du cathéter. La longueur de cet anneau liquidien écartant le parenchyme du cathéter est un facteur primordial de la qualité de l'injection. Il peut entraîner une distorsion de la symétrie de diffusion, ou, si cet anneau atteint la surface d'un sillon ou du cortex, conduira à une fuite dans le sillon ou un reflux de surface.

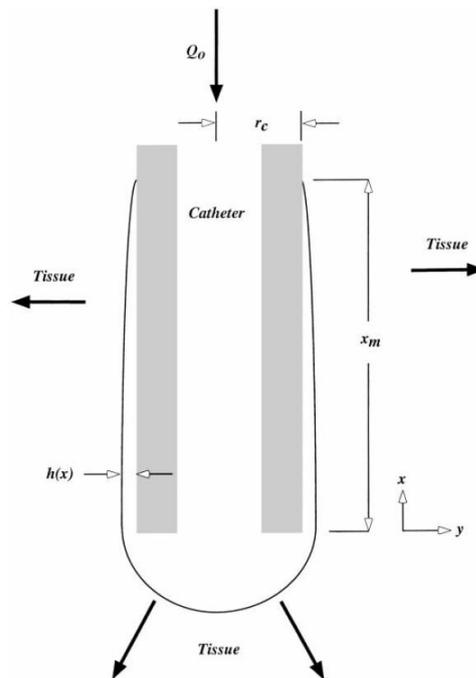


Figure 7 : Schéma de l'extrémité d'un cathéter lors d'une injection avec l'anneau de reflux. Q_0 est le flux arrivant au sein d'un cathéter de rayon r_c , x_m étant la distance de reflux : distance depuis l'extrémité du cathéter jusqu'à la fin de l'anneau de reflux. $h(x)$ étant l'épaisseur de l'anneau de reflux. Les flèches en gras représentant le flux convectif depuis l'extrémité du cathéter ou depuis l'anneau de reflux (Morrison et al).

Plusieurs paramètres influent sur la distance X_m , génératrice de reflux : les plus importants semblent être le diamètre du cathéter, le débit de l'injection et le site d'injection : substance grise d'un noyau, cortex ou substance blanche.

La longueur de cet anneau de reflux semble être croissante avec le diamètre du cathéter et le débit d'injection, une injection corticale augmenterait la longueur de cet anneau contrairement à une injection dans la substance blanche. Il est à noter que l'avantage procuré par une injection dans la substance blanche ne semble objectivable qu'à des débits plus importants.

Table 2. Results of backflow model (32-gauge catheter)

Volumetric Inflow Rate (Q_0), $\mu\text{l}/\text{min}$	Backflow Distance (x_m), cm		Percent Mass in White Layer	
	Gray matter model	Layered model	Layered model	Experiment
0.03	0.03*	0.03*	0	—
0.10	0.07	0.07	0	4
0.50	0.21	0.20	0	5
0.65	0.24	0.23	2	—
1.00	0.32	0.25	15	23
5.00	0.84	0.57	38	30

* Included only to indicate a short backflow distance at this lowest flow rate. Axial flow component in porous media at this Q_0 may introduce a significant uncertainty in this value.

Figure 8 : Exemple de modifications de reflux en fonction du débit d'injection et du site d'implantation du cathéter pour un calibre de 32 gauges (Morrisson et al).

Ce travail apporte une notion importante, les paramètres d'injection doivent être choisis en fonction de la cible à atteindre et du calibre du cathéter.

Il semble donc important de contrôler l'ensemble des paramètres pouvant nuire à une bonne délivrance intra-parenchymateuse.

Un facteur majeur de reflux est la lésion du parenchyme cérébral liée à l'insertion du cathéter en effet si un chenal de gros diamètre est créé, il formera une voie de reflux à faible résistance lors de l'injection. Ceci explique le fait que l'utilisation d'un cathéter souple, suivant les mouvements du

parenchyme cérébral sera moins pourvoyeur de reflux qu'un cathéter rigide cisillant le cerveau lors des mouvements de celui-ci(41).

Un travail important d'optimisation de design du cathéter a donc été entrepris avec plusieurs stratégies. Une façon d'augmenter la surface de contact avec le cerveau est d'augmenter le nombre de perforations d'injection comme sur un cathéter ventriculaire utilisé dans le cadre du drainage du LCS ventriculaire. Lors d'une injection avec ce type de cathéter seul le trou le plus proximal est fonctionnel et délivre réellement le traceur(42).

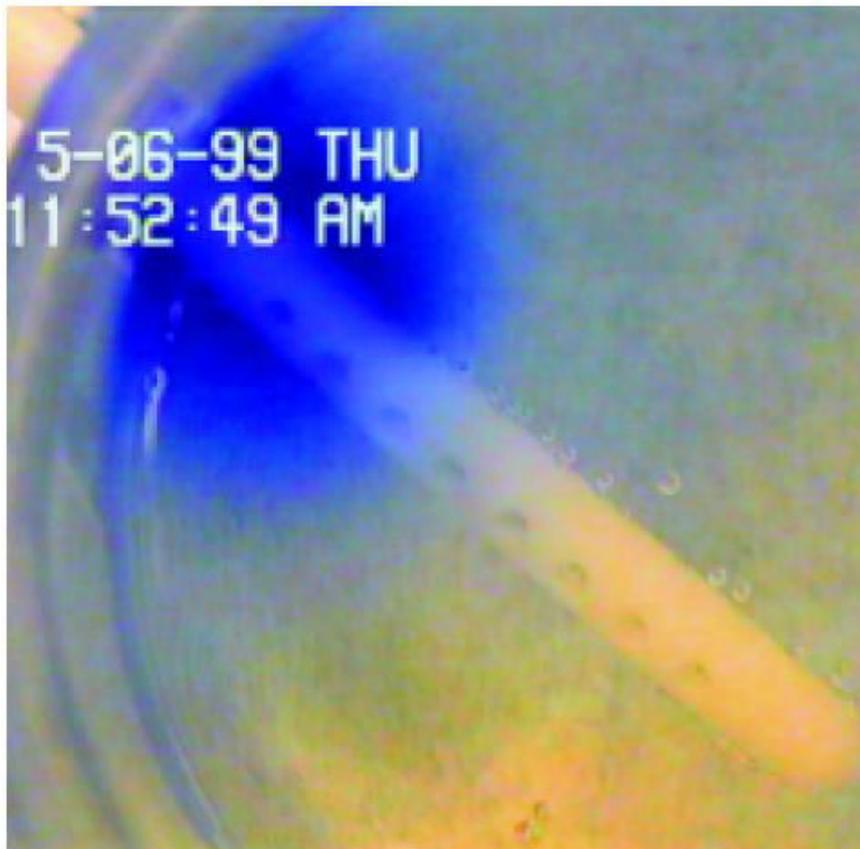


Fig 9 : injection à partir d'un cathéter ventriculaire de dérivation de LCS dans un gel d'agarose montrant une injection depuis la partie proximal uniquement, les perforations distales étant non perfusées. (Raghavan 2006)

Une des stratégies pour conserver une approche de cathéter multi-perforé est d'augmenter de façon importante l'impédance rhéologique pour que le différentiel entre le premier trou et les suivants soit négligeable, c'est ainsi qu'une équipe de l'université John Hopkins ont abordé le problème avec

succès : ils ont rempli la lumière du cathéter par un matériau poreux permettant que l'injection puisse se faire par l'ensemble des trous au long du cathéter (42). Une autre stratégie réside dans l'utilisation d'un cathéter avec une lumière d'injection différente pour chaque ouverture.

Le principal élément à maîtriser est le reflux, nous l'avons vu il est dû à la création d'un chenal le long du cathéter, si ce chenal atteint un sillon, l'épendyme ou le cortex, un flux de moindre résistance est créé, un reflux de liquide ou une fuite est alors créée.

En ce qui concerne le design du cathéter il est possible d'optimiser la diffusion en modifiant les cathéters utilisés : l'équipe de Bankiewicz à San Francisco utilise un cathéter enrobé d'une gaine de silicone sur toute sa longueur excepté la partie terminale (43). Ceci permet de créer une variation de diamètre dont la fonction est de bloquer le flux du chenal ascendant le long du cathéter pourvoyeur de reflux et de fuites, ce cathéter est appelé step-cannula, la longueur de cette marche est variable selon l'utilisation, elle semble être d'autant plus efficace que la distance entre la pointe du cathéter et la « marche » est importante mais cette distance doit être adaptée à l'anatomie locale.

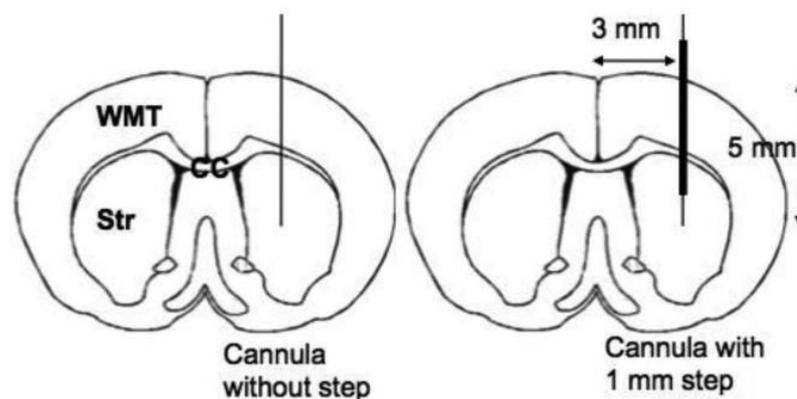


Figure 10 : Injection striatale, via un cathéter simple (image de gauche) et à l'aide d'un « step-cannula » cathéter enrobé de silicone jusqu'à 1 mm de l'extrémité distale du cathéter. (Yin et al 2010)

Si cette distance est de 3 mm lors de l'utilisation chez les primates (44), cette marche n'est plus que de 1 mm chez le rat compte tenu de l'épaisseur de son striatum (de l'ordre de 3 mm). Si l'on

considère que la longueur du chenal de reflux est limitée par l'augmentation de l'épaisseur du cathéter, si celui-ci se situe trop proche des limites du volume cible une fuite sera inévitable (dans le corps calleux dans le cas d'une injection striatale).

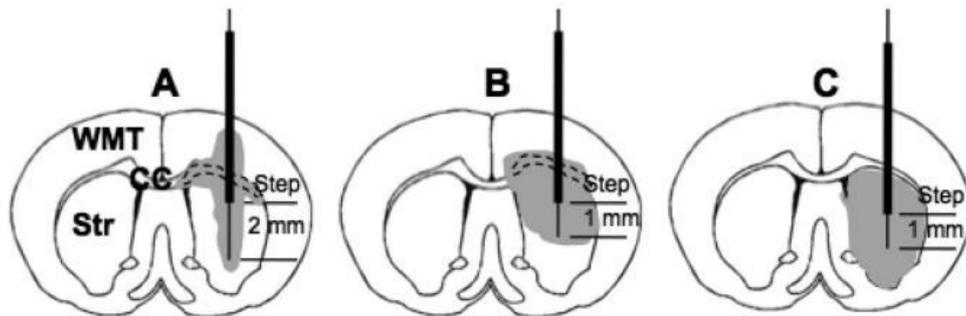


Fig 11 : Illustration de l'importance d'adapter la longueur de la partie la plus fine du cathéter en fonction de la cible, une augmentation de diamètre trop proche des zones de fuites hors cible se traduit par une diminution du volume au sein du tissu cible (Yin 2010).

Lors de ce travail les auteurs ont testé des injections d'un traceur coloré au sein de gels d'agarose pour évaluer la qualité de distribution en temps réel et in vivo par une injection de GDNF au sein du striatum de rat. Les résultats sont significatifs, lors des injections au sein du gel d'agarose la présence de cette variation de diamètre est un garant d'une distribution sphérique et minimise les reflux le long du cathéter. L'injection est de bonne qualité même pour des débits d'injection supérieurs aux débits optimaux pour l'infusion convective.

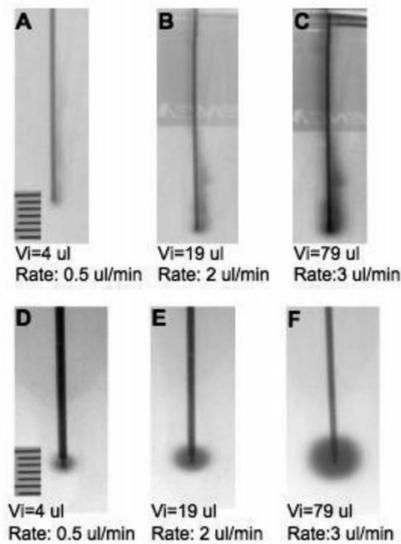


Fig 12 : Injection dans un gel d'agarose d'un traceur coloré, les injections A, B et C sont faites avec un cathéter standard, un reflux est visible même à un débit optimal (0,5 μ l/min), alors qu'avec le cathéter « step-cannula » la distribution est sphérique à des débits importants (3 μ l/min).

Pour l'utilisation in-vivo, les résultats sont similaires avec des volumes de distributions beaucoup plus importants. Avec le cathéter « step-cannula » les fuites sont minimales au sein du corps calleux.

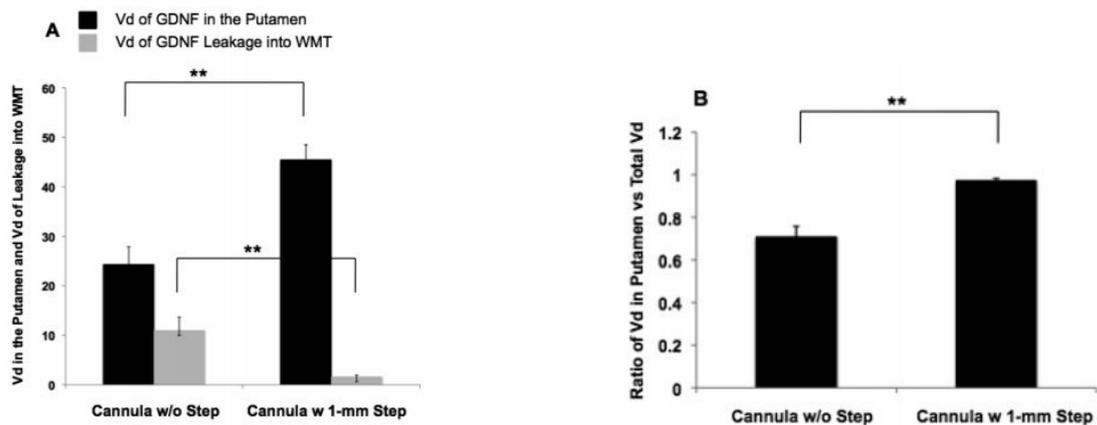


Fig 13 : Histogramme A, Volume de distribution du GDNF au sein du striatum et Volume ayant fuit au sein du corps calleux. Histogramme B, Rapport entre le volume injecté et le volume de distribution au sein du corps calleux en fonction du type de cathéter (Yin et al 2010).

Nous avons donc vu que la taille, le matériau composant le cathéter, son design et le débit d'injection sont des éléments cruciaux à intégrer pour limiter les fuites et délivrer l'agent thérapeutique au sein de la cible.

Malgré des études précliniques prometteuses, les principales études cliniques réalisées de traitement de tumeurs cérébrales par infusion convective ont été des échecs. L'équipe de Sampson de la Duke University a étudié de manière systématique la position des cathéters pourvoyeurs de fuites et établit des recommandations (45).

Critères majeurs de qualité :

Les cathéters doivent avoir des points d'entrée corticaux distants

L'extrémité du cathéter doit se trouver à plus de 3 cm de la surface, à plus de deux centimètres de la berge de résection et plus d'un centimètre de l'épendyme.

Conseils de positionnement :

Les cathéters doivent être positionnés dans la prise de contraste ou le parenchyme adjacent à la tumeur le cas échéant.

L'extrémité des cathéters doivent être distants de 2 à 4 cm au moins et au contact de tissus infiltrés ou résidus tumoraux

Les cibles privilégiées doivent être les voies anatomiques d'infiltration naturelle de la tumeur (T2 pre-opératoire) et diamétralement opposées par rapport au foyer d'exérèse.

L'auteur propose un logiciel permettant, à partir d'un algorithme de simulation de prédire le mode et volume de diffusion en fonction de la position du cathéter et du volume injecté. Il propose également un évaluateur du positionnement des cathéters en fonction des recommandations énoncées ci-dessus. Le positionnement est alors défini comme optimal, acceptable ou inadéquate. L'injection est ensuite faite de l'albumine à l'iode 123 utilisée comme marqueur, un SPECT-CT est

effectué en fin d'injection. Ces résultats sont ensuite comparés avec les données du logiciel de simulation.

Il en résulte que les critères proposés augmentent le taux de succès d'une injection mais que ceci n'est pas suffisant car 60 % des cathéters placés idéalement ont permis une injection efficace, 40 % si positionnement acceptable.

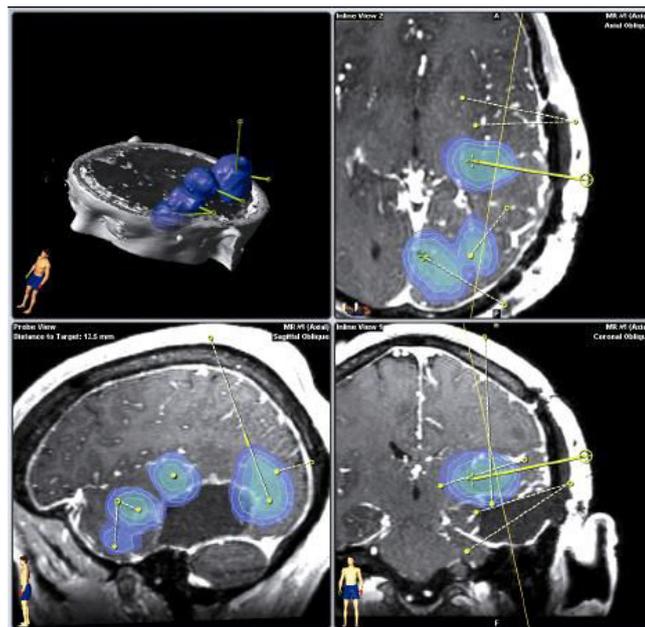


Figure 14 : exemple de simulation de délivrance avec le logiciel de simulation de la Duke University (Sampson 2007)

Il s'avère donc que les caractéristiques intrinsèques du cathéter, le positionnement de celui-ci ainsi que le débit de délivrance sont des éléments d'une importance cruciale afin que l'injection soit pertinente en termes de volume de distribution.

Une équipe israélienne a proposé une approche complémentaire très intéressante pour limiter le reflux le long du cathéter, il s'agit de l'équipe de Y. Mardor de Tel-Aviv. Cette équipe a étudié

l'influence que pouvait avoir une variation de la viscosité sur la qualité de la délivrance lors d'une infusion convective (46). Le principe de l'étude résidait dans une injection au sein du striatum de rat de solution de viscosité différentes, la variation de viscosité était modulée par des concentrations différentes d'albumine, d'éthanol, sucrose ou taxol. Afin de suivre cette injection deux traceur ont été utilisés : le gadolinium et le bleu d'Evans utilisés en co-injection permettant ainsi de suivre l'injection en temps réel et de vérifier les données IRM par une confrontation histologique.

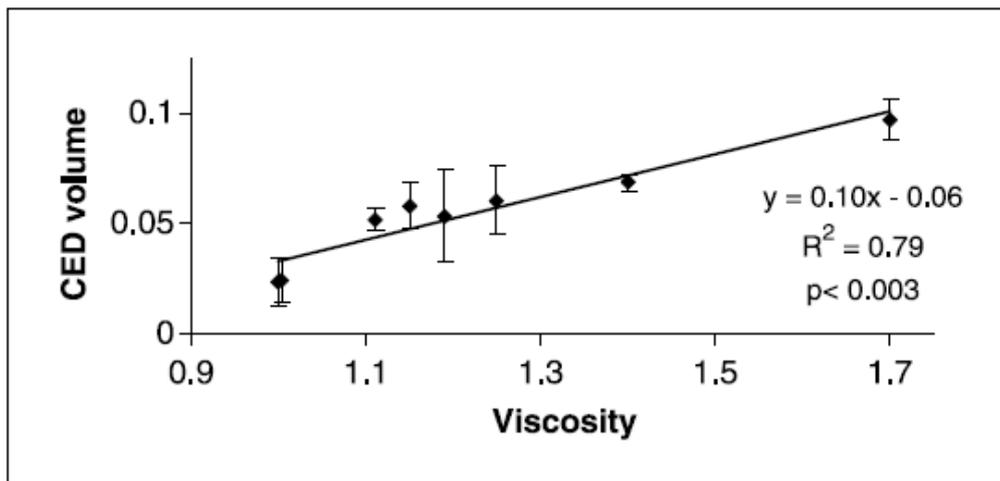


Figure 15 : courbe montrant l'optimisation du volume de distribution en fonction de la viscosité, l'augmentation de la viscosité diminue significativement les fuites le long du cathéter (Mardor 2005)

La diminution des fuites a permis de pouvoir produire des injections plus pertinentes en terme de recouvrement de la cible de diminuer le nombre d'injections conduisant à des fuites intraventriculaires ou des recouvrements partiels du striatum (fig 16).

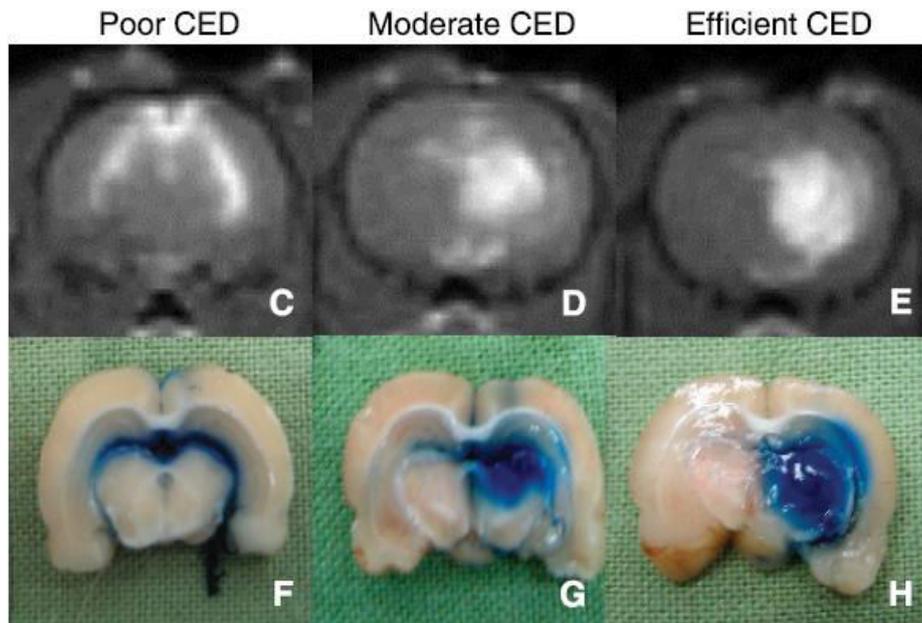


Figure 16 : exemple de comparaison entre l'étude de la distribution en IRM et sur des coupes histologiques montrant une fuite majeure dans les ventricules (C, F), un recouvrement partiel de la cible du fait de fuites (D,G) et une infusion optimale (E, H) (Mardor 2005).

1.8 Proposition d'un plan de travail

Nous avons donc évoqués les différents paramètres indispensables à maîtriser pour optimiser une infusion convective, le plan de ce travail suivra donc plusieurs étapes successives :

- Choisir une molécule dont les caractéristiques physico-chimiques en font un candidat adapté à une utilisation locale.
- Comprendre la pharmaco-cinétique lors d'une injection intratumorale afin d'évaluer la pertinence de cette stratégie avec la molécule choisie.
- Comparer l'efficacité d'un traitement intra-tumoral par infusion convective par rapport à un traitement conventionnel.
- Mettre au point un modèle anatomiquement pertinent permettant une validation préclinique d'une innovation technologique orientée vers la clinique ;

- Anticiper la qualité d'une injection au sein du parenchyme cérébral afin de ne pas confondre absence d'efficacité du concept et mauvaise délivrance en rapport avec des fuites.
- Mettre au point un système d'injection pertinent implanté, adapté à une injection lente et de volume adéquat.
- Optimiser le positionnement des cathéters grâce à une meilleure connaissance anatomique de la diffusion lors d'une injection dans la substance blanche d'un encéphale humain.

Justification du choix de la molécule :

Compte tenu des points évoqués lors du chapitre précédent, la molécule de choix dans une stratégie de traitement local par infusion convective doit remplir plusieurs caractéristiques pour être considérées comme un candidat sérieux. La première est d'éviter le passage de la barrière hémato-encéphalique depuis l'interstitium tumoral vers le secteur vasculaire tel qu'observé avec l'échec thérapeutique des implants de carmustine(47). La carmustine une molécule de petit poids moléculaire et lipophile, elle traverse donc facilement la barrière hémato-encéphalique depuis le secteur vasculaire. Il s'agit d'une molécule de choix pour un traitement systémique mais lors d'une injection locale ces propriétés physico-chimiques entraînent un passage rapide depuis le secteur interstitiel vers le secteur vasculaire. Le deuxième point est de choisir une molécule qui ne possède pas à priori de neurotoxicité intrinsèque.

Il pourrait être intéressant de tester une molécule déjà utilisée dans le traitement des glioblastomes dans le but de faciliter l'acceptabilité d'un éventuel protocole clinique.

Une molécule semble remplir ces critères ; il s'agit du bevacizumab, elle possède une masse moléculaire importante 149kDA, utilisée en clinique mais avec des résultats discutables en ce qui

concerne l'efficacité anti-tumoral(19). Par soucis d'acceptabilité, il apparaît peu envisageable d'utiliser, par une voie plus invasive l'administration d'une molécule ayant déjà prouvé une efficacité notable par voie systémique.

Etude pharmacocinétique de
l'injection de bevacizumab
chez des souris porteuses de
tumeurs cérébrales U 87.

2.1. Introduction

Le but de cette expérience est l'étude de la pharmacocinétique de l'avastin avec deux modes de délivrance différents : une injection intra-péritonéale et une injection intra-tumorale chez des souris porteuses de tumeurs cérébrales. En effet, afin de pouvoir évaluer la pertinence de cette approche et de valider l'utilisation de la molécule choisie : le bevacizumab. Il nous semblait également important de pouvoir évaluer la concentration de l'anticorps au sein de la tumeur lors des ces deux types de traitement pour confirmer le fait qu'une injection d'anticorps directement au sein de la tumeur puisse avoir un intérêt en terme de biodisponibilité.

2.2. Matériels et méthodes

Pour cette expérience, deux groupes de 5 souris Nude âgées de 3 mois ont été utilisés : toutes étaient porteuses de tumeurs cérébrales, vérifiées en IRM avant injection de bevacizumab. 5 souris ont reçu une injection intra-péritonéale (IP) de bevacizumab à la posologie utilisée en clinique, 5 autres une injection intra-tumorale (IT) par infusion convective, différents prélèvements étaient réalisés 24 heures plus tard afin de doser l'agent thérapeutique dans différentes cibles.

Lignée tumorale :

La lignée étudiée est une lignée de gliome humain U 87 MG. Les cellules ont été obtenues via l'American Type Culture Collection, Manassas, VA (ATCC). Les cellules ont été cultivées en monocouche dans un milieu contenant du DMEM avec 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mmol/l de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 40 µg/ml de gentamycine. Avant implantation les cellules ont été dispersées avec une solution de trypsine/EDTA et conditionnée à une concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules /20 µl de DMEM.

Implantation :

L'animal est anesthésiée par inhalation d'isoflurane (une induction à un débit de 3 ml/min ; puis poursuite à un débit de 1,5 ml/min). L'animal induit est placé sur une couverture chauffante jusqu'à la procédure d'implantation. Il est installé sur le cadre stéréotaxique (Kopf®). Une désinfection cutanée du crâne de l'animal (bétadine) est réalisée, puis une injection sous-cutanée de bupivacaïne était réalisée au niveau du site chirurgical (solution à 0,25%, dose maximale 8 mg/kg) afin de procurer une analgésie pour la période post-opératoire immédiate.

Les plan osseux sont exposés au bistouri par incision céphalique médiane dans un plan sagittal de 1 cm (sans dépasser la ligne joignant les canthus internes).

L'aiguille d'implantation est mise en place après repérage du bregma et craniotomie avec une aiguille 27 gauges à 2 mm à droite du bregma.

La tumeur est implantée au sein du striatum : injection de 5.10^5 cellules U 87 MG à l'aide d'une seringue de précision (Hamilton, dans un volume de 5 μ l) à une profondeur de 2,5 mm

La peau était fermée par un point au monocryl 3.0.

La souris était maintenue sur une couverture chauffante jusqu'au réveil.

IRM post-implantation :

Afin de contrôler la présence, la localisation et taille de la tumeur, une IRM était effectuée 12 jours après l'implantation des cellules tumorales.

Le développement d'une tumeur, si elle est quasiment systématique nécessite d'être localisée afin de pouvoir réaliser une injection intra-tumorale précise. De plus la taille des tumeurs étant variable

cet examen est intéressant pour ne garder que dix des tumeurs les plus pertinentes à injecter parmi les 14 souris implantées

L'examen comprend l'acquisition de séquences T1, T2 et T1 avec injection de gadolinium.

Les acquisitions sont réalisées sous anesthésie générale à l'isoflurane durant cette période la température et fréquence respiratoire de l'animal sont surveillées.

Après avoir réalisé les séquences T1 et T2, 10ml/kg de Dotarem® (0,5 mmol/ml) sont injectés au moyen d'une seringue à insuline dans la cavité péritonéale de la souris. Des acquisitions pondérées T1 sont effectuées 1 heure plus tard. Les souris sont ensuite réparties dans 2 groupes homogènes en sélectionnant les tumeurs potentiellement injectables.

Injection de bevacizumab :

L'injection a lieu 14 jours après l'implantation tumorale. Deux groupes de traitements ont été formés, un groupe d'injection systémique intra-péritonéal (IP) et un groupe d'injection intra-tumoral (IT) par infusion convective.

Pour le groupe IP : une injection à une dose comparable à celle utilisée en clinique (10 mg/kg) est administrée, ce qui correspond, pour une souris de 20 g, à une dose de 0,2 mg de bevacizumab diluée dans du PBS pour un volume d'injection total de 100µl. L'injection été faite sous contention manuelle dans le flanc droit.

Pour le groupe IT : les animaux sont anesthésiés comme décrit lors de l'implantation tumorale, puis placé dans le cadre de stéréotaxie. Le site d'injection était adapté en fonction des données de l'IRM.

La dose injectée a été choisie arbitrairement à $\frac{1}{4}$ de la dose utilisée pour l'injection IP, soit 2,5 mg/kg soit 0,05mg de bevacizumab diluée dans 10 µl de PBS.

L'injection est faite grâce à un cathéter conçu spécialement pour ce travail par le laboratoire BD[®], il s'agit d'un cathéter de 24 gauges. Le cathéter est pré-rempli de la solution injectée, puis connecté à un prolongateur lui-même raccordé à une seringue Hamilton de 1ml montée sur un pousse seringue. Le cathéter est placé au cœur de la cible, le trocard du cathéter est retiré, l'injection débute après 1 minute de latence en place afin de diminuer les risques de fuites.

L'injection est réalisée à un débit de 1μL/min pendant 10 minutes, à la fin de l'injection une attente de 5 minutes est observée avant de retirer très progressivement le cathéter (2,5 mm en 1 minute).

De la cire de Horsley est appliquée sur la craniotomie, La peau est fermée par un point au monocryl 3.0.

La souris est maintenue sur une couverture chauffante jusqu'au réveil.

Sacrifice :

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale 24 heures après l'injection.

Les prélèvements sont immédiatement réalisés :

1ml de sang en intra-cardiaque

Les reins

Le foie

L'encéphale avec séparément la tumeur et l'hémisphère controlatéral à l'injection

Le sang est centrifugé pour récupérer le plasma, l'ensemble des prélèvements est immédiatement congelés à -80°C.

Dosage :

La méthode de dosage du bevacizumab utilisée par G. Nugue utilise une technique de suspension array, elle a été décrite et validée au sein du laboratoire par Nugue et al(48).

Le bevacizumab est dosé par une technique de suspension array. Les billes de VEGF sont déposées dans des puits sur des plaques Bio-Plex[®] puis incubées avec les prélèvements préalablement solubilisés dans une solution de PBS puis avec des IgG anti-humains conjuguées avec une protéine de phycoerythrine (Sigma-Aldrich[®]). Les billes sont rincées 3 fois sur la station. La fixation est mesurée via la phyco-erythrine sur un Bio-Plex 220 (Bio-Rad) et analysée par le logiciel Bio-Plex Manager 5.0 (Bio-Rad).

Ethique :

L'ensemble des expériences menées sur ces animaux a fait l'objet d'une demande auprès du comité d'éthique et se conforment aux recommandations gouvernementales en ce qui concerne les expériences sur les animaux (Décret 87-848, 1987).

2.3.Résultats

Dans cette étude, les concentrations plasmatiques de bevacizumab mesurées (Tableau 1) sont respectivement de 125,6 (\pm 22,8 μ g/ml) pour l'injection intra-péritonéale et 1,8 (\pm 1,6) μ g/ml pour l'injection intratumorale par CED. En ce qui concerne la concentration au sein de la tumeur, elle est de 0,307 (\pm 0,127) μ g/ml pour l'injection IP et 0,114 (\pm 0,040) μ g/ml. La concentration au niveau de l'hémisphère controlatéral à la tumeur est de 0,146 (\pm 0,051) μ g/ml pour une injection systémique et 0,163 (\pm 0,074) μ g/ml pour l'injection par infusion convective. Pour ce qui est de la concentration de bevacizumab au niveau hépatique, pour une injection IP : 1,314 (\pm 0,636) μ g/ml et

0,025 (+/- 0,029) µg/ml pour le groupe IT. Une injection systémique entraîne une concentration rénale de 5,554 (+/- 2,416) µg/ml alors que l'injection intra-tumorale est responsable de concentration moins élevée 0,091 (+/- 0,102)µg/ml.

	Injection intra-péritonéale Concentration de BCZ en µg/ml	Injection intra-tumorale CED Concentration de BCZ en µg/ml
Tumeur	0,307 (+/-0,127)	0,114 (+/- 0,040)
Plasma	125,6 (+/-22,8)	1,8 (+/- 1,6)
Hémisphère controlatéral	0,146 (+/-0,051)	0,163 (+/-0,074)
foie	1,314 (+/-0,636)	0,025 (+/- 0,029)
rein	5,554 (+/- 2,416)	0,091 (+/- 0,102)

Tableau 1 : concentrations de bevacizumab dans les différentes cibles 24 heures après injection intra-péritonéale ou intra-tumorale directe.

2.4. Discussion :

Plusieurs points sont remarquables en ce qui concerne la pharmacocinétique du bevacizumab. Le premier point à valider était l'intérêt quant à la concentration systémique. En effet, un des intérêts du traitement local par infusion convective est la réduction de la concentration systémique de l'agent thérapeutique afin de minimiser l'incidence des effets secondaires. Nous avons pu observer une concentration nettement plus basse : 125,6 (+/-22,8) µg/ml pour une injection IP contre 1,8 (+/- 1,6) µg/ml pour une injection IT, il existe une différence de concentration de l'ordre d'un facteur 100. Ceci confirme l'absence de passage de la barrière encephalique vers le secteur vasculaire de l'anticorps. Un élément apporté par cette étude est que la concentration obtenue au sein de la tumeur n'est pas significativement différente entre une injection directe par rapport à une injection

systémique. Probablement du fait de l'altération de la barrière hémato-encéphalique liée à la néoangiogénèse. Cette altération permet un passage de notre agent thérapeutique au sein de la tumeur de manière assez homogène contrairement à ce qui pourrait se passer au sein d'un glioblastome rencontré en clinique humaine (Fig 19).

La concentration dans ce cas serait probablement moins homogène, moins élevée.

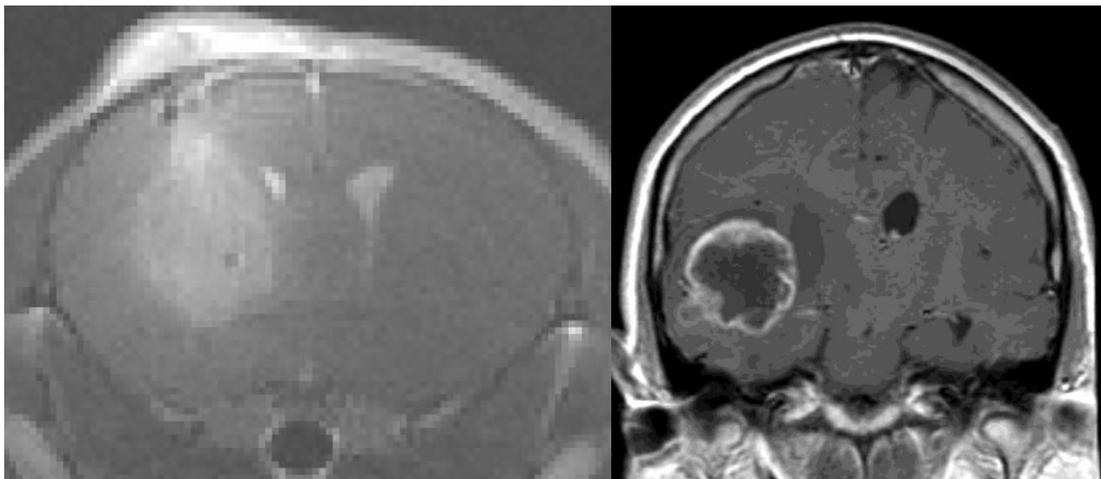


Figure 19 : l'image de gauche est une IRM en séquence T1 avec injection de gadolinium d'une tumeur U87, la prise de contraste est importante et homogène, l'image de droite est une IRM en séquence T1 avec injection de gadolinium d'un patient porteur d'un glioblastome, la prise de contraste est hétérogène en cocarde.

En outre les résultats montrent qu'il existe une concentration non négligeable de bevacizumab au sein de l'hémisphère controlatéral à la tumeur et à l'injection, la concentration obtenue lors d'une injection IT est comparable à la concentration lors de l'injection IP. Ceci prouve que lors d'une injection intra-cérébrale la molécule injectée est transportée à distance du site d'injection de façon efficace, la concentration au sein de la tumeur étant comparable à la concentration au sein de l'hémisphère controlatéral. Ce résultats nécessite quelques réflexions : le fait que la concentration de l'anticorps soit la même au sein de l'hémisphère controlatéral que de la cible est une confirmation que la convection est un moyen efficace de transporter des molécules avec un coefficient de diffusion bas sur une distance longue en un temps réduit. L'autre remarque est que sur ces mesures

il n'existe pas de gradient de concentration entre le site d'injection et l'hémisphère controlatéral. Il est donc important de souligner que 24 heures après l'injection, la concentration au sein de la tumeur est probablement sous estimée car déjà diminuée par le gradient de pression au sein du liquide interstitielle lié à la densité cellulaire importante, chassant l'anticorps vers des zones de pression plus basses, alors qu'il existe toujours un gradient plasma/tumeur pour mes souris traitées par injection IP (125,6 (+/-22,8) µg/ml pour le plasma contre 0,307 (+/-0,127) µg/ml pour la tumeur). Dans l'injection intra-péritonéale « l'alimentation » tumorale en bevacizumab se poursuit plus longtemps. Il est donc logique d'estimer que la concentration par injection locale entraîne une concentration supérieure à la concentration induite par une administration systémique mais qui diminue assez rapidement une fois l'injection terminée. Ceci est contraire à une injection systémique où ce gradient persiste, dans la limite où l'agent thérapeutique n'est pas métabolisé trop vite. Ce constat s'applique à un anticorps, beaucoup moins pour une molécule comme une nitroso-urée métabolisée en 5 minutes dans le plasma(49).

La concentration au niveau rénale est notablement plus faible lors d'une injection IT ce qui est un point important en raison de la toxicité rénale du bevacizumab cause de l'arrêt de ce traitement lors d'une utilisation prolongée, notamment pour les tumeurs pédiatriques.

Les conclusions pouvant être faite de cette étude pharmacocinétique sont les suivantes :

- Une concentration adaptée peut être obtenue par une injection locale en infusion convective au niveau de la tumeur.
- Cette délivrance atteint des cibles distantes du site d'injection de manière efficace même avec une molécule à diffusivité faible.
- Les concentrations plasmatiques sont significativement plus faibles avec une probable incidence plus faible des effets secondaires

- Le gradient de concentration est maintenu le temps de l'injection mais semble disparaître précocement à l'arrêt de celle-ci.

Il semble donc que ce mode de délivrance soit adapté à la molécule d'intérêt dans le traitement des tumeurs cérébrales, la prochaine question à laquelle nous nous proposons de répondre est l'efficacité thérapeutique de ce traitement sur ce modèle de tumeur murine.

Etude de l'efficacité
thérapeutique de l'injection
intra-tumoral de bevacizumab
dans le traitement d'un
modèle de tumeur cérébrale
U87 chez la souris.

3.1. Introduction

Le but de cette étude était de comparer l'efficacité d'un traitement intra-tumoral par infusion convective sur la survie des souris porteuse d'un glioblastome humain (modèle U87 MG) comparé à un traitement systémique par injection intrapéritonéal ou d'une injection de placebo en traitement local. Une étude de la réponse radiologique a également été réalisée.

3.2. Matériels et méthodes :

L'étude est composée de trois conditions de traitement : bevacizumab par injection intra-tumorale, bevacizumab par injection systémique et contrôle (bevacizumab dénaturé en injection intra-tumorale), chaque groupe comprend 10 souris. La première étape consiste à implanter les cellules tumorales U 87 au sein du striatum droit des souris. Douze jours plus tard une IRM est réalisée afin de constituer des groupes homogènes en termes de volume tumoral. Les souris sont traitées au 14^{ème} jour. Une IRM de contrôle est réalisée au 28^{ème} jour puis les animaux sont suivis jusqu'à l'apparition de signes de souffrance, entraînant alors le sacrifice. Les encéphales sont prélevés pour analyses histologique et immuno-histologiques.

Lignée tumorale :

La lignée étudiée est une lignée de gliome humain U 87 MG. Les cellules ont été obtenue via l'American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Les cellules sont cultivées en monocouche dans un milieu contenant du DMEM avec 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mmol/l de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 40 µg/ml de gentamycine. Avant implantation les cellules sont dispersées avec une solution de trypsine/EDTA et conditionnée à une concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules /20 µl de DMEM.

Implantation :

Les expérimentations ont été réalisées sur un modèle de souris Nude (Laboratoire Harlan) âgées de 3 mois. L'implantation suit le même protocole que précédemment décrit.

IRM post-implantation :

Afin de contrôler la présence, localisation et taille de la tumeur une IRM est effectuée 12 jours après l'implantation des cellules tumorales.

En effet le développement d'une tumeur, si elle est quasiment systématique nécessite d'être localisée précisément afin de pouvoir réaliser une injection intra-tumorale précise. De plus la taille des tumeurs étant variable cet examen est intéressant pour ne garder sur les 14 souris implantées que les 10 tumeurs les plus pertinentes à injecter.

L'examen comprend l'acquisition de séquences T1, T2 et T1 avec injection de gadolinium.

Les acquisitions sont réalisées sous anesthésie générale, comme décrit précédemment.

Après avoir réalisé les séquences T1 et T2, 10ml/kg de Dotarem® (0,5 mmol/ml) sont injectées au moyen d'une seringue à insuline dans la cavité péritonéale de la souris. Des acquisitions pondérées T1 sont effectuées 1 heure plus tard. Les souris sont ensuite réparties dans 3 groupes homogènes en sélectionnant les tumeurs potentiellement injectables et en excluant les autres.

Une IRM a été réalisée le 24^{ème} jour après implantation de la tumeur pour évaluer la réponse radiologique au traitement.

Les IRM sont analysées afin de déterminer le volume de la tumeur. Celui-ci est mesuré grâce au logiciel RadiANT DICOM Viewer® selon la formule suivante :

Volume = nombre de pixels comprenant la tumeur *surface d'un pixel* épaisseur d'une coupe.

Surface d'un pixel = 0,117 mm*0,117 mm

Epaisseur de coupe = 0,7 mm

Injection de bevacizumab :

L'injection à lieu 14 jours après l'implantation tumorale. Trois groupes de traitements ont été formés : un groupe d'injection systémique intra-péritonéal (IP) et un groupe d'injection intra-tumoral (IT) par infusion convective et un groupe contrôle.

Pour le groupe IP : une injection à une dose comparable à celle utilisée en clinique (10 mg/kg) est réalisée, ce qui correspond pour une souris de 20 g à une dose de 0,2 mg de bevacizumab dilué dans du PBS pour un volume d'injection total de 100µl. L'injection est faite sous contention manuelle dans le flanc droit.

Pour le groupe IT : les animaux sont anesthésiés comme décrit lors de l'implantation tumorale, puis placé dans le cadre de stéréotaxie, la sédation était maintenue à l'isoflurane à la dose de 1,5 ml/min. Le site d'injection est adapté en fonction des données de l'IRM.

La dose injectée a été choisie arbitrairement à ¼ de la dose utilisée pour l'injection IP, soit 2,5 mg/kg soit 0,05mg de bevacizumab diluée dans 10 µl de PBS.

Pour le groupe bevacizumab dénaturé : le protocole d'injection était le même que le groupe IC mais le bevacizumab, subissait une dénaturation thermique durant 1h à 100°C. Les volumes et la concentration de l'anticorps sont la même que le groupe IC.

L'injection est faite grâce à un cathéter conçu spécialement pour ce travail par le laboratoire BD[®], il s'agissait d'un cathéter de 24 gauges. Le cathéter était pré-rempli de la solution injectée, le cathéter était connecté à un prolongateur lui-même raccordé à une seringue Hamilton 1ml montée sur un

pousse seringue. Le cathéter était placé au cœur de la cible, le trocard du cathéter était ensuite retiré, l'injection commençait après 1 minute de latence en place pour diminuer les risques de fuites.

L'injection était ensuite réalisée à un débit de 1 μ L/min pendant 10 minutes, à la fin de l'injection une attente de 5 minutes était observée avant de retirer très progressivement le cathéter (2,5 mm en 1 minute en moyenne).

De la cire de Horsley était appliquée sur la craniotomie, La peau est fermée par un point au monocryl 3.0.

La souris est maintenue sur une couverture chauffante jusqu'au réveil.

Suivi des animaux :

Un suivi clinique rigoureux et quotidien des animaux est réalisé avec une euthanasie sans délai en cas d'atteinte des points limites défini selon 2 classes d'alerte A et B.

Signes cliniques d'alerte de classe A

Prostration

A l'observation de ce signe, l'euthanasie de l'animal est réalisée sans délai.

Perte de poids (liée à la cachexie et/ou au manque d'alimentation)

Echelle de gradation de perte de poids de l'animal par rapport au poids initial et attitude adoptée :

Niveau 0 : perte de poids inférieure à 5%. Pas de consigne particulière

Niveau 1 : perte de poids comprise entre 5 et 20%,

En association avec un autre signe clinique d'alerte de classe B, l'euthanasie de l'animal est réalisée sans délai.

En absence d'association avec un autre signe clinique d'alerte de classe B, une surveillance quotidienne est programmée.

Niveau 2 : perte de poids supérieure ou égale à 20%, l'euthanasie de l'animal est réalisée sans délai.

Epistaxis

L'euthanasie de l'animal est réalisée sans délai.

Signes cliniques d'alerte de classe B

Signes morphologiques

Posture anormale (inclinaison permanente de la tête)

Mobilité de l'animal

Niveau 0 : absence de signe

Niveau 1 : hypokinésie légère

Niveau 2 : akinésie

Comportement

Rotation de l'animal

Qualité du poil

Niveau 0 : poil normal

Niveau 1 : anomalies de qualité du poil

L'arbre décisionnel de décision suivi clinique des animaux est résumé dans le tableau 2.

Sacrifice :

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, les encéphales prélevés et congelés.

Niveau d'alerte		Niveau d'alerte		Rotation de l'animal		Inclinaison tête (2)		Mobilité			Prostration		Epistaxis (2)		Entretien du poil		Renforcement des yeux	
		Oui B	non	Oui B	non	Ø normale	hypokinésie	akinésie	Oui A	non	Oui A	non	Oui B	non	Oui B	non		
Perte de poids (1)	< 5%	Ø	B	B	Ø	B	A	A	A	A	A	B	B					
	5 - 20 %	B	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A	A					
	> 20 %	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A					
Renforcement des yeux	(oui non), oui : ou si B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A	A						
Entretien du poil	(oui non), non : ou si B	A	A	A	B	A	A	A	A	A	A							
Epistaxis (2)	(oui non), oui : ou si A	A	A	A	A	A	A	A										
Prostration	(oui non), oui : ou si A	A	A	A	A	A												
Mobilité	normale	Ø	B	B	Ø	B												
	hypokinésie	B	A	A	B													
	akinésie	A	A	A														
Inclinaison tête (2)	(oui non), oui : ou si B	A																
Rotation de l'animal	(oui non), oui : ou si B																	

Tableau 2 : organigramme décisionnel définissant les critères de mauvaise tolérance devant conduire au sacrifice de l'animal.

Les encéphales prélevés sont ensuite coupés dans le plan coronal en centrant la coupe sur le point d'injection puis congelés. Une première analyse est réalisée par une coloration hématoxyline éosine.

Des analyses immuno-histologiques sont réalisées par la suite:

-Collagène IV pour évaluer les modifications structurelles en rapport avec une éventuelle angiogénèse.

-KI 67 pour estimer la prolifération tumorale.

Les mesures d'angiogénèse sont des moyennes de points de fixation intense (points chauds) au sein des zones les plus fixantes de la tumeur définies alors comme zones d'angiogénèse intense, il sera définis alors des zones au sein de la tumeur moins fixantes définies comme zones d'angiogénèse réduite.

Les mesures de prolifération sont réalisées au sein des zones d'angiogénèse intense ainsi qu'au niveau des zones d'angiogénèse réduite. Les mesures quantitatives étaient pour chaque cas une moyenne des points « chaud » de fixation par champs sur 5 comptages sur des zones différentes.

Après congélation des coupes de 10 μm d'épaisseur sont réalisées puis les lames sont laissées à sécher 1 h à température ambiante. La fixation se fait par immersion dans du Paraformaldéhyde à 4% pendant 30 minutes, suivi de trois lavages au PBS 1X. Ces lavages sont suivis d'une incubation de 20 minutes dans du PBS avec 10% de sérum normal de chèvre.

Les anticorps primaires sont mis en contact à une dilution d'un centième dans du PBS 1X contenant 10 % de sérum de chèvre normal toute une nuit à une température de 4°C, sous agitation.

Puis trois lavage au PBS 1X de 10 min sont nécessaire avant d'incuber les anticorps secondaires dilués au 1/500ème dans du PBS 1X et 10 % de serum normal de chèvre pendant 30 minutes à température ambiante. De nouveau trois lavages au PBS 1X sont réalisés, les lames sont laissées à sécher. Les anticorps tertiaires sont laissés en contact puis lavés, les lames sont ensuite collées au FluorSave®. La

lecture est faite après émissions à des longueurs d'ondes de 550 nm pour le CY3 et 496 nm pour le FITC.

Liste des anticorps utilisés:

- IgG de lapin anti souris Collagène 4 (Novotec Ref:20451)
- Anticorps monoclonal Ki67 de souris anti-humain (Sigma Ref:M7240)
- IGg de chèvre anti lapin couplé CY3 550 nm
- FITC anti souris (SIGMA F8521).

Ethique :

L'ensemble des expériences menées sur ces animaux avait fait l'objet d'une demande auprès du comité d'éthique et se conforment aux recommandations gouvernementales en ce qui concerne les expériences sur les animaux (Décret 87-848, 1987).

3.3. Résultats

La première IRM avait pour but de vérifier la prise tumorale et l'absence de complication après injection des cellules tumorales.

Sur cette IRM la tumeur apparaît en hypersignal T1, prenant le contraste après injection de gadolinium et en hypersignal T2.

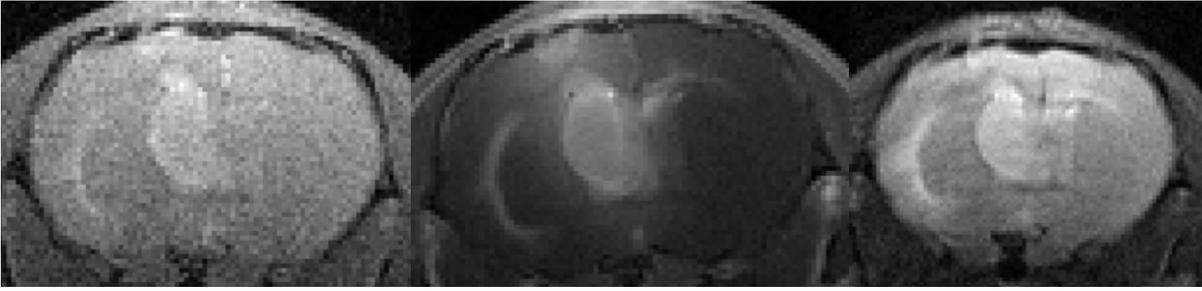


Figure 20 : IRM pondérée en T1 à gauche, T1 avec injection de gadolinium au centre et T2 à droite, montrant une tumeur en hypersignal à toutes les pondérations et prenant le contraste au sein du striatum droit.

Volumes tumoraux lors de L'IRM post-implantation à J12:

Le volume moyen est de 227(+/- 314) mm³ pour les acquisitions en T1, 243 (+/- 308) mm³ pour le T1 avec injection de gadolinium et 230 (+/- 303) mm³ pour les séquences T2.

Si l'on considère la répartition par bras de traitement les volumes respectifs en T1, T1 avec injection de gadolinium et T2 sont pour :

le groupe Bevacizumab en injection IT par CED : 165 (+/-249) mm³, 198 (+/- 314) mm³, 228 (+/- 314) mm³ et 179 (+/- 260) mm³.

le groupe Bevacizumab en injection systémique : 388 (+/-350) mm³, 415 (+/- 328) mm³ et 379 (+/- 300) mm³.

le groupe SHAM (Injection de bevacizumab dénaturé) :147 (+/- 322) mm³, 129 (+/- 269) mm³, 147 (+/- 331) mm³.

Un point crucial à ce stade est de savoir s'il existe un biais dans la constitution des groupes, un test ANOVA est donc réalisé pour chaque séquence réalisée : pour les pondérations T1, T2 et T1 avec injection de gadolinium les différences de moyennes de volumes tumoraux ne sont pas significatives entre les groupes ($p > 0,05$).

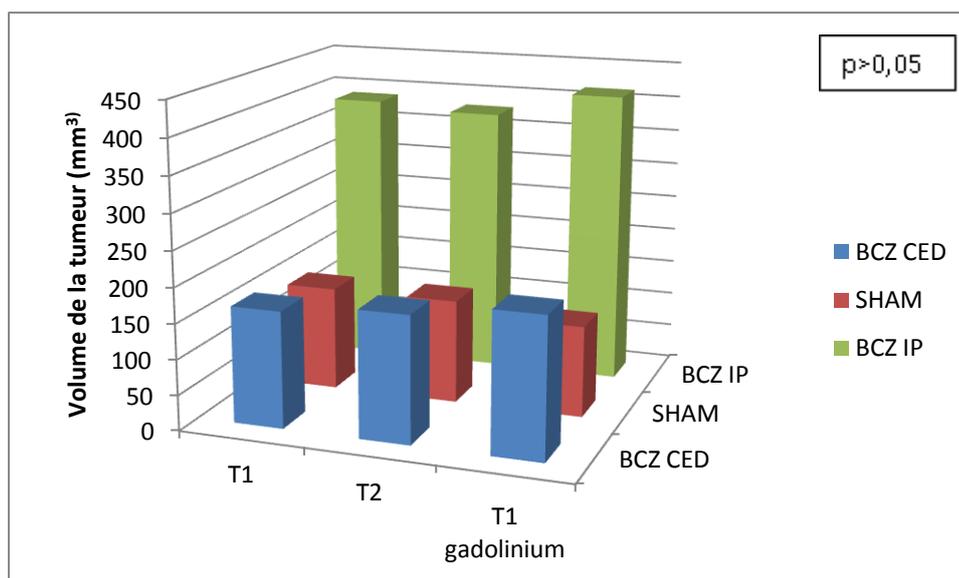


Figure 21 : histogramme représentant les moyennes de volumes des tumeurs selon les groupes de traitements et les séquences IRM (volumes en mm³)

Volumes tumoraux après l'IRM post-traitement à J24 :

Sur l'ensemble des souris incluses dans cette étude une souris a été euthanasiée avant l'IRM de contrôle, il s'agissant d'une souris du bras BCZ intra-tumoral par CED.

Les volumes moyens en IRM post-traitements sont les suivants :

Pour le groupe bevacizumab intra-tumoral par CED : 336 (+/-590) mm³ en T1, 402(+/- 605) mm³ pour les séquences T1 avec injection de gadolinium et 367 (+/- 590) mm³ en acquisition T2.

Les souris traitées par BCZ systémique avaient un volume de moyen de 1199 (+/-1314) mm³ en T1

1406 (+/- 468) mm³ sur les séquences T1 avec injection de gadolinium et 1236 (+/-1325) mm³ sur les séquences T2.

La comparaison des moyennes des volumes entre les différents groupes pour chaque acquisition (T1, T2 et T1 après injection de gadolinium) par un test ANOVA ne permet pas de mettre de différence significative ($p > 0,05$).

Compte tenu de la grande variabilité volumique des tumeurs, on se propose de calculer la croissance tumorale pour chaque souris et d'en extraire un ratio de croissance entre les deux IRM afin d'estimer l'influence des traitements sur la cinétique de croissance tumorale.

En ce qui concerne le rapport moyen entre le volume tumoral de la deuxième acquisition sur le volume tumoral de la première acquisition en pondération T1, il est de 3,7 (+/-3,4) pour le groupe de traitement intra-tumoral par CED, de 3,8 (+/-2,9) et 14,4 (+/-25,7) pour le groupe SHAM.

Les rapports de volumes tumoraux pour les pondérations T1 avec injection de gadolinium sont de 4,7 (+/- 4,2) pour le bras de traitement IT par CED, 3,2 (+/-2,9) pour le bras traité par une injection systémique de BCZ et 14,8 (+/- 21,6) pour le groupe SHAM.

En ce qui concerne les séquences T2 les rapports moyens sont pour le groupe IT : 4,5 (+/-4,7), 3,8 (+/- 2,6) pour le groupe BCZ intrapéritonéal et 14,9 (+/- 23,5) pour le groupe Témoin.

Les différences observées entre les groupes en ce qui concerne la cinétique de croissance tumorale entre les deux examens ne sont pas significatifs lorsque testée par un test de Kruskal-Wallis et ce pour l'ensemble des séquences étudiées ($p > 0,05$).

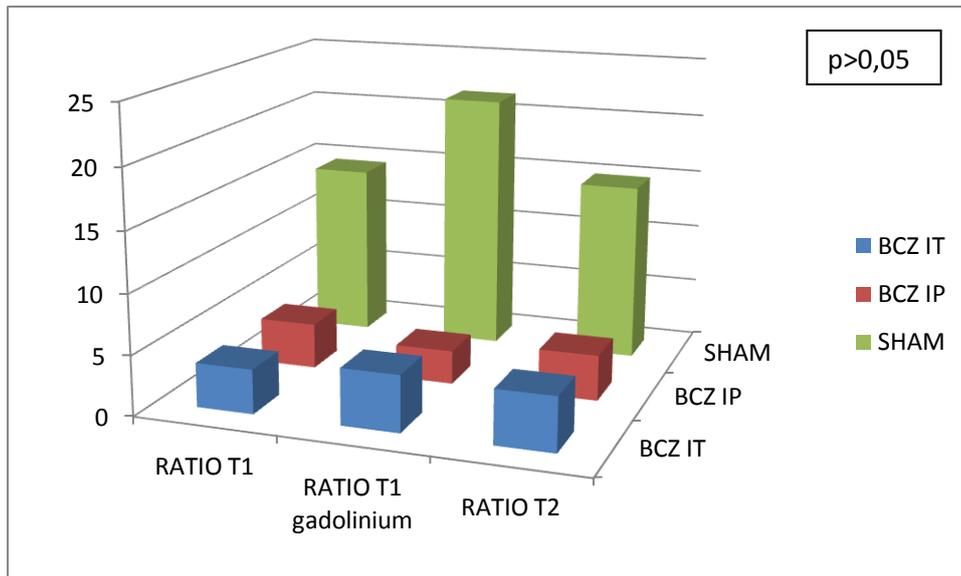


Figure 22 : histogramme représentant les rapports de volumes entre la première et la deuxième acquisition IRM : cinétique de croissance tumorale après traitement.

Survie des animaux :

La durée de suivi entre l'implantation tumorale et l'euthanasie est de 46 (+/-21) jours pour le groupe traité par une injection de BCZ intra-tumorale, de 30 (+/-8) jours pour le groupe traité par une injection systémique de BCZ et de 29 (+/-7) jours pour le groupe SHAM.

Le test du logrank pour la survie de ces animaux met en évidence un bénéfice significatif pour le groupe traité par une injection intra-tumorale directe ($P < 0,05$).

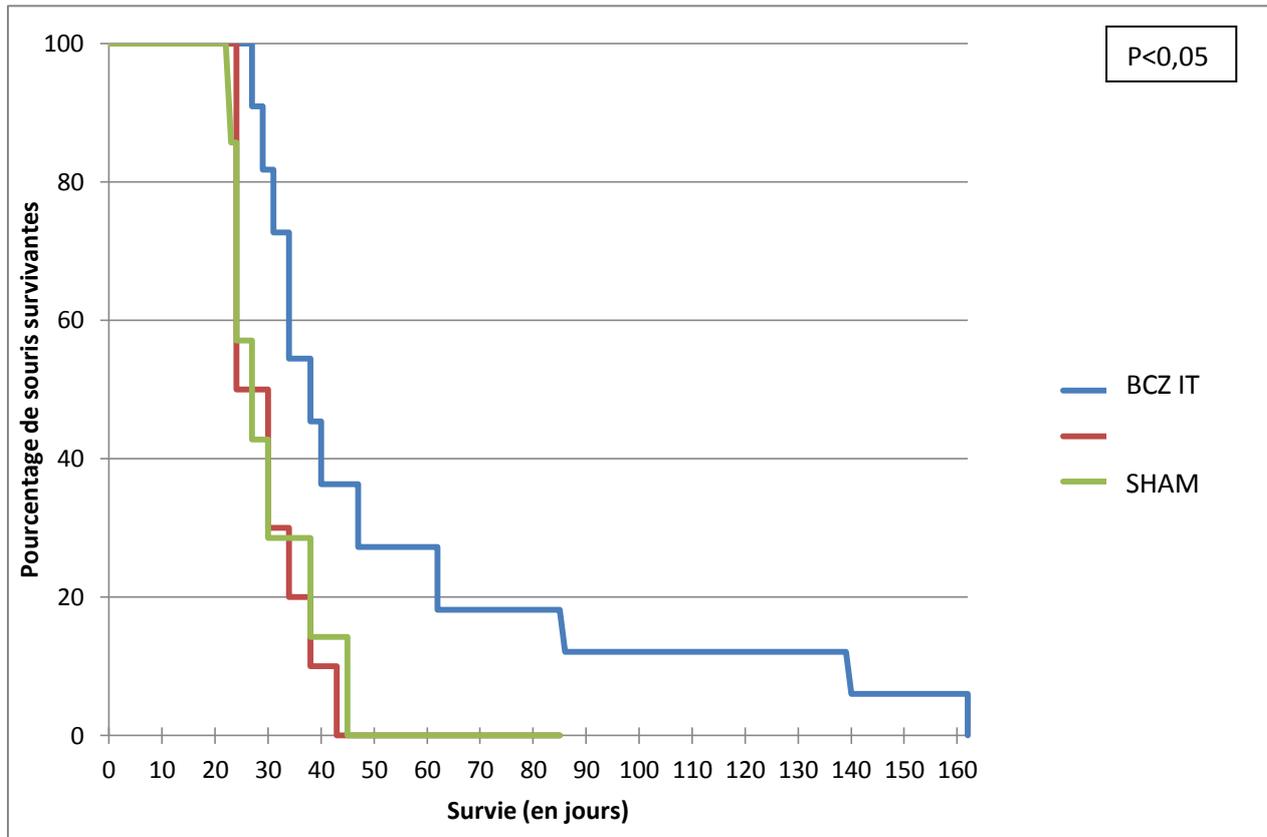


Figure 23 : Courbes de survie des souris traitées par BCZ IT, IP et groupe témoin (SHAM), montrant une survie supérieure du groupe traité par infusion convective.

Analyse histologique des tumeurs :

Angiogénèse

Le nombre moyen de points chauds de fixation par champs pour les zones d'angiogénèse intense est de 5,4 (+/- 1,1) pour le groupe SHAM, 4 (+/- 0,7) pour le groupe IP et 2,2 (+/- 1,1) pour le groupe IT.

L'angiogénèse est donc plus faible dans le groupe IT ($p = 0,01$).

Prolifération tumorale

Les analyses immuno-histologiques quantitatives retrouvent une moyennes de points chauds de 8,2 (+/- 1,3) pour le groupe SHAM au sein des zones d'angiogénèse importantes (A+) et de 9 (+/- 1,8) pour les zones d'angiogénèse réduite (A-). Pour le groupe IP la moyenne est de 8,8 (+/- 0,8) en zone

A+ et de 9,4 (+/- 1,1) pour les zones A-. Pour le groupe IT la moyenne des points chauds au sein des zones A+ est de 2,8 (+/- 0,8) et 2,2 (+/- 0,4) pour les zones A-. Il existe donc une nette diminution de la prolifération entre le groupe IT et les autres groupes (p=0,01).

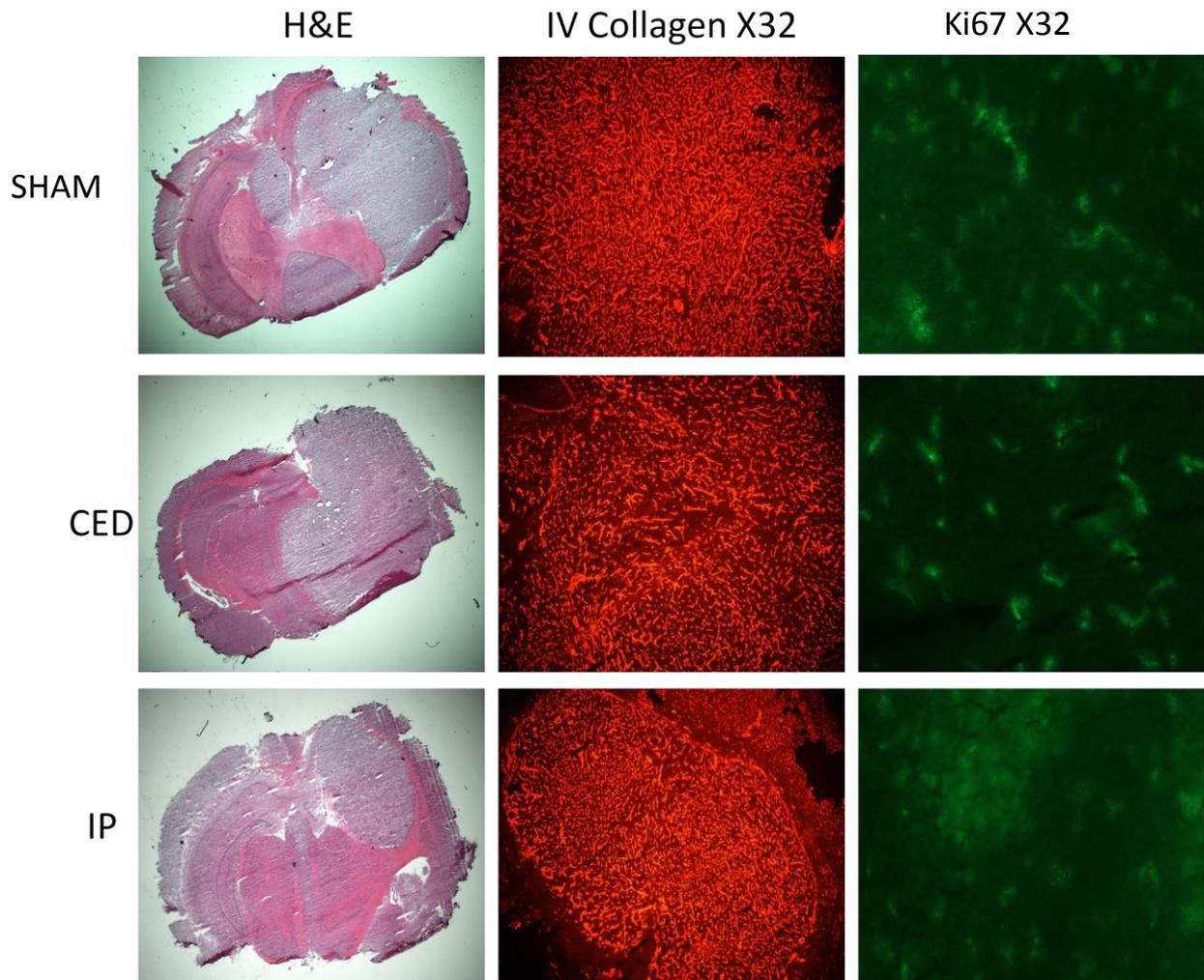


Figure 24 : Histologie (X4) et immuno-histologie (X32) des tumeurs U87 pour les souris des 3 groupes de traitement à droite coloration hématoxyline-éosine au centre marquage du collagène IV et à droite Ki67. On retrouve une angiogénèse plus faible au sein du groupe IT ainsi qu'une prolifération inférieure.

3.4. Discussion

Ces résultats soulèvent plusieurs questions. L'analyse statistique des IRM ne permet pas de mettre en évidence une différence significative en terme de cinétique de croissance tumorale entre les différentes modalités d'administration du BCZ et le groupe témoin même si une tendance assez nette se dégage ($p=0,06$, $n=10$?) semblant suggérer que les résultats sont similaires entre l'administration de BCZ par voie locale ou systémique alors que la croissance semble explosive dans le groupe témoin. Cette observation mériterait d'être confirmée sur un nombre d'animaux supérieur.

Si le volume tumoral semble peu affecté par le mode d'administration du BCZ, il n'en est pas de même en ce qui concerne la survie avec une survie moyenne 50% supérieure pour le groupe traité par une administration locale de BCZ (46 vs 30 jours). On pourrait être surpris par le parallélisme entre la survie des animaux traités par BCZ par voie systémique et le groupe témoin. Cependant ces résultats ne font que confirmer les résultats obtenus lors des essais cliniques avec une augmentation de la survie sans récurrence (réponse radiologique) sans effet bénéfique sur la survie globale(19). Un autre point mérite discussion, il s'agit de l'absence de différence claire entre le T1 avec injection de gadolinium et le T2 pour les souris traitées par antiangiogénique, ceci peu s'expliquer par la faible proportion de substance blanche au sein de l'encéphale de souris. Une autre explication pourrait être lié a une faible affinité (10%) du BCZ pour le VEGF A murin, cela n'explique cependant pas la de survie des animaux. Comme il a pu être observé lors de l'étude pharmacocinétique la concentration de BCZ au sein de la tumeur est équivalente entre les deux voies d'administration, ce qui suggère un mode d'action différent lors d'une injection locale..

Les données histologiques confirment l'efficacité différentielle de l'injection locale. En effet si la concentration locale est la même, la prolifération tumorale est significativement moindre dans le groupe IT, ainsi que l'angiogénèse possiblement du fait d'une action plus importante lorsque l'anticorps injecté au sein de l'interstitium, il est possible que les cibles ne soient pas les mêmes. Il s'agit d'un point important : l'action d'une molécule à une concentration similaire n'est pas la même

lors d'une injection systémique que lors d'une injection directement dans l'interstitium. On notera la faible efficacité du bevacizumab sur l'angiogénèse est la prolifération tumorale lors d'une injection systémique, ou compte tenu du fait que le sacrifice ait eu lieu 15 jours plus tard à un effet rebond, non retrouvé lors d'une injection locale. Le bénéfice d'une injection locale ne réside donc pas uniquement dans un ratio dose administrée dose au niveau de la cible mais également sur un mode d'action différent.

Mise au point d'un modèle
porcin de gliome

4.1. Introduction

Avant ce travail, il n'existait pas de modèle de gliome induit chez un gros animal, cependant il s'agissait d'un point dur pour la mise au point de systèmes d'injection adaptables à une utilisation clinique dans des conditions de sécurité et d'asepsie satisfaisante, problématique soulevée par certains auteurs(50). Les essais réalisés chez l'homme l'ont été par l'intermédiaire d'un système externalisé ne permettant pas d'administration sur une durée importante(51, 52), ce qui est pourtant incontournable pour une injection dans de bonnes conditions de délivrance (un débit lent associé à un volume injecté en rapport avec la tumeur et son infiltrat). Il faut donc en parallèle développer des systèmes compacts, implantables, biocompatibles tout en gardant une interaction possible avec le dispositif pour pouvoir l'arrêter rapidement si nécessaire. Il n'est pas possible de miniaturiser de tels dispositifs à l'échelle du rongeur, du fait de la complexité technique d'une pompe intelligente et de l'investissement financier pour une utilisation pré-clinique. Il est donc nécessaire de l'utiliser chez un animal de taille comparable. Le principal problème en dehors des soins vétérinaires et du coût, est qu'il n'existe pas pour l'instant de modèle de glioblastome induit chez les gros animaux : absence de lignée isolée et absence d'animaux nus permettant de passer outre la barrière d'espèce et ainsi utiliser des lignées de gliome humain.

L'avantage d'utiliser un gros animal, est la taille et la morphologie cérébrale : le cerveau des mammifères subit un phénomène de gyration alors que les rongeurs ont un encéphale lisse. En utilisant un gros animal on se place donc dans des conditions proches de l'homme puisque les fuites sulcales ne peuvent pas être observées dans les études chez le rongeur. Cette particularité permet de travailler sur un facteur majeur de bonne délivrance occulté par les études sur le petit animal. L'animal choisi est le porc (*sus domesticus*) du fait de son prix, de la similarité morphologique de son encéphale par rapport à l'homme, de sa robustesse et de sa taille compatible avec l'implantation du matériel.

S'il existe un modèle canin de tumeur cérébrale, (les chiens brachycéphales possèdent une importante capacité à développer des tumeurs intracrâniennes), plusieurs points nous ont amené à ne pas choisir ce modèle dont une très forte hétérogénéité histologique (53-55) : Dans la série de Stoica, seul 1/3 des chiens porteurs de tumeur intra-parenchymateuse souffraient d'un glioblastome(56).

Les caractéristiques de coût, des similarités morphologiques de son encéphale par rapport à l'homme, de robustesse et de taille compatible avec l'implantation du matériel, ont orienté le choix du modèle animal vers le porc (*sus domesticus*).

Se modèle présente de plus une bonne acceptabilité éthique, en évitant l'emploi de primate non humaine (règle des 3 R), ou d'un animal de compagnie comme pourrait l'être le chien.



Figure 25 : vue supérieure de 3 encéphales : à droite souris nude, au centre porc charcutier et à droite encéphale humain, on notera la grande similitude entre le porc et l'homme.

La philosophie de ce modèle est de créer les conditions d'une tolérance du non soi ainsi que de la barrière d'espèce en considérant l'implantation tumorale comme une xenogreffe. Pour cela nous avons utilisé une immunosuppression par la ciclosporine comme utilisée dans la greffe d'organe en clinique humaine.

4.2. Matériels et méthodes

Les lignées tumorales :

Deux lignées de gliomes humains sont étudiées lors de cette expérience : U 87 MG et G6. $10 \cdot 10^6$ cellules sont injectée par animal.

La lignée U 87 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) est une lignée classique de glioblastome cultivé en sérum largement utilisé dans les modèles rongeurs. Une des limites de cette lignée est son caractère peu infiltrant, son homogénéité (absence de nécrose, un seul type cellulaire), cependant du fait de sa vascularisation importante elle peut-être intéressante dans le cadre d'un traitement anti-angiogénique.

Les cellules sont cultivées en monocouches dans du DMEM supplémenté par du serum de veau foetal à 10%, de la L6glutamine (2 mmol/l), de la pénicilline 100 unités/ml, de la streptomycine 100 µg/ml et de gentamycine à 40 µg/ml.

Préalablement à l'implantation, les cellules sont dispersées avec une solution de trypsine/EDTA à 0.05% et ajustées pour une concentration de $10 \cdot 10^6$ cellules/20 µl de DMEM.

La deuxième lignée est la lignée Glio 6 (G6) individualisée, (travaux interne au laboratoire) à partir d'une culture de glioblastome en milieu sans sérum(57). Ces cellules poussent en neurosphères. Cette lignée correspond au concept de cellule souche de glioblastome tel qu'il a été décrit dans la littérature (58-60). Si le concept de cellules souches de gliomes reste discuté(61, 62) , cette lignée à l'avantage d'être une primo-culture à 3 % d'oxygène(63). L'intérêt de cette lignée est à la fois d'obtenir une tumeur plus invasive et de reproduire la diversité cellulaire propre aux glioblastomes.

Ces cultures sont faites dans des enceintes hypoxiques à 3 % d'oxygène afin de se mettre dans les conditions proches de la réalité.

Les cellules ont été obtenues à partir d'une primoculture de glioblastome. Les cellules sont cultivées sous forme de neurosphères dans une atmosphère hypoxique à 3% d'O₂, dans un incubateur MCO-5M (Sanyo), dans un milieu contenant un mélange de DMEM/glucose 4,5 g/l, DMEM/glucose 1g/l/F12 (1:1:1) 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 40 µg/ml de gentamycine, 20 ng/ml d'EGF, 20 ng/ml de bFGF, 2 µg/ml d'héparine, 0.5 unités de N₂ and 0.5 unités de B-27. Avant injection, les cellules sont centrifugées et remises en suspension à une concentration de 10.10⁶ cellules/ 20 µl de DMEM.

Animaux :

Les expérimentations sont réalisées sur des truies (*sus domesticus*) âgées de 3 mois (élevage Fournand , Les Halles, France) d'un poids de 30 kg environ au moment de l'inclusion. Chaque animal a fait l'objet d'un examen minutieux par un vétérinaire avant l'inclusion dans le protocole, notamment en ce qui concerne l'existence de foyers infectieux latents ou anomalie hématologique pouvant interférer avec l'immunosuppression.

15 animaux ont reçu une injection de cellules U87, et 6 animaux une injection de G6.

Protocole d'immunosuppression :

Le protocole d'immunosuppression a pour but d'induire une tolérance du système immunitaire de l'animal vis-à-vis des cellules humaines implantées, il fait appel à la ciclosporine (Neoral® NOVARTIS sol. Buv. 100mg/ml) 30mg/kg/jour, en 2 prises de 15mg/kg, per os. Le traitement est initié la veille de l'implantation et maintenu tout au long de l'expérimentation.

Implantation des cellules tumorales :

Une pré médication (20 à 30min avant anesthésie) est réalisée sous la forme d'une injection intramusculaire d'un mélange de sulfate d'atropine 1 mg/ml (Aguettant) à la posologie de 0,04 mg/kg et d'azapérone (Stresnil® JANSSEN-CILAG SANTE ANIMALE): 1mg/kg

Anesthésie :

L'induction de l'animal est obtenu par une injection de Tiletamine + zolazepam (Zoletil® VIRBAC): 5mg/kg. *Par la suite, l'animal est intubé et l'anesthésie maintenue par voie gazeuse (isoflurane + O₂ à 2%).*

Intervention :

L'animal est installé en décubitus ventral, l'extrémité céphalique est maintenue en extension, puis le scalp est désinfecté à la bétadine en 3 temps.



Figure 26 : installation de l'animal pour l'intervention chirurgicale d'implantation tumorale.

Après installation des champs opératoire, une incision longitudinale est réalisée sur une longueur de 4 cm jusqu'au péricrâne qui était ruginé. Ecartement cutané à l'aide d'un écarteur autostatique, fraisage du crâne 3 cm en avant de la crête occipitale et un centimètre à droite de la ligne médiane. L'injection était réalisée l'aide d'une seringue Hamilton : $10 \cdot 10^6$ cellules dans 20 μ l de DMEM à une profondeur entre 11 et 13 mm selon les données de L'IRM pré-opératoire.



Figure 27 : voie d'abord et fraisage avant implantation tumorale

La craniotomie est refermée à la cire de Horsley. Suture en deux plans. Un pansement est réalisé, l'animal est extubé et la douleur contrôlée à l'aide d'antalgiques morphiniques : morphine 0,3 mg/kg sous-cutanée (SC), puis si nécessaire (après 3 à 4h), une injection de morphine 0,1 mg/kg SC. Afin de limiter la douleur ressentie en post opératoire et favoriser la récupération de l'animal, un patch de fentanyl (Durogesic[®] JANSSEN CILAG ou générique) 50 μ g/h (éventuellement renouvelé une fois à 48h si nécessaire) est placée dans la région dorsale.

L'antibioprophylaxie

Dans le but de limiter tout risque infectieux post opératoire une antibioprophylaxie est mise en place. Celle-ci comprend une injection 48 heures avant l'intervention d'amoxicilline et acide clavulanique (Kesium[®] VETOQUINOL), ainsi que les 5 jours suivant l'intervention, matin et soir per os

Suivi des animaux :

Les animaux sont suivis cliniquement à la recherche d'un déficit neurologique, de signes d'hypertension intra-crânienne, d'un foyer infectieux. Une IRM est réalisée 4 jours après implantation afin de dépister des complications liées à la procédure, une IRM était réalisée 14, 28, 42 et 56 jours après implantation pour suivre l'apparition et l'évolution des tumeurs. Les séquences réalisées sont une acquisition en T1, T2 puis T1 avec injection de gadolinium.



Figure 28 : photographie d'un porc pendant une IRM, la tête au sein d'une antenne utilisée pour les grands chiens, parfaitement adapté.

Analyse anatomopathologique :

En cas de signes de souffrance : déficit neurologique, apathie, refus d'alimentation l'animal est euthanasié après une IRM (anesthésie, puis injection intracardiaque de 30 ml de pentobarbital (Dolethal®) 200 mg/ml).

L'encéphale est prélevé dans son ensemble. Une partie de la tumeur est congelée le reste fixé dans du formol.

L'analyse anatomopathologique est réalisée la neuropathologiste du CHU de Grenoble.

Ethique :

L'ensemble des expériences menées sur ces animaux avait fait l'objet d'une demande auprès du comité d'éthique et se conforment aux recommandations gouvernementales en ce qui concerne les expériences sur les animaux (Décret 87-848, 1987).

4.3. Résultats

Aucune complication n'a été à déplorer dans les suites de l'implantation, l'ensemble des animaux ont rapidement retrouvé un examen clinique rassurant, pas de déficit neurologique ou de crise comitiale.

Les IRM réalisées à J4 post-implantation n'ont pas mis en évidence d'hématome ou de poussée œdémateuse significative.

Suivi des porcs implantés avec la lignée U 87 :

Sur les 15 animaux implantés 14 ont présenté une tumeur macroscopique pendant le suivi. Les caractéristiques radiologiques de ces tumeurs sont: un isosignal T1, un hypersignal T2 et une prise de contraste importante et homogène en séquence T1 après injection de gadolinium.

La croissance tumorale suit un modèle exponentiel avec un volume moyen de 0,34 (+/- 0,1) mm³ à J4 de 5,16 (+/- 2) mm³ à J14 et de 5570 (+/- 2000) mm³ à J28. Aucune acquisition n'a été réalisée après L'IRM de J28, la quasi-totalité des animaux présentaient des signes de souffrance ayant conduit au sacrifice des animaux au 30ème jour de suivi.

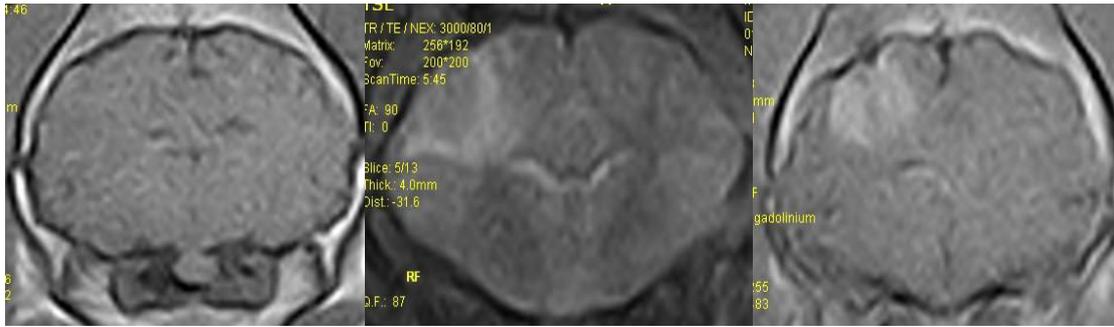


Figure 29 : tumeur U87 chez le porc en IRM T1 en isosignal (à gauche), hypersignal T2 au centre et Prise de contraste en T1 avec injection de gadolinium à droite

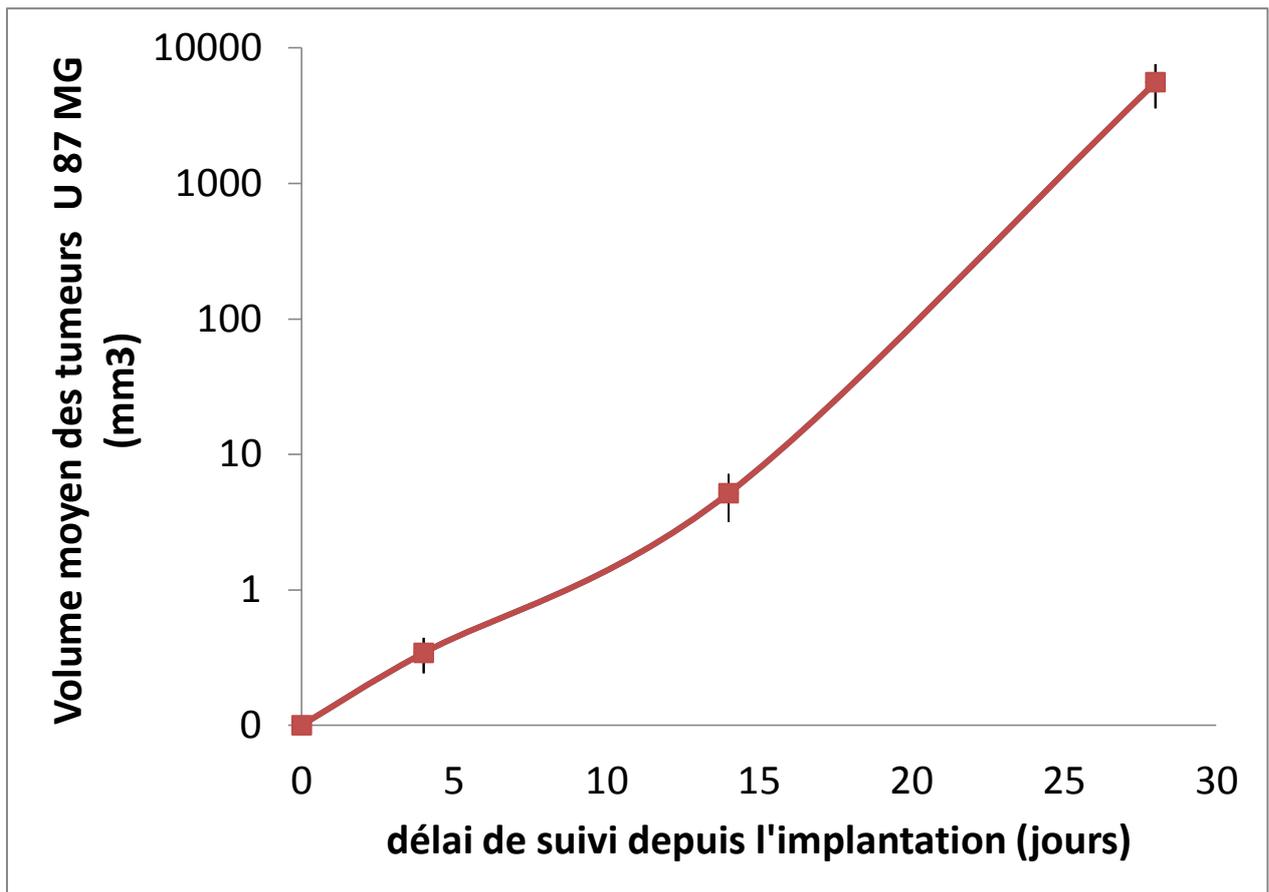


Figure 30 : croissance tumorale des tumeurs U87 mesurée lors des différentes IRM de suivi.

Résultats anatomopathologiques :

Lors du sacrifice, les tumeurs se présentaient avec un diamètre de 1,5 à 3 cm. L'examen macroscopique retrouve une tumeur homogène avec une stase veineuse dont résultent des hémorragies par engorgement veineux.

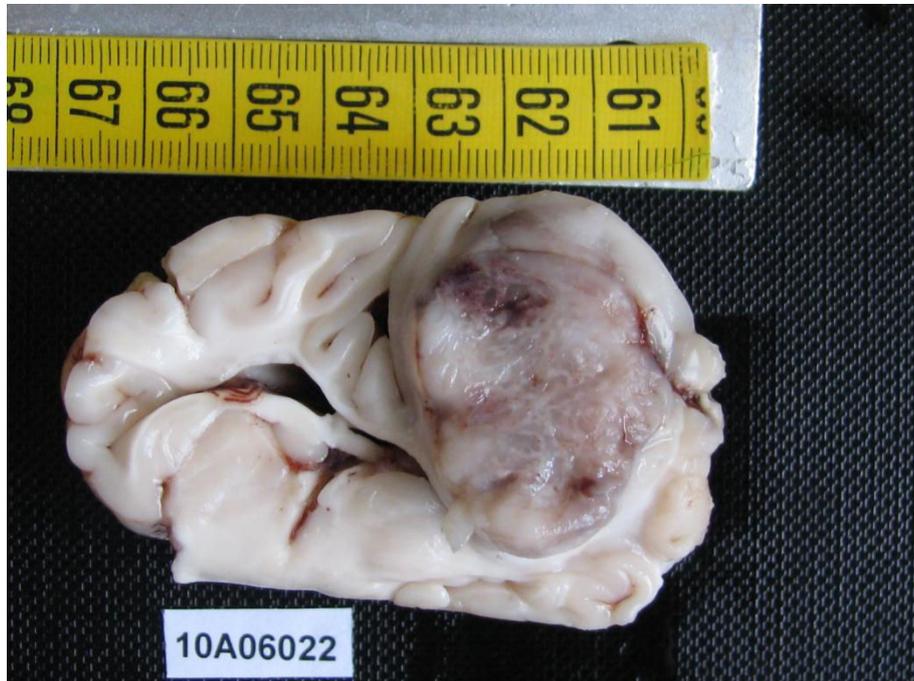


Figure 31 : examen macroscopique d'une tumeur U87 MG au sein d'un encéphale de porc.

L'examen microscopique met en évidence une augmentation de la densité cellulaire, une prolifération micro-vasculaire avec néoangiogénèse et satellitose. Les mitoses sont très nombreuses. L'examen de la substance blanche apparemment saine en périphérie de la tumeur montre une infiltration de cellules tumorales le long des fibres de substance blanche. L'immuno-marquage est positif pour la GFAP, confirmant la nature astrocytaire de la tumeur.

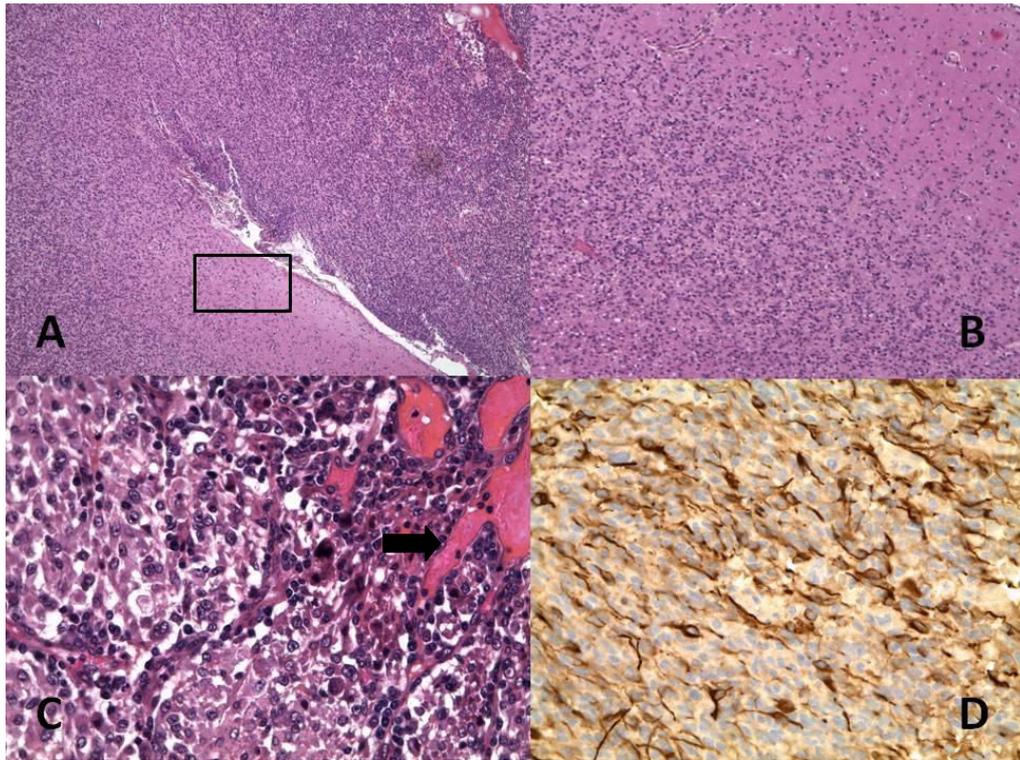


Figure 32 : examen microscopique d'une tumeur U87, A : grossissement X5 mettant en évidence une infiltration au sein du parenchyme sain. B : Agrandissement X20 du front d'infiltration au sein de la substance blanche (cadre noir sur A). C : X40, importante néoangiogénèse (flèche noire). D : immunofixation de la GFAP.

Suivi des porcs implantés avec la lignée G6 :

Sur les 6 animaux implantés 1 seul a développé une tumeur sur les IRM au terme des 60 jours de suivi, l'animal a été sacrifié avant que n'apparaissent de signe clinique.

Les caractéristique IRM de cette tumeur sont proche des tumeurs U87 avec un hyposignal T1, un hypersignal T2 et une prise de contraste importante et homogène de 25 mm de diamètre lors de l'IRM réalisée à J60.

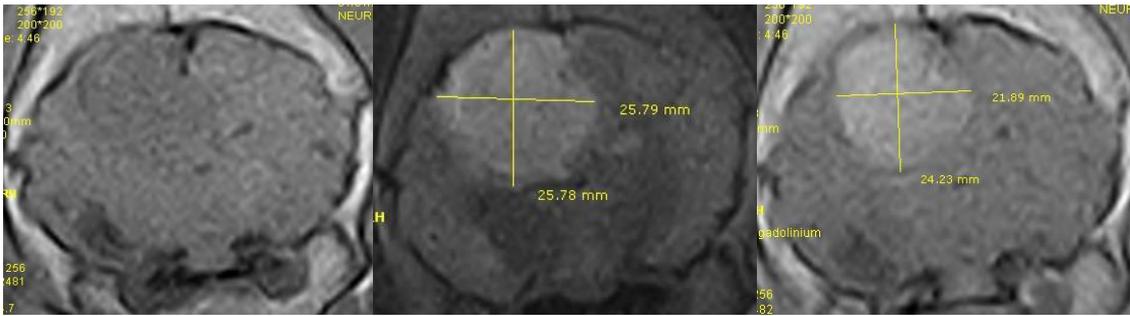


Figure 33 : IRM de la tumeur G6 chez le porc, à gauche, tumeur en hyposignal T1, hypersignal T2 au centre, prise de contraste importante et homogène à droite.

Examen anatomopathologique :

L'examen macroscopique de la tumeur retrouve une tumeur sans hémorragie en son sein mais avec un centre nécrotique.

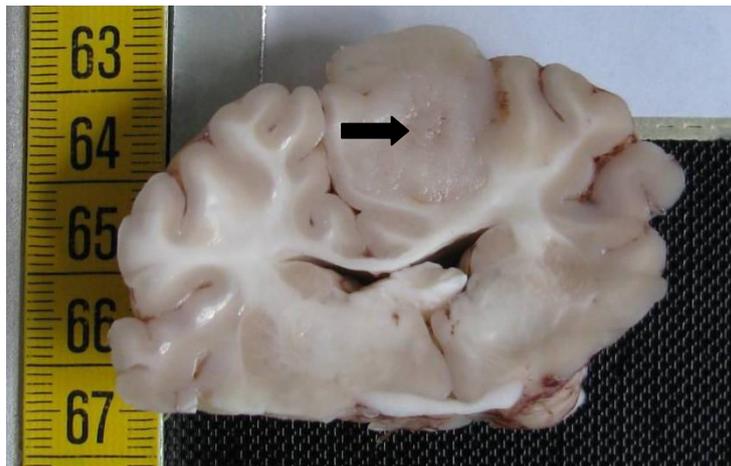


Figure 34 : examen macroscopique de la tumeur G6 chez le porc, le centre de la tumeur apparaissait évoluant vers la nécrose (flèche).

L'examen microscopique révèle une augmentation de la densité cellulaire, une prolifération microvasculaire avec néoangiogenèse et satellitose. Les mitoses sont très nombreuses. L'examen de la

substance blanche apparemment saine en périphérie de la tumeur isole une infiltration de cellules tumorales le long des fibres de substance blanche.

La principale différence avec la tumeur U 87 est la présence de plage de nécrose pseudopallissadique typique des glioblastomes. L'immuno-marquage était positif pour la GFAP, confirmant la nature astrocytaire de la tumeur.

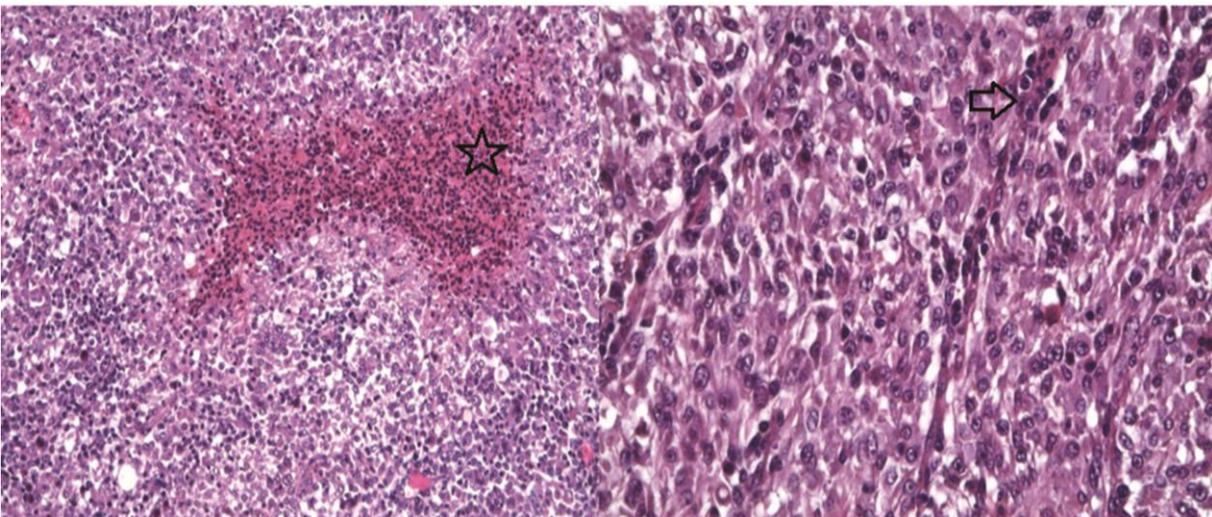


Figure 35 : examen microscopique d'une tumeur G6 chez le porc, à gauche X20, aspect typique de nécrose pseudopallissadique (étoile), à droite X40, néoangiogénèse et satellitose (flèche).

4.4. Discussion

Ces résultats confirment la possibilité de proposer un modèle de gliome induit chez le gros animal. Il s'agit d'une étape décisive dans le développement de thérapies innovante par infusion convective dans le traitement des gliomes dans la phase préclinique.

La reproductibilité du modèle est excellente pour la lignée U87, qui est une lignée largement utilisée dans la littérature (64-67) avec 14 implantations sur 15 ayant conduit à la formation d'une tumeur

macroscopique. Le délai d'apparition de la tumeur est rapide et homogène dans l'ensemble du groupe, permettant de mettre en place un essai préclinique dans des conditions acceptables. Ce modèle possède des caractéristiques proches de celle d'un gliome humain : infiltration, important coefficient de prolifération, néoangiogénèse. Cette néoangiogénèse est un point clé pour notre travail puisque l'agent thérapeutique testé est une immunothérapie antoangiogénique : le bevacizumab.

Une limite est la faible rentabilité de la lignée G6, puisqu'une seule tumeur macroscopique a été observée sur les 6 implantations, le délai d'apparition fut relativement lent (60 jours), ceci rend son utilisation plus délicate à mettre en place, la faible rentabilité et une durée de suivi plus longue impliquant un coût plus élevé. Cette faible rentabilité vient probablement de la cinétique de croissance plus lente de ces tumeurs, comme observé chez la souris. En effet, environ 60 jours sont nécessaires pour observer une tumeur macroscopique après implantation chez la souris, alors que les souris implantées avec des cellules U87 présentent des tumeurs volumineuses plus rapidement conduisant à des signes de souffrance au 30^{ème} jour en moyenne, comme chez le porc. La durée de suivi des animaux était donc probablement trop courte pour espérer un plus grand rendement.

Cependant même avec une faible rentabilité, la possibilité d'induire une tumeur G6 chez le porc avec ce protocole d'immunosuppression est un point important puisqu'il exclut un artéfact de lignée dans la prise de ces tumeurs.

Il est important de noter que les tumeurs issues de cellules cultivées en hypoxie présentent des caractéristiques plus à même de mimer un glioblastome sur le plan microscopique.

Un reproche qui pourrait être fait à ce modèle est la nécessité d'induire une immunosuppression chez l'animal.

Deux philosophies sont possibles dans la modélisation de tumeurs cérébrales chez l'animal :

L'utilisation d'animaux nus et de lignées de tumeurs humaines (xenotransplantation)

L'utilisation de tumeurs syngéniques

L'utilisation d'animaux nus implique une immunosuppression naturelle, touchant exclusivement l'immunité cellulaire, modèle donc imparfait sur le plan de la réponse immunologique naturelle contre la tumeur, il est important de noter que le mode d'action de la ciclosporine se fait exclusivement via une interférence avec l'immunité cellulaire sans effet myelosuppresseur(68) , mode d'action comparable à celui des modèles d'animaux athymiques.

L'utilisation de modèles syngéniques permet de s'affranchir de cette modification de l'immunité cellulaire par l'utilisation de tumeurs issues de cellules de la même espèce. Deux possibilités s'offrent à nous : un modèle de tumeurs spontanées et l'implantation de tumeurs de l'espèce étudiée. L'utilisation de tumeur spontanée semble à notre avis le plus mauvais choix pour la mise en place d'études précliniques : mauvaise synchronisation temporelle pour des essais rapidement conduits, l'hétérogénéité des caractéristiques anatomopathologiques et des topographies tumorales conduisant à des pronostics trop variables. La mise en place d'un tel modèle semble également extrêmement contraignante car elle nécessiterait de conduire ces essais chez des animaux de compagnie et d'obtenir l'accord des propriétaires.

L'utilisation de tumeurs de la même espèce, implantées chez des animaux immuno-compétents est celui de la comparabilité d'une tumeur d'une espèce différentes, conduisant à des chimio-sensibilités différentes d'une lignée de tumeur issues d'une tumeur humaine, incertitude supplémentaire dans l'optique d'un essai clinique ultérieur.

Notre modèle apparaît donc comme un bon compromis, biologique, économique et éthique.

Tests d'injection avec un cathéter prototype, avec un système externalisé dans un parenchyme sain puis avec un système implanté sur un modèle de gliome chez le porc

5.1. Introduction

Nous avons abordé au préalable les différents facteurs cruciaux en ce qui concerne la bonne délivrance d'un agent thérapeutique au sein du parenchyme cérébral lors d'une infusion convective. L'un des points est le choix du cathéter. Nous utiliserons ici le cathéter prototype fournit par les laboratoires BD®. Ce cathéter a déjà été utilisé pour les injections de bevacizumab chez la souris. Le but de cette partie du travail est de rechercher des facteurs permettant de prédire la qualité d'une injection en fonction du profil d'évolution des pressions au cours de l'injection.

Cette expérience s'est déroulée en deux temps :

- Premièrement : définitions de paramètres prédictifs d'une injection sans fuite ni reflux
- Deuxièmement : test du cathéter in vivo avec un système implanté sur une injection de longue durée au sein d'une tumeur chez un porc en condition préclinique.

5.2. Définitions de paramètres prédictifs d'une injection satisfaisante

5.2.1. Matériels et méthodes :

Pour ce travail 2 animaux ont été nécessaires, il s'agit toujours de porcs âgés de 3 mois, provenant du même élevage.

Les animaux sont sédatés selon le protocole utilisé pour l'implantation de cellules tumorales.

Les différentes étapes chirurgicales sont les mêmes jusqu'à la réalisation de la craniotomie, puis le cathéter est implanté au sein du lobe pariétal droit des porcs à une profondeur moyenne de 15 mm.

La profondeur d'insertion est définie par un scanner pré-opératoire réalisé dès que l'animal est anesthésié.

Afin de suivre la pression au cours de l'intervention un raccord est placé sur la ligne d'injection, la ligne de pression était raccordée à un capteur permettant un suivi en continu du profil pressionnel (figure 35). Une fois la première injection réalisée la même procédure est réalisée contra-latéralement.

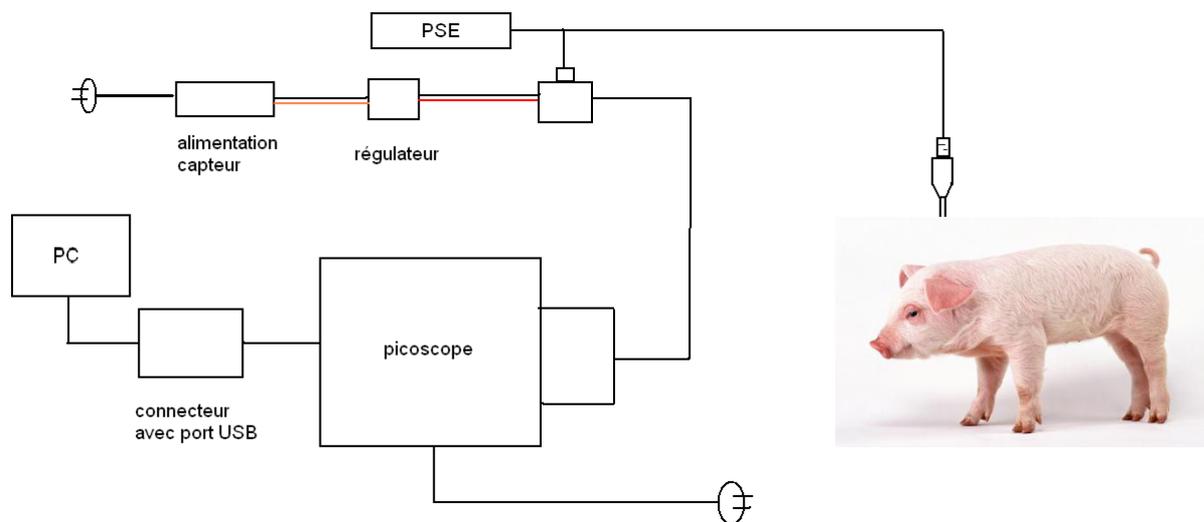


Figure 35 : schéma du montage permettant le suivi de la pression le long de la ligne d'injection.

Une fois en place, l'injection débute après 1 minute d'attente entre le placement du cathéter et le début de l'injection. Le volume injecté est de 100 μl à un débit de 1 $\mu\text{L}/\text{minute}$. Une heure après la fin de l'injection, l'animal est sacrifié par une injection intracardiaque de Dolethal, ainsi que décrit précédemment. L'encéphale est alors prélevé et congelé dans de l'azote liquide.

Il est découpé ultérieurement selon des coupes coronales afin d'effectuer une analyse qualitative de la diffusion. L'analyse du profil pressionnel est alors réalisée à la lumière de la qualité de la diffusion.

5.2.2. Résultats

Sur les quatre injections réalisées une seule a conduit à une diffusion de qualité au sein de la substance blanche, les trois autres injections ont conduit à une coloration quasi-nulle de la substance blanche secondaire à des fuites et reflux massifs.

Injection 1 :

On retrouve une diffusion intéressante suivant la direction des fibres de la substance blanche. Un reflux anecdotique a pu être observé dans les espaces sous-arachnoïdiens probablement lors du retrait du cathéter.



Figure 36 : photographie des coupes en regard de la zone d'injection avec à gauche une vue globale montrant une diffusion intéressante au sein du parenchyme et à droite un grossissement permettant de mettre en évidence un minime reflux sous-arachnoïdien (flèche).

Profil de pression :

Au démarrage de l'injection après retrait du trocard du cathéter il existait une pression négative qui mettait 500 secondes à se positiver, puis atteinte d'un pic de pression autour de 50 mbar. La pression évoluait par la suite vers une courbe asymptotique entre 5 et 10 mbar.

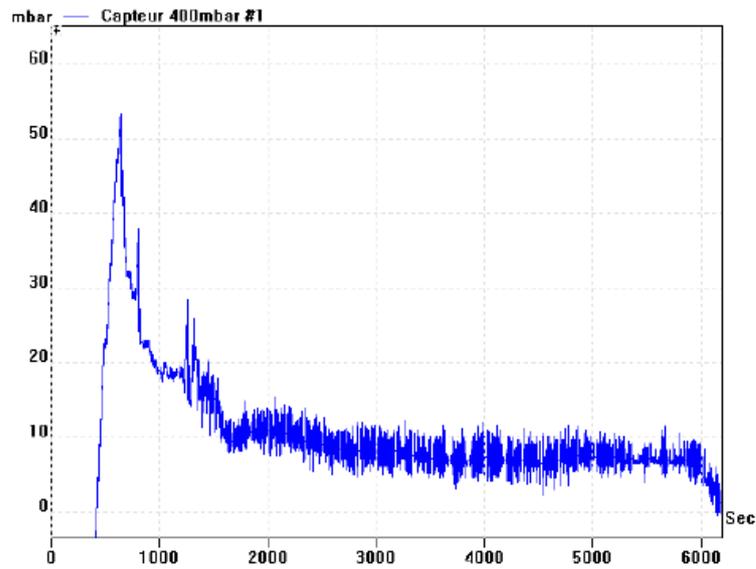


Figure 37 : profil pressionnel de l'injection 1 en fonction du temps avec en ordonnée la pression en Mbar en fonction du temps en seconde.

Injection 2 :

L'injection au sein du parenchyme cérébral s'était conclue par une fuite massive et une absence de coloration parenchymateuse.

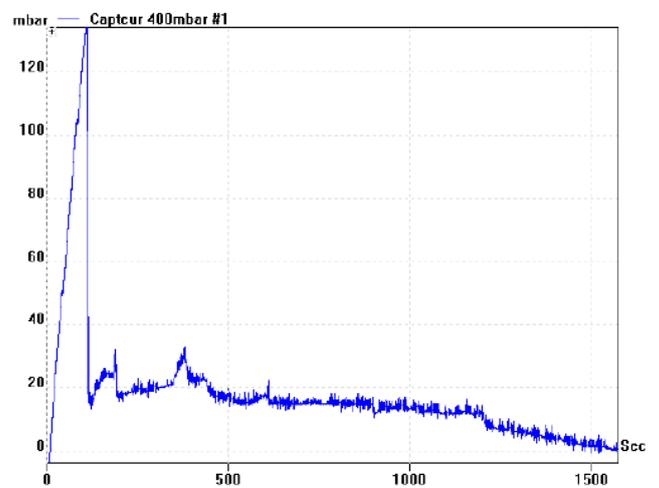


Figure 38 : à gauche photographie montrant un reflux massif depuis le site d'injection (flèche), à droite étude de la pression en fonction du temps retrouvant une pression devenant quasi-immédiatement positive.

Injection 3 :

L'injection a conduit à une fuite massive à travers un sillon, aucune diffusion ne s'est faite au sein de la substance blanche cérébrale.

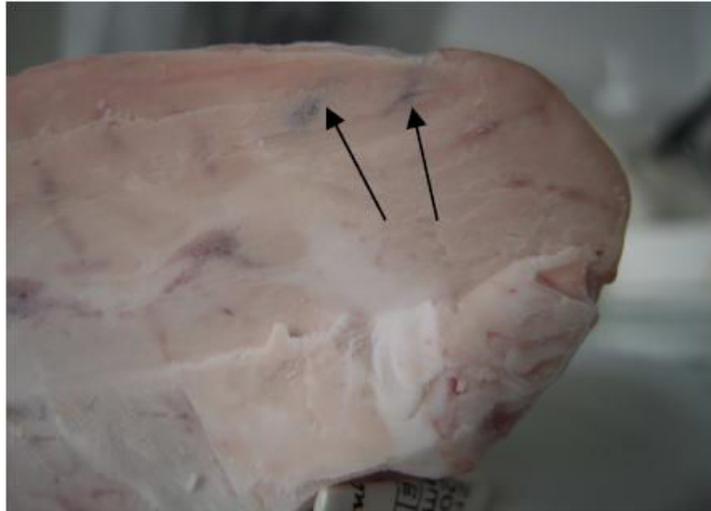


Figure 39 : photographie montrant une coloration des espaces sous-arachnoïdiens de part et d'autre du site d'injection témoignant d'une fuite massive et une absence de coloration parenchymateuse

L'étude du profil de pression est différente avec une pression devenant positive beaucoup plus rapidement que lors de la première injection puis de nouveau une pression en plateau.

Injection 4 :

L'examen de l'encéphale a révélé une fuite massive dans un sillon depuis la profondeur de celui-ci avec une absence totale de coloration parenchymateuse. La courbe de pression est également positive plus rapidement que lors de la première injection (lors les premières 100 secondes).

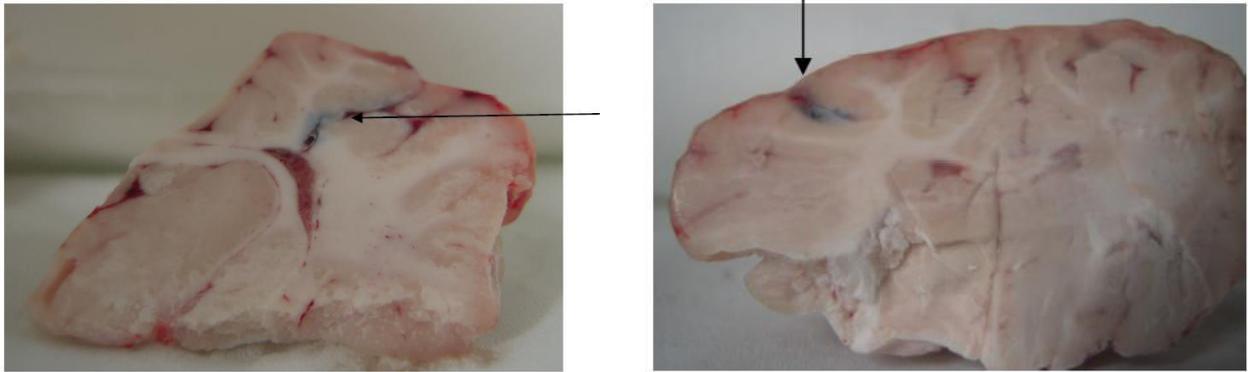


Figure 40 : photographies montrant à gauche le point d'injection avec un reflux (flèches) dans un sillon de voisinage, jusqu'à la superficie à droite sans coloration parenchymateuse.

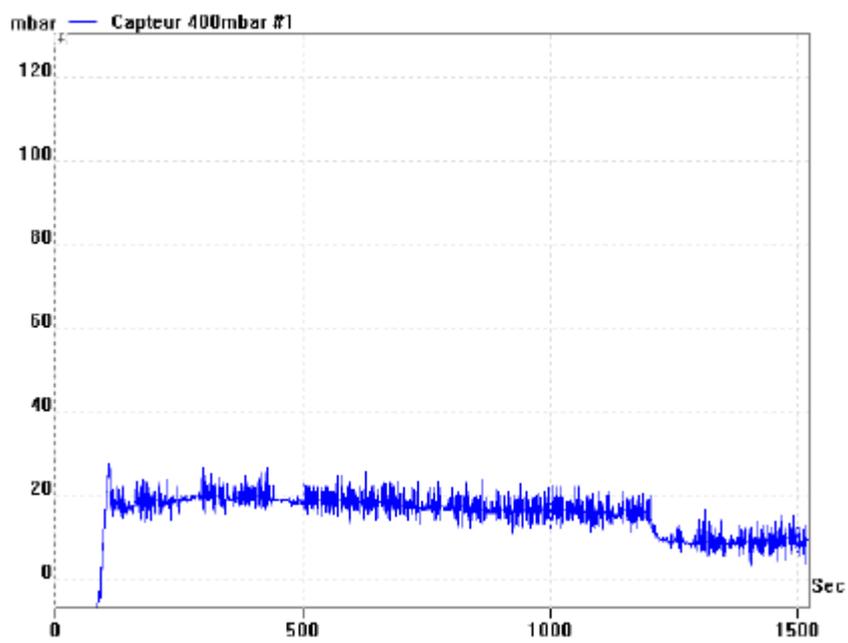


Figure 41 : Pression de la ligne d'injection (mbar), en fonction du temps (secondes), la pression devient positive avant les 100 premières secondes sans pic de pression.

5.2.3. Discussion

Nous pouvons donc avancer le fait que l'étude d'un profil de pression pourrait permettre d'anticiper la qualité de l'injection. En effet lors du retrait du trocart une dépression est réalisée. Nous pouvons donc imaginer un phénomène d'aspiration parenchymateuse au sein de la lumière du cathéter. Puis au cours de l'injection la pression se majore progressivement pour atteindre une pression nulle. Nous remarquons ensuite un pic de pression, comme celui observé par Bobo et al(37), la théorie du bouchon de parenchyme prend tout son sens du fait de la dépression initiale. Une fois ce bouchon évacué, il se crée une chambre de convection avec une pression positive en plateau, il est intéressant d'observer que les niveaux de pression atteintes lors de la phase de plateau sont similaires : 25 mmHg pour l'expérience de Bobo (environ 18 mbar) entre 10 et 20 mbar pour nous. Un point qui semble primordial pour détecter une fuite est le temps de latence entre le début de l'injection et le moment où la pression devient positive. Elle était de 500 ms pour l'injection de bonne qualité alors que le temps de latence observé dans les injections ayant conduit à des fuites sont bien inférieurs. Le mécanisme proposé est celui d'une pression qui atteindrait plus rapidement une valeur nulle du fait d'un point du départ à une pression supérieure : en effet la proximité d'un sillon ou de l'épendyme, après aspiration d'un bouchon parenchymateux conduit à une aspiration de liquide cérébro-spinal. La pression de départ est donc moins basse, de plus, l'ouverture d'une voie d'impédance rhéologique inférieure crée une voie d'écoulement vers les espaces sous-arachnoïdiens ou les ventricules.

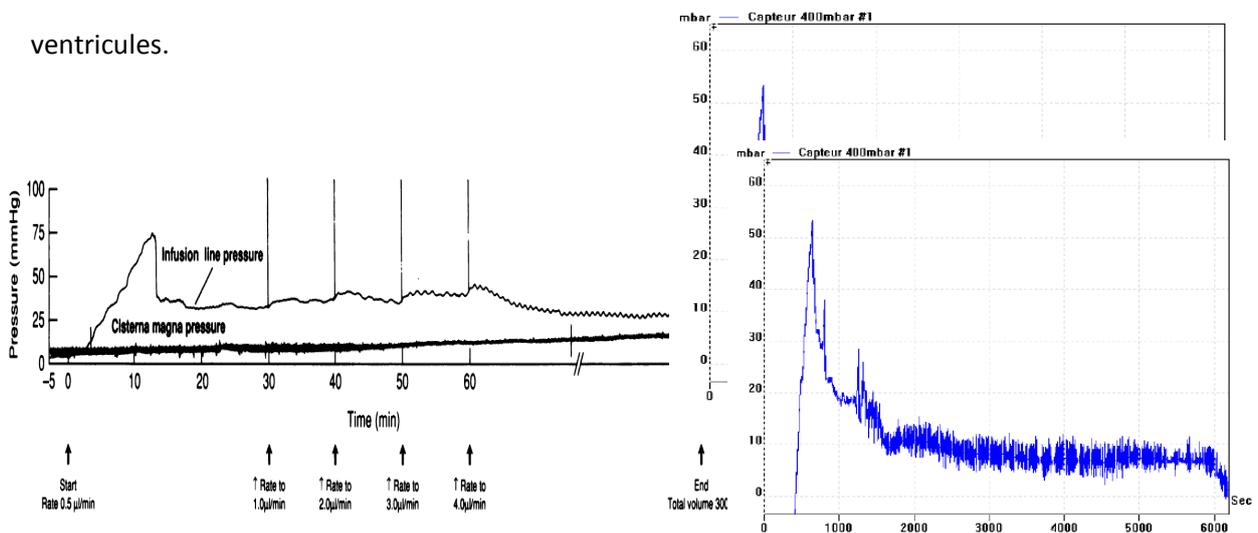


Figure 42 : à gauche profil de pression lors de l'injection au sein de la corona radiata de chat à droite (Bobo et al.) injection au sein de la corona radiata de porc, on remarquera les similitudes entre les deux tracés, pic précoce suivi d'une décroissance rapide et d'un plateau d'une pression comparable.

Si le cathéter est placé directement dans un sillon ou au sein des ventricules, le retrait du trocart entraînant une dépression, il en résulte un appel de LCS au sein du cathéter la pression est nulle immédiatement : l'injection se fera directement dans les espaces sous arachnoïdiens.

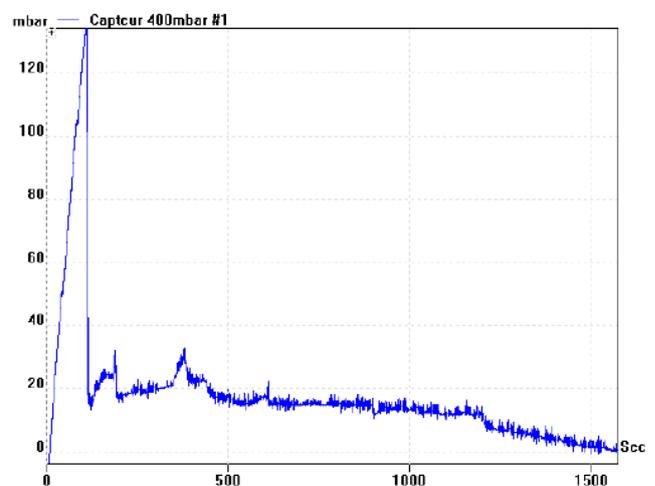
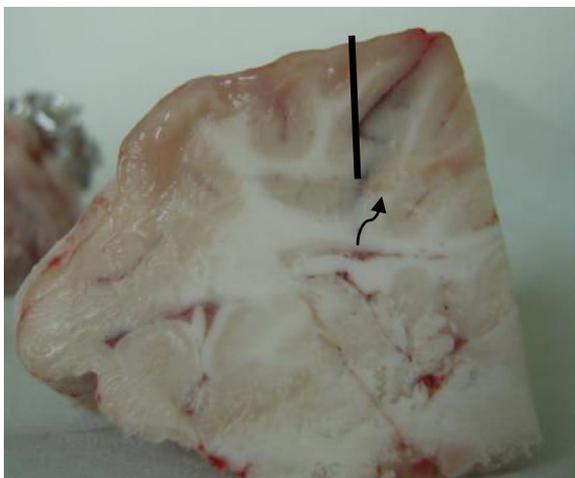


Figure 43 : photographie de l'injection 3 avec simulation de la fuite depuis le point d'injection en profondeur du sillon par lequel la fuite a été identifiée, le profil de pression à droite montre une pression nulle dès le départ du fait de l'aspiration de LCS : le cathéter devait de trouver dans les espaces sous-arachnoïdiens.

Nous avons donc un profil type d'injection sans reflux majeur, ni fuite et 3 tracés dont l'analyse des caractéristiques nous permet une prédiction de fuite par l'ouverture d'une voie d'impédance rhéologique inférieure. Le faible taux d'injection réussit vient de la mise en place « à l'aveugle » du cathéter, ce taux de succès anormalement bas serait probablement différent en condition clinique

avec une mise en place en stéréotaxie. L'étude de la pression au cours d'une implantation peut donc permettre une analyse de la qualité de positionnement du cathéter, le suivi tout au long de l'injection est également primordial car l'apparition d'une fuite plus tardivement serait visualisable par une chute brutale de la pression en plateau. Il s'agit donc d'un contrôle qualité continu à notre disposition lorsqu'un contrôle imagerie per opératoire n'est pas possible ou sur des injections longues.

5.3. Tests d'injection intra-tumorale avec un système implanté chez le porc

5.3.1 Introduction

L'étape suivante après la mise au point du modèle de gliome chez le porc est la mise au point d'un protocole d'injection au long cours par un système implanté d'un colorant pour établir un test de faisabilité et de tolérance du dispositif en condition préclinique adaptée.

Le système d'injection est un système prototype mis au point par le CEA-LETI, ce système comprend un réservoir, une technologie de type pompe MEMS. Le système initial est composé de deux boîtiers, l'un contenant le réservoir, le deuxième contenant la pompe. Pour une assurer la biocompatibilité du système, les boîtiers sont confectionnés en PEEK.



Figure 44 : photographie du boitier N°2 (pompe) de profil à gauche, de face à droite avec une entrée recevant le colorant du réservoir et une sortie vers le cathéter.

Le but de ce travail est donc d'induire la formation d'une tumeur chez le porc puis de tester l'injection d'un colorant au sein de la tumeur. La distribution au sein de la tumeur est étudiée de manière qualitative afin de tester la pertinence d'un système d'injection continu implanté ainsi que sa tolérance.

5.3.2 Matériels et méthodes :

Implantation tumorale :

5 animaux ont été utilisés pour cette étude, il s'agit de porcs âgés de trois mois issus du fournisseur habituel.

Un protocole d'injection tumoral de cellules U87 a été utilisé comme décrit dans le chapitre consacré au modèle tumoral, les animaux étaient immunosupprimés.

IRM de suivi :

Une IRM a été réalisée sous anesthésie générale à J14 post-implantation selon le protocole utilisé précédemment avec la réalisation de séquences T1, T2 et T1 avec injection de gadolinium.

Cette IRM permet de vérifier le développement de la tumeur, son volume et sa position précise afin de pouvoir placer le cathéter au centre de celle-ci.

Implantation de l'injecteur :

2 jours après la réalisation de l'IRM, les animaux sont anesthésiés selon le protocole habituel, puis après désinfection cutanée à la povidone iodée et champage, la cicatrice initiale était reprise. Une autre incision est pratiquée en région cervicale pour la mise en place de la pompe.

Mise en place des boitiers et du cathéter :

Une incision cervicale longitudinale de 20 cm est réalisée jusqu'à l'aponévrose musculaire, celle-ci est ouverte puis l'espace entre les plans musculaires disséqués pour glisser de part et d'autre le boitiers du réservoir et la pompe, reliés entre eux par un cathéter de dérivation ventriculo-péritonéal (Integra).

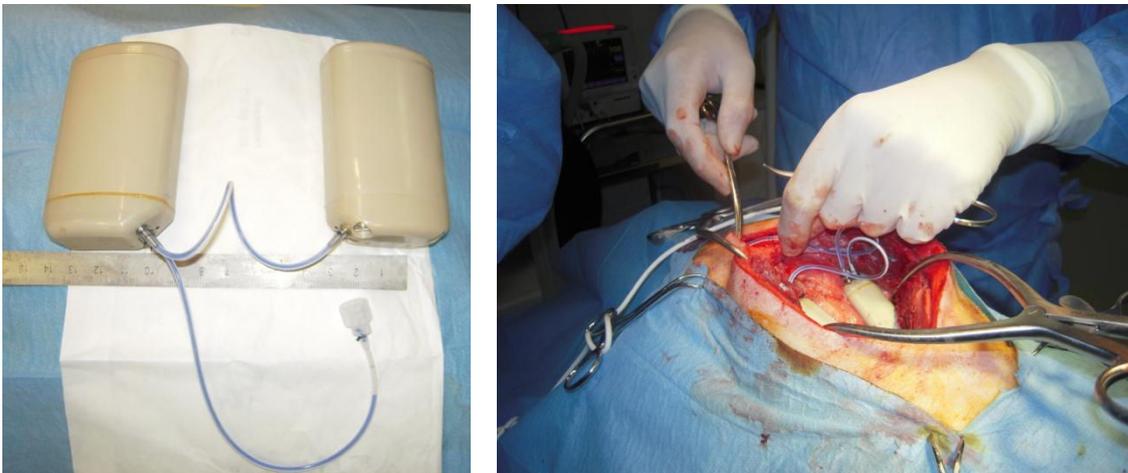


Figure 45 : photographie du système d'injection, à gauche les deux boitiers du réservoir et de la pompe reliés par un cathéter de dérivation ventriculo-péritonéal, la sortie de la pompe est connectée avec une extension jusqu'au raccord pour le cathéter, à droite implantation des boitiers dans la région cervicale.

La sortie de la pompe est connectée par un drain muni d'un raccord Luer-Lock, tunnélisé jusqu'à l'incision crânienne. Le réservoir est rempli d'une solution de sérum physiologique + bleu trypan (0,5 ml de bleu trypan pour 10 ml de sérum physiologique). Le cathéter est raccordé au système puis purgé. Après avoir ruginé les masses musculaires temporales le cathéter est inséré dans la cavité crânienne par le trou de craniotomie utilisé pour l'implantation tumorale à une profondeur déterminée par une IRM pré-opératoire afin de se placer au centre de la tumeur. Le cathéter est fixé puis les différentes incisions sont refermées.

Injection :

L'injection est réalisée le lendemain de la chirurgie à un débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour un volume final injecté de 4,5 ml, l'injection est ensuite arrêtée 24 heures avant le sacrifice de l'animal selon le protocole habituel. L'encéphale est prélevé et congelé dans l'azote liquide. Pour le 5^{ème} animal, il a été décidé de reprendre l'injection 300 minutes avant le sacrifice en reprenant une injection de 300 μl à un débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, afin de tester la possibilité de reprendre une injection par une commande à distance, matériel implanté.

Analyse :

Les encéphales ont été découpés selon un plan coronal centré sur le site d'implantation du cathéter pour une analyse qualitative de l'injection.

5.3.3. Résultats

Sur les 6 implantations tumorales, 6 tumeurs macroscopiques ont été obtenues à l'évaluation IRM à J14, aucune complication d'ordre infectieuse n'a été à déplorer malgré l'immunosuppression et les 2 interventions chirurgicales dont une avec pose de matériel implantable.

Animal N°1

A l'extraction du système d'injection, on ne retrouve pas de fuite de colorant dans les tissus sous-cutanés. Après ouverture du boîtier réservoir, celui-ci s'est bien vidé. Après extraction de l'encéphale on observe une tumeur macroscopiquement visible avec une coloration superficielle signant une fuite ou un reflux dans les espaces sous-arachnoïdiens. Après réalisation des coupes, on retrouve une très faible coloration punctiforme au sein de la tumeur et une coloration intense au sein des espaces sous-arachnoïdiens.

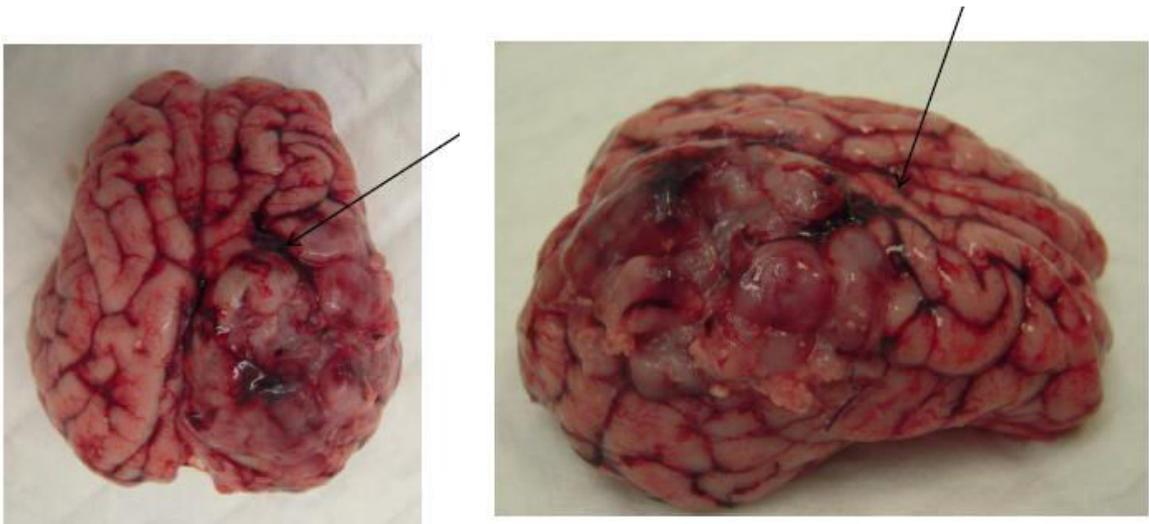


Figure 46 : Photographies de l'encéphale de l'animal 1 : à gauche en vue supérieure à droite en vue latérale droite, on retrouve une tumeur macroscopique, avec une importante fuite de colorant dans les espaces sous-arachnoïdiens (flèches).



Figure 47 : Photographie d'une coupe coronale passant par le point d'injection de l'animal 1, on retrouve au sein de la tumeur une faible coloration centro-tumorale (flèche).

Animal 2

L'inspection du système injecteur, a révélé une absence de fuite, le réservoir est vide. A l'examen externe de l'encéphale une tumeur bourgeonnante est identifiable, ainsi qu'une fuite de colorant à la superficie. La réalisation de coupes coronales permet de mettre en évidence une coloration de reflux depuis le point d'injection vers le cortex sans coloration significative du parenchyme tumoral.

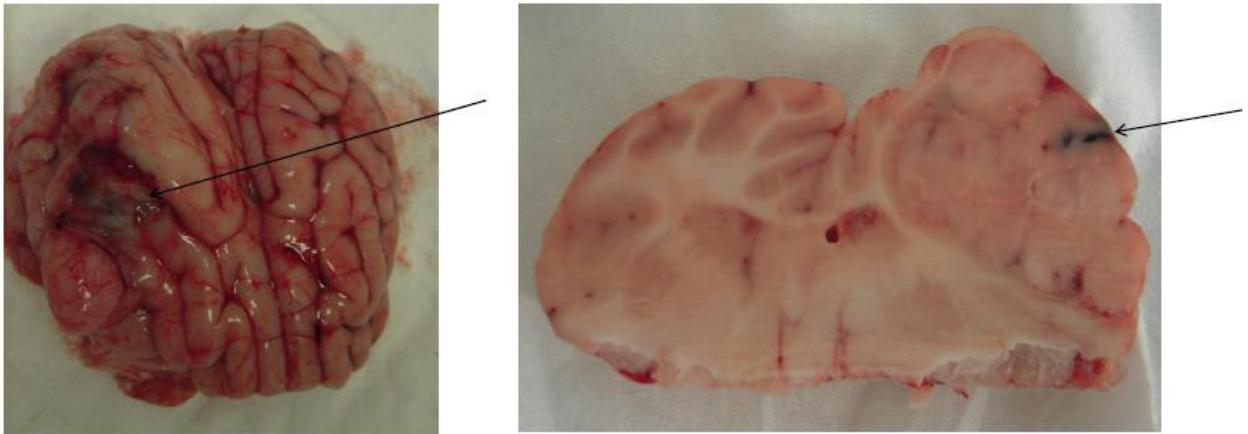


Figure 48 : photographies de l'encéphale de l'animal 2, à gauche vue supérieure droite, à droite coupe coronale centrée sur le point d'injection, montrant une tumeur macroscopique avec un reflux depuis le site d'injection vers la superficie sans coloration tumorale significative.

Animal 3 :

A l'extraction du système d'injection, on ne retrouve pas de fuite de colorant dans les tissus sous-cutanés. Après ouverture du boîtier réservoir, celui-ci est vide. Après extraction de l'encéphale on observe une tumeur macroscopiquement visible sans fuite de colorant à la superficie.

En coupe aucune coloration au sein de la tumeur n'était visible.



Figure 49 : photographie de l'encéphale de l'animal 3, à gauche en vue latérale droite, une tumeur bien visible, à droite en coupe, aucune coloration identifiable.

Animal 4 :

Lors du prélèvement aucune fuite n'a été identifiée le long du système injecteur, aucun signe d'infection, le réservoir est bien vidé. Aucune fuite en superficie du cerveau. A l'examen en coupe il existe une concentration de la coloration en périphérie de la tumeur. Le colorant n'est pas visualisé au niveau du site d'injection.



Figure 50 : photographie d'une coupe de l'encéphale de l'animal 4 montrant une coloration périphérique de la tumeur sans fuite.

Animal 5 :

A l'examen après extraction de dispositif, aucune fuite n'a été à déplorer, le réservoir s'est bien vidé. Une tumeur macroscopique est bien visible, il existe une coloration en périphérie de la tumeur. A la réalisation de coupes, il est clairement observé une coloration périphérique ainsi qu'une coloration au centre de la tumeur.

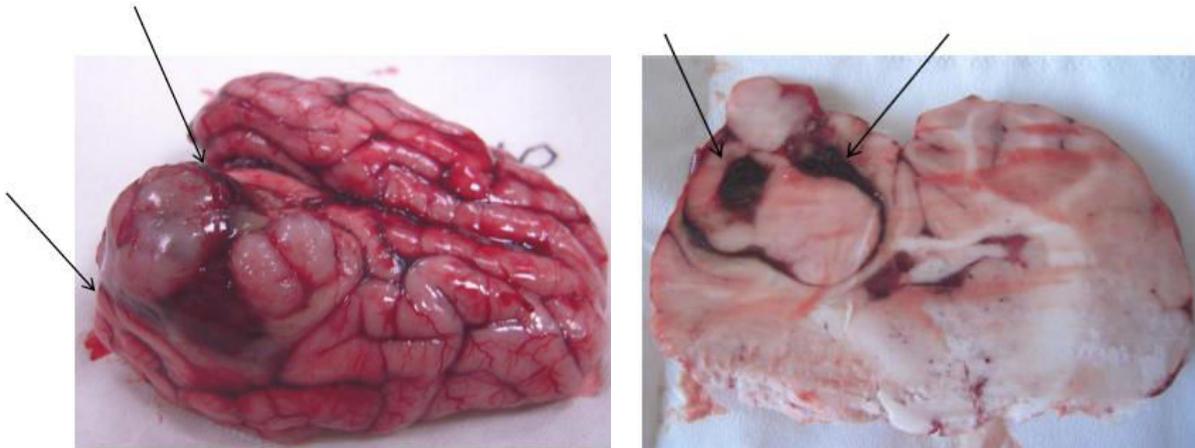


Figure 51 : photographie de l'encéphale 5, à gauche vue latérale droite ou une tumeur est individualisée, déformant la surface du cerveau, à droite coupe coronale passant par le site d'injection. On retrouve une coloration périphérique et au centre de la tumeur (flèches).

5.3.4. Discussion

Cette étape était une étape primordiale car elle permet de répondre à des questions clés du processus d'étude. Il est donc possible d'implanter un système d'injection chez un porc porteur d'une tumeur cérébrale. Cette implantation est bien tolérée malgré l'immunosuppression concomitante, aucune infection n'a été relevée, aucune désunion de cicatrice ou trouble du comportement de l'animal n'est observé malgré le volume des dispositifs.

Une injection prolongée avec des volumes d'injection adaptés aux volumes nécessaires en clinique est donc envisageable.

Nous confirmons ici que le principal écueil est le reflux et la fuite puisque sur les 5 injections 3 ont conduit à une mauvaise délivrance du colorant. La principale difficulté est la mise en place à « l'aveugle » des cathéters, en effet la précision de notre visée reste approximative car réalisée à

main levée. Une implantation en condition stéréotaxique permettrait probablement de réduire de manière importante les reflux à travers les sillons.

Deux injections ont conduit à une injection sans fuite majeure, les animaux 4 et 5. La répartition de la coloration à la périphérie de la tumeur, sans coloration au sein observée chez l'animal 4 peut paraître intrigant. On pourrait extrapoler une injection ayant reflué jusqu'à la surface de la tumeur puis ayant « disséqué » la périphérie tumorale, se concentrant contenu par l'arachnoïde. Ce mécanisme n'est probablement pas l'explication de ce phénomène. Il est plus facile d'interpréter ces résultats en prenant en compte les coupes de l'animal 5. Il faut se rappeler que l'injection était arrêtée 24 heures avant le sacrifice, l'animal 5 avait une injection de 300 μ l reprise juste avant le sacrifice. On retrouve sur l'animal 5 une couronne de coloration comme retrouvée sur l'animal 4 mais une coloration centro-tumorale. Ceci confirme le fait que le colorant était bien injecté au centre de la tumeur avant de se répartir de façon radiaire en périphérie de la tumeur. Le principal vecteur de « chasse » du colorant, en plus de la convection liée au générateur de pression à l'extrémité du cathéter, est le gradient de pression interstitiel entre la tumeur et sa périphérie comme suggéré par Jain et al dans leurs travaux(69, 70). Ce gradient de pression induit un transport accéléré du colorant depuis le centre de la tumeur (haute pression) et la périphérie de la tumeur où la pression devient homogène avec le parenchyme adjacent, le principal moteur de mouvement est la diffusion. La diffusion étant un mode de transport lent, il existe une accumulation de colorant en périphérie.

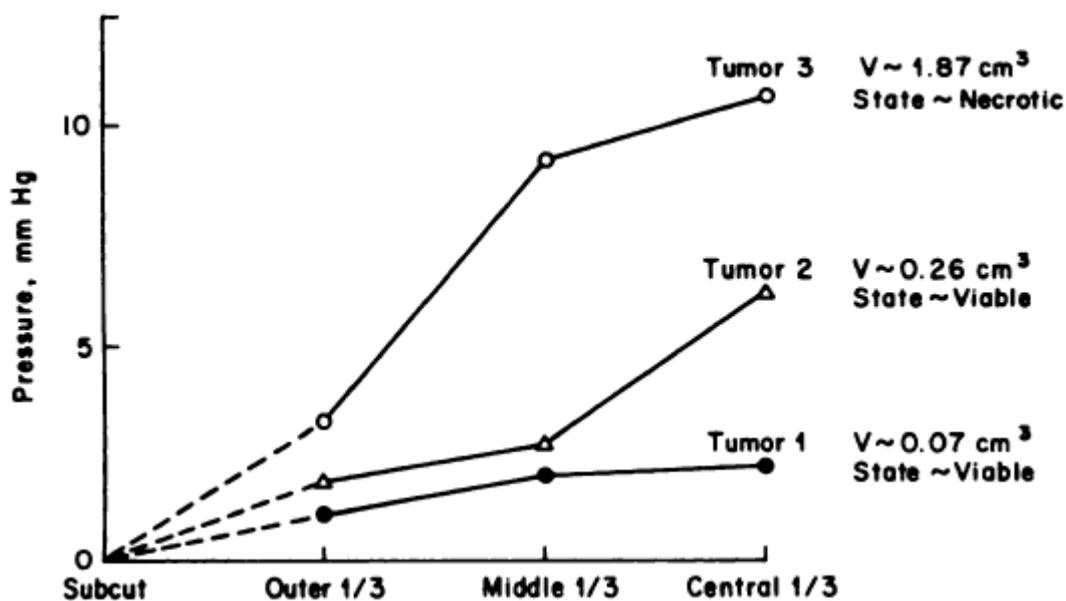


Figure 52 : gradients pression interstitielle dans un modèle de carcinome VX2 sous cutané, plus la tumeur grossit, plus la pression interstitielle devient importante (Jain et al 1979).

Le principal problème que pourrait poser cette dispersion rapide depuis le centre tumoral vers la périphérie est la possibilité qu'il existe un temps de contact minimal entre notre futur agent thérapeutique et les cellules tumorales, il est certain que notre traceur ne mime que partiellement les interactions qui pourraient intervenir entre un anticorps et son antigène «ralentissant» la progression contrairement à un traceur. Cependant ce temps de contact pourrait être important pour des phénomènes d'endocytose de molécules de chimiothérapie : problème qu'avait posé l'utilisation de carmustine in-situ (temps de contact rendu fugace par la facilité à regagner le secteur vasculaire).

Une piste à explorer est la modification de la viscosité de la solution injectée qui pourrait ralentir le front de progression lié à un double moteur de convection (le flux convectif et le gradient de pression interstitiel), problématique soulevée par l'équipe de Tel-Aviv pour essayer de diminuer les reflux(46).

Etude anatomique d'une
injection par infusion
convective dans un encéphale
humain.

6.1. Etude anatomique d'une injection par infusion convective dans la corona radiata pariétale

6.1.2 : Introduction

Le but de ce travail est de proposer un modèle prédictif des grandes voies de distribution lors d'une infusion convective dans l'encéphale humain. En effet, si nous connaissons les grandes voies de dissémination du gliome le long des voies de substance blanche, il reste à connaître le mode de répartition lors d'une injection au sein de l'encéphale, afin de pouvoir préciser ce que nous appellerons une anatomie rhéologique du cerveau humain. Ces éléments pourraient permettre d'établir une distribution prédictive en fonction des points d'injection et ainsi de personnaliser le planning d'implantation à chaque patient selon la position et l'infiltration du gliome. Pour débiter nous avons choisi une injection au sien de la corona-radiata en ayant comme but de savoir comment atteindre les principales voies de dissémination à ce niveau : les faisceaux d'association pour l'infiltration homolatérale et le corps calleux pour l'extension controlatérale.

6.1.2. Matériels et méthodes

Prélèvements des encéphales :

Les corps utilisés pour ce travail sont issus du don de corps au Laboratoire d'Anatomie Des Alpes Françaises (LADAF).

Pour ce travail 4 encéphales ont été utilisés, il s'agissait d'encéphales de corps formolés. L'encéphale est prélevé dans son intégralité et plongé dans un bain de formol à 2,5 % pendant 24 heures.

Injection :

Les cathéters sont implantés à travers le gyrus post-central en regard de la deuxième circonvolution frontale à une profondeur de 15 mm afin de rester à distance des ventricules. L'implantation était bilatérale et symétrique.

Le colorant injecté est du carmin d'indigo dilué dans du sérum physiologique à la concentration de 1 ml pour 60 ml de sérum physiologique. L'injection est réalisée à un débit de 0,1 ml /heure grâce à un pousse seringue (Fresenius Inc®) pendant une durée de 7 jours pour un volume de 16,6 ml. Le cathéter utilisé est un cathéter prototype fournit par les laboratoires BD.

Analyse :

Une fois l'injection terminée les cathéters sont retirés, les fuites et reflux sont recherchés par un examen externe minutieux puis deux séries de coupes sont réalisées centrées sur le point d'injection les premières en coupe coronales et ensuite dans un plan sagittal. Les trois principaux diamètres de l'injection étaient mesurés et un volume approximatif de distribution était calculé selon la formule suivante $V = 1/3 \pi R^1.R^2.R^3$.

6.1.3. Résultats :

Sur les quatre encéphales et les huit injections, lors de l'examen externe 4 reflux ou fuites ont été détectés. Sur les 4 toutes ont fuit dans le sillon central, 2 dans le sillon intra-pariétal.



Figure 53 : photographie montrant les points d'entrée dans le gyrus post-central bilatéralement, à gauche fuite dans le sillon central et le gyrus-précentral à droite absence de fuite ou de reflux.

Le volume moyen de diffusion était de 12,8 ml (5,6 – 18,9), une injection n'a entraîné aucune coloration intra-parenchymateuse du fait d'une fuite sur un raccord.

Sur les coupes coronales, en ce qui concerne la distribution le long des fibres de substance blanche, toutes les injections ont conduits à une coloration des gyrus adjacents par la voie es fibres en U, aucune coloration du corps calleux n'a été visualisé malgré des diffusions de grands volumes.



Figure 54 : photographie d'un encéphale, coupe coronale centrée sur le point d'injection, montrant une diffusion depuis la corona-radiata vers les gyrys de proximité en suivant les faisceaux de substance blanche sans atteindre le corps calleux.

La répartition du colorant se répartit également mais à une moindre intensité dans le cortex adjacent, en examinant cette répartition on a pu remarquer que seul le cortex du gyrys en regard de l'injection a été siège d'une coloration.

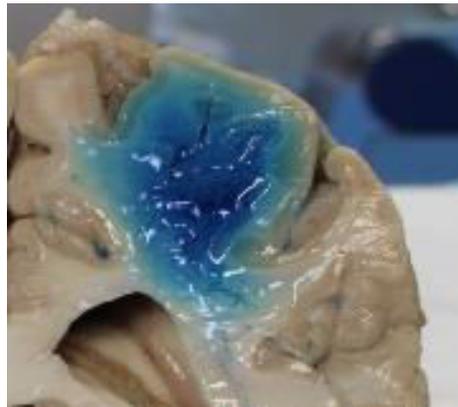


Figure 55 : photographie centrée sur le gyrys adjacent au site d'injection montrant une coloration corticale exclusive de ce gyrys.

Les coupes sagittales ont mis en évidence une coloration du faisceau occipito-frontal supérieur dans 6 cas sur 8 et du faisceau longitudinal supérieur dans 4 cas sur 8.

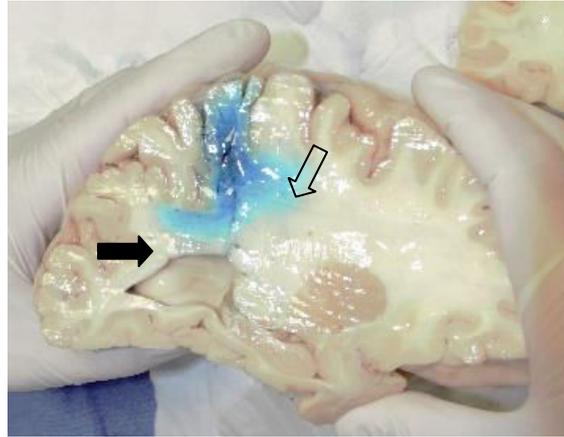


Figure 56 : coupe sagittale d'un hémisphère gauche centrée sur le point d'injection en vue mésiale, montrant une coloration du bras postérieur du faisceau longitudinal postérieur (flèche pleine noire) et du faisceau occipito-frontal supérieur (flèche vide).

6.1.4. Discussion

Ce travail nous a permis de confirmer le fait que lors d'une infusion convective au sein de la substance blanche la répartition est anisotrope contrairement à une injection dans un noyau de substance grise comme réalisé habituellement chez les rongeurs. Cette répartition suit les grandes voies de substance blanche permettant le passage d'un gyrus à l'autre. L'imprégnation corticale est plus limitée car nous n'avons pas réussi à obtenir une coloration corticale exceptée dans le gyrus directement concerné par l'injection. En observant les coupes, le mécanisme le plus probable semble être que le cortex est coloré par un phénomène de diffusion simple et non pas par la convection. Le traceur rejoint la limite substance grise/substance blanche puis un phénomène de diffusion beaucoup plus lent permettrait une imprégnation corticale. Les gyrus contigus sont plus tardivement colorés, ce mécanisme n'aurait pas dans le temps imparti permit ce phénomène. Il serait intéressant de savoir si ce phénomène est similaire lors d'une injection près d'un noyau de substance grise en profondeur du cerveau.

La propagation via le faisceau longitudinal supérieure et le faisceau occipito-frontal supérieur est un élément positif pouvant laisser supposer la possibilité d'atteindre des cibles distantes du point d'injection et de couvrir les zones d'infiltration du gliome de manière efficace.

Un point surprenant est l'absence de coloration du corps calleux malgré des volumes de distribution conséquent à proximité de celui-ci. Ce constat apparaît comme un problème s'agissant d'une voie d'infiltration préférentielle des gliomes vers l'hémisphère controlatéral.

Si une injection dans la corona-radiata ne permet pas d'atteindre le corps calleux bien que le volume injecté soit conséquent, il apparaît nécessaire de changer le site d'injection.

6.2. Etude anatomique d'une injection par infusion convective dans la corona-radiata pariétale à proximité immédiate du corps calleux

6.2.1. Introduction

Il semble primordial compte tenu de la propension qu'on les gliomes d'infiltrer le corps calleux de pouvoir trouver une cible permettant d'atteindre cet objectif. Notre hypothèse est que lors d'une infusion convective le flux se dirige sous pression vers les zones de moindre résistance. Les radiations calleuses étant de moins en moins denses au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la ligne médiane, il est d'autant plus difficile de faire diverger le flux vers cette structure.

Nous avons donc pris la décision de placer l'extrémité du cathéter le plus près possible du corps calleux, le principal écueil est un cathéter trop profond au sein de la lumière ventriculaire. Afin de positionner au mieux notre cathéter nous nous sommes aidés d'un échographe afin de pouvoir placer le cathéter au plus près de la cible idéal.

6.2.2. Matériels et méthodes

Prélèvements des encéphales :

Les corps utilisés pour ce travail sont issus du don de corps au Laboratoire d'Anatomie Des Alpes Françaises (LADAF).

Pour ce travail 8 encéphales ont été utilisés, il s'agissait d'encéphales de corps formolés. L'encéphale est prélevé dans son intégralité et plongé dans un bain de formol à 2,5 % pendant 24 heures.

Injection :

Les encéphales sont plongés dans un bain de formol afin d'éviter toute interface liquide/air pour le repérage échographique (échographe ALOKA® UST-5524-7.5). Deux cathéters sont disposés symétriquement en ce qui concerne le point d'entrée le premier, à gauche, au sein de la corona-radiata comme précédemment, le deuxième, à droite, au contact du corps calleux grâce à un contrôle continu échographique.

La cible est une zone latérale et crâniale par rapport au bord latéral du corps calleux, les principales structures repérées lors de l'échographie sont le sillon cingulaire pour éviter une fuite inter-hémisphérique, le ventricule, la scissure inter-hémisphérique.

Le colorant injecté est du carmin d'indigo dilué dans du sérum physiologique à la concentration de 1 ml pour 60 ml de sérum physiologique. L'injection est réalisée à un débit de 0,1 ml /heure grâce à un pousse seringue (Fresenius Inc) pendant une durée de 7 jours pour un volume de 16,6 ml. Le cathéter utilisé est un cathéter prototype fournit par les laboratoires BD.

Analyse :

Une fois l'injection terminée les cathéters sont retirés, les fuites et reflux sont recherchés par un examen externe minutieux puis deux séries de coupes sont réalisées centrées sur le point d'injection les premières en coupe coronales et ensuite dans un plan sagittal

6.2.3. Résultats

Les injections au sein de la corona radiata gauche ont conduit à 5 injections de qualités et 3 fuites, 2 vers les ventricules et une vers le sillon central.

Les constatations sont les même que précédemment, aucune coloration du corps calleux n'a été visualisée.

Pour les injections à proximité du corps calleux, 6 ont conduits à des fuites 2 à travers un sillon vers la superficie, 2 via le sillon cingulaire vers la scissure inter-hémisphérique, 4 vers les ventricules.

Deux injections ont permit une coloration du corps calleux depuis ses radiations vers le corps, une de ces injection à tout de même fuit vers les ventricules.

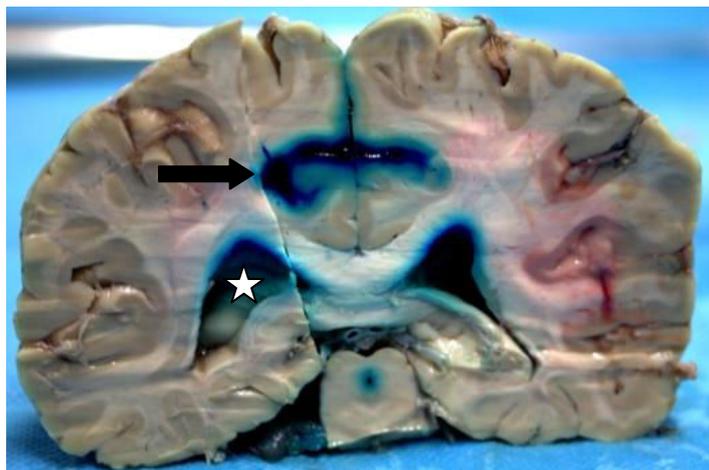


Figure 56 : photographie d'une coupe coronale avec une fuite depuis le sillon cingulaire (flèche) droit vers la scissure inter-hémisphérique ainsi que vers les ventricules (étoile).

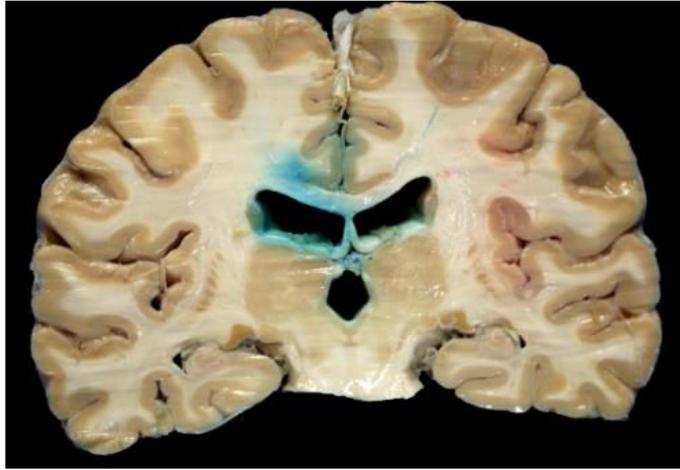


Figure 57 : photographie d'une coupe coronale retrouvant une coloration du corps calleux dépassant la ligne médiane avec fuite vers les ventricules.

Un point remarquable est que les deux injections ayant entraîné une coloration visible au sein du corps calleux n'ont que très peu diffusé vers les faisceaux longitudinaux supérieurs et occipito-frontaux supérieurs.

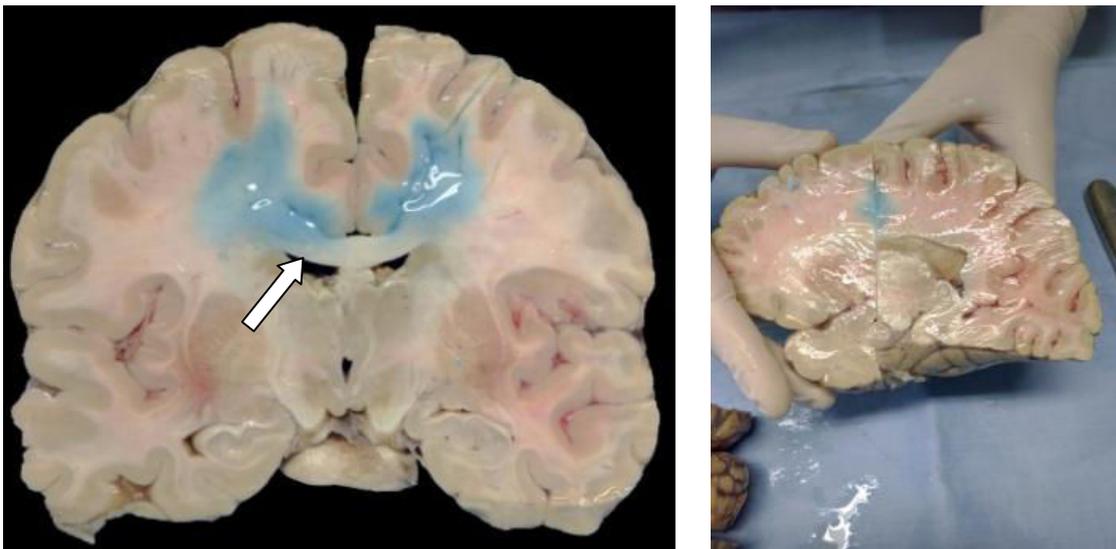


Figure 58 : photographies d'un encéphale, à gauche coupe coronale montrant une belle coloration du corps calleux dans l'hémisphère droit (flèche), une diffusion au sein de la corona-radiata dans l'hémisphère gauche n'infiltrant pas le corps calleux. Image de droite, coupe sagittale de l'hémisphère droit montrant une faible diffusion vers les faisceaux d'association.

6.2.4. Discussion

Ces résultats confirment notre hypothèse de départ, pour atteindre le corps calleux il faut se trouver à proximité du corps calleux, afin que la densité de radiations calleuse soit suffisamment importante pour diriger le flux vers celui-ci. Cette théorie est renforcée par le fait que lorsque le flux est dirigé vers le corps calleux donc dans un plan coronal, le colorant n'est que très peu orienté dans le plan sagittal vers les faisceaux occipito-frontaux supérieurs et longitudinaux supérieurs contrairement à une injection plus superficielle, ceci étant confirmé par les injections controlatérales simultanées.

Cependant une injection à proximité du corps calleux, si elle semble nécessaire à une distribution efficace à travers celui-ci est pourvoyeuse de fuite, notamment vers les ventricules (50% des injections), ce qui pourrait être un frein pour l'efficacité d'une telle injection. Ceci confirme la nécessité de prédire la qualité d'une injection par une mesure de pression lors d'un essai clinique pour pouvoir replacer le cathéter.

Ces éléments sont à notre sens en faveur d'une étude systématique des différentes cibles afin d'atteindre les principales voies d'infiltration des gliomes. Nous nous orientons donc vers une thérapie adaptée à chaque patient en fonction de la localisation, des principales voies de substances blanches, nécessitant de connaître au préalable cette anatomie rhéologique qui nous l'avons vu n'est pas intuitive et nécessite d'être étudiée précisément.

Notre choix d'injecter des cerveaux humains vient de la singularité de l'anatomie de la substance blanche chez l'homme qui ne peut être complètement déduite d'une étude d'encéphale de mammifères. En effet, c'est en partie par sa richesse de connexion entre ses différentes aires corticales que l'homme tire sa singularité neurologique (fonctions supérieures, praxies élaborées). L'utilisation d'encéphales humains nécessite une fixation, cette fixation en remplaçant l'eau du secteur interstitiel par du formol peut modifier sa conductance hydraulique, cependant nous n'avons pas actuellement de modèle supérieur.

Conclusions générales

Les principaux objectifs que nous nous étions fixés sont atteints et plusieurs éléments primordiaux dans la compréhension des différents mécanismes intervenants semblent éclaircir.

En ce qui concerne la pharmacocinétique d'une injection intracérébrale de bevacizumab, il existe un rationnel en faveur de cette voie car la concentration sérique lors de cette injection est beaucoup plus faible que lors d'une administration systémique. Cet élément est primordial si l'on se réfère aux nombreux effets secondaires associés à ce traitement principalement hémorragiques ou thromboemboliques (71, 72). La diminution significative de la concentration sérique pourrait probablement permettre de réduire sensiblement l'incidence de ces effets secondaires dont une partie non négligeable aboutie à un arrêt des traitements, une morbidité importante ou au décès.

De plus, la concentration au sein de la tumeur est comparable, ce gain en terme d'exposition systémique, ne se fait pas au détriment d'une plus faible disponibilité au niveau de la cible thérapeutique. Un potentiel écueil de cette technique pourrait être une disponibilité plus faible des zones d'infiltration à distance de la tumeur, qui sont un enjeu thérapeutique majeur. Une fois encore les concentrations mesurées dans l'hémisphère controlatéral sont encourageantes. En effet les zones infiltrées ne sont pas le siège d'une néoangiogénèse, la perméabilité vasculaire étant normale, le passage de la BHE reste modeste ainsi que le passage interstitiel lors d'une injection systémique. L'infusion convective pourrait donc être également une voie d'administration appropriée pour atteindre ces zones protégées par une BHE non altérée.

Si le rationnel pharmacocinétique semble démontré, il fallait faire la preuve de son efficacité thérapeutique sur la croissance tumorale. Les résultats sont probants, il existe un avantage de l'injection intra-tumorale de bevacizumab en ce qui concerne la survie des animaux alors que la

survie des animaux traités, par bevacizumab, par voie systémique ont la même survie que les animaux traités par placebo. Les résultats similaires entre placebo et le bevacizumab systémique sur la survie globale conforte les résultats des essais cliniques où seule la survie sans récurrence est améliorée (19). Ceci est un résultat primordial de notre travail puisqu'il suggère que l'infusion convective n'apporterait pas uniquement un avantage en diminuant la concentration systémique de l'agent thérapeutique et en diminuant les effets indésirables, il pourrait être plus efficace qu'une administration systémique, ce qui valide notre hypothèse de départ. Cependant notre étude pharmacocinétique retrouve une concentration similaire au sein de la tumeur entre les deux voies d'injections. Cette différence viendrait donc d'une action différente (qualitative ou quantitative) de la même molécule. Ce point soulève un point important, il ouvre la voie vers l'utilisation, lors d'une infusion convective, de molécules n'ayant pas pu montrer leur efficacité lors d'essais cliniques.

Les résultats encourageants des études d'efficacité chez le rongeur nous poussent à envisager un essai clinique chez l'homme, cependant à notre sens une étape supplémentaire est indispensable afin d'éviter les écueils des essais cliniques d'infusion convective instaurés directement après des résultats positifs chez les rongeurs(51, 73). En effet, le risque principal est de sous-estimer les paramètres anatomiques indispensables à maîtriser pour une infusion convective de qualité tel que décrite par Sampson et al(45). Afin de maîtriser en amont ces paramètres il est nécessaire de tester en plus de l'efficacité d'une molécule sur une tumeur donnée, la tolérance et la robustesse du système d'injection face aux limites principales de cette technique, le reflux et les fuites provoquant de mauvaises délivrances ayant possiblement conduit à sous-estimer l'efficacité de certaines stratégies thérapeutiques (73). Pour ce faire, il nous semblait indispensable de mettre au point un modèle de gliome chez un mammifère de grande taille permettant d'injecter au sein d'un encéphale de volume comparable, ayant subi un phénomène de gyration et simulant ainsi, au mieux, une injection au sein d'un cerveau humain. Notre modèle est le premier modèle de gliome induit chez un

gros animal, la stratégie mise en place pour obtenir une immunotolérance de la xenogreffe s'est révélée efficace, sans complication infectieuse notable. Ce modèle ouvre la voie au développement de modèles tumoraux extra-cérébraux chez des gros animaux permettant de tester de nouvelles technologies médico-chirurgicales dans des conditions pathologiques réalistes à l'échelle. Nous avons choisi le porc pour sa taille et la similitude macroscopique de son encéphale, et son adéquation avec les nouvelles orientations des directives portant sur l'éthiques animales visant à limiter l'usage de primates non humains. Le choix d'un tel modèle commence également à être retenu dans le cadre de l'étude des pathologies neuro-dégénératives(74).

Les collaborations mise en place pour ce projet nous ont permis d'utiliser le vivier technologique de notre région au profit d'une meilleure anticipation de la qualité d'une injection. L'étude du profil de pression au cours d'une injection a permis d'extraire les informations nécessaires afin d'anticiper une fuite ou un reflux de manière précoce pour pouvoir arrêter l'injection et replacer le cathéter. Ce suivi permettra d'optimiser les positionnements de cathéters et de pouvoir réellement analyser l'efficacité d'un essai en fonction de la réponse de la tumeur face à l'agent thérapeutique testé en s'assurant de la bonne délivrance.

Une injection d'un volume suffisant impose une injection sur plusieurs jours, nous avons opté pour l'utilisation d'un système implantable (rendue possible par l'utilisation d'un modèle gros animal). Le système a été bien toléré malgré son volume et l'immunosuppression des animaux. Il a permis des injections de qualité mais également de nombreux échecs, nous rappelant la nécessité d'une implantation stéréotaxique des cathéters et des paramètres anatomiques à contrôler, ce qui n'est pas rencontré chez les rongeurs. Un point supplémentaire doit être pris en compte après étude de ces résultats, il faudra également travailler sur le temps de contact entre l'agent thérapeutique et la cellule tumoral car le gradient de pression interstitielle entre le centre de la tumeur et la périphérie entraîne un flux rapide depuis le site d'injection vers l'extérieur. Une des pistes à tester est celle de la

viscosité de la solution injectée pouvant freiner le flux, une viscosité supérieure pourrait diminuer la proportion de reflux (46).

Dans l'optique d'un essai clinique, il faudra qu'il soit conçu pour être adapté à chaque patient. Les sites d'implantation seront à définir en fonction des zones d'infiltrats sur l'IRM, de l'existence d'une exérèse préalable et de son positionnement par rapport aux grandes voies de substances blanches cérébrales. Notre étude anatomique nous a permis de mettre en évidence que, si la distribution se faisait de manière anisotrope dans la substance blanche, comme nous l'avions anticipé, pour atteindre une voie d'infiltrat tumoral il faudra probablement étudier précisément le positionnement par rapport à cette voie car le cas du corps calleux a soulevé une question importante. Une tumeur au sein de la corona-radiata infiltre quasi systématiquement le corps calleux, cependant nous avons vu qu'une injection au sein de la corona-radiata n'entraînait pas de coloration de celui-ci, il a fallu positionner le cathéter au plus près de l'origine des radiations calleuses pour que la voie de distribution préférentielle soit commissurale et ceci au détriment des voies d'associations homolatérales. Il existe donc probablement une densité critiques de fibres de substances blanches pour qu'une voie de diffusion deviennent prioritaire, l'impédance rhéologique devenant plus faible, cette voie sera privilégiée au détriment des autres. Ceci confirme le fait qu'un traitement nécessitera plusieurs cibles simultanées pour couvrir l'étendue d'infiltration de la maladie et que ce positionnement doit être basé sur des connaissances anatomiques que nous n'avons pas encore complètement élucidées. Nous devons avoir défini au préalable des points clefs de ciblage des voies de substance blanche, atlas prédictif d'une diffusion préférentielle qui pourra définir une anatomie rhéologique de l'encéphale humain, ce travail reste à étoffer.

Ce travail a permis de comprendre un certain nombre de phénomènes entrant en compte dans l'optimisation d'une infusion convective. Certains points restent à préciser avant d'envisager un essai clinique : l'utilisation d'un cathéter innovant utilisable chez l'homme (le cathéter utilisé dans ce

travail n'est utilisable que chez l'animal pour l'instant), la définition anatomiques des points clefs pour orienter le flux vers une voie de diffusion données au sein de la substance blanche. Si un système implanté est envisageable, comme nous l'avons montré, il sera peut être plus simple d'envisager initialement un système externe réutilisable comme celui développé par l'équipe de Bristol(75), offrant la possibilité d'injection itérative par un port transcutané reliés à plusieurs cathéters. Devant les contraintes techniques et règlementaire, l'arrivé en clinique système injecteur utilisable prendra vraisemblablement de nombreuses années.

Références

1. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Blatt V, Pession A, Tallini G, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol*. 2008 May 1;26(13):2192-7.
2. Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W, Van den Bent MJ, Kortmann RD, Fisher B, et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol*. 2006 Jun 1;24(16):2563-9.
3. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005 Mar 10;352(10):987-96.
4. Wrensch M, Minn Y, Chew T, Bondy M, Berger MS. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. *Neuro Oncol*. 2002 Oct;4(4):278-99.
5. Ron E, Modan B, Boice JD, Jr., Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, et al. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med*. 1988 Oct 20;319(16):1033-9.
6. Bricolo A, Turazzi S, Cristofori L, Gerosa M, Grosslercher JC, Talacchi A, et al. Experience in "radical" surgery of supratentorial gliomas in adults. *J Neurosurg Sci*. 1990 Jul-Dec;34(3-4):297-8.
7. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg*. 2001 Aug;95(2):190-8.
8. Stummer W, Stepp H, Moller G, Ehrhardt A, Leonhard M, Reulen HJ. Technical principles for protoporphyrin-IX-fluorescence guided microsurgical resection of malignant glioma tissue. *Acta Neurochir (Wien)*. 1998;140(10):995-1000.
9. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol*. 2006 May;7(5):392-401.
10. Sheline GE. The importance of distinguishing tumor grade in malignant gliomas: treatment and prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1976 Jul-Aug;1(7-8):781-6.
11. Salazar OM, Rubin P, Feldstein ML, Pizzutiello R. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1979 Oct;5(10):1733-40.
12. Bleehen NM, Stenning SP. A Medical Research Council trial of two radiotherapy doses in the treatment of grades 3 and 4 astrocytoma. The Medical Research Council Brain Tumour Working Party. *Br J Cancer*. 1991 Oct;64(4):769-74.
13. Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1583-8.
14. Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., et al. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*. 1978 Sep;49(3):333-43.
15. Deutsch M, Green SB, Strike TA, Burger PC, Robertson JT, Selker RG, et al. Results of a randomized trial comparing BCNU plus radiotherapy, streptozotocin plus radiotherapy, BCNU plus hyperfractionated radiotherapy, and BCNU following misonidazole plus radiotherapy in the postoperative treatment of malignant glioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1989 Jun;16(6):1389-96.
16. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 1;20(5):1375-82.
17. Yung WK, Mechtler L, Gleason MJ. Intravenous carboplatin for recurrent malignant glioma: a phase II study. *J Clin Oncol*. 1991 May;9(5):860-4.
18. Couldwell WT, Hinton DR, Surnock AA, DeGiorgio CM, Weiner LP, Apuzzo ML, et al. Treatment of recurrent malignant gliomas with chronic oral high-dose tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 1996 Apr;2(4):619-22.

19. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 2007 Oct 20;25(30):4722-9.
20. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4733-40.
21. Gallego Perez-Larraya J, Lahutte M, Petrirena G, Reyes-Botero G, Gonzalez-Aguilar A, Houillier C, et al. Response assessment in recurrent glioblastoma treated with irinotecan-bevacizumab: comparative analysis of the Macdonald, RECIST, RANO, and RECIST + F criteria. *Neuro Oncol*. 2012 May;14(5):667-73.
22. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):709-22.
23. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, Wefel JS, Blumenthal DT, Vogelbaum MA, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014 Feb 20;370(8):699-708.
24. Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, Haas-Kogan DA, Zhu S, Dia EQ, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med*. 2005 Nov 10;353(19):2012-24.
25. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, Hegi ME, Stupp R. Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 15;14(4):957-60.
26. Bailey OT. Genesis of the Percival Bailey-Cushing classification of gliomas. *Pediatr Neurosci*. 1985;12(4-5):261-5.
27. Zulch KJ. Principles of the new World Health Organization (WHO) classification of brain tumors. *Neuroradiology*. 1980;19(2):59-66.
28. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*. 1993 Jul;3(3):255-68.
29. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007 Aug;114(2):97-109.
30. Daumas-Duport C, Szikla G. [Definition of limits and 3D configuration of cerebral gliomas. Histological data, therapeutic incidences (author's transl)]. *Neurochirurgie*. 1981;27(5):273-84.
31. Mittler MA, Walters BC, Stopa EG. Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg*. 1996 Dec;85(6):1091-4.
32. Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C. [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol*. 2000 Oct;20(5):413-28.
33. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010 Jan;37(1):13-25.
34. Dedrick RL, Flessner MF. Pharmacokinetic considerations on monoclonal antibodies. *Prog Clin Biol Res*. 1989;288:429-38.
35. Jain RK. Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Apr 19;81(8):570-6.
36. Rosenberg GA, Kyner WT, Estrada E. Bulk flow of brain interstitial fluid under normal and hyperosmolar conditions. *Am J Physiol*. 1980 Jan;238(1):F42-9.
37. Bobo RH, Laske DW, Akbasak A, Morrison PF, Dedrick RL, Oldfield EH. Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 15;91(6):2076-80.
38. Chen MY, Lonser RR, Morrison PF, Governale LS, Oldfield EH. Variables affecting convection-enhanced delivery to the striatum: a systematic examination of rate of infusion, cannula size, infusate concentration, and tissue-cannula sealing time. *J Neurosurg*. 1999 Feb;90(2):315-20.

39. Morrison PF, Chen MY, Chadwick RS, Lonser RR, Oldfield EH. Focal delivery during direct infusion to brain: role of flow rate, catheter diameter, and tissue mechanics. *Am J Physiol.* 1999 Oct;277(4 Pt 2):R1218-29.
40. Morrison PF, Laske DW, Bobo H, Oldfield EH, Dedrick RL. High-flow microinfusion: tissue penetration and pharmacodynamics. *Am J Physiol.* 1994 Jan;266(1 Pt 2):R292-305.
41. Guarnieri M, Carson BS, Khan A, Penno M, Jallo GI. Flexible versus rigid catheters for chronic administration of exogenous agents into central nervous system tissues. *J Neurosci Methods.* 2005 Jun 15;144(2):147-52.
42. Raghavan R, Brady ML, Rodriguez-Ponce MI, Hartlep A, Pedain C, Sampson JH. Convection-enhanced delivery of therapeutics for brain disease, and its optimization. *Neurosurg Focus.* 2006;20(4):E12.
43. Yin D, Forsayeth J, Bankiewicz KS. Optimized cannula design and placement for convection-enhanced delivery in rat striatum. *J Neurosci Methods.* 2010 Mar 15;187(1):46-51.
44. Krauze MT, Saito R, Noble C, Tamas M, Bringas J, Park JW, et al. Reflux-free cannula for convection-enhanced high-speed delivery of therapeutic agents. *J Neurosurg.* 2005 Nov;103(5):923-9.
45. Sampson JH, Raghavan R, Brady ML, Provenzale JM, Herndon JE, 2nd, Croteau D, et al. Clinical utility of a patient-specific algorithm for simulating intracerebral drug infusions. *Neuro Oncol.* 2007 Jul;9(3):343-53.
46. Mardor Y, Rahav O, Zauberman Y, Lidar Z, Ocherashvilli A, Daniels D, et al. Convection-enhanced drug delivery: increased efficacy and magnetic resonance image monitoring. *Cancer Res.* 2005 Aug 1;65(15):6858-63.
47. Wang CC, Li J, Teo CS, Lee T. The delivery of BCNU to brain tumors. *J Control Release.* 1999 Aug 27;61(1-2):21-41.
48. Nogue G, Bidart M, Arlotto M, Mousseau M, Berger F, Pelletier L. Monitoring monoclonal antibody delivery in oncology: the example of bevacizumab. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e72021.
49. Oliverio VT. Pharmacology of the nitrosoureas: an overview. *Cancer Treat Rep.* 1976 Jun;60(6):703-7.
50. Lopez KA, Waziri AE, Canoll PD, Bruce JN. Convection-enhanced delivery in the treatment of malignant glioma. *Neurol Res.* 2006 Jul;28(5):542-8.
51. Patel SJ, Shapiro WR, Laske DW, Jensen RL, Asher AL, Wessels BW, et al. Safety and feasibility of convection-enhanced delivery of Cotara for the treatment of malignant glioma: initial experience in 51 patients. *Neurosurgery.* 2005 Jun;56(6):1243-52; discussion 52-3.
52. Sampson JH, Brady ML, Petry NA, Croteau D, Friedman AH, Friedman HS, et al. Intracerebral infusate distribution by convection-enhanced delivery in humans with malignant gliomas: descriptive effects of target anatomy and catheter positioning. *Neurosurgery.* 2007 Feb;60(2 Suppl 1):ONS89-98; discussion ONS-9.
53. Snyder JM, Shofer FS, Van Winkle TJ, Massicotte C. Canine intracranial primary neoplasia: 173 cases (1986-2003). *J Vet Intern Med.* 2006 May-Jun;20(3):669-75.
54. Foster ES, Carrillo JM, Patnaik AK. Clinical signs of tumors affecting the rostral cerebrum in 43 dogs. *J Vet Intern Med.* 1988 Apr-Jun;2(2):71-4.
55. Heidner GL, Kornegay JN, Page RL, Dodge RK, Thrall DE. Analysis of survival in a retrospective study of 86 dogs with brain tumors. *J Vet Intern Med.* 1991 Jul-Aug;5(4):219-26.
56. Stoica G, Kim HT, Hall DG, Coates JR. Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. *Vet Pathol.* 2004 Jan;41(1):10-9.
57. Platet N, Liu SY, Atifi ME, Oliver L, Vallette FM, Berger F, et al. Influence of oxygen tension on CD133 phenotype in human glioma cell cultures. *Cancer Lett.* 2007 Dec 18;258(2):286-90.
58. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5821-8.
59. 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.* 2004 Aug;5(8):511-4.

60. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ, et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 2007 May 1;67(9):4010-5.
61. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1883-90; discussion 95-6.
62. Garcion E, Naveilhan P, Berger F, Wion D. Cancer stem cells: beyond Koch's postulates. *Cancer Lett.* 2009 Jun 8;278(1):3-8.
63. Wion D, Christen T, Barbier EL, Coles JA. PO(2) matters in stem cell culture. *Cell Stem Cell.* 2009 Sep 4;5(3):242-3.
64. Zhu Y, Zhao K, Prinz A, Keyvani K, Lambertz N, Kreitschmann-Andermahr I, et al. Loss of endothelial programmed cell death 10 activates glioblastoma cells and promotes tumor growth. *Neuro Oncol.* 2015 Aug 8.
65. Kiprianova I, Remy J, Milosch N, Mohrenz IV, Seifert V, Aigner A, et al. Sorafenib Sensitizes Glioma Cells to the BH3 Mimetic ABT-737 by Targeting MCL1 in a STAT3-Dependent Manner. *Neoplasia.* 2015 Jul;17(7):564-73.
66. Tripathy D, Choudhary A, Banerjee UC, Singh IP, Chatterjee A. Induction of Apoptosis and Reduction of Endogenous Glutathione Level by the Ethyl-Acetate Soluble Fraction of the Methanol Extract of the Roots of *Potentilla fulgens* in Cancer Cells. *PLoS ONE.* 2015;10(8):e0135890.
67. Yang JA, Li JQ, Shao LM, Yang Q, Liu BH, Wu TF, et al. Puerarin inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cell lines. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(6):10132-42.
68. Bennett WM, Norman DJ. Action and toxicity of cyclosporine. *Annu Rev Med.* 1986;37:215-24.
69. Jain RK, Wei J, Gullino PM. Pharmacokinetics of methotrexate in solid tumors. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1979 Apr;7(2):181-94.
70. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res.* 1987 Jun 15;47(12):3039-51.
71. Gressett SM, Shah SR. Intricacies of bevacizumab-induced toxicities and their management. *Ann Pharmacother.* 2009 Mar;43(3):490-501.
72. Ranpura V, Hapani S, Wu S. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *JAMA.* 2011 Feb 2;305(5):487-94.
73. Sampson JH, Archer G, Pedain C, Wembacher-Schroder E, Westphal M, Kunwar S, et al. Poor drug distribution as a possible explanation for the results of the PRECISE trial. *J Neurosurg.* 2010 Aug;113(2):301-9.
74. White E, Woolley M, Bienemann A, Johnson DE, Wyatt M, Murray G, et al. A robust MRI-compatible system to facilitate highly accurate stereotactic administration of therapeutic agents to targets within the brain of a large animal model. *J Neurosci Methods.* 2011 Jan 30;195(1):78-87.
75. Barua NU, Woolley M, Bienemann AS, Johnson DE, Lewis O, Wyatt MJ, et al. Intermittent convection-enhanced delivery to the brain through a novel transcutaneous bone-anchored port. *J Neurosci Methods.* 2013 Apr 15;214(2):223-32.